



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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**“Producción de biohidrógeno a partir de paja de
trigo y podas de jatrofa con extracción *in situ*”**

Tesis que presenta
Hugo Enrique Serrato Nerio

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2017



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Producción de biohidrógeno a partir de paja de trigo y podas de jatrofa con extracción in situ” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Hugo Enrique Serrato Nerio** y aprobada el **día de mes de año** 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. Francisco Javier Cervantes Carrillo
Director de la tesis

Dr. Elías Razo Flores
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Lorena Amaya Delgado
Miembro del Comité Tutorial

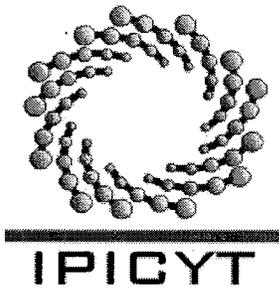


Créditos Institucionales

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. Francisco Javier Cervantes Carrillo.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-590320).

Este trabajo fue apoyado por el Clúster Bioturbosina a través del proyecto 248090 del Fondo de Sustentabilidad Energética, financiado por la Secretaría de Energía y el CONACYT.



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

En la ciudad de San Luis Potosí a los 29 días del mes de enero del año 2018, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Felipe Alatraste Mondragón	Presidente	IPICYT
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo	Secretario	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó el C.

Hugo Enrique Serrato Nerio

sobre la Tesis intitulada:

Producción de biohidrógeno a partir de paja de trigo y podas de jatrofa con extracción in situ

que se desarrolló bajo la dirección de

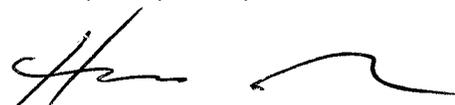
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

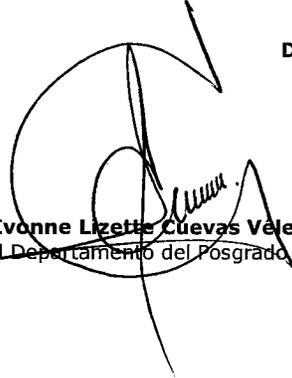
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:20 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 29 días del mes de enero de 2018.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



A Dios, que sin su ayuda no hubiera seguido adelante durante las etapas más difíciles de mi vida.

A mis padres que son un ejemplo para mí y sin cuyo apoyo nunca hubiera logrado terminar esta etapa.

A Andrea, por su amor, cariño y comprensión durante esta etapa de mi vida, esperando que siga conmigo de aquí en adelante.

A Sabi y Lucy por llenar mi vida de alegría y luz.

Agradecimientos

A mi director de tesis, el Dr. Francisco Cervantes por abrirme las puertas de su grupo de investigación, brindarme sus conocimientos y ayuda siempre que lo necesitaba y depositar su confianza en mí en todo momento.

Al Dr. Elías Razo, que a pesar de no poder acompañarme en el trayecto final de esta etapa no me cabe duda que sin sus contribuciones no hubiera podido sacar adelante el trabajo.

A la Dra. Lorena Amaya por sus comentarios y aportaciones durante la realización de la tesis.

Al Dr. Felipe Alatraste que a pesar de tener que entrar en la parte final de me dio grandes contribuciones para la tesis.

A todos los doctores que me dieron clases durante la maestría, ya que de todos aprendí y lo que me enseñaron me servirá para el resto de mi vida.

A los técnicos M. en C. Guillermo Vidriales, M. en C. Juan Pablo Rodas, Dulce Partida, Alejandra Colunga, Mario Cardozo por su ayuda y atenciones, así como a las I.Q. María del Carmen Rocha e I.Q. María Guadalupe Ortega por su amabilidad y disponibilidad al momento de usar los equipos del LANBAMA.

A Miguel e Iván, que me ayudaron en todo momento y me enseñaron mucho durante mi estancia en la maestría.

A todos mis compañeros de generación, a Andrea por darme todo su amor y aguantar conmigo los momentos más difíciles. A Ricardo y Javier por sus consejos y sabiduría. A Augusto y Karen por los buenos momentos vividos en el cubículo. A Betsa y Ale por toda la alegría y risas que compartieron conmigo. A Angelito y Lupita

por ayudarme a entender mejor la parte ecológica de la maestría. A Toño y Pancho por enseñarme a divertirme sanamente. A Moni por ayudarme cuando la necesitaba. A Bety por proveer de alimento a la generación durante todo un semestre.

Al grupo de investigación al que pertenezco (Cervantes' Team) por hacer más amenos los seminarios.

A mi familia, mis padres Pablo y Rosario que son un ejemplo de vida para mí, a mis hermanos Carlo, Laura y Juan con los que he compartido mis logros toda la vida, a mis cuñados Ricardo y Ana que ya son parte de mi familia, a Lucy y Sabi, que aunque tienen poco tiempo en este mundo me han hecho inmensamente feliz y a Rony que es una parte vital de la familia

A toda la gente que formó parte de mi vida en este proceso ya que sin sus contribuciones no hubiera llegado hasta donde estoy.

Contenido

Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	vi
Contenido	viii
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
1. Introducción	1
1.1 Biocombustibles	2
1.1.1 Biohidrógeno	3
1.2 Biomasa	6
1.2.1 Composición	6
1.2.2 Residuos lignocelulósicos de interés	9
1.2.2.1 Paja de trigo	10
1.2.2.2 Podas de jatrofa	11
1.3 Pretratamiento	12
1.4 Producción de biohidrógeno	15
1.4.1 Hidrólisis enzimática	16
1.4.2 Fermentación Oscura	17
1.4.3 Factores de importancia en la producción de biohidrógeno	21
1.4.3.1 Inóculo	21
1.4.3.2 pH y temperatura	22
1.4.3.3 Formación de inhibidores	23
1.4.3.4 Presión parcial de hidrógeno	23
1.4.3.5 Tipo de reactor	25
	viii

2.	Justificación, hipótesis y objetivos	26
2.1	Justificación	26
2.2	Hipótesis	27
2.3	Objetivos	27
2.3.1	Objetivo General	27
2.3.2	Objetivos Específicos	27
3.	Materiales y Metodología	28
3.1	Materia prima	28
3.2	Caracterización de fibras	28
3.3	Pretratamiento ácido diluido	28
3.4	Hidrólisis enzimática	29
3.5	Producción de biohidrógeno	30
3.5.1	Inóculo y medio	30
3.5.2	Producción en botellas	31
3.5.3	Producción en reactor	32
3.6	Métodos Analíticos	32
4.	Resultados y Discusión	34
4.1	Caracterización de Residuos	34
4.2	Producción de azúcares	36
4.3	Inhibidores	38
4.4	Producción de biohidrógeno	41
4.4.1	Producción biohidrógeno en botellas	42
4.4.2	Producción de biohidrógeno en un CSTR	44
5.	Conclusiones y Perspectivas	48
6.	Referencias	50

Lista de tablas

Tabla 1. Composición en peso seco (%) de la paja de trigo	10
Tabla 2. Composición en peso seco (%) de jatrofa y biomasa similar	12
Tabla 3. Efecto de los distintos tipos de pretratamiento en la composición y estructura de los residuos lignocelulósicos Modificado de (Hendriks & Zeeman, 2009)	13
Tabla 4. Experimentos de hidrólisis realizados de los residuos pretratados	29
Tabla 5. Composición de los residuos lignocelulósicos	34
Tabla 6. Comparación de la composición lignocelulósica con la literatura	35
Tabla 7. Producción de azúcares (g/L) a partir de los residuos lignocelulósicos después de 12 horas de tratamiento.	36
Tabla 8. Valores de p para las relaciones entre residuos en experimentos de sacarificación	37
Tabla 9. Caracterización del hidrolizado ácido (g/L)	41
Tabla 10. Parámetros cinéticos de la producción de biohidrógeno	45
Tabla 11. Comparación de los resultados obtenidos en el CSTR con la literatura	46
Tabla 12. Producción de AGV's (mg/L) durante el proceso de fermentación oscura después de 48 horas.	47

Lista de figuras

Figura 1. Métodos de producción de hidrógeno a partir de distintos tipos de materiales (Modificado de Nikolaidis & Poullikkas, 2017).	5
Figura 2. Arreglo espacial de la celulosa, hemicelulosa y lignina dentro de la biomasa lignocelulósica (Modificado de Brandt et al., 2013).	7
Figura 3. Estructura de los componentes de la biomasa lignocelulósica.	9
Figura 4. Proceso general de la digestión anaerobia. (Modificado de Zheng et al., 2014)	¡Error! Marcador no definido. 6
Figura 5. Producción de biohidrógeno por medio de la enzima piruvato ferredoxinoxidorreductasa.	20
Figura 6. Producción de biohidrógeno por medio de la enzima piruvato formiato liasa.	20
Figura 7. Producción de inhibidores por residuo lignocelulósico el proceso de sacarificación con pretratamiento e hidrólisis enzimática.	40
Figura 8. Producción acumulada de biohidrógeno a partir de residuos lignocelulósicos.	43
Figura 9. Producción de hidrógeno a partir de los residuos lignocelulósicos.	45

Resumen

“Producción de biohidrógeno a partir de paja de trigo y podas de jatrofa con extracción *in situ*”

Palabras clave: Fermentación oscura, residuos lignocelulósicos, aplicación de vacío, hidrógeno.

El uso intensivo de los combustibles fósiles genera la necesidad de explorar nuevas fuentes de energía. Una de las más importantes es el hidrógeno, el cual puede ser producido de forma biológica, a partir de residuos lignocelulósicos, por medio de la fermentación oscura; sin embargo, existen factores que afectan su producción, uno de los más destacados es la presión parcial de hidrógeno. En este trabajo se evaluó la producción biológica de hidrógeno mediante fermentación oscura a partir de 2 residuos, la paja de trigo y las podas de jatrofa (*Jatropha curcas*) aplicando vacío como un mecanismo para disminuir la presión parcial de hidrógeno. Se evaluó el uso de un pretratamiento con ácido diluido (HCl 2%) y una hidrólisis enzimática con un coctel enzimático comercial (Celluclast 1.5 L), como métodos de liberación de azúcares, tanto por separado como en forma secuencial. La producción de biohidrógeno se realizó en 2 fases, primero a pequeña escala con botellas serológicas (120 mL) y posteriormente en un reactor continuamente agitado (2L). La aplicación del vacío se realizó únicamente en el reactor. Los resultados arrojaron que la concentración de azúcares reductores al usar hidrólisis enzimática más pretratamiento (31.52 g AR/L para jatrofa y 43.25 g AR/L para paja) no mejora en gran medida lo obtenido sólo con pretratamiento (29.3 g AR/L para jatrofa y 36 g AR/L para paja). En cuanto a la producción de biohidrógeno, el uso del vacío mejoró de forma considerable la velocidad específica de producción siendo que se aumentó al triple para los hidrolizados de jatrofa (2.589 a 7.282 mL H₂/g SSV h) y casi el cuádruple para los obtenidos con paja de trigo (1.733 a 7.011 mL H₂/g SSV h). En conclusión, este trabajo demostró la viabilidad de la aplicación de vacío como método para disminuir la presión parcial de hidrógeno y aumentar la producción de biohidrógeno.

Abstract

"Bio-hydrogen production from wheat straw and Jatropha pruning with in situ extraction"

Key words: Dark fermentation, lignocellulosic residues, vacuum application, hydrogen.

The intensive use of fossil fuels generates the need to explore new sources of energy. One of the most important is hydrogen, which can be produced biologically from lignocellulosic wastes by means of dark fermentation; however, there are factors that affect its production. One of the most important is the hydrogen partial pressure. In this work, it was evaluated the biological production of hydrogen by dark fermentation from 2 residues, wheat straw and Jatropha pruning (*Jatropha curcas*), applying vacuum as a strategy for decreasing the partial pressure of hydrogen. The use of a diluted acid pretreatment (HCl 2%) and an enzymatic hydrolysis with commercial enzymes (Celluclast 1.5 L) as sugar release methods, both separately and sequentially, were evaluated. Hydrogen production was carried out in 2 phases, first on a small scale with serological bottles (120 mL) and then in a continuously stirred reactor (2L), in which the vacuum was applied. The results showed that the concentration of reducing sugars when using enzymatic hydrolysis plus pretreatment (31.52 g AR / L for Jatropha and 43.25 g AR / L for wheat straw) does not greatly improve with respect to what was obtained only with pretreatment (29.3 g AR / L for Jatropha and 36 g AR / L for wheat straw); In terms of hydrogen production, the use of vacuum significantly improved the specific production rate, being increased threefold for Jatropha (2,589 to 7,282 mL H₂ / g SSV h) and almost four times for wheat straw (1,733 to 7,011 mL H₂ / g SSV h). In conclusion, this work demonstrated the feasibility of vacuum as a method to decrease the partial pressure of hydrogen and increase hydrogen yields.

1. Introducción

En la actualidad existe una gran dependencia energética de los combustibles fósiles, en 2015 cerca del 82% de la energía mundial se produjo a partir de éstos (IEA, 2017) mientras que en México fue del 90% (SENER, 2016). Derivados de la explotación de los recursos, surgen 2 problemas principales, uno ambiental que es provocado por el aumento de la concentración de gases de efecto invernadero (GEI) y por la emisión de otros contaminantes que dañan aire, tierra y agua (Chmielewski, 2005) y otro económico, debido a la amenaza de una escasez de combustible en el futuro provocada por la falta de diversificación de combustibles (Lee et al., 2004).

Debido a estos motivos es de gran importancia e interés generar alternativas al uso de combustibles fósiles, lo cual ha provocado la exploración de nuevos métodos de producción de energía a partir de fuentes renovables, como energía solar, eólica, geotérmica, hidráulica y biomasa. Estas fuentes de energía alternas son amigables con el medio ambiente, ya que reducen de forma considerable la producción de GEI y otros contaminantes que generan los combustibles fósiles, además de que al usarlos se diversifica el mercado de los combustibles (Naik et al., 2010). Dentro de estas fuentes limpias de energía destaca la biomasa debido a su gran abundancia y al hecho de que puede aprovechar residuos de otros procesos.

Existe una gran variedad de biomasa que puede ser utilizada como fuente de energía. Sin embargo es preferible utilizar biomasa no comestible, como residuos lignocelulósicos derivados de jatrofa e higuera, o desechos agrícolas como el bagazo de agave o la paja de trigo.

Dependiendo del tipo de biomasa, ésta puede ser utilizada para producir una gran variedad de biocombustibles, siendo los principales el bioetanol, biodiesel, biogás, syngas y biohidrógeno; este último es de gran interés debido a que a diferencia de los demás, no genera ningún producto dañino para el ambiente, siendo que su único

producto de combustión es agua, esto aunado a que genera una gran cantidad de energía (142 kJ/g), lo hace una alternativa muy atractiva a los combustibles fósiles.

