



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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

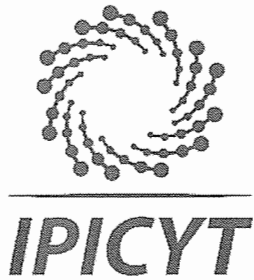
**Producción de hidrógeno en continuo a partir de
hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave
obtenidos con la enzima nacional Cellulase 50 XL**

Tesis que presenta
Cassandra Valencia Ojeda

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Ambientales


Director de la Tesis
Dr. Elías Razo Flores

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2019



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Producción de hidrógeno en continuo a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenidos con la enzima nacional Cellulase 50 XL**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Casandra Valencia Ojeda** y aprobada el veintiséis de agosto del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Elías Razo Flores
Director de la tesis



Dr. Felipe Alatraste Mondragón
Miembro del Comité Tutoral



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



Dr. Luis Alberto Arellano García
Miembro del Comité Tutoral

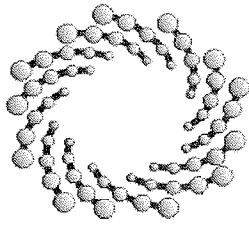


Créditos Institucionales

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (636102) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

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



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 077 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 26 días del mes de agosto del año 2019, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Felipe Alatraste Mondragón	Presidente	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Secretaria	IPICYT
Dr. Elías Razo Flores	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Casandra Valencia Ojeda

sobre la Tesis intitulada:

Producción de hidrógeno en continuo a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenidos con la enzima nacional Cellulase 50 XL

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Elías Razo Flores

El Jurado, después de deliberar, determinó

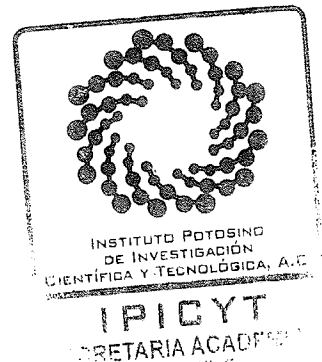
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 26 días del mes de agosto de 2019.

Dr. Marcial Bonifá Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



A mis padres.

A mi hermana.

A los amigos de siempre.

A los nuevos amigos.

A todos los que creyeron en mí, gracias.

Agradecimientos

A mi director de tesis, el Dr. Elías Razo Flores por aceptarme en su grupo de trabajo y brindarme su guía, confianza y apoyo incondicional durante la realización de este proyecto. A mi comité tutorial, la Dra. Berenice Celis García, el Dr. Felipe Alatraste Mondragón y el Dr. Luis Arellano García por sus invaluable consejos y orientación.

A los técnicos académicos, M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, M. en C. Juan Pablo Rodas Ortíz, M. en C. Karen Lizeth Galindo Hernández y Lic. Mario Delgado Cardozo por su gran ayuda y apoyo técnico.

A la Dra. Virginia Montiel Corona por su dedicación, tiempo y paciencia durante mi capacitación y al Dr. Rodolfo Palomo Briones por sus valiosos comentarios que enriquecieron de gran manera mi trabajo.

A todo el equipo de trabajo del Clúster Biocombustibles Gaseosos, en especial a Jesús, Paulina, Daniel, Aida e Irma por siempre brindarme su ayuda y motivación durante esta etapa.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Tabla de contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Producción de hidrógeno.....	1
1.2. Fermentación oscura.....	1
1.2.1. Rutas metabólicas en la fermentación oscura	2
1.3. Biomasa lignocelulósica	4
1.4. Sacarificación	5
1.4.1. Enzimas comerciales	7
1.5. Producción de hidrógeno en reactores continuos	9
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVO	11
2.1. Justificación.....	11
2.3. Hipótesis.....	12
2.4. Objetivo general	12
2.5. Objetivos específicos	12

3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Bagazo de agave y acondicionamiento	14
3.2. Sacarificación	14
3.2.1. Hidrólisis con la enzima individual	14
3.2.2. Hidrólisis con la mezcla enzimática	15
3.3. Inóculo.....	15
3.4. Medio mineral.....	15
3.5. Operación del reactor	16
3.6. Evaluación del desempeño del CSTR.....	18
3.7. Métodos analíticos	18
3.8. Análisis estadísticos	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. Hidrólisis enzimática.....	20
4.2. Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos con la enzima individual.....	25
4.3. Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos con mezclas enzimáticas.	31
4.4. Efecto de la carga orgánica en la VVPH y el REH	40
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	45
5.1. Conclusiones.....	45
5.2. Perspectivas.....	46
REFERENCIAS.....	47
ANEXOS	51