Uno de los principales métodos de producción de biohidrógeno es la fermentación oscura, proceso por el cual los azúcares contenidos en la biomasa se transforman en hidrógeno por la actividad de bacterias hidrogenogénicas; este método es de importancia debido a que es el método que comprende la tecnología más sencilla, así como los más altos rendimientos (Ntaikou et al., 2010). Sin embargo, la principal desventaja de este método es el efecto negativo de la presión parcial de hidrógeno (P_{H_2}) en el rendimiento; para evitar la caída de la producción de H_2 se pueden utilizar distintas estrategias. En este trabajo se emplea una configuración de reactor asistida por vacío, como método de extracción *in situ*, para lograr disminuir el efecto de la P_{H_2} .

1.1 Biocombustibles

De acuerdo con la FAO, los biocombustibles son producidos directa o indirectamente a partir de biomasa, en forma de bioetanol, biodiesel, biogás (metano) o biohidrógeno. La biomasa es un material de origen biológico, excluyendo material embebido en material geológico y transformado a fósil.

Los biocombustibles se agrupan en “generaciones” de acuerdo a la biomasa de la cual se originan (Saladini et al., 2016) de los cuales hay 4 generaciones:

- Primera generación: Proviene de biomasa comestible, su principal desventaja es que al servir para alimentación se generan problemas sociales y económicos al momento de ser utilizados como biocombustibles.
- Segunda generación: Se obtienen de biomasa no comestible o de desechos agrícolas, evitan el problema de los cultivos de primera generación. Sin embargo al necesitar de parcelas para su siembra se genera el mismo debate

ya que se quita espacio para cultivos comestibles; una forma de solucionar esto es utilizar sólo desechos agrícolas o utilizar cultivos que puedan crecer en condiciones extremas donde no se puedan desarrollar cultivos comestibles.

- Tercera generación: Se obtienen de micro y macro algas, generan un mayor rendimiento, además de poder ser cultivables en espacios reducidos, sin embargo, sus altos costos los hacen aún prohibitivos.
- Cuarta generación: Proviene de cultivos que sirven para atrapar dióxido de carbono, también pueden ser creados a partir de bacterias modificadas para que consuman exclusivamente dióxido de carbono. Aún no hay producción, se encuentran en fase de desarrollo.

Los biocombustibles de segunda generación son preferidos a los otros debido a que no compiten con la generación de alimento como la primera generación, no son tan costosos como los de tercera generación y ya se está desarrollando una plataforma tecnológica para su producción, a diferencia de los de la cuarta generación.

Una ventaja de producir biocombustibles de segunda generación es el aprovechamiento de desechos, ya que al utilizarlos se pueden mitigar otros problemas como es la acumulación o la disposición de dichos desechos.

1.1.1 Biohidrógeno

Uno de los biocombustibles más prometedores es el hidrógeno, es el combustible conocido con la mayor cantidad de energía por unidad de peso (142 kJ/g). Puede ser transportado para consumo doméstico o industrial fácilmente ya que es más seguro que el gas natural, y es amigable con el ambiente, ya que su único producto de combustión es agua (Das & Veziroglu, 2008). Tiene la particularidad de que

puede ser usado directamente como combustible en un motor de combustión interna o puede servir como parte de una celda de combustible.

Además de sus usos como combustible, el hidrógeno es utilizado en procesos industriales para otros fines, como el hidroprocesamiento e hidrocraqueo de hidrocarburos durante el procesamiento del petróleo, en la industria petroquímica se utiliza en la producción de metanol así como en la producción de fertilizantes. También es usado para la producción de plásticos y metales (Ramachandran, 1998).

Además, puede ser utilizado como precursor de otros combustibles como es el caso del biocombustible para aviones (bioturbosina), para el cual se utiliza hidrógeno durante el proceso conocido como hidrogenación, el cual consiste en usar hidrógeno para remover oxígeno y saturar los dobles enlaces C=C para producir n-alcenos parafínicos (Jansen, 2013; Lambert, 2012) que son necesarios para tener las características necesarias para certificar la bioturbosina.

A pesar de ser el elemento más abundante en el universo, el hidrógeno no se encuentra disponible de forma natural para ser usado. Es necesario el procesamiento de distintas fuentes para su obtención. Dependiendo de dichas fuentes, podemos dividir los métodos en convencionales y de tecnologías renovables (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). Los primeros involucran el uso de combustibles fósiles en procesos como el reformado de hidrocarburos y la pirólisis, mientras que los segundos utilizan biomasa o agua en procesos termoquímicos y biológicos (Figura 1). De estos métodos, cerca del 96% de la producción mundial de hidrógeno es a partir de combustibles fósiles, siendo el gas natural el más utilizado para su producción (Dufour et al., 2009)

La producción biológica de hidrógeno es de gran interés ya que el impacto ambiental negativo se reduce, además de que se necesita menos energía durante el proceso de producción gracias a que las temperaturas usadas durante los procesos

biológicos son menores que las usadas con procesos convencionales (Bundhoo & Mohee, 2016).

Dentro de los distintos tipos de producción biológica de hidrógeno, la fermentación oscura es de gran interés ya que se obtienen buenos rendimientos, es un proceso simple y se utilizan desechos de poco valor como materia prima. El proceso consiste a grandes rasgos en la transformación de los azúcares (presentes en la biomasa) a hidrógeno a través de una serie de reacciones que ocurren dentro de microorganismos en condiciones anóxicas (ausencia de O₂).

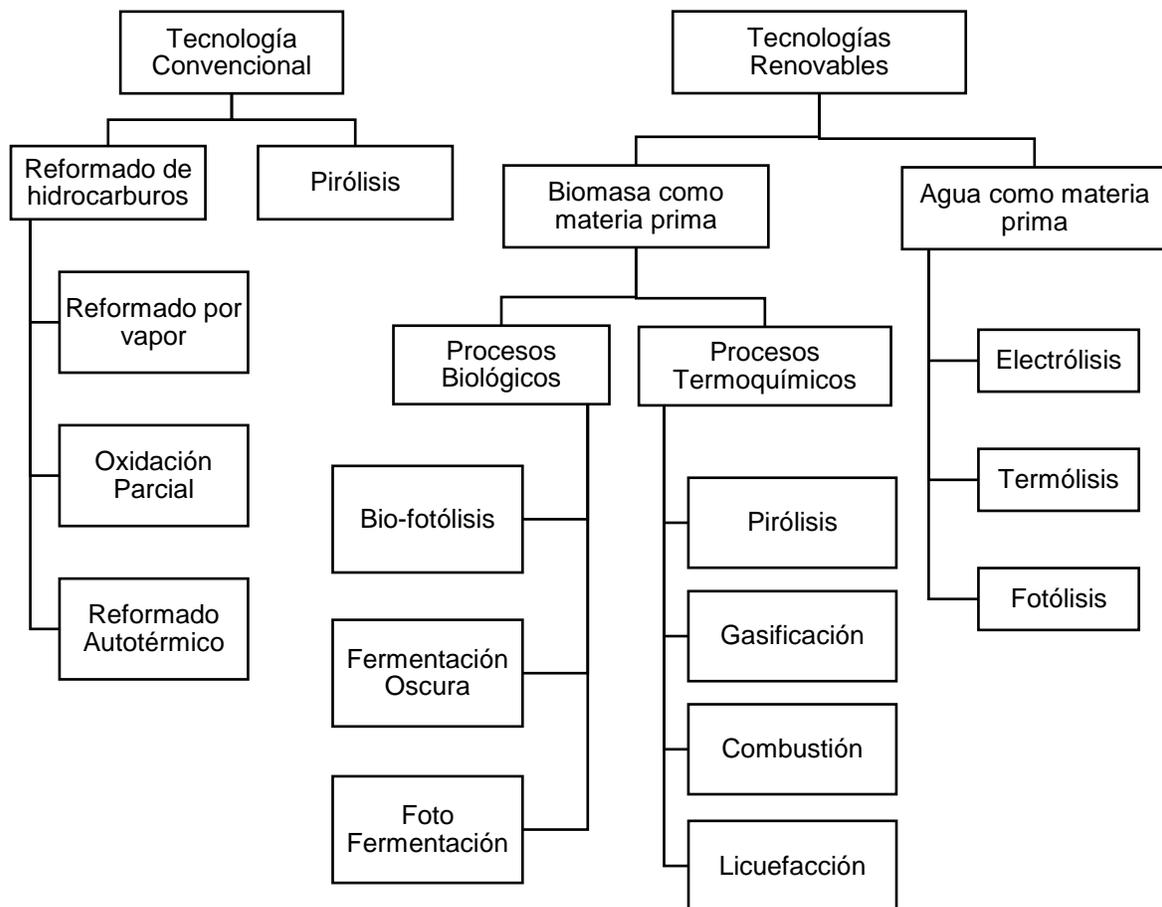


Figura 1. Métodos de producción de hidrógeno a partir de distintos tipos de materiales (Modificado de Nikolaidis & Poullikkas, 2017).

1.2 Biomasa

De acuerdo a la Real Academia Española (RAE) la biomasa es considerada toda la materia que se genera por medio de un proceso biológico, ya sea espontáneo o provocado, que puede ser utilizada como una fuente de energía. Teniendo en cuenta esta definición, podemos definir 3 tipos principales de biomasa (Tumuluru et al., 2014):

- Biomasa natural: Se genera sin intervención humana como la caída natural de ramas y troncos
- Biomasa residual: Comprende los residuos generados de distintos sectores como la agricultura, la silvicultura, industria alimentaria, industria maderera, etc.
- Biomasa de cultivos energéticos: Proviene de cultivos sembrados específicamente para ser usados en la producción de energía.

La biomasa también se puede clasificar de acuerdo a su composición en lignocelulósica y no lignocelulósica, la primera comprende sobre todo residuos leñosos y madereros, mientras que la segunda incluye aceites vegetales y animales y algunos microorganismos (Li & Jiang, 2017). Ambas sirven como fuente de energía para la producción de biocombustibles; sin embargo, la biomasa lignocelulósica es el material más abundante y renovable con el cual pueden producirse biocombustibles (Cai et al., 2017). Además, dentro de la biomasa lignocelulósica son preferibles los residuos ya que son económicamente factibles y muy abundantes (Panagiotopoulos et al., 2013).

1.2.1 Composición

La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de carbohidratos poliméricos (celulosa y hemicelulosa) y de lignina, que es un polímero aromático (Figura 2). También se pueden encontrar en menor cantidad pectinas, compuestos

inorgánicos, proteínas y lípidos; la cantidad exacta de estos compuestos varía dependiendo de la especie y condiciones de crecimiento (Brandt et al., 2013).

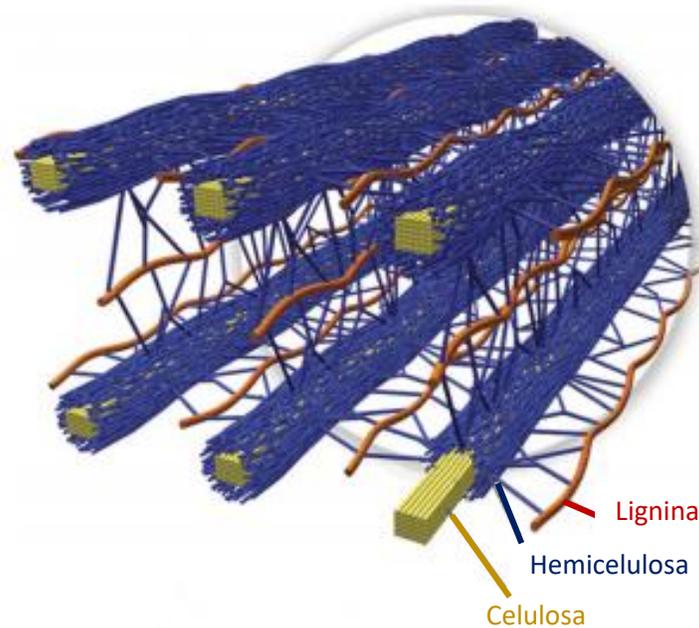


Figura 2. Arreglo espacial de la celulosa, hemicelulosa y lignina dentro de la biomasa lignocelulósica (Modificado de Brandt et al., 2013).

La celulosa es el componente estructural principal de la biomasa lignocelulósica, se encuentra organizada en forma de fibras, consiste únicamente en unidades de glucosa unidas por enlaces 1-4- β glucosídicos con puentes de hidrógeno uniendo estas cadenas en forma de hojas planas (Figura 3), comprende del 35 al 50% de la biomasa (Brandt et al., 2013; Kumar et al., 2009); se pueden formar monómeros de glucosa fermentables rompiendo los enlaces glucosídicos. La celulosa está presente tanto en forma amorfa como en forma cristalina, esta última le da resistencia a la despolimerización y promueve que sea insoluble en agua (Singh et al., 2014).

La hemicelulosa está constituida por un grupo de polisacáridos que comprenden cerca del 25% del total de la biomasa. La principal diferencia con la celulosa es que tiene ramificaciones con cadenas laterales cortas que consisten en pentosas y hexosas (glucosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa); las cuales están unidas a la parte medular por medio de enlaces 1-4- β glucosídicos y 1-3- β glucosídicos (Figura 3). A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa es un polímero fácilmente hidrolizable debido a que no tiene forma cristalina.

Por último, tenemos a la lignina, que es un compuesto aromático, insoluble en agua y que provee un refuerzo estructural, así como resiliencia a ataques físicos y biológicos. Se sintetiza a partir de 3 monómeros, coniferil, sinapil y p-coumaril (todos alcoholes) los cuales una vez incorporados al polímero de lignina pasan a llamarse guaiacil, siringil y p-hidroxifenil (Bajpai, 2016). Tiene una amplia variedad de enlaces; los más comunes son los enlaces β -O-4 éter, pero también están presentes enlaces C-O y C-C (Figura 3). La lignina no sólo previene el acceso a las hidrolasas para que hidrolicen los polisacáridos, sino que también propicia una unión no productiva (enzima-sustrato) aún después del pretratamiento. Por otra parte, la lignina también es la fuente de compuestos inhibitorios para la fermentación, tales como el siringaldehído y el ácido vanílico.