Lista de tablas

Tabla 1. Producción de hidrógeno en reactores CSTR empleando hidrolizados de biomasa lignocelulósica.	10
Tabla 2. Condiciones de operación del CSTR alimentado con hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave a un TRH de 6 h.	17
Tabla 3. Ecuaciones para evaluar el desempeño del reactor.	19
Tabla 4. Hidrolizados de bagazo de agave obtenidas con diferentes preparaciones enzimáticas.	23
Tabla 5. Desempeño del CSTR alimentado con hidrolizados obtenidos con la enzima individual Cellulase 50 XL en la producción de H ₂ y metabolitos en los estados estables de cada periodo operacional.	28
Tabla 6. Balance de electrones de días específicos de los estados estables del CSTR empleando los hidrolizados a partir de la enzima individual Cellulase 50 XL.	31
Tabla 7. Desempeño del CSTR alimentado con hidrolizados obtenidos con las mezclas enzimáticas Cellulase 50 XL - Viscozyme L en la producción de H ₂ y metabolitos en los estados estables de cada periodo operacional.	35
Tabla 8. Balance de electrones de días específicos de los estados estables del CSTR empleando los hidrolizados a partir de la mezcla enzimática	39
Tabla 9. Producción de hidrógeno en continuo a partir de hidrolizados de bagazo de agave en reactores CSTR.	42

Lista de figuras

Figura 1. Principales rutas metabólicas presentes durante la fermentación oscura.	3
Figura 2. Hidrólisis enzimática de la celulosa y hemicelulosa	7
Figura 3. Esquema del reactor CSTR.	16
Figura 4. Cinética de la sacarificación del bagazo de agave obtenida con la enzima Cellulase 50 XL en función de los AT y la DQO soluble.	20
Figura 5. Cinética de la sacarificación del bagazo de agave obtenida con la Mezcla 1 (Cellulase 50 XL - Viscozyme L) en función de los AT y la DQO soluble.	22
Figura 6. Cinética de la sacarificación del bagazo de agave obtenida con la Mezcla 2 (Cellulase 50 XL - Viscozyme L) en función de los AT y la DQO soluble.	22
Figura 7. Desempeño del CSTR durante los distintos periodos de operación empleando los hidrolizados obtenidos con la enzima individual Cellulase 50XL.	25
Figura 8. Desempeño en el porcentaje de remoción de azúcares y velocidad de consumo de azúcares empleando los hidrolizados obtenidos con la enzima individual Cellulase 50 XL.	27
Figura 9. Balance de electrones para los estados estables del CSTR empleando los hidrolizados a partir de la enzima individual Cellulase 50 XL.	30
Figura 10. Desempeño del CSTR durante los distintos periodos de operación empleando los hidrolizados obtenidos con las mezclas enzimáticas de Cellulase 50 XL – Viscozyme L.	33
Figura 11. Desempeño en el porcentaje de remoción de azúcares y velocidad de consumo de azúcares empleando los hidrolizados obtenidos con la mezcla enzimática Cellulase 50 XL - Viscozyme L.	34

Figura 12. Balance de electrones para los estados estables del CSTR empleando los hidrolizados a partir de la mezcla enzimática Cellulase 50 XL - Viscozyme L.	38
Figura 13. Diagrama de cajas que muestra el efecto de la COV en la VVPH y el REH en el CSTR empleando los hidrolizados obtenidos con la enzima individual del experimento 1.	40

Abreviaturas

AFBR	Reactor anaerobio de lecho fluidificado
AGVs	Ácidos grasos volátiles
AT	Azúcares totales
CO ₂	Dióxido de carbono
COV	Carga orgánica volumétrica
CSTR	Reactor continuo de tanque agitado
DQO	Demanda química de oxígeno
H ₂	Hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
MBR	Biorreactor de membrana
N ₂	Nitrógeno
REH	Rendimiento específico de producción de hidrógeno
RMH	Rendimiento molar de hidrógeno
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente con manto de lodos
VVPH	Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno

Resumen

El bagazo de agave es un residuo lignocelulósico que puede ser utilizado como sustrato para la producción de hidrógeno (H_2). Sin embargo, debido a su estructura compleja, es necesario someterlo a un proceso de sacarificación para incrementar la disponibilidad de los carbohidratos. Esto es posible por medio de hidrólisis enzimática. Una amplia variedad de enzimas comerciales ha sido evaluada en la sacarificación de bagazo de agave y otros residuos lignocelulósicos, principalmente enzimas de importación, lo cual puede incidir en el costo de producción de H_2 . En este trabajo se investigó la viabilidad de la producción de H_2 en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR por sus siglas en inglés) usando como sustrato hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenidos con la enzima nacional Celulase 50 XL de manera individual y en mezcla binaria con la enzima de importación Viscozyme L. En el experimento 1 del trabajo se evaluó la producción de H_2 a partir de hidrolizados preparados con la enzima Cellulase 50 XL de manera individual, obteniéndose una velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) máxima de 9.9 ± 0.03 L H_2 /L-d, a una carga orgánica volumétrica (COV) de 100 g DQO/L-d. Dicho valor es similar a la VVPH más alta reportada a la fecha para la producción de H_2 en continuo a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave. Mientras que el rendimiento específico de hidrógeno (REH) máximo fue de 32.5 ± 0.1 L H_2 /kg bagazo también a la COV de 100 g DQO/L-d. Por otro lado, en el experimento 2 se evaluó la producción de H_2 a partir de dos tipos de hidrolizados preparados con una mezcla binaria de Cellulase 50 XL y Viscozyme L a diferentes condiciones de hidrólisis (Mezcla 1 y Mezcla 2), obteniéndose una VVPH de 4.6 ± 0.04 L H_2 /L-d a una COV de 60 g DQO/L-d con un REH de 32.9 ± 0.3 L H_2 /kg bagazo, y de 4.1 ± 0.03 L H_2 /L-d a una COV de 70 g DQO/L-d con un REH de 22.5 ± 0.1 L H_2 /kg bagazo para la Mezcla 1 y Mezcla 2, respectivamente. En conclusión, los resultados mostraron que la utilización de los hidrolizados obtenidos con la enzima de manera individual son la mejor alternativa en la sacarificación de bagazo de agave para la producción de H_2 frente a las mezclas enzimáticas probadas.