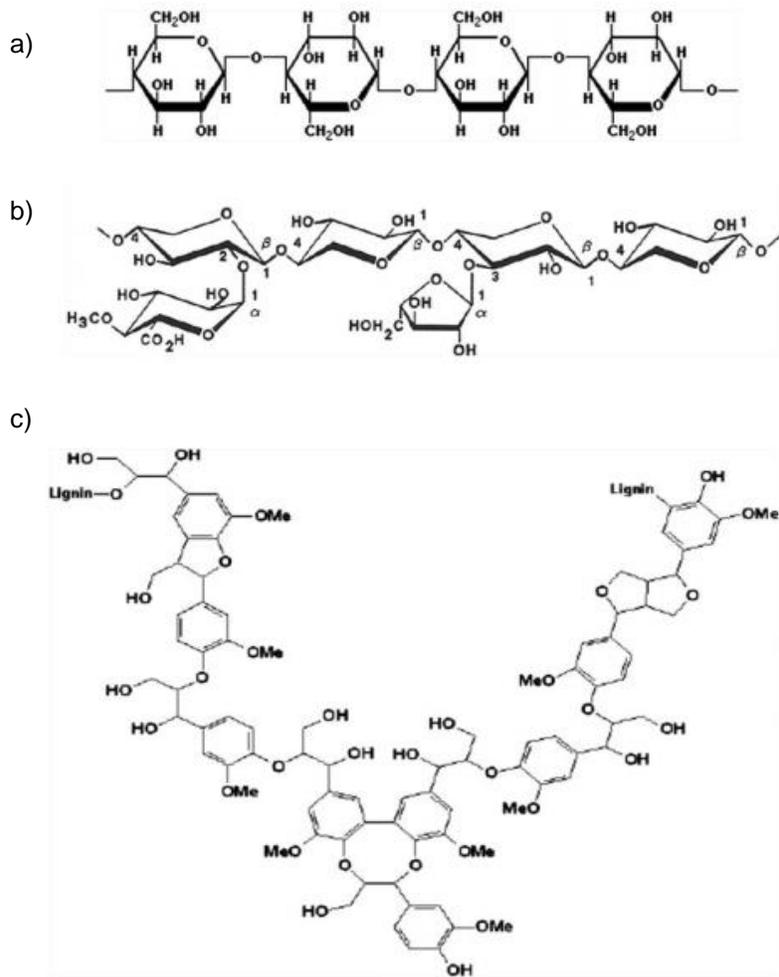


Figura 3. Estructura de los componentes de la biomasa lignocelulósica. a) Celulosa, b) Hemicelulosa, c) Lignina, (Modificado de Bajpai, 2016).

1.2.2 Residuos lignocelulósicos de interés

La biomasa de más fácil acceso y de menor costo la constituyen los residuos lignocelulósicos, éstos son desechos producidos a partir de procesos industriales o agrícolas que virtualmente no tienen valor comercial alguno. Existe una gran variedad de estos residuos ya que provienen de una gran cantidad de procesos. Tenemos residuos agrícolas, como las pajas de trigo o de avena y residuos industriales como el bagazo de agave, entre otros.

Otro tipo de residuos son los que se obtienen de cultivos energéticos que son sembrados específicamente para ser aprovechados para la producción de biocombustibles, en algunos casos sólo se utilizan los frutos de las plantas por tanto las podas quedan como un residuo lignocelulósico con un potencial para su aprovechamiento.

En este trabajo se plantea el uso de 2 tipos de residuos lignocelulósicos, la paja de trigo que se obtiene como subproducto después de la cosecha del grano y las podas de jatrofa (*J. curcas*) la cual es una planta que se siembra para usar su fruto en producción de biocombustibles como el biodiesel.

1.2.2.1 Paja de trigo

El trigo es el segundo grano de mayor producción a nivel mundial superado sólo por el maíz; es cultivado en una gran cantidad de países y en México se cultiva principalmente en Sonora, Guanajuato, Baja California, Zacatecas, Tlaxcala, Chihuahua y Michoacán, siendo el estado de Sonora donde se produce cerca del 50% del trigo a nivel nacional. La composición de la paja de trigo es variable y depende de distintos factores, tales como la especie de trigo que se cultivó, las condiciones de cultivo y el tiempo de crecimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Composición en peso seco (%) de la paja de trigo

Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Fuente
33.7 - 40	21 - 26	11 – 22.9	(Saleem et al., 2012)
37 - 41	27 - 32	13 - 15	(Saini et al., 2015)
48.57	27.7	8.17	(Saha et al., 2005)
38	29	15	(Singh et al., 2014)
30	50	15	(Harmsen et al., 2010)

En 2011 la producción de paja de trigo se estimó en 4 407 436 toneladas, que es un 11% del total de rastrojos producidos en ese año a nivel nacional (SAGARPA et al., 2013). Esto representa una gran cantidad de residuo, el cual no se aprovecha, ya que, si bien puede ser dado como alimento al ganado, debe ser mezclado con

otros nutrientes y los ganaderos prefieren usar otro tipo de alimentos. Aunado a esto, está el hecho de que en Baja California se suele quemar la paja sobrante lo cual genera contaminación (García et al., 2013); por lo tanto, es un residuo ideal para ser utilizado en la producción de biocombustibles.

Existen reportes del uso del trigo como materia prima para la producción de hidrógeno ya sea con o sin pretratamiento (Guo et al., 2010), así como para la producción de biogás, bioetanol y biohidrógeno (Kaparaju et al., 2009). Las condiciones a las que se utiliza la paja son variadas ya que en algunos artículos se reportan mesofílicas, termofílicas e incluso condiciones termofílicas extremas (Kongjan et al., 2010); por tanto podemos decir que aunque sí hay reportes de su uso para producción de hidrógeno, no son tan comunes.

1.2.2.2 Podas de jatrofa

La jatrofa (*J. curcas*) es una planta originaria de México y Centro América pero se ha adaptado a crecer en una gran variedad de países tropicales. Es un arbusto que crece cerca de más de 2 metros de altura puede crecer en condiciones semiáridas, resiste un amplio intervalo de temperaturas (18 a 34 °C) y es una planta no comestible (SAGARPA & SENASICA, 2012). Una planta adulta saludable puede dar cerca de 4 a 6 kg de residuos en podas, por lo cual, si se tiene una gran cantidad de plantas cultivadas, se pueden obtener una gran cantidad de residuos (Kumar et al., 2014).

Su composición no es tan variable como la paja de trigo, ya que en este caso se habla de una especie específica (*J. curcas*), sin embargo varía dependiendo de la parte de la planta que se utilice para producción de biocombustibles, ya que hay reportes del uso de semillas, cáscaras, vainas, tallos y podas (Kumar et al., 2009) (Tabla 2).

En México, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en colaboración con Aeropuertos y Servicios Auxiliares (ASA) estableció un total de 2 millones de hectáreas para la producción de *J. curcas*, siendo Sinaloa el estado con una mayor extensión, teniendo cerca de medio millón de hectáreas para su cultivo.

Tabla 2. Composición en peso seco (%) de jatrofa y biomasa similar

Biomasa	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Fuente
Podas de jatrofa	30.5	13.2	26.1	(Kumar et al., 2014)
Cáscara de semilla de jatrofa	32.7	11.1	45.6	(Makkar et al., 1998)
Tronco de jatrofa	42.99	19.11	24.11	(Vaithanomsat & Apiwatanapiwat, 2009)
Cáscara del fruto de jatrofa	30.38	8.5	20.43	(Adinurani et al., 2015)

Por otra parte, los aceites extraídos de sus semillas son usados como materia prima para la producción de biodiésel. Existen algunos reportes sobre el uso de los residuos de semilla sin aceite para la recuperación de azúcares fermentables (Kumar et al., 2013); además, de otros artículos que indican que las cáscaras y recubrimientos de los frutos de la jatrofa pueden ser usados en la producción de etanol (García et al., 2014, 2015). El único reporte del que se tiene conocimiento de uso de las podas de jatrofa se refiere a la producción de azúcares fermentables (Kumar et al., 2014). No se encontró ningún reporte relacionado con la producción de hidrógeno.

1.3 Pretratamiento

Debido a la composición que tienen los residuos lignocelulósicos se necesita darles un pretratamiento para su uso en la producción de biohidrógeno. El objetivo del pretratamiento es alterar las propiedades, como la cristalinidad de la celulosa, el área superficial disponible de holocelulosa (hemicelulosa + celulosa), el grado de

polimerización de la holocelulosa y el grado de acetilación de la hemicelulosa, así como también eliminar la presencia de lignina (Zheng et al., 2014).

Existen una gran variedad de pretratamientos que se pueden clasificar en 4 categorías principales:

- Físicos: Se refiere a tratamientos que no involucran sustancias químicas
- Químicos: Usan sustancias químicas, pueden ser ácidas, alcalinas u oxidantes.
- Biológicos: Incluyen el uso de microorganismos y enzimas específicas.
- Combinados: Usualmente son combinaciones de tratamientos físicos y químicos

El grado de pretratamiento que se logre con cada uno de los distintos métodos que existen depende de una gran variedad de factores como lo son la composición de holocelulosa y lignina que tenga el residuo, el grado de cristalinidad o la humedad del residuo. Además cada pretratamiento tiene distintos efectos sobre los factores mencionados anteriormente (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de los distintos tipos de pretratamiento en la composición y estructura de los residuos lignocelulósicos Modificado de (Hendriks & Zeeman, 2009)

Pretratamiento	Aumento de área superficial	Solubilización de hemicelulosa	Solubilización de lignina	Alteración de la estructura de la lignina	Formación de furfural
Molienda	●	NE	NE	NE	NE
Explosión por vapor	●	●	○	●	●
Ácido	●	●	○	●	●
Alcalino	●	○	●	●	○
Térmico/ácido	●	●	NE	NE	●
Térmico/alcalino	●	NE	●	●	○
Biológico	●	●	●	●	NE

● = Efecto importante, ○ = Efecto menor, NE= No hay efecto

Los pretratamientos mecánicos se basan principalmente en la fragmentación de la biomasa para poder acceder a los azúcares de forma más sencilla. Generalmente se trata de un proceso de molienda donde el área superficial aumenta y se suele utilizar en conjunto con otros pretratamientos, ya que no ayuda a la solubilización de los compuestos ni a la eliminación de lignina. Otros tipos de pretratamiento mecánico son la pirólisis y la explosión de vapor; sin embargo, éstos requieren grandes cantidades de energía para alcanzar las temperaturas de operación (300°C) lo cual incrementa los costos y hacen prohibitivo su uso (Kumar et al., 2009).

El uso de sustancias químicas, ya sean ácidos o bases, como pretratamiento ha sido estudiado ampliamente. Los ácidos tienen la ventaja de que, además de ser un pretratamiento, puede ser usado también para hidrolizar la biomasa y liberar los azúcares monoméricos contenidos en la hemicelulosa (Nissilä et al., 2014); sin embargo, también ocasiona la formación de inhibidores de la fermentación (Harmsen et al., 2010). Por lo tanto, debe de medirse la concentración de éstos y tratar de ajustar parámetros para que las concentraciones de inhibidores sean lo más bajas posibles. Para esto es importante el uso de ácido diluido ya que disminuye la cantidad de inhibidores que se producen con el ácido concentrado. Las sustancias alcalinas también ayudan a la liberación de azúcares tanto de la celulosa como de la hemicelulosa; sin embargo, al igual de los ácidos, producen compuestos inhibitorios.

Los pretratamientos biológicos son más baratos que los mecánicos y son más seguros que los químicos (no usan sustancias corrosivas), además de que se tiene una mayor liberación de azúcares por lo cual su uso es recomendable; sin embargo, requieren de tiempos mucho más largos de reacción, además de que hay una competencia por los carbohidratos ya que los microorganismos utilizados los necesitan para realizar el pretratamiento, por tanto su uso no es muy común (Zheng et al., 2014)

En cuanto a la producción de hidrógeno, el pretratamiento ácido da mejores resultados que el alcalino ya que se genera un mayor rendimiento de hidrógeno (Monlau et al., 2013). Además de que si es utilizado en conjunto con otros pretratamientos como los mecánicos se pueden obtener aún mejores rendimientos.

1.4 Producción de biohidrógeno

El biohidrógeno puede producirse por medio de 3 vías principales, bio-fotólisis, foto fermentación y fermentación oscura; esta última es de especial interés debido a los altos rendimientos de producción que se pueden obtener por unidad de biomasa utilizada (Wu et al., 2005).

Una fermentación es un proceso bioquímico llevado a cabo en condiciones anóxicas por medio del cual se consumen azúcares para producir ácidos orgánicos, alcoholes y gases.

La fermentación oscura es un tipo de fermentación mediante el cual se utilizan azúcares, los cuales están presentes en residuos lignocelulósicos para producir. La fermentación oscura es la etapa inicial del proceso conocido como digestión anaerobia. En este proceso el producto final es metano a diferencia de la fermentación donde el producto final deseado es el hidrógeno.

La digestión anaerobia consta de 4 pasos, hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Figura 4). El proceso de fermentación oscura sólo abarca los primeros 2 pasos ya que se realizan ciertos pretratamientos a los inóculos para evitar la metanogénesis que es un proceso que consume hidrógeno.

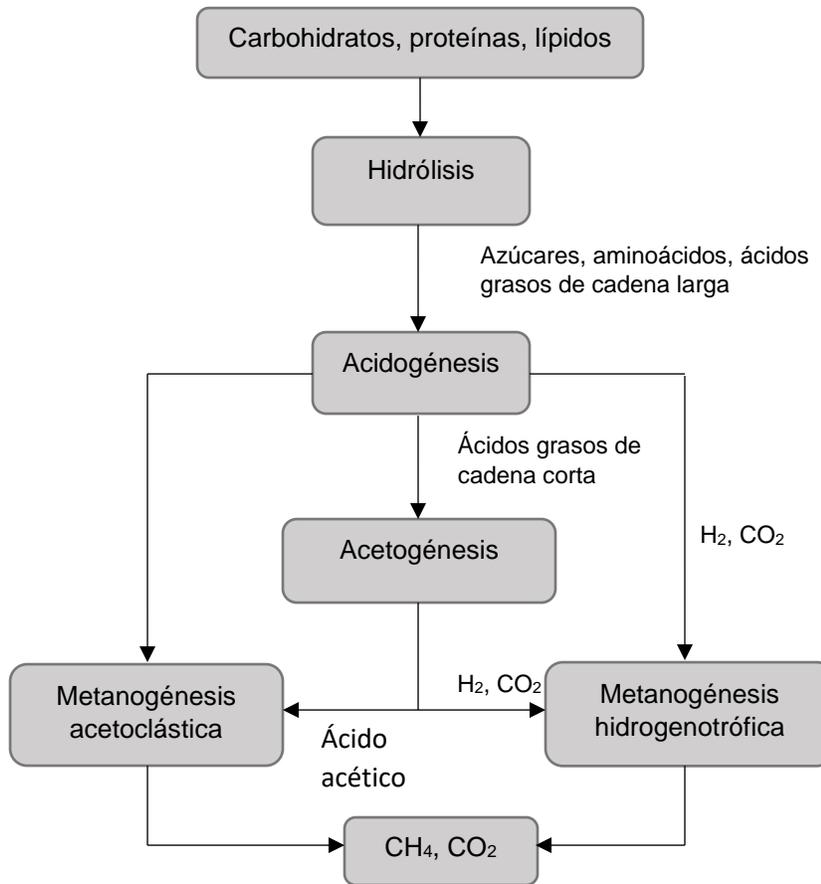


Figura 4. Proceso general de digestión anaerobia. (Modificado de Zheng et al., 2014)

1.4.1 Hidrólisis enzimática

Después de realizar el pretratamiento, la matriz lignocelulósica se rompe y se solubilizan la hemicelulosa y la celulosa queda expuesta para poder hidrolizarla. La hidrólisis de la celulosa es llevada a cabo por enzimas llamadas celulasas que se encargan de romper los enlaces 1-4- β glucosídicos que unen los monómeros de glucosa. Las celulasas comerciales son cocteles que incluyen una variedad de enzimas (endoglucanasas, exoglucanasas, β glucosidasas) que ayudan a degradar de manera más eficiente la celulosa.

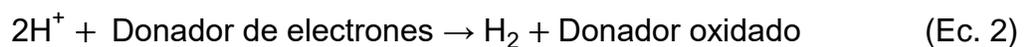
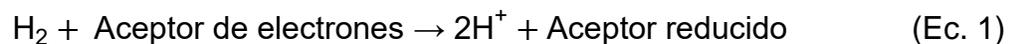
El uso del pretratamiento es importante ya que sin éste los factores como el grado de cristalinidad, el contenido de lignina y el grado de acetilación de la hemicelulosa impedirían la acción de las enzimas sobre la celulosa.

Las enzimas tienen condiciones de pH y temperatura óptimas para funcionar, normalmente el pH se debe ajustar entre 4 y 5, aunque puede ser ligeramente mayor, y la temperatura oscila entre 40 y 50 °C (Maitan-Alfenas et al., 2015).

1.4.2 Fermentación Oscura

Existe un grupo diverso de bacterias capaces de llevar a cabo la conversión fermentativa de los residuos lignocelulósicos a hidrógeno como los anaerobios estrictos (*Clostridia*, metilótrofos, bacterias del rumen), anaerobios facultativos (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia coli*) y hasta algunos aerobios (*Alcaligenes*, *Bacillus*) (Li & Fang, 2007).

Estos microorganismos se caracterizan por tener hidrogenasas, la cual es una enzima que cataliza la oxidación reversible de hidrógeno molecular (H₂) la cual consiste en 2 reacciones (Ec. 1 y 2). En la primer reacción el hidrógeno se oxida para provocar la reducción de especies aceptoras de electrones tales como el oxígeno, nitrato, sulfato, dióxido de carbono y fumarato. La segunda reacción consiste en la reducción de los protones (H⁺) y se relaciona con la oxidación de especies donadoras de electrones como la ferredoxína y sirve para promover la síntesis de biohidrógeno.

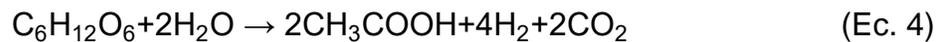


Existen 3 tipos de hidrogenasas, la Ni-Fe hidrogenasa, la Fe-Fe hidrogenasa y la Fe hidrogenasa. Las hidrogenasas Ni-Fe y la Fe-Fe son enzimas completamente

redox catalizando la oxidación del H₂ y la reducción de H⁺, la Ni-Fe cataliza la oxidación de hidrógeno mientras que la Fe-Fe reduce protones, aunque existen excepciones (Hallenbeck, 2009). Por otra parte, la hidrogenasa Fe cataliza la escisión heterolítica reversible del H₂ (Ec. 3).



Teóricamente, el proceso de fermentación oscura puede generar un máximo de 4 moles de hidrógeno por mol de glucosa consumida (Ec. 4); sin embargo, esto depende de los ácidos grasos volátiles (AGV's) que se produzcan como producto final.



El proceso de síntesis de biohidrógeno comienza con la hidrólisis de los residuos lignocelulósicos para formar monómeros de celulosa y hemicelulosa como la glucosa o la xilosa, los cuales a partir de la glicólisis (conocida como vía Embden-Meyer-Parnas o EMP) se transforman en ácido pirúvico.

Posteriormente, el ácido pirúvico sufre una descarboxilación oxidativa por la coenzima CoA, que dependiendo del tipo de microorganismo puede ser metabolizada por 2 enzimas; los anaerobios estrictos utilizan la piruvato ferredoxinoxidorreductasa (pfor), y los anaerobios facultativos la piruvato formiato liasa (pfl) (Hallenbeck, 2009).

En la vía de la pfor la ferredoxina actúa como aceptor de electrones formando así acetil coA y ferredoxina reducida (Ec. 5), la cual por medio de una reacción de regeneración formará hidrógeno (Ec. 6). En esta reacción por cada mol de piruvato se producen 2 de ferredoxina reducida, y a su vez por cada 2 moles de ferredoxina reducida se obtiene 1 mol de hidrógeno. Teniendo en cuenta que la glicólisis forma 2 moles de piruvato, en total se obtienen 2 de hidrógeno (Khanna & Das, 2013).



Posteriormente, el acetilo es transformado en acetato o butirato (Blanco Londoño & Rodriguez Chaparro, 2012) dependiendo de las condiciones de la reacción; a presiones parciales de hidrógeno bajas se promueve la formación de acetato, mientras que a altas presiones se genera butirato. Esto impacta directamente en la formación de hidrógeno, ya que para producir butirato se usa NADH formado durante la reacción de producción de piruvato, lo cual impide que el NADH se regenere (Ec. 7), situación que por el contrario si sucede el acetato es el producto final, ya que el NADH no se consume y se regenera (Figura 5).



En total, por la vía de la pfor se producen entre 2 y 4 moles de hidrógeno, esto es variable dependiendo de si se produce sólo acetato, sólo butirato o los dos al mismo tiempo.

Por otra parte, en la vía de la pfl se promueve la formación de acetato y formiato mediante una ruptura del enlace C-C, liberando así el formiato y el acetil coA que posteriormente se transformará en acetato, mientras que el formiato sigue una reacción reversible catalizada por una hidrogenasa lo cual forma hidrógeno. Al tener 2 moles de piruvato, que forman 2 moles de formiato, al final se logran obtener 2 moles de hidrógeno por mol de glucosa en total. A diferencia de la vía pfor, en esta vía el NADH producido durante la formación del piruvato se utiliza en la producción de otros compuestos reducidos como el etanol o el lactato (Hallenbeck, 2009).

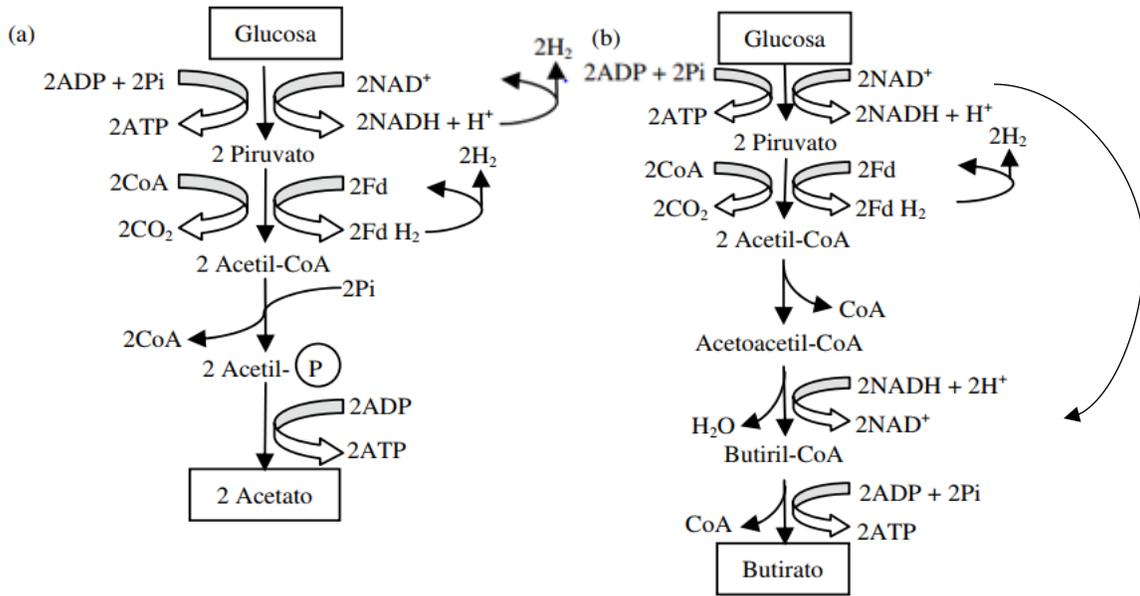


Figura 5. Producción de biohidrógeno por medio de la enzima piruvato ferredoxinoxidorreductasa, a) acetato como producto final, b) butirato como producto final. En el caso del acetato se utiliza el NADH para la producción extra de 2 moles de hidrógeno. En el cas

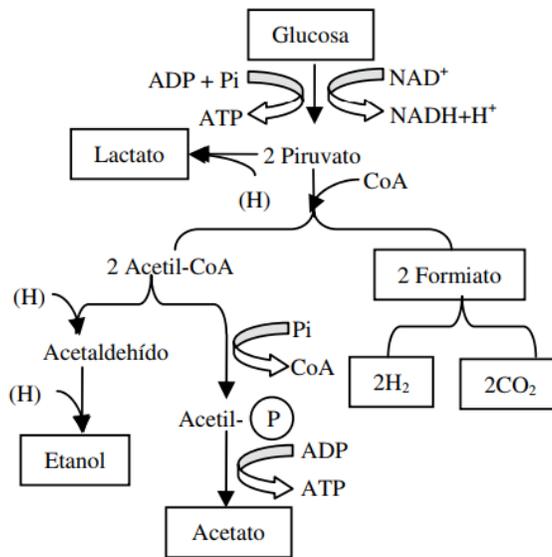


Figura 6. Producción de biohidrógeno por medio de la enzima piruvato formiato liasa, el NADH producido se utiliza en la formación de otros compuestos reducidos como lactato y etanol, (Modificado de Blanco Londoño & Rodriguez Chaparro, 2012).

1.4.3 Factores de importancia en la producción de biohidrógeno

El proceso de producción de biohidrógeno es dependiente de varios factores que afectan los rendimientos, estos factores se asocian con condiciones ambientales, operacionales y químicas. Entre los factores más importantes tenemos: tipo de inóculo, pH, temperatura, formación de inhibidores, presión parcial de hidrógeno y tipo de reactor (Wang & Wan, 2009).

Existen más factores, como el tiempo de retención hidráulico y la carga orgánica volumétrica. Sin embargo, son factores que sólo pueden tomarse en cuenta al momento de realizar producción en continuo, algo que en el presente trabajo no se realizó.

1.4.3.1 Inóculo

El inóculo se refiere a los microorganismos que se utilizan para llevar a cabo la producción de biohidrógeno. Existen una gran variedad de microorganismos que pueden llevar a cabo la producción de biohidrógeno, pero principalmente hay 2 clases principales, *Clostridium* y *Enterobacter*, las cuales se han usado de 2 formas, en cultivos puros y en cultivos mixtos (Blanco Londoño & Rodríguez Chaparro, 2012).

La ventaja de utilizar cultivos puros es que se pueden obtener mejores rendimientos de producción de biohidrógeno; sin embargo, son menos resistentes a cambios de temperatura o pH; por ejemplo, los *Clostridium* son anaerobios estrictos muy sensibles a la presencia de oxígeno y en caso de una fuga del reactor todo el cultivo se inhibiría. Además, el sustrato preferible a usar es la glucosa pura ya que si se usan sustratos como residuos agrícolas o industriales, existe la posibilidad de contaminar los cultivos puros (Bedoya et al., 2007).

El uso de cultivos mixtos es más aceptado a nivel piloto e industrial, ya que a pesar de que las rutas metabólicas pueden combinarse y de este modo disminuir el

rendimiento de biohidrógeno, se tiene la ventaja de que al ser comunidades microbianas son más resistentes a cambios operacionales como carga orgánica volumétrica, pH, temperatura y concentración de oxígeno. Además, existe el beneficio agregado de poder usar residuos agrícolas e industriales, lo cual añade beneficios económicos a la operación (Wang & Wan, 2009). Una desventaja del uso de estos cultivos es que normalmente contienen microorganismos metanogénicos y sulfatorreductores, los cuales tienen la particularidad de consumir hidrógeno; sin embargo, estos pueden ser eliminados con el uso de pretratamientos como el choque térmico y el uso de lavados a cortos TRH para mantener únicamente los microorganismos hidrogenogénicos (Carrillo-Reyes et al., 2016)

1.4.3.2 pH y temperatura

El pH es un factor que influye directamente en la estabilidad de los cultivos. Se ha observado que cambios en el pH pueden afectar directamente el metabolismo de los microorganismos radicalmente. Dependiendo del tipo inóculo, el sustrato y la forma de operar el reactor, el pH óptimo puede variar desde 4.0 hasta 9.0 (Fang & Liu, 2002). Los microorganismos producen biohidrógeno durante la fase de crecimiento exponencial. Cuando llegan a la fase estacionaria, cambian a producir compuestos reducidos como el etanol, este cambio ha sido reportado que sucede cuando el pH cae por debajo de 4.5, lo cual ocurre por la acumulación de ácidos grasos volátiles. Es por esto que el pH óptimo suele estar entre 5.0 y 6.0 (Davila-Vazquez et al., 2008)

La temperatura varía dependiendo del tipo de microorganismos que se utilicen, pueden ser psicrófilicos (0 – 20°C), mesófilicos (20 – 42°C) y termófilicos (42 – 75°C).

Para cultivos puros de *Clostridium*, la temperatura suele ser óptima entre 37 y 45°C, mientras que para cultivos mixtos no existe una temperatura óptima fija, depende mucho de la comunidad de microorganismos que exista, por esto cuando se utilizan

cultivos mixtos se suele utilizar una temperatura de 37°C estable, ya que se favorece el crecimiento de *Clostridium* que es el principal género dentro de los productores de biohidrógeno (Khanna & Das, 2013)

1.4.3.3 Formación de inhibidores

El proceso de hidrólisis con ácido diluido consiste en añadir al residuo lignocelulósico una cantidad baja de ácido (0.5 - 4%) y aplicar un choque térmico a altas temperaturas (120 – 200°C). Debido a esto, compuestos como el furfuraldehído (furfural) y el hidroximetilfurfural (HMF) son formados a partir de la xilosa y pentosas. Estos compuestos tienen distintos efectos como impedir la actividad de enzimas involucradas en la glicolisis, suprimir el crecimiento celular, causar daño al ADN y mutaciones en varias bacterias, así como cambiar las vías de fermentación (Arreola-Vargas et al., 2013). Además, el NADH puede reducir estos compuestos y oxidarse, lo cual genera un déficit de NADH el cual se utiliza durante las reacciones de producción de hidrógeno.

Otro tipo de compuestos derivados del uso de calor y altas presiones como pretratamientos, son los compuestos fenólicos, como la vainillina y el siringaldehído que se derivan de la degradación de la lignina. Estos compuestos afectan las membranas celulares, aunque se ha mostrado que se pueden alcanzar concentraciones de 2 g/L de estos compuestos antes de que se muestre un efecto inhibitorio (Bundhoo & Mohee, 2016).

1.4.3.4 Presión parcial de hidrógeno

Un inhibidor muy importante que es producido durante la fermentación oscura es la presión parcial de hidrógeno. Durante la producción de biohidrógeno, la hidrogenasa lleva a cabo una reacción reversible de oxidación de la ferredoxina, la cual promueve la reducción de protones generando biohidrógeno. Cuando la concentración de biohidrógeno en el líquido aumenta, este proceso se ve menos

favorecido y por el contrario, la reducción de la ferredoxina oxidada se ve favorecida, lo que promueve un consumo de hidrógeno para generar protones (Chong et al., 2009).

Por otra parte, también se han tenido reportes de que altas presiones parciales de hidrógeno inhiben la conversión de ácidos grasos de cadena larga a acetato e hidrógeno (Dong et al., 2009). Además de que las rutas fermentativas pueden cambiar para favorecer la producción de lactato, etanol, acetona y butanol (Levin et al., 2004; Van Niel et al., 2003).