Palabras clave: sacarificación, bagazo de agave, hidrógeno, CSTR.

Abstract

Agave bagasse is a lignocellulosic residue that can be used as substrate to produce hydrogen (H_2). However, due to its complex structure, it needs to undergo a saccharification process to increase the availability of carbohydrates. Enzymatic hydrolysis is what makes this possible. A wide diversity of commercial enzymes has been used in the saccharification of agave bagasse and other lignocellulosic residues, mainly imported enzymes, which can affect the cost of H_2 production. In this work, the feasibility of H_2 production in a continuous stirred tank reactor (CSTR) was investigated using enzymatic hydrolysates of agave bagasse as substrate, obtained with the national enzyme Cellulase 50 XL both individually and in combination with the imported enzyme Viscozyme L. In the stage 1 of this work, H_2 production was evaluated from hydrolysates prepared with Cellulase 50XL alone, obtaining a maximum volumetric H_2 production rate (VHPR) of 9.9 ± 0.03 L H_2 /L-d at an organic loading rate (OLR) of 100 g COD/L-d. Such value was quite similar to the highest VHPR reported for continuous H_2 production from enzymatic hydrolysates of agave bagasse up to date. On the other hand, a maximum specific hydrogen yield (SHY) of 32.5 ± 0.10 L H_2 /kg bagasse was obtained also at the OLR of 100 g COD/L-d. In contrast, in stage 2, H_2 production was evaluated using two types of hydrolysates prepared with a binary mixture of Cellulase 50XL and Viscozyme L at different hydrolysis conditions (Mixture 1 and Mixture 2), obtaining a VHPR of 4.6 ± 0.04 L H_2 /L-d at an OLR of 60 g COD/L-d with a SHY of 32.9 ± 0.3 L H_2 /kg bagasse, and a VHPR of 4.1 ± 0.03 L H_2 /L-d at an OLR of 70 g COD/L-d with a SHY of 22.5 ± 0.1 L H_2 /kg bagasse, for Mixture 1 and Mixture 2, respectively. In conclusion, the results showed that the use of hydrolysates obtained with the individual enzyme were a better alternative in the saccharification of agave bagasse for H_2 production compared to the enzymatic mixtures tested.

Key words: saccharification, agave bagasse, hydrogen, CSTR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Producción de hidrógeno

El hidrógeno (H_2) es una alternativa viable a la utilización de combustibles convencionales, debido a que posee un alto contenido energético de 122 kJ/g y puede utilizarse directamente en un motor de combustión interna o en celdas de combustible para la generación de energía. Además, es considerado una fuente de energía limpia debido a que no produce emisiones de dióxido de carbono (CO_2), generando únicamente agua durante su combustión (Das y Veziroglu, 2008; Kapdan y Kargi, 2006). Convencionalmente, el hidrógeno es producido a partir de métodos termoquímicos que involucran la utilización de combustibles fósiles, no obstante, también puede ser producido mediante procesos biológicos, con la ventaja de que se pueden utilizar fuentes de energía renovables y se requiere un menor consumo energético (Manish y Banerjee, 2008).

Los procesos biológicos para la producción de hidrógeno pueden ser divididos en dos categorías, aquellos que requieren de luz (fotólisis directa e indirecta y fotofermentación) y en aquellos que no la requieren (fermentación oscura). La producción fotodependiente implica la transformación de energía solar a hidrógeno por microalgas o bacterias fotosintéticas, sin embargo, su aplicación en la práctica es complicada por la baja eficiencia de conversión y las dificultades en los diseños de los reactores. Por otra parte, la fermentación oscura resulta ser una opción más atractiva, teniendo una operación más simple, una tasa de producción de hidrógeno más alta y la capacidad de utilizar diversos desechos orgánicos como sustrato (Show et al., 2012; Wang y Wan, 2009).

1.2. Fermentación oscura

Para la producción de hidrógeno por fermentación oscura se utilizan dos tipos de inóculos: (1) cultivos mixtos de bacterias anaerobias obtenidas a partir de digestores, composta y suelos, y (2) cultivos puros de especies productoras de hidrógeno, siendo las pertenecientes a *Clostridium* y *Enterobacter* las más ampliamente utilizadas (Davila-Vazquez et al., 2008b; Wang y Wan, 2009). En los

sistemas de cultivos puros es posible detectar con mayor facilidad los cambios metabólicos debido a la menor diversidad en la biomasa, y pueden revelar información importante sobre las condiciones necesarias para obtener un alto rendimiento de hidrógeno y aumentar la tasa de producción (Elsharnouby et al., 2013). A pesar de ello, se prefiere usar reactores con cultivos mixtos, ya que permiten emplear una mayor variedad de sustratos, son más baratos de mantener y más fáciles de controlar, además de que no es rentable mantener el sistema estéril cuando se utilizan residuos como materia prima (Wang y Yin, 2017).