Para disminuir dicha presión parcial, se han empleado diversos sistemas, el más utilizado es el arrastre por gas (gas sparging) (Mizuno et al., 2000) que consiste en burbujear nitrógeno para sacar el biohidrógeno del líquido y de ese modo obtener una mezcla de ambos. Sin embargo, agregar otro gas a la mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono que se obtiene no es deseable ya que se generarían problemas para separar ambos gases posteriormente (Lee et al., 2012).

Otros métodos incluyen el aumento del espacio de cabeza y el uso de vacío para sacar el biohidrógeno del líquido. Este último método es más atractivo, ya que no se necesita añadir un gas adicional ni se necesita disminuir el volumen de trabajo para aumentar el espacio de cabeza, simplemente se utiliza una bomba de vacío para sacar el gas que se produce y al mismo tiempo se puede estar recolectando.

El uso del vacío propicia un aumento en la cantidad de biohidrógeno producido, siendo que cuando se utiliza glucosa como sustrato el vacío incrementa la producción 5 veces, mientras que en otros sustratos como aguas residuales hay un cambio radical de no producir biohidrógeno a producirlo en grandes cantidades (Rajhi et al., 2016).

1.4.3.5 Tipo de reactor

Existe una gran variedad de reactores para la producción de biohidrógeno, como el continuamente agitado (CSTR), el de flujo ascendente (UASB), los reactores de lecho fluidificado y los de lecho expandido. Cualquiera de éstos puede ser usado en modo continuo o en lote, pero para propósitos de investigación se prefiere utilizar los reactores en lote, aunque al momento de hacer escalamiento industrial se debe de aplicar un modo continuo o semicontinuo (lote alimentado).

El CSTR es el más sencillo de los reactores ya que ofrece una construcción simple, una operación más fácil y un mezclado homogéneo, lo que permite que se pueda tener un buen contacto entre el sustrato y los microorganismos. Su principal desventaja es al momento de utilizarlos en modo continuo, ya que el tiempo de retención hidráulico (TRH) que necesitan es largo, debido a que si se utilizan TRH muy bajos (por debajo de 6 horas) pueden llevar a que ocurra el lavado de la biomasa, es decir, la pérdida de microorganismos (Guo et al., 2010). EL CSTR ofrece la facilidad de ser modificado de forma más simple, ya que para reducir la presión parcial de hidrógeno se necesita ya sea el uso de un gas o de vacío, lo cual puede ser agregado fácilmente en este tipo de reactores sin afectar su funcionamiento.

La operación en lote del CSTR ha mostrado obtener mejores rendimientos que en continuo (Ntaikou et al., 2010) lo cual se puede atribuir al microambiente que se genera durante una operación en lote.

2. Justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Justificación

El creciente daño ambiental que se ocasiona debido al uso indiscriminado de combustibles fósiles hace necesaria la inclusión de nuevas alternativas amigables con el ambiente. Entre estas alternativas destaca la producción de biohidrógeno. Éste es un biocombustible atractivo debido a su alto contenido energético (142 kJ/g), y al hecho de que la única emisión que se genera durante su combustión es agua. Existen varias formas de producción de biohidrógeno. Sin embargo, la que mejores rendimientos genera es la fermentación oscura. Además, este proceso tiene una gran variedad de sustratos disponibles como los residuos lignocelulósicos agrícolas (paja de trigo o avena), residuos industriales (alimenticios o madereros), residuos de ganadería (estiércol de ganado bovino o porcino), aguas residuales municipales, así como el uso de cultivos energéticos específicos y sus residuos (jatrofa, salicornia e higuera). En México, es de interés el aprovechamiento de los residuos, como la paja de trigo, de la cual se producen grandes cantidades en el país anualmente y no tienen uso alguno, y las podas de jatrofa, que es un cultivo energético capaz de crecer en condiciones inhóspitas y cuya semilla se utiliza en la producción de biodiesel. Ambos son residuos lignocelulósicos que requieren de un pretratamiento para lograr su hidrólisis. La paja es un producto que actualmente ya es utilizado para la producción de biocombustibles, mientras que la jatrofa es un nuevo residuo cuyo uso ayudará a aumentar la diversificación en la producción de biocombustibles. El uso de la hidrólisis enzimática como medio para mejorar la obtención de azúcares a partir de los residuos lignocelulósicos es de gran interés debido a que un aumento en la concentración de éstos se puede traducir en un incremento del rendimiento de biohidrógeno, lo cual nos resultará en un proceso más rentable económicamente. Dentro de la producción de biohidrógeno, uno de los factores que más llega a afectar es el aumento en la presión parcial de hidrógeno, ya que esto se traduce en un menor rendimiento, lo cual impide obtener el máximo teórico de biohidrógeno a partir de cada residuo. Sin embargo, a pesar de que existen varios métodos para la

disminución de la presión parcial el uso del vacío es un método innovador ya que se evita el uso de gases inertes que pueden generar mayores costos, y al mismo tiempo se aumenta la viabilidad económica del proceso al aumentar el rendimiento de biohidrógeno.

2.2 Hipótesis

El uso del vacío como sistema de extracción provocará una disminución de la presión parcial de hidrógeno en el sistema, permitiendo que la reacción reversible de producción se mantenga favorable, lo cual resultará en el aumento en la cantidad de biohidrógeno producido durante la fermentación de los hidrolizados de residuos lignocelulósicos.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Evaluar la producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de residuos de trigo y jatrofa en un CSTR con sistema de extracción *in situ* en operación en lote.

2.3.2 Objetivos Específicos

Evaluar el uso de la hidrólisis enzimática como método para mejorar la extracción de azúcares después del pretratamiento ácido diluido de los residuos de trigo y jatrofa

Evaluar el uso del vacío como método de extracción durante la producción de biohidrógeno en un CSTR alimentado con hidrolizados de residuos de trigo y jatrofa.

3. Materiales y Metodología

3.1 Materia prima

Las podas de jatrofa fueron proporcionadas por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (Culiacán, Sinaloa). Al momento de utilizarlas para los experimentos se notó que tenían un hongo en la superficie de la corteza, por lo cual se optó por realizar los experimentos de 2 formas, utilizando las podas de jatrofa completas y usándolas sin corteza. Para remover la corteza se utilizó una navaja y se dejó solo el tallo debajo de la misma para procesamiento posterior. La paja de trigo fue proporcionada por el Instituto Tecnológico de Sonora (Valle del Yaqui, Sonora). Ambos residuos se trituraron sin controlar el tamaño de partícula.

Posteriormente, se les dio un secado a 60°C durante 24 horas para eliminar la humedad que pudieran contener. Todos los experimentos se realizaron con la biomasa triturada y seca.

3.2 Caracterización de fibras

La caracterización de fibras consistió en determinar los porcentajes de materia soluble, lignina, celulosa y hemicelulosa, así como de cenizas de cada una de las materias primas. Se realizó en base al protocolo proporcionado por el fabricante del equipo (ANKOM Technology) usando los procedimientos de determinación de fibra detergente neutral, determinación de fibra detergente ácida y determinación de lignina detergente ácida.

3.3 Pretratamiento ácido diluido

Para el pretratamiento se utilizó el método del ácido diluido. Se decidió utilizar HCl debido a que el uso de H₂SO₄ permite el crecimiento de microorganismos sulfatorreductores, los cuales compiten por los equivalentes de electrones

necesarios para la formación de hidrógeno. El ácido se utilizó en una concentración de 2% (v/v) y se mantuvo una relación 1:8 sólido – líquido (biomasa – ácido diluido). Se usaron 30 g de biomasa (jatrofa con corteza y sin corteza o paja de trigo), se añadieron 240 mL de HCl al 2% (v/v) y se calentó en autoclave a 121°C por 15 min.

3.4 Hidrólisis enzimática

Para observar el efecto que tiene la hidrólisis enzimática sobre los residuos ya pretratados, se hicieron 4 series de experimentos como se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Experimentos de hidrólisis realizados de los residuos pretratados

Experimento	Pretratamiento (ácido diluido) ^a	Enzima	Residuo (jatrofa o trigo)
1	•	•	•
2	•		•
3		•	•
4	•	•	

• = Parte del experimento; en blanco = no se utilizó; ^a Indica el pretratamiento dado al residuo

Los experimentos 1 a 3 se realizaron para todos los sustratos (jatrofa con corteza, sin corteza y paja de trigo) por triplicado. El experimento 1 se realizó usando residuo, dándole un pretratamiento y posteriormente realizando la hidrólisis enzimática. Los experimentos 2 y 3 son controles que se realizaron con residuo, en el 2 sólo se usó el pretratamiento mientras que en el 3 sólo la hidrólisis enzimática, esto para observar la diferencia en el grado de sacarificación usando sólo pretratamiento y sólo hidrólisis enzimática. El experimento 4 también es un control que consistió en un pretratamiento ácido sin biomasa al cual posteriormente se le realizó la hidrólisis enzimática, esto se hizo para observar la cantidad de azúcares que aportan el ácido y la enzima a los azúcares obtenidos después de la hidrólisis enzimática por el pretratamiento ácido y por la hidrólisis enzimática a nuestros resultados.

El proceso de hidrólisis consiste primero en ajustar el pH de la mezcla de reacción 5.5 (óptimo para la enzima). En el caso del experimento 1 y 2, debido a que vienen

del pretratamiento ácido, se debe de ajustar el pH a 5.5, lo mismo se hace para el experimento 4 en el que antes de la hidrólisis se neutraliza el ácido; en el experimento 3, como no se realizó el pretratamiento ácido, no se necesita ajustar pH, pero sí se necesita pasar por el autoclave a 121°C por 15 min.

Ya que se ajustó el pH se procede a agregar la enzima al 1% (p/v con respecto al residuo lignocelulósico, obteniendo un total de 300 µl de enzima) y se mantiene la relación 1:8 sólido – líquido añadiendo buffer de acetatos 50 mM. Para el experimento 4 sólo se añaden 300 mL de buffer ya que no hay sólidos. Por último, se incuba en un recipiente cerrado, en agitación continua, durante 24 horas, a 50°C.

Se toman muestras cada 4 horas durante el periodo de incubación para analizar azúcares reductores (AR) azúcares totales (AT) y demanda química de oxígeno (DQO).

Además, se tomaron muestras para realizar los análisis de compuestos inhibitorios (furfural, HMF, vainillina y siringaldehído)

3.5 Producción de biohidrógeno

Se plantean 2 experimentos, primero una producción en botellas serológicas para observar la cinética de producción del inóculo utilizado para, posteriormente, hacer la producción en un reactor CSTR y observar el efecto del vacío.

3.5.1 Inóculo y medio

El inóculo a utilizar proviene de la planta de tratamiento de aguas de la tequilera Casa Herradura (Amatitán, Jalisco). Para promover sólo el crecimiento de los microorganismos hidrogenogénicos se utilizó el choque térmico como pretratamiento.

El pretratamiento consiste en disgregar el lodo en una malla del No. 20 para romper los gránulos del lodo y así liberar a los microorganismos metanogénicos que puedan estar dentro. Una vez hecho esto, se procede a calentar el lodo por 24 horas a 105°C para asegurar la eliminación de microorganismos no esporulantes. Después se muele en mortero hasta conseguir un polvo. Se determinaron sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV), siendo el contenido de 0.1017 g SST/L y 0.0923 g SSV/L respectivamente.

Para los experimentos de producción de biohidrógeno se utilizó un medio mineral con la siguiente composición (g/L): 41.6, NH₄Cl; 4, K₂HPO₄; 2, MgCl₂·6H₂O; 1.6, FeSO₄·7H₂O; 0.04, CoCl₂·6H₂O; 0.04, MnCl₂·4H₂O; 0.04, KI; 0.008, mg NiCl₂·6H₂O; 0.008, ZnCl₂ (Mizuno et al., 2000).

3.5.2 Producción en lote en botellas serológicas

Los experimentos de producción de biohidrógeno en botellas se realizaron con botellas serológicas de 120 mL, se inocularon con 4.5 g SSV/L, se añadieron 5 gDQO/L de del hidrolizado y 5 mL de medio mineral. Se dejó un espacio de cabeza de 40 mL para mantener un volumen de trabajo de 80 mL (relación 1:2) y se ajustó el volumen con agua destilada. El pH se ajustó a 5.5 y se sellaron las botellas con tapones de hule y arillos metálicos. Para obtener la atmósfera anóxica se purgó el aire con un flujo de nitrógeno durante 30 s. Todo se realizó en triplicados y se incubó de 3 a 6 días a 37°C con agitación continua a 130 rpm hasta que se detuvo la producción de biohidrógeno.

Se midió el gas cada 3 horas y se tomaron muestras al inicio y al final del día para analizarlas por medio de cromatografía de gases para determinar la cantidad de biohidrógeno producida y el dióxido de carbono que contiene el gas.

3.5.3 Producción en lote en reactor

Para la producción en reactor se utilizó un reactor CSTR de vidrio de 2L (SEV-Prendo) conectado a un equipo de control (TPLC 1000) con sensores de pH y temperatura y a un recirculador con control de temperatura. El volumen de trabajo del reactor fue de 1800 mL y se usó un espacio de cabeza de 200 mL.

Se realizaron 2 modos de operación, con y sin vacío; para ambos modos de operación el reactor se inoculó con 4.5 g SSV/L, 10 gDQO/L de hidrolizado y medio mineral; se ajustó el pH a 5.5 y se sellaron por completo todas las entradas con tapones de goma, parafilm y cinta teflón. La temperatura se fijó en 37 °C mientras que el pH se mantuvo entre 4.5 y 5.5. Se operaron durante 2 días.

Durante el modo de operación sin vacío se tomaron muestras de gas cada 4 horas y se midieron por medio del cromatógrafo de gases.

Para la operación con aplicación de vacío se utilizó una bomba de vacío acoplada a un controlador (HEB China, modelo VC 4000). El reactor se conecta al controlador por medio de una manguera, éste a su vez se conecta a la bomba de vacío la cual se conecta a una bolsa TEDLAR la cual almacenará el gas extraído. Se aplicaron pulsos de vacío de 2 min cada 4 horas por 2 días durante los cuales se recolectó el gas producido en las bolsas; posteriormente se realizaban las mediciones en cromatógrafo de gases.

Para ambos modos de operación se tomó muestra del líquido cada 4 horas para realizar una medición de los AGV's producidos.

3.6 Métodos Analíticos

Los parámetros de DQO, SST y SSV se determinaron con los métodos estándar (APHA, 1998) mientras que las determinaciones de azúcares reductores y azúcares

totales se realizaron por el método del fenol – sulfúrico (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956).

La determinación de AGV's se realizó por electroforesis capilar con el equipo Agilent 7100 CE, se utilizó un buffer anión básico 12.1 y una columna capilar de sílice, la temperatura y voltaje fueron de 20 °C y -30 kV respectivamente.; para esto se filtraron los hidrolizados con filtros de 0.22 micras después de lo cual se procedió a realizar diluciones 1:3, se midió acetato, lactato y butirato.