La desventaja principal de los sistemas de cultivos mixtos es la proliferación de microorganismos que consumirán eventualmente el hidrógeno producido, como metanógenos y/o homoacetógenos, disminuyendo así el rendimiento del sistema (Carrillo-Reyes et al., 2014). Con el fin de inhibir a los consumidores de hidrógeno y enriquecer a las bacterias que lo producen, se han estudiado diversos métodos de pretratamiento del inóculo, como el choque térmico, tratamientos químicos, aeración, congelación y descongelación, entre otros. No obstante, existe un desacuerdo sobre cuál método es el más efectivo, debido posiblemente a la variación de las condiciones de fermentación de cada experimento (Wang y Wan, 2009; Wang y Yin, 2017).

1.2.1. Rutas metabólicas en la fermentación oscura

La producción de hidrógeno por medio de la fermentación oscura se lleva a cabo por el metabolismo anaerobio del piruvato. Los azúcares simples como la glucosa son metabolizados a piruvato por medio de la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (también conocida como glicolisis). El piruvato obtenido es transformado en acetil coenzima A, y el hidrógeno se genera a partir del formiato (vía formiato hidrógeno liasa) o por la ferredoxina reducida (Fe_{red}) (Figura 1) dependiendo de los microorganismos presentes en el sistema. Además, según sea el producto final de la fermentación, existe un rendimiento teórico de 2 o 4 moles de H_2 por mol de glucosa consumida, dependiendo si el producto final de la fermentación corresponde a butirato o acetato, respectivamente (Hallenbeck, 2005).

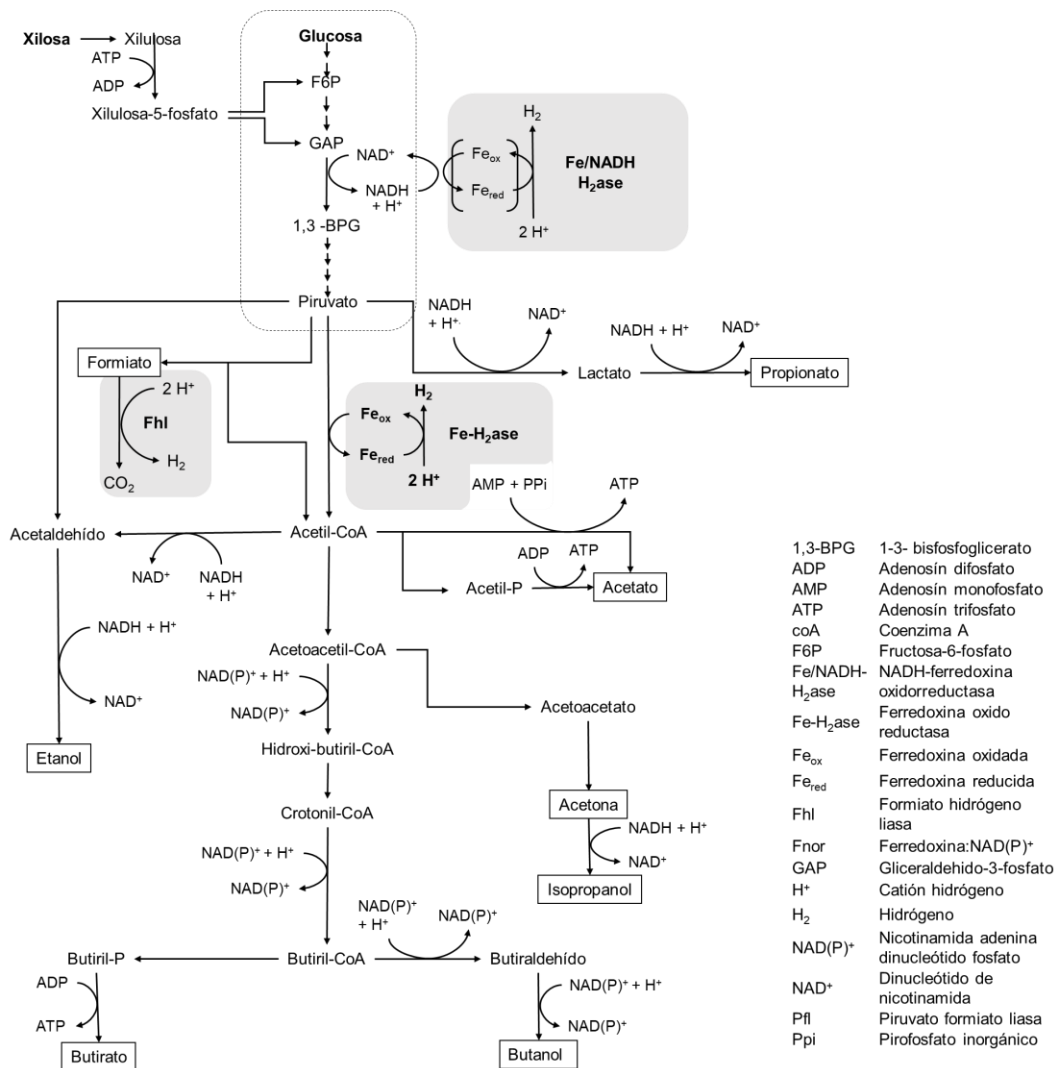


Figura 1. Principales rutas metabólicas presentes durante la fermentación oscura. La glicólisis se muestra dentro del recuadro con las líneas punteadas. En sombreado gris se presenta la producción de hidrógeno. Modificada de Mazzoli (2012).

No obstante, los rendimientos de H₂ obtenidos en la práctica son por lo general más bajos al rendimiento teórico, debido a la presencia de otras rutas metabólicas, como la producción de ácidos, alcoholes y cetonas, que compiten con las rutas de producción de H₂, o que requieren del consumo de hidrógeno para su formación (Figura 1). En este aspecto, la formación de cada producto final dependerá de condiciones operacionales (pH, temperatura, tiempo de retención hidráulico (TRH),

entre otros), el tipo de sustrato utilizado y las características de los consorcios microbianos dentro del sistema de fermentación (Mazzoli, 2012; Shen Lee et al., 2014).

1.3. Biomasa lignocelulósica

Gran parte de los estudios reportados en la literatura han investigado la producción de hidrógeno por fermentación oscura a partir de azúcares puros, siendo los más utilizados la glucosa, sacarosa, y lactosa. La desventaja principal de la utilización de carbohidratos puros es que son muy caros para ser empleados en la producción a escala industrial de hidrógeno, que sólo puede ser económicamente viable cuando se basa en la utilización de recursos renovables de bajo costo como la biomasa (Elsharnouby et al., 2013; Show et al., 2012). El uso de biomasa proveniente de residuos lignocelulósicos resulta ser una excelente opción ya que es un material abundante, cuya producción mundial supera los 220,000 millones de toneladas por año, tiene un alto contenido de carbohidratos y no compete con materia prima destinada a alimento (Łukajtis et al., 2018; Monlau et al., 2014).

La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa, y lignina, junto con componentes menores como cenizas, pectinas, proteínas y azúcares solubles (Monlau et al., 2014). La celulosa es un polímero lineal de glucosa formado por unidades de celobiosa unidas por enlaces glicosídicos β -(1-4), las cadenas de celulosa se encuentran empacadas en microfibrillas que se unen entre sí por medio de la hemicelulosa, así como por otros polímeros como las pectinas. Finalmente, esta estructura se encuentra cubierta por lignina, la fracción de más difícil degradación, que se encarga de impartir soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano. La presencia de lignina es uno de los inconvenientes en el uso de los materiales lignocelulósicos como materia prima para la fermentación, siendo que cuanto mayor sea la proporción de lignina, mayor será la resistencia a la degradación química y enzimática, por lo que se requiere de un pretratamiento

que permita que el proceso de hidrólisis de la fracción de carbohidratos se lleve a cabo rápidamente y con altos rendimientos (Kumar et al., 2009; Taherzadeh y Karimi, 2008).

En este aspecto, el bagazo de agave es un desecho lignocelulósico generado por la industria tequilera en México, con potencial para ser utilizado como sustrato para la producción de hidrógeno tal como lo han reportado diversos autores (Arreola-Vargas et al., 2016a; Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona y Razo-Flores, 2018; Montoya-Rosales et al., 2019). En el 2018 el consumo de agave se estimó en 1,138,800 toneladas (Consejo Regulador del Tequila. 2019), de las cuales aproximadamente 40% son convertidos en bagazo (Arreola-Vargas et al., 2016a). Este material alcanza hasta 60% de azúcares fermentables debido a su alto contenido de carbohidratos y bajo contenido en lignina; alrededor de 43% de celulosa, 19% de hemicelulosa y 15% de lignina en peso seco (Caspeta et al., 2014).

1.4. Sacarificación

La hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa es el primer paso para la producción de hidrógeno, sin embargo, la hidrólisis directa de los materiales lignocelulósicos no es muy efectiva debido a la alta estabilidad de estos materiales contra el ataque enzimático o bacteriano (Taherzadeh y Karimi, 2008). Como ya se mencionó anteriormente, es necesario la aplicación de un proceso de pretratamiento que permita la remoción de la lignina, la reducción de la cristalinidad de la celulosa y/o el incremento de la porosidad del material. Además, el pretratamiento debe cumplir con ciertos requisitos como mejorar la formación de azúcares, evitar la degradación o pérdida de carbohidratos, evitar la formación de subproductos inhibitorios y ser costo efectivo (Kumar et al. 2009) .