El análisis de la composición del gas se llevó a cabo usando un cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890N. Se utilizó una columna Hayesep D (Alltech, Deerfield, Illinois, EUA), la temperatura del puerto de inyección, del horno y del detector fueron 250, 60 y 250°C respectivamente, se usó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 12 mL/min.

Los compuestos inhibitorios se determinaron en LANBAMA (IPICYT, San Luis Potosí, México) para realizar su determinación mediante HPLC. Se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB – C18 (Agilent) de 4.6 x 150 mm 5 µm con una mezcla de agua/acetonitrilo (92/8%) como fase móvil con un flujo de 0.8 mL/min a una temperatura de 40°C. Antes de la inyección se ajustó el pH de las muestras a 4.4.

Los análisis estadísticos se realizaron con RStudio Versión 0.99.473 – © 2009-2015 RStudio, Inc.

4. Resultados y Discusión

4.1 Caracterización de Residuos

Los resultados de la caracterización de los residuos se puede observar en la Tabla 5. Uno de los aspectos más relevantes, la cantidad de lignina presente en los residuos, indicó que la biomasa de jatrofa tiene más del triple comparada con la que se encuentra en la paja de trigo, sin importar si es jatrofa con corteza o sin corteza. Esto era de esperarse debido a la constitución que tienen los residuos de podas de la jatrofa, recordando que en este caso sólo se utilizaron ramas y tallos, no se incluyeron hojas ni frutos, por tanto era de esperarse que tuviera un mayor porcentaje de lignina.

Al comparar los resultados de biomasa de jatrofa con corteza y sin corteza, encontramos que la biomasa sin corteza tiene mayor porcentaje de holocelulosa (hemicelulosa + celulosa). Sin embargo, no es una diferencia muy amplia por lo cual podríamos decir que en realidad la corteza no debería de afectar nuestros resultados posteriores.

Tabla 5. Composición de los residuos lignocelulósicos

Residuo	Compuestos Solubles (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Total (%)
Jatrofa con corteza	22.75	5.53	50	21.23	99.5
Jatrofa sin corteza	18.86	5.38	57.76	17.84	99.85
Corteza de jatrofa	47.09	3.62	28.89	19.93	99.53
Paja de trigo	33.25	18.56	41.93	5.46	99.2

En la Tabla 6 podemos observar la comparación con otros trabajos publicados. Como se había mencionado, la jatrofa es un sustrato nuevo en cuanto a la producción de biohidrógeno se refiere, por lo que sólo se encontró un artículo donde se menciona su composición lignocelulósica (Kumar et al., 2014). En este trabajo se usaron, además de los tallos y ramas, las hojas y residuos de los frutos

de la jatrofa, es por esto que se puede observar una diferencia sobre todo en la composición de lignina, donde aumenta gracias a las semillas. En cambio, disminuye en cuanto al contenido de celulosa, debido a la presencia de las hojas. Los demás trabajos son comparativos, con otro tipo de biomasa encontrada en la planta de la jatrofa, pero como se puede observar, todos son muy variables, por lo que no hay una composición típica de este residuo.

En el caso de la paja de trigo, los resultados son un poco más constantes, teniendo en general una composición de celulosa de 30 – 40%, de 20 – 30% de hemicelulosa y de 10 – 20% de lignina. Sin embargo, existen algunas excepciones (Harmsen et al., 2010; Saha et al., 2005); esto se explica teniendo en cuenta que no sabemos a cuál etapa de crecimiento del trigo se obtuvieron estos residuos, aunado a que son investigaciones realizadas en distintos países por lo que las condiciones ambientales varían de región a región, afectando a la composición de la paja de trigo.

Tabla 6. Comparación de la composición lignocelulósica con la literatura

Residuo	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Fuente
Paja de trigo	41.93	18.56	5.46	Este trabajo
	33.7 - 40	21 - 26	11 – 22.9	(Saleem Khan & Mubeen, 2012)
	37 - 41	27 - 32	13 - 15	(Saini et al., 2015)
	48.57	27.7	8.17	(Saha et al., 2005)
	38	29	15	(Singh et al., 2014)
	30	50	15	(Harmsen et al., 2010)
Jatrofa sin corteza	35.4	24.6	17.7	(Panagiotopoulos et al., 2013)
	50	5.53	21.23	Este trabajo
Jatrofa con corteza	57.76	5.38	17.84	Este trabajo
Podas de jatrofa	30.5	13.2	26.1	(Kumar et al., 2014)
Cáscara de semilla de jatrofa	32.7	11.1	45.6	(Makkar et al., 1998)
Tronco de jatrofa	42.99	19.11	24.11	(Vaithanomsat & Apiwatanapiwat, 2009)
Cáscara del fruto de jatrofa	30.38	8.5	20.43	(Adinurani et al., 2015)

4.2 Producción de azúcares

En la Tabla 7 se presenta la producción de azúcares reductores a partir de los residuos después de la aplicación de los distintos tratamientos a las 12 horas; se eligió este tiempo de tratamiento debido a que posterior a estas primeras 12 horas no se observó un aumento significativo en la producción de azúcares.

Tabla 7. Producción de azúcares (g/L) a partir de los residuos lignocelulósicos después de 12 horas de tratamiento.

Residuo	Tratamiento	Reductores	Totales
Jatrofa sin corteza	AER	35.189±0.256	43.889±1.065
	AR	34.555±0.256	41.983±1.722
	ER	2.392±0.088	4.423±0.264
	AE	0.142±0	0.062±0
jatrofa con corteza	AER	31.52±0.833	37.303±0.272
	AR	29.3±0.769	47.719±1.586
	ER	2.511±0.064	5.431±0.695
	AE	0.142±0	0.062±0
Paja de trigo	AER	43.253±0.769	49.178±2.198
	AR	36.005±0.256	40.188±1.269
	ER	3.543±0.038	7.777±0.218
	AE	0.142±0	0.062±0

AER= Pretratamiento + Hidrólisis enzimática + Residuo

AR= Pretratamiento + Residuo

ER = Hidrólisis enzimática + Residuo

AE= Ácido + Hidrólisis enzimática (sin residuo)

Al comparar el grado de sacarificación de los experimentos realizados con jatrofa con corteza y sin corteza se observan resultados variados. Los datos obtenidos por análisis estadísticos arrojan que usando sólo la hidrólisis enzimática no hay diferencias tanto en azúcares reductores como en azúcares totales (Tabla 8). Usando sólo el pretratamiento obtenemos diferencias significativas en azúcares reductores no así en totales, y por último, usando pretratamiento e hidrólisis se obtienen diferencias tanto en reductores como totales.

Esto nos indica que si bien existen diferencias estadísticamente significativas en algunos tratamientos, usando sólo el pretratamiento ácido podríamos obtener prácticamente las mismas concentraciones de azúcares de ambos residuos.

Tabla 8. Valores de p para las relaciones entre residuos en experimentos de sacarificación

Relación	AR			AT		
	AER	AR	ER	AER	AR	ER
Paja - JSC	0.00000020	0.11677300	0.26300000	0.03027850	0.54479230	0.01004000
Paja - JCC	0.00000000	0.00177060	0.26300000	0.00016860	0.03286700	0.02730760
JSC-JCC	0.00004050	0.00358510	0.26300000	0.00942110	0.06674920	0.20708560

JSC: Jatrofa sin corteza; JCC: Jatrofa con corteza. Los valores con diferencias significativas están en negritas ($p \leq 0.05$).

En los experimentos utilizando pretratamiento e hidrólisis enzimática se observa una mayor producción de azúcares reductores y totales en la paja de trigo que en la jatrofa con o sin corteza, lo cual se explica por su composición, ya que observamos que hay un mayor porcentaje de hemicelulosa en la paja de trigo. Sin embargo, al comparar los resultados de p obtenidos de la paja de trigo con los de la jatrofa sin corteza obtenemos muy pocas diferencias significativas; por tanto, estos 2 residuos dan prácticamente la misma cantidad de azúcares totales; mientras que al comparar paja con jatrofa con corteza, los resultados son completamente distintos.

En general, la producción de azúcares usando sólo la hidrólisis enzimática, es pobre ya que se llega a un máximo de 10 g/L, por lo cual se concluye que es necesario realizar el pretratamiento ácido.

Al comparar la producción de azúcares por hidrólisis enzimática con la producción por hidrólisis enzimática más pretratamiento, podemos observar que se tiene un gran incremento, de 10 g/L en azúcares totales a 60 g/L. Esto se debe a la acción del pretratamiento durante el cual el ácido actúa sobre la hemicelulosa degradándola hasta monómeros como la xilosa.

Comparando el grado de sacarificación de los experimentos realizados con pretratamiento e hidrólisis enzimática con los de sólo pretratamiento en la jatrofa observamos valores muy parecidos lo cual nos indica que no es necesario utilizar la hidrólisis enzimática para obtener una mayor cantidad de azúcares, esto puede deberse a que las condiciones en las cuales se llevó a cabo la hidrólisis enzimática no eran las más correctas, ya que en estudios anteriores (Ibarra De Lira, 2018) se observó que las condiciones utilizadas en este trabajo no favorecían la producción de azúcares por medio de hidrólisis enzimática.

La paja de trigo tiene un ligero aumento en la producción de azúcares reductores al usar el pretratamiento con la hidrólisis enzimática comparando con el pretratamiento solo, esto puede ser debido a que la hidrólisis enzimática puede actuar más fácilmente sobre la celulosa, ya que el porcentaje de lignina que existe en la paja de trigo es mucho menor al que contienen las podas de jatrofa.

Comparando con la literatura, la cantidad de azúcares encontrada en la paja de trigo fue mayor que la que se reporta en otros trabajos (Saha et al., 2005), ya que en ese trabajo se alcanzan cerca de 30 g/L de azúcares reductores, mientras que la concentración encontrada en este trabajo de tesis fue casi 45 g/L; esto se puede deber a la diferencia en la composición de la paja de trigo de diferentes orígenes y quizás al ácido utilizado, ya que en este caso se usó HCl y no H₂SO₄.

4.3 Inhibidores

Se realizó la determinación de inhibidores de la fermentación en los experimentos con pretratamiento e hidrólisis enzimática. Se determinaron 4 compuestos en total, hidroximetilfurfural (HMF), furfural, vainillina y siringaldehído; en la Figura 7 podemos ver la comparación entre los 3 residuos.

En todos se tienen concentraciones muy bajas, por debajo de los 0.1 g/L, siendo la vainillina y el siringaldehído los que tienen las menores concentraciones (0.05 g/L).

Bundhoo & Mohee, (2016) reportaron que la concentración de furfural es inhibitoria a partir de 1 a 2 g/L, la de HMF a partir de 0.5 g/L en adelante, la de vainillina y la de siringaldehído de 0 a 2 g/L. Por lo tanto no se esperan efectos inhibitorios debido a inhibidores durante las fermentaciones, ya que las concentraciones obtenidas son muy pequeñas.

Aun así, existen trabajos donde se ha observado que el furfural hasta una concentración de 1 g/L promueve la producción de biohidrógeno(Akobi et al., 2016) por lo cual podría verse afectada la producción de forma positiva.

Además, se puede observar una disminución en la producción de inhibidores durante el proceso de sacarificación, esto se puede deber al conjunto de condiciones abióticas, en las cuales se lleva a cabo la sacarificación, tales como el pH y la temperatura, así como el tiempo durante el cual se lleva a cabo. Por otro lado, también puede ser debido a la presencia de factores bióticos, ya que ha sido observado, en otros estudios, que existen hongos capaces de transformar los compuestos derivados del furano (furfural e HMF) en ácidos y alcoholes, tales como el ácido furóico y alcohol furfurílico (Ran et al., 2014).

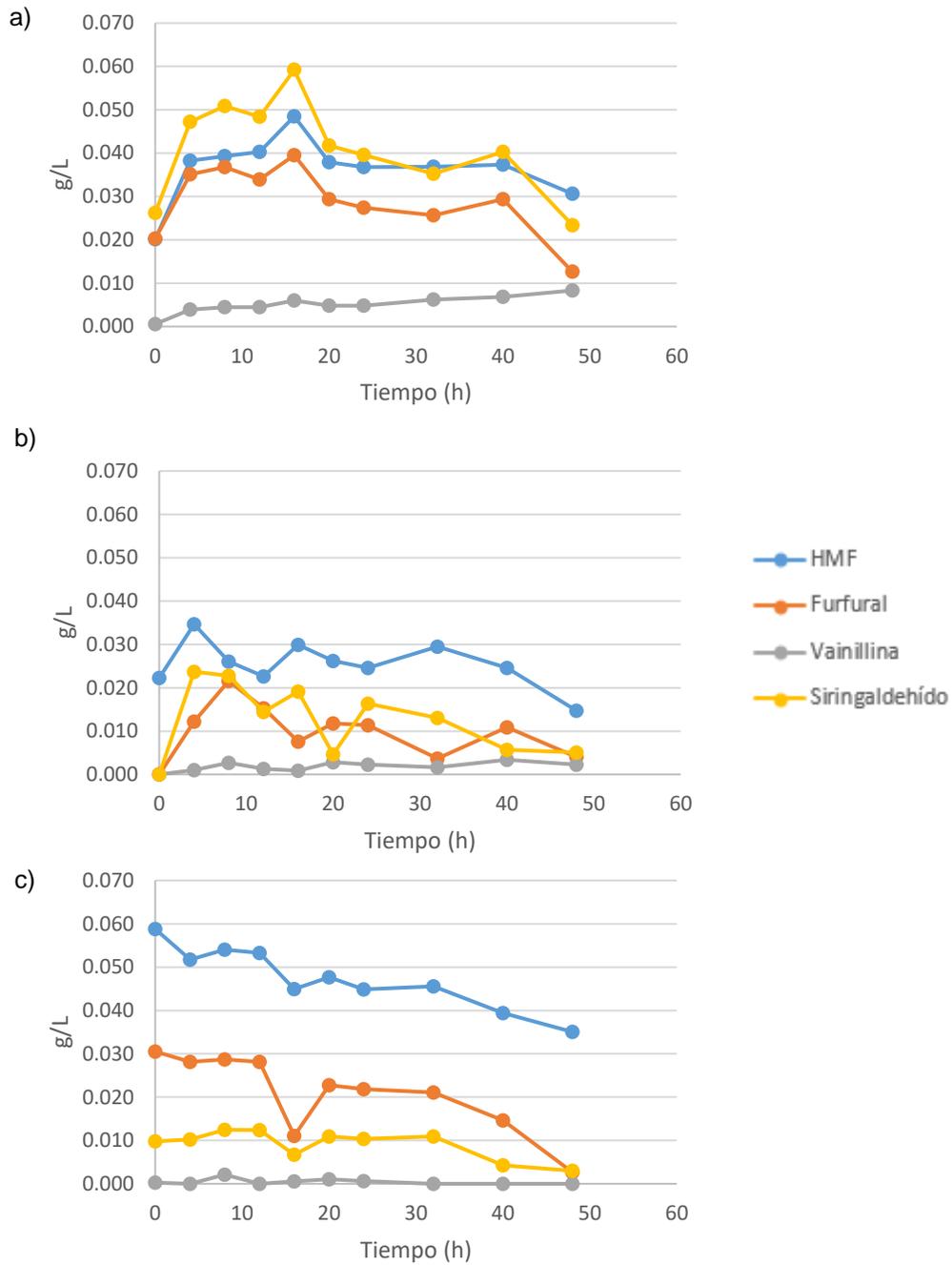


Figura 7. Producción de inhibidores por residuo lignocelulósico el proceso de sacarificación con pretratamiento e hidrólisis enzimática. a) Jatrofa sin corteza; b) Jatrofa con corteza; c) Paja de trigo.