Una vez que la celulosa y hemicelulosa se encuentran disponibles es posible llevar a cabo el proceso de sacarificación. Entre las técnicas utilizadas para este proceso, la utilización de ácido diluido ha demostrado ser altamente efectiva para

la despolimerización de ambas fracciones de carbohidratos, no obstante, dependiendo de la severidad de las condiciones de la hidrólisis, este método liberará subproductos tóxicos, tales como compuestos fenólicos y furánicos que pueden resultar inhibitorios, por lo que la utilización de la hidrólisis enzimática es una opción atractiva (Arreola-Vargas et al., 2016a).

La hidrólisis enzimática es catalizada por dos grupos de enzimas extracelulares: las celulasas y las hemicelulasas (Figura 2). La eficacia de la hidrólisis de la fracción celulósica dependerá de la acción sinérgica de un sistema enzimático compuesto por al menos tres clases de enzimas, que incluyen: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Las primeras son las responsables de iniciar la hidrólisis mediante la escisión aleatoria de enlaces internos en la celulosa con la producción de oligosacáridos de diferentes tamaños, lo que hace que se generen nuevos extremos accesibles a las exoglucanasas que actúan eliminando unidades de celobiosa de los extremos de la molécula. Por último, las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa a glucosa, controlando la velocidad global de la hidrólisis. Por otro lado las hemicelulasas se componen principalmente de xilanasas como las endo- β -1,4-xilanasas que escinden residuos de la cadena principal de la hemicelulosa, reduciendo el grado de polimerización, y las β -xilosidasas que hidrolizan externamente la estructura del xilano y los pequeños xilooligosacáridos en xilosa (Garcia et al., 2018).

Resulta importante mencionar que, dentro de las ventajas que presenta el bagazo de agave para la aplicación de la hidrólisis enzimática, durante el proceso de producción de tequila la piña del agave es sometida a un tratamiento de cocción y molienda, lo que permite la aplicación de una hidrólisis directa tal como ha sido reportado por diversos autores (Arreola-Vargas et al., 2016a; Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona y Razo-Flores, 2018).

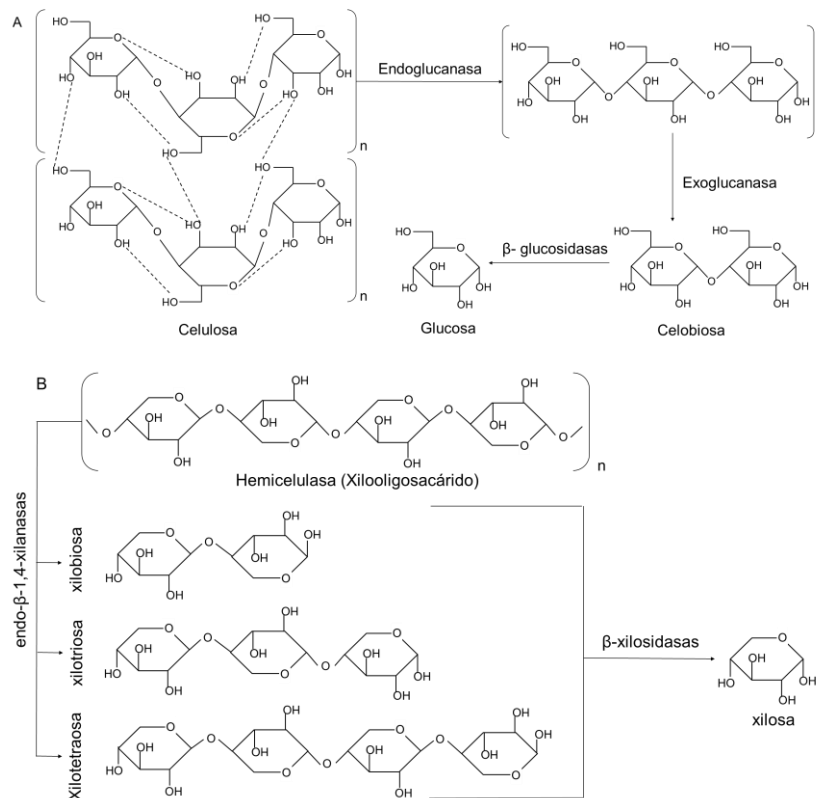


Figura 2. Hidrólisis enzimática de la celulosa y hemicelulosa. (A) Actividad enzimática de las celulasas y (B) actividad enzimática de las hemicelulasas. Modificado de Tanthapanichakoon y Jian (2012).

1.4.1. Enzimas comerciales

En la actualidad existe una amplia variedad de enzimas comerciales con actividades celulolítica y hemicelulolítica que pueden ser utilizadas en el tratamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de biocombustibles. Una de las más reportadas en la literatura es Celluclast 1.5 L de la compañía danesa Novozyme, esta enzima con actividad celulolítica ha sido utilizada para la hidrólisis de distintos materiales, como es el caso de bagazo de agave, donde se han obtenido rendimientos de sacarificación de 0.15 a 0.30 g de azúcares totales (AT) por g de bagazo (Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona y Razo-Flores, 2018), siendo estos resultados similares a los reportados para hidrolizados de paja de avena con la misma enzima, de entre 0.18 y 0.28 g de AT/g de paja de avena (Gomez-Tovar et al., 2012).

Un punto importante a tomar en cuenta es que, a pesar de que en los trabajos anteriormente mencionados se ha utilizado únicamente una enzima con actividad celulasa, diversos estudios han demostrado que la adición de hemicelulasas mejora el rendimiento en la obtención de azúcares fermentables (Ask et al., 2012; Galindo-Hernández et al., 2018; Hu et al., 2011), por lo que existe interés en evaluar la acción enzimática conjunta de las celulasas y hemicelulasas. Tal es el caso del trabajo de Montoya-Rosales et al. (2019), en el que se utilizó una mezcla enzimática de Celluclast 1.5 L junto con la enzima Viscozyme L (enzima con actividad hemicelulasa de Novozyme) para aumentar los rendimientos en la sacarificación del bagazo de agave para la producción de hidrógeno, obteniendo 0.25 g de AT/g de bagazo.

Una limitante de los estudios realizados en México sobre producción de biocombustibles a partir de hidrolizados enzimáticos de biomasa lignocelulósica, tanto para bagazo de agave como para otros materiales, es que las enzimas comerciales utilizadas son de importación, lo cual puede aumentar el costo de la producción de H₂ y hacer más difícil la adquisición de la enzima. Actualmente existen enzimas nacionales que, aunque tienen diferentes aplicaciones a la hidrólisis de biomasa lignocelulósica, podrían ser utilizadas en la sacarificación de las fibras de bagazo de agave. Un ejemplo de ello es que en el trabajo anteriormente mencionado de Montoya-Rosales et al. (2019), se probó también la enzima comercial nacional Stonezyme con actividad celulolítica y hemicelulolítica de la empresa ENMEX, como una alternativa para las enzimas de importación, obteniendo rendimientos entre 0.20 y 0.23 g de AT por gramo de bagazo, lo que se traduce en un costo de producción por gramo de AT de entre \$ 2.14 y \$ 2.48 MN, siendo esto aproximadamente cuatro veces menor que el costo de producción por gramo de AT obtenido con la mezcla enzimática Celluclast 1.5 L - Viscozyme L de entre \$ 8.34 y \$ 9.68 MN.

Además de Stonezyme, otra enzima nacional con actividad celulasa llamada Cellulase 50 XL producida por la empresa ENZIQUM, también ha sido utilizada en

la sacarificación del bagazo de agave, obteniéndose rendimientos de sacarificación de 0.13 g de AT/g de bagazo, y ha sido probada para la producción de hidrógeno y metano en lote (Tapia-Rodríguez et al., 2019). Sin embargo, al momento no existe información al respecto de su utilización para la producción de H₂ en continuo.

1.5. Producción de hidrógeno en reactores continuos

La mayoría de los estudios sobre fermentación oscura se han llevado a cabo en lote debido a su fácil operación y control, lo que permite la investigación preliminar para la selección de las condiciones óptimas para la producción de hidrógeno. Sin embargo, operaciones a escala industrial requieren de un proceso de producción continua por razones prácticas. Entre las configuraciones de reactor más comúnmente utilizadas para la producción continua de hidrógeno se encuentran: reactor continuo de tanque agitado (CSTR), reactor anaerobio de flujo ascendente con manto de lodos (UASB), reactor anaerobio de lecho fluidificado (AFBR) y biorreactor de membrana (MBR), siendo el CSTR el más ampliamente usado (Łukajtis et al., 2018; Wang y Wan, 2009).

Los reactores CSTR presentan diversas ventajas como un diseño simple, fácil ajuste de las condiciones de operación, agitación que facilita las condiciones homogéneas del medio permitiendo un control efectivo de la temperatura y el pH dentro del reactor, y proporcionan un buen contacto de los microorganismos con el sustrato (Łukajtis et al., 2018). Además, la agitación permite mejorar la transferencia del H₂ disuelto de la fase líquida a la fase gas del reactor, lo cual puede reducir la homoacetogenesis y aumentar el rendimiento de la producción de hidrógeno (Montiel Corona y Razo-Flores, 2018). En contrasentido, el reactor también tiene una serie de inconvenientes ya que la concentración de biomasa se ve limitada debido a que su tiempo de retención de sólidos es idéntico al tiempo de retención hidráulico (TRH), por lo que puede ocurrir el lavado de la biomasa a TRH menores a 6 horas, resultando así en una disminución en las tasas de producción de hidrógeno (Davila-Vazquez et al., 2009).

Cabe mencionar que a pesar de que el CSTR es ampliamente utilizado para la producción de H₂ en continuo con sustratos simples, son pocos los estudios que utilizan hidrolizados obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica. En la Tabla 1 se muestra una recopilación de distintos trabajos realizados con hidrolizados a partir de sustratos lignocelulósicos, principalmente de bagazo de agave, observándose para éste sustrato velocidades volumétricas de producción de hidrógeno (VVPH) de entre 2.2 y 12.9 L H₂/L-d a cargas orgánicas volumétricas (COV) de entre 44 y 100 g demanda química de oxígeno (DQO)/L-d, correspondiendo la velocidad más alta a la utilización de la mezcla enzimática Celluclast 1.5 L - Viscozyme L.

Tabla 1. Producción de hidrógeno en reactores CSTR empleando hidrolizados de biomasa lignocelulósica.