4.4 Producción de biohidrógeno

Teniendo en cuenta los resultados de la producción de azúcares y la producción de inhibidores se decidió que la biomasa de jatrofa sería utilizada con corteza, esto debido a que se obtienen rendimientos de producción tanto de azúcares como de inhibidores muy parecidos, por tanto usar la jatrofa con corteza evita el proceso de remoción de la corteza.

Además, observando la producción de azúcares, podemos ver que los resultados al usar la hidrólisis enzimática después del pretratamiento, son los mismos que al no usarla; por lo que se decidió no utilizarla. Debido a esto los experimentos de producción de biohidrógeno se realizaron con hidrolizados provenientes sólo del pretratamiento ácido.

Por último, con base en el grado de sacarificación obtenido en los distintos tratamientos utilizados, se decidió que además del pretratamiento, se daría un tiempo de hidrólisis (sin la enzima, sólo con el ácido) para poder obtener la mayor cantidad de azúcares posibles; esto se logra dejando la hidrólisis por 12 horas, que es aproximadamente el tiempo en el que se alcanza el máximo de producción de azúcares en todos los residuos. Al hidrolizado ácido producido, se les realizó una caracterización de azúcares reductores, azúcares totales, DQO e inhibidores para los experimentos de producción de biohidrógeno (Tabla 9).

Tabla 9. Caracterización del hidrolizado ácido (g/L)

Residuo	AR	AT	DQO	HMF	F	S	V
Jatrofa	31.656	41.192	52.797	0.023	0.008	0.019	0.001
Paja de trigo	47.601	52.965	58.534	0.053	0.028	0.012	0.000

HMF= Hidroximetilfurfural; F= furfural; S= Siringaldehído; V= Vainillina

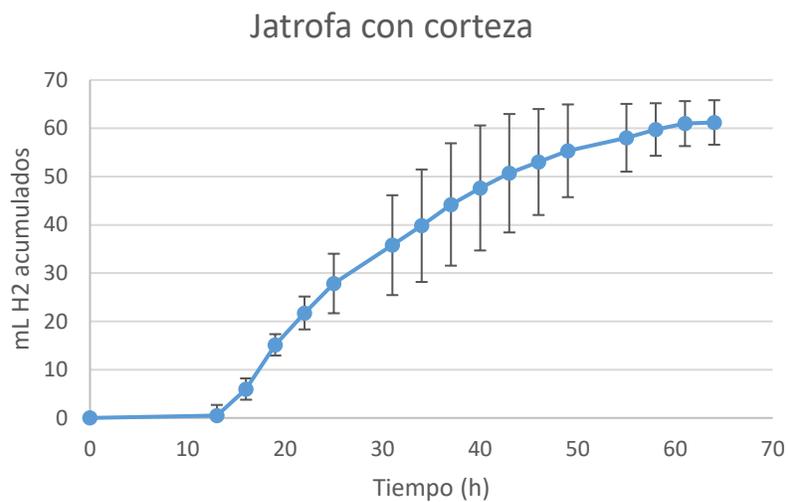
4.4.1 Producción biohidrógeno en lote en botellas serológicas

En la Figura 8 se puede observar la producción acumulada de biohidrógeno; podemos ver que con la biomasa derivada de las podas de jatrofa se obtienen mayores volúmenes acumulados de biohidrógeno, teniendo una velocidad de producción específica de biohidrógeno de 4.21 mL H₂/g SSV h, mientras que con la paja de trigo se obtienen 4.14 mL H₂/g SSV h.

Una razón para obtener estos resultados podría ser que se tiene una mayor concentración de inhibidores dentro del hidrolizado de paja de trigo, específicamente la concentración de HMF que es más del doble en la paja de trigo que en las podas de jatrofa. Si bien esta concentración no es tan alta como para menguar completamente la producción, ya que se necesitan concentraciones mayores a 2 g/L (Bundhoo & Mohee, 2016), sí existen reportes de que la vainillina y el siringaldehído puede comenzar el proceso de inhibición desde concentraciones de 0.25 g/L (Sharma & Melkania, 2017), con lo cual estas concentraciones obtenidas en los hidrolizados podrían estar afectando la producción de biohidrógeno de forma leve.

La fase exponencial de producción de biohidrógeno es diferente para cada uno de los residuos. Durante la fermentación del hidrolizado de la paja de trigo se observa claramente que la fase termina cerca de las 45 horas, después de lo cual prácticamente no hay producción de biohidrógeno. Por su parte, en la fermentación realizada con las podas de jatrofa, se obtiene una fase exponencial más larga, llegando a cerca de 58 horas antes de que la producción se detenga; esto está relacionado con lo anterior, ya que puede significar que los microorganismos en el experimento con jatrofa tienen una fase de crecimiento más larga debido a la ausencia del HMF, que es un inhibidor que específicamente afecta la fase de crecimiento de las bacterias (Arreola-Vargas et al., 2013)

a)



b)

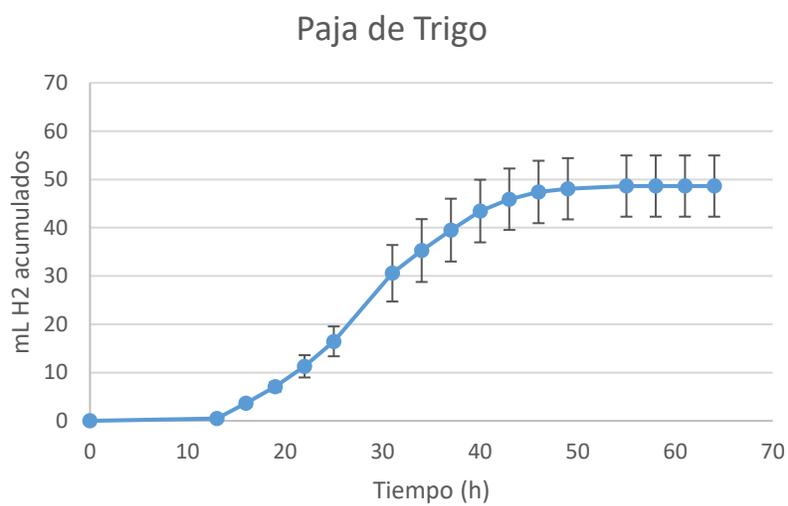


Figura 8. Producción acumulada de biohidrógeno a partir de residuos lignocelulósicos. a) Jatrofa; b) Paja de trigo.

4.4.2 Producción de biohidrógeno en lote en reactor

En la Figura 9 podemos observar las producciones de biohidrógeno de acuerdo al residuo y al tratamiento aplicado. Al escalar el proceso de producción de biohidrógeno a un reactor CSTR, podemos observar que existe un acortamiento del periodo de crecimiento de los microorganismos, esto se puede relacionar con 2 factores principales; primero está la diferencia en forma de agitación entre el reactor y las botellas. El primero tenía una agitación mecánica y el segundo una agitación orbital. La mecánica favorece más la transferencia de masa entre el sustrato y el inóculo permitiendo que se aproveche más rápido el sustrato. El segundo factor, tiene que ver con la formación de gránulos, gracias a la agitación mecánica se favorece la formación de gránulos, con lo cual se crean microambientes que permiten que los microorganismos tengan mejores condiciones para su crecimiento y por tanto una producción más rápida de biohidrógeno.

Se observa que existe una mayor producción de biohidrógeno al aplicar el vacío que al no utilizarlo, esto se debe a que al momento de extraer el biohidrógeno, las reacciones de producción de biohidrógeno siguen su curso normal de acuerdo al principio de Le Châtelier, que nos dice que una reacción reversible será favorable hacia el lado (reactivos o productos) que se encuentre en menor concentración, al extraer el biohidrógeno (el producto) éste se encuentra en menor concentración que los reactivos y por tanto se continúa con la producción del mismo. El aumento total en la producción de biohidrógeno es cerca del triple para la fermentación realizada con las podas de jatrofa y cerca del cuádruple para aquella realizada con la paja de trigo, esto se puede observar comparando la producción específica de biohidrógeno para cada caso (Tabla 10), lo cual es bastante importante al momento de tomar en cuenta los costos de operación.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de la producción de biohidrógeno

Tratamiento	Producción biohidrógeno (mL H ₂ /g SSV h)	VVPH (mL H ₂ /L h)	mL H ₂ acumulado	mL H ₂ /g residuo
JSV	2.589±0.55	11.653	821.465	48.190
JCV	7.282±0.588	32.770	1362.981	79.957
PSV	1.733±0.401	7.800	571.417	37.164
PCV	7.011±0.972	31.547	1338.001	87.021

VVPH: Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno

JSV= Jatrofa sin vacío; JCV= Jatrofa con vacío; PSV= Paja sin vacío; PCV= Paja con vacío

Al comparar los sustratos, podemos ver que al aplicar el vacío la producción se mantiene prácticamente igual de principio a fin por lo cual podemos decir que el uso del vacío maximiza la producción de biohidrógeno que se puede obtener de los residuos utilizados en las condiciones dadas, algo que no sucedía durante la producción en botellas (Figura 9) y que tampoco sucede al utilizar el reactor sin el vacío.

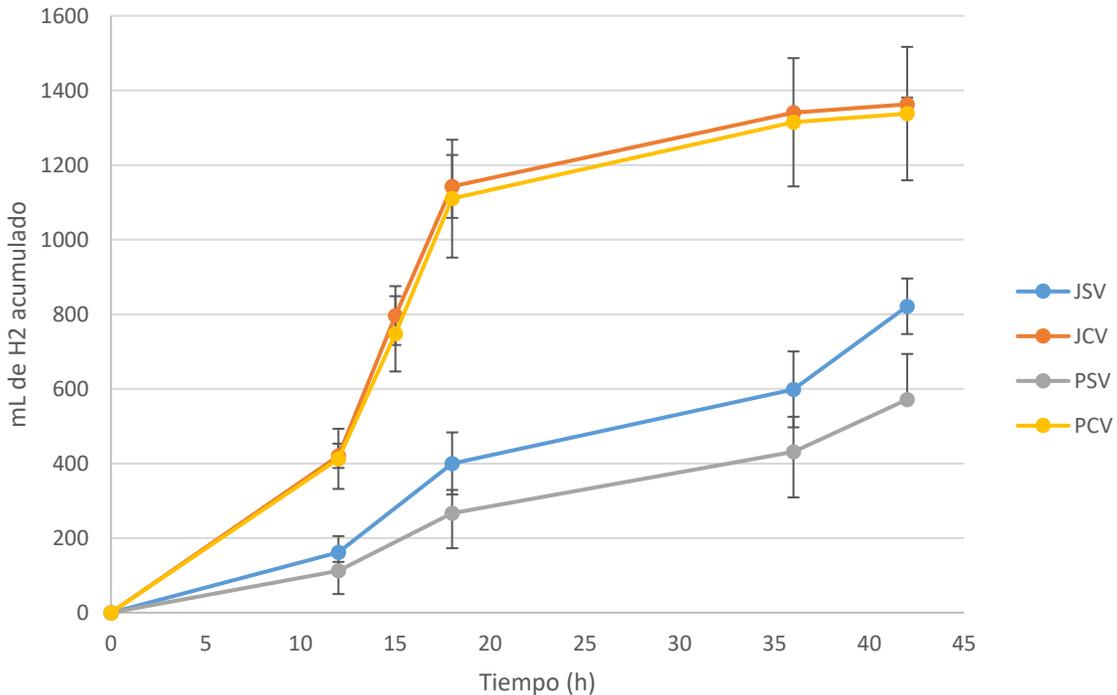


Figura 9. Producción de hidrógeno a partir de los residuos lignocelulósicos. JSV= Jatrofa sin vacío; JCV= Jatrofa con vacío PSV= Paja sin vacío; PCV= Paja con vacío

Durante las cinéticas de producción de biohidrógeno, tanto en botellas como en reactor, no se detectó la producción de metano, esto es de importancia ya que la producción de metano consume biohidrógeno, por lo cual, al no tener metano, estamos asegurando una mayor producción de biohidrógeno; la eliminación de los microorganismos productores de metano se llevó a cabo con el pretratamiento térmico que se le aplicó al lodo, ya que los microorganismos metanogénicos no son esporulantes, por lo cual no pueden sobrevivir al calor aplicado.

En la Tabla 11 podemos observar una comparación de los resultados obtenidos en la producción de biohidrógeno en el reactor CSTR con los obtenidos en otros estudios. Podemos observar una alta producción al comparar con otro tipo de residuos, como la paja de arroz o la paja de salvado, así como también los tallos de girasol; sin embargo, sólo los valores obtenidos con el vacío son mayores a los demás, los resultados obtenidos sin vacío son de normales a bajos.

Tabla 11. Comparación de los resultados obtenidos en el CSTR con la literatura

Sustrato	Inoculo	Condiciones (g/L, °C, pH)	Producción de H ₂	Referencia
Paja de salvado	Lodo activado de industria papelera	100, 36, 7	50.6 (mL/g SSV)	(Pan et al., 2008)
Paja de trigo	Lodo activado anaerobio	60, 35, 6.5	23 (mL/g SSV)	(Chu et al., 2011)
Paja de trigo	<i>Clostridium butyricum</i>	40, 35, 7.2	9 (mL/g sustrato)	(Li et al., 2007)
Rastrojo de maíz	Sedimento de río pretratado	5, 37, 7	0.78 (mmol/L/h)	(Zhang et al., 2014)
Paja de arroz	Lodo anaerobio	90, 55, 6.5	24.8 (mL/ g SST)	(Chen et al., 2012)
Tallos de girasol	Lodo anaerobio	5, 35, 5.5	2.3 (mL/g SSV)	(Monlau et al., 2013)
Paja de trigo	Lodo anaerobio pretratado	10, 37, 5.5 (sin vacío)	37.164 (mL/g sustrato)	Este trabajo
Podas de jatropa	Lodo anaerobio pretratado	10, 37, 5.5 (sin vacío)	48.19 (mL/g sustrato)	Este trabajo
Podas de jatropa	Lodo anaerobio pretratado	10, 37, 5.5 (con vacío)	79.957 (mL/g sustrato)	Este trabajo
Paja de trigo	Lodo anaerobio pretratado	10, 37, 5.5 (con vacío)	87.021 (mL/g sustrato)	Este trabajo

En la Tabla 12 podemos ver que existe una gran producción de AGV's, principalmente de ácido acético, el cual es el de mayor concentración en todos los tratamientos, superando ligeramente las concentraciones de ácido butírico, lo cual coincide con la producción de biohidrógeno, ya que estos ácidos son productos derivados de la fermentación oscura.

Comparando entre tratamientos, el tratamiento con vacío produce una mayor cantidad de acetato y butirato, lo cual se ve traducido en una mayor cantidad de biohidrógeno producido como se pudo ver en la Figura 9.

Tabla 12. Producción de AGV's (mg/L) durante el proceso de fermentación oscura después de 48 horas.

Residuo	Acético	Láctico	Butírico
JSV	4330.666	390.225	3614.159
JCV	5094.488	164.110	4612.567
PSV	3816.771	303.650	2512.579
PCV	7506.024	518.933	7308.490

JSV= Jatrofa sin vacío; JCV= Jatrofa con vacío; PSV= Paja sin vacío, PCV= Paja con vacío

El ácido láctico se produce en mayor cantidad durante la fermentación con podas de jatrofa al no aplicar el vacío, lo cual se correlaciona con una baja en la producción de biohidrógeno, ya que se consume el mismo para la producción de este ácido. En la fermentación realizada con paja de trigo, vemos que se produce más ácido láctico usando el vacío; sin embargo, si tenemos en cuenta las concentraciones de los 3 ácidos, vemos que se produce más del doble de ácido butírico y casi el doble de ácido acético, por lo cual también es de esperar un aumento en la producción de ácido láctico, aunque éste no afecte la producción de biohidrógeno ya que se compensa con las altas producciones de los otros 2 ácidos.

En las cinéticas de producción de biohidrógeno con vacío, el hidrolizado generado de la paja de trigo produce más ácidos que el derivado de las podas de jatrofa con vacío; sin embargo, la producción de biohidrógeno es prácticamente igual debido a la presencia del ácido láctico en mayor cantidad en la fermentación con paja de trigo. En las cinéticas sin vacío, la jatrofa produce más ácidos acético y butírico, sin embargo produce menos ácido láctico, esto se refleja en una mayor producción de biohidrógeno.

5. Conclusiones y Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten responder a la hipótesis formulada, ya que podemos afirmar que el uso del vacío como método de extracción de biohidrógeno durante la fermentación oscura de los residuos lignocelulósicos, sí promueve una mayor producción de biohidrógeno, aumentando los rendimientos y la velocidad específica. Se puede aumentar entre 3 y 4 veces más la producción de biohidrógeno dependiendo del sustrato que se utilice; además, el escalamiento ayuda a acortar los periodos de producción de biohidrógeno.

También, podemos concluir que el uso de podas de jatrofa como sustrato para la producción de biohidrógeno es viable, primeramente debido a los resultados alentadores que se obtuvieron durante la producción de azúcares y posteriormente con los resultados de producción de biohidrógeno, mostrando incluso rendimientos de producción iguales o mayores a los obtenidos con la paja de trigo, la cual es un sustrato ya probado en la producción de biohidrógeno.

Sin embargo, a pesar de estos resultados obtenidos, aún hace falta realizar más investigación para optimizar el uso del vacío como método de mejoramiento de la producción de biohidrógeno.

Entre las perspectivas a futuro del trabajo podemos mencionar:

- Realizar un seguimiento de otros productos reducidos durante la fermentación oscura, como el etanol y el propionato, ya que puede existir la posibilidad de que, al igual que el lactato, se estén produciendo, lo cual estaría disminuyendo nuestros rendimientos.
- Optimizar la producción de biohidrógeno en el reactor para poder aumentar los rendimientos, modificando factores como la temperatura, el pH y la velocidad de agitación.
- Iniciar cinéticas de producción de biohidrógeno en CSTR en continuo, esto debido a que en la industria siempre se usan procesos en continuo o en semicontinuo para ahorrar costos de producción.
- Realizar análisis de costo beneficio, ya que si bien en este trabajo se corroboró que la producción de biohidrógeno aumenta en casi 60%, es importante tener en cuenta si el beneficio que se obtiene de ese excedente producido es redituable al contrastarlo con los costos de la operación del vacío.

6. Referencias

- Adinurani, P. G., Hendroko, S. R., Nindita, A., Wahono, S. K., Maizirwan, M., Sasmito, A., ... Liwang, T. (2015). Characterization of Jatropha Curcas Linn. Capsule Husk as Feedstock for Anaerobic Digestion. *Energy Procedia*, 65, 264–273. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.01.046>
- Akobi, C., Hafez, H., & Nakhla, G. (2016). Bioresource Technology The impact of furfural concentrations and substrate-to-biomass ratios on biological hydrogen production from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic anaerobic digester sludge. *Bioresource Technology*, 221, 598–606. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.067>
- APHA. (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Standard Methods*, 541. <http://doi.org/ISBN 9780875532356>
- Arreola-Vargas, J., Celis, L. B., Buitrón, G., Razo-Flores, E., & Alatríste-Mondragón, F. (2013). Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor : Performance and microbial population analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38.
- Bajpai, P. (2016). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production. *Green Chemistry for Sustainability*. <http://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6>
- Bedoya, A., Ramírez, J. E., Vásquez, J. E., Castrillón, J. C., & Arias, M. (2007). Producción biológica de hidrógeno: Una aproximación al estado del arte. *Dyna*, 75(154), 137–157.
- Blanco Londoño, S. A., & Rodríguez Chaparro, T. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura : una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 20(3), 398–411. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-33052012000300014>
- Brandt, A., Gräsvik, J., Halletta, J. P., & Welton, T. (2013). Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, 15(3), 550–583. <http://doi.org/10.1039/c2gc36364j>
- Bundhoo, M. A. Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-

- hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16), 6713–6733. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- Cai, J., He, Y., Yu, X., Banks, S. W., Yang, Y., Zhang, X., ... Bridgwater, A. V. (2017). Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass, 76(March), 309–322. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.072>
- Carrillo-Reyes, J., Cortés-Carmona, M. A., Bárcenas-Ruiz, C. D., & Razo-Flores, E. (2016). Cell wash-out enrichment increases the stability and performance of biohydrogen producing packed-bed reactors and the community transition along the operation time. *Renewable Energy*, 97, 266–273. <http://doi.org/10.1016/j.renene.2016.05.082>
- Chen, C. C., Chuang, Y. S., Lin, C. Y., Lay, C. H., & Sen, B. (2012). Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15540–15546. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.036>
- Chmielewski, A. G. (2005). Environmental effects of fossil fuel combustion. *Interactions: Energy/Environment*, (January 2005).
- Chong, M., Sabaratnam, V., Shirai, Y., & Ali, M. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3277–3287. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.010>
- Chu, Y., Wei, Y., Yuan, X., & Shi, X. (2011). Bioconversion of wheat stalk to hydrogen by dark fermentation: Effect of different mixed microflora on hydrogen yield and cellulose solubilisation. *Bioresource Technology*, 102(4), 3805–3809. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.092>
- Das, D., & Veziroglu, T. N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046–6057. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>
- Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatríste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., Rosales-Colunga, L. M., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives. *Reviews in Environmental Science and*

- Biotechnology*, 7(1), 27–45. <http://doi.org/10.1007/s11157-007-9122-7>
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., & Yu, Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 812–820. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.031>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <http://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dufour, J., Serrano, D. P., Gálvez, J. L., Moreno, J., & García, C. (2009). Life cycle assessment of processes for hydrogen production . Environmental feasibility and reduction of greenhouse gases emissions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 1370–1376. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.053>
- Fang, H. H. P., & Liu, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 82(1), 87–93. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00110-9](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00110-9)
- García, A., Cara, C., Moya, M., Rapado, J., Puls, J., Castro, E., & Martín, C. (2014). Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Jatropha curcas* fruit shells for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 53, 148–153. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.029>
- García, A., López, Y., Karimi, K., Benítez, A., Lundin, M., Taherzadeh, M., & Martín, C. (2015). Chemical and Physical Characterization and Acid Hydrolysis of a Mixture of *Jatropha Curcas*. *Cellulose Chemistry and Technology*, 49, 737–744.
- García, C., Montero, G., Coronado, M., & Acosta, M. (2013). Potencial energético de la paja de trigo en el valle de Mexicali. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 29, 67–72.
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrre, H., & Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660–10673. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>

- Hallenbeck, P. C. (2009). Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7379–7389. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.080>
- Harmsen, P., Huijgen, W., López, L., & Bakker, R. (2010). Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. *Food and Biobased Research*, (September), 1–49. Retrieved from <http://www.ecn.nl/docs/library/report/2010/e10013.pdf>
- Ibarra De Lira, M. (2018). *Producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos: optimización de la hidrólisis enzimática y efecto de la aplicación de vacío en la fermentación*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- IEA. (2017). *World energy balances: Overview (2017 edition)*.
- Jansen, R. A. (2013). *Second Generation Biofuels and Biomass - Essential Guide for Investors, Scientists and Decision Makers*. <http://doi.org/10.1002/9783527652976>
- Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A. B., Kongjan, P., & Angelidaki, I. (2009). Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 100(9), 2562–2568. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.011>
- Khanna, N., & Das, D. (2013). Biohydrogen production by dark fermentation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*, 2(4), 401–421. <http://doi.org/10.1002/wene.15>
- Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B., & Angelidaki, I. (2010). Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(5), 899–908. <http://doi.org/10.1002/bit.22616>
- Kumar, G., Sen, B., & Lin, C. Y. (2013). Pretreatment and hydrolysis methods for recovery of fermentable sugars from de-oiled Jatropha waste. *Bioresource Technology*, 145, 275–279. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.080>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel

- production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713–3729. <http://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Kumar, R., Sattlewal, A., Sharma, S., Kagdiyal, V., Gupta, R. P., Tuli, D. K., & Malhotra, R. K. (2014). Investigating Jatropha prunings as a feedstock for producing fermentable sugars and chemical treatment for process optimization. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 6(3). <http://doi.org/10.1063/1.4880215>
- Lambert, N. (2012). Study of hydrogenation derived renewable diesel as a renewable fuel option in North America, 1–78.
- Lee, K., Tseng, T., Liu, Y., & Hsiao, Y. (2012). Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen ...*, 37(20), 15556–15562. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.039>
- Lee, K., Wu, J., Lo, Y., Lo, Y., Lin, P., & Chang, J. (2004). Anaerobic Hydrogen Production With an Efficient Carrier-Induced Granular Sludge Bed Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(5), 648–657. <http://doi.org/10.1002/bit.20174>
- Levin, D. B., Pitt, L., & Love, M. (2004). Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), 173–185. [http://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](http://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6)
- Li, C., & Fang, H. H. P. (2007). Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(1), 1–39. <http://doi.org/10.1080/10643380600729071>
- Li, D., & Chen, H. (2007). Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(12), 1742–1748. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.12.011>
- Li, D., & Jiang, H. (2017). Bioresource Technology The thermochemical conversion of non-lignocellulosic biomass to form biochar : A review on characterizations and mechanism elucidation. *Bioresource Technology*.

<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.029>

- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., & Guimarães, V. M. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, 1(1), 44–49. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>
- Makkar, H. P. S., Aderibigbe, A. O., & Becker, K. (1998). Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chemistry*, 62(2), 207–215. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00183-0](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00183-0)
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., & Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*, 73(1), 59–65. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00130-3](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00130-3)
- Monlau, F., Aemig, Q., Trably, E., Hamelin, J., Steyer, J. P., & Carrere, H. (2013). Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(28), 12273–12282. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.018>
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels : A comprehensive review, 14, 578–597. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Nikolaidis, P., & Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67, 597–611. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044>
- Nissilä, M. E., Lay, C. H., & Puhakka, J. A. (2014). Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates - A review. *Biomass and Bioenergy*, 67, 145–159. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.035>
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation : A Review. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), 21–39. <http://doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>
- Pan, C., Fan, Y., & Hou, H. (2008). Fermentative Production of Hydrogen from Wheat Bran by Mixed Anaerobic Cultures. *Industrial & Engineering Chemistry*

- Research*, 47(16), 5812–5818. <http://doi.org/10.1021/ie701789c>
- Panagiotopoulos, I. A., Bakker, R. R., de Vrije, T., Claassen, P. A. M., & Koukios, E. G. (2013). Integration of first and second generation biofuels: Fermentative hydrogen production from wheat grain and straw. *Bioresource Technology*, 128, 345–350. http://doi.org/10.1007/10_2016_11
- Rajhi, H., Puyol, D., Martínez, M. C., Díaz, E. E., & Sanz, J. L. (2016). Vacuum promotes metabolic shifts and increases biogenic hydrogen production in dark fermentation systems. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 10(3), 513–521. <http://doi.org/10.1007/s11783-015-0777-y>
- Ramachandran, R. A. M. (1998). An overview of industrial uses of hydrogen, 23(7), 593–598.
- Ran, H., Zhang, J., Gao, Q., Lin, Z., & Bao, J. (2014). Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–12. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-7-51>
- SAGARPA, & SENASICA. (2012). Información técnica de semilla de *Jatropha curcas* mexicana para exportación, 35.
- SAGARPA, Vélez-Izquierdo, A., Guevara-Hernández, F., Castro-Gómez, H., Ovando-Cruz, J., Hellin, J., ... Hernández-Rodríguez, V. M. (2013). *Rastrojos: Manejo, uso y mercado en el centro y sur de México*.
- Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., & Wu, Y. V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, 40(12), 3693–3700. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.04.006>
- Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337–353. <http://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F. M., & Marchettini, N. (2016). Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66(September 2015), 221–227.

<http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.073>

Saleem Khan, T., & Mubeen, U. (2012). Wheat Straw: A Pragmatic Overview.

Current Research Journal of Biological Sciences, 4(6), 673–675.

SENER. (2016). *Balance Nacional de Energía 2015*.

Sharma, P., & Melkania, U. (2017). Impact of furan derivatives and phenolic compounds on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *E. coli*. *Bioresource Technology*, 239, 49–56. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.113>

Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., & Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 713–728. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.051>

Tumuluru, J. S., Sokhansanj, S., Boardman, R. D., Wright, C. T., Boardman, R. D., & Yancey, N. A. (2014). A Review on Biomass Classification and Composition , Co-Firing Issues and Pretreatment Methods, (August 2011).

<http://doi.org/10.13031/2013.37191>

Vaithanomsat, P., & Apiwatanapiwat, W. (2009). Feasibility study on vanillin production from *Jatropha curcas* stem using steam explosion as a pretreatment. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 3(5), 839–842. Retrieved from

<http://www.waset.org/publications/15930>

Van Niel, E. W. J., Claassen, P. A. M., & Stams, A. J. M. (2003). Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(3), 255–262. <http://doi.org/10.1002/bit.10463>

Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 799–811. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>

Wu, S.-Y., Hung, C.-H., Lin, C.-N., Chen, H.-W., Lee, A.-S., & Chang, J.-S. (2005). Fermentative Hydrogen Production and Bacterial Community Structure in High-Rate Anaerobic Bioreactors Containing Silicone-Immobilized and Self-

Flocculated Sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(5), 934–946.
<http://doi.org/10.1002/bit.20800>

Zhang, K., Ren, N. Q., & Wang, A. J. (2014). Enhanced biohydrogen production from corn stover hydrolyzate by pretreatment of two typical seed sludges. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(27), 14653–14662.
<http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.083>

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42(1), 35–53. <http://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>