Sustrato	Tipo de hidrólisis	TRH (h)	COV (g DQO/L-d)	VVPH (L H ₂ /L-d)	Referencia
Bagazo de Agave	Enzimática (Celluclast 1.5 L)	6	52.2	2.53	Contreras-Dávila et al., 2017
Bagazo de Agave	Enzimática (Celluclast 1.5 L)	6	44	6	Montiel Corona y Razo-Flores, 2018
Bagazo de Agave	Enzimática (Celluclast 1.5 L - Viscozyme L)	6	90	12.9	Montoya-Rosales et al., 2019
Bagazo de Agave	Enzimática (Stonezyme)	6	100	2.2	Montoya-Rosales et al., 2019
Paja de trigo	Enzimática (Cellic CTec - Cellic HTech)	6.7	70.3	5.19	Pawar et al., 2013
Pasto	Alcalina	18	67*	0.65	Massanet-Nicolau et al., 2015

* g sólidos volátiles/L-d

TRH: tiempo de retención hidráulico, COV: carga orgánica volumétrica, DQO: demanda química de oxígeno, VVPH: velocidad volumétrica de producción de hidrógeno.

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVO

2.1. Justificación

La industria tequilera en México utilizó en el 2018 un aproximado de 1,138,800 toneladas de agave (Consejo Regulador del Tequila, 2019), lo cual generó un estimado de 455,000 toneladas de bagazo, implicando una gran cantidad de residuos que deben ser procesados. Debido a su composición, el bagazo de agave es un material lignocelulósico con alto potencial para la producción de biocombustibles (Caspeta et al. 2014), destacando la producción de hidrógeno por medio de fermentación oscura. Una limitante en el uso de la biomasa lignocelulósica es que, antes de su utilización por los microorganismos, se requiere la hidrólisis de sus azúcares constituyentes, por lo que es necesario someter la lignocelulosa a un pretratamiento y una sacarificación. En este aspecto el bagazo de agave presenta ventajas frente a otros residuos lignocelulósicos ya que, debido a los procesos físicos y térmicos que sufre el agave durante la manufactura del tequila, se considera que las fibras quedan acondicionadas y es posible realizar una sacarificación directa sin la necesidad de un pretratamiento (Arreola-Vargas et al. 2016).

Actualmente existen pocos reportes sobre la utilización de hidrolizados de bagazo de agave en la producción de hidrógeno en continuo, y lo que es aún menos frecuente, son los estudios que utilicen mezclas enzimáticas en la hidrólisis (Arreola-Vargas et al., 2016b; Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona y Razo-Flores, 2018; Montoya-Rosales et al., 2019), lo que podría aumentar el rendimiento en la liberación de azúcares, impactando directamente tanto en la VVPH como en el rendimiento molar de hidrógeno (RMH), y por ende en el costo global del proceso. Aunado a esto, a la fecha sólo existe un estudio que ha reportado la producción continua de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave utilizando enzimas de origen nacional, las cuales podrían ser obtenidas a un menor precio y tener una mayor disponibilidad que aquellas de origen extranjero (Montoya-Rosales et al., 2019). En cuanto a las configuraciones de

reactor utilizadas en estos estudios, el uso del reactor CSTR ha demostrado una fácil operación, un buen desempeño y altos valores de VVPH.

Por lo anterior, es importante la realización de estudios que evalúen la capacidad de producción de hidrógeno del CSTR utilizando como sustrato hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenidos con distintas mezclas enzimáticas, haciendo énfasis en aquellas de origen nacional, que permitan comparar los resultados de producción de hidrógeno con trabajos similares. Esto con el fin de establecer las condiciones óptimas de hidrólisis y operación que resulten en maximizar la capacidad de producción de hidrógeno del sistema y permitan disminuir los costos de producción.

2.3. Hipótesis

La utilización de hidrolizados de bagazo de agave obtenidos de la mezcla enzimática con actividad celulasa (Cellulase 50 XL) y hemicelulasa (Viscozyme L) permitirá una mayor producción de hidrógeno en continuo, debido a que producen una mayor cantidad de azúcares fermentables en comparación a los hidrolizados obtenidos cuando se utiliza un solo tipo de enzima.

2.4. Objetivo general

Evaluar los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos con una celulasa individual (Cellulase 50 XL) y la mezcla enzimática de ésta con una hemicelulasa (Viscozyme L) como sustratos en la producción continua de hidrógeno en un CSTR.

2.5. Objetivos específicos

- Caracterizar los hidrolizados obtenidos de la enzima individual y la mezcla enzimática en términos de demanda química de oxígeno y azúcares totales.
- Estudiar el efecto de la carga orgánica volumétrica en la producción de hidrógeno en el reactor CSTR alimentado con hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenidos de la enzima individual y la mezcla enzimática.

- Realizar un análisis de costo de la producción de hidrógeno en función de los dos hidrolizados obtenidos.
- Comparar los resultados obtenidos con otros estudios de producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Bagazo de agave y acondicionamiento

El bagazo de agave fresco fue proporcionado por la empresa Casa Herradura™ (Amatitán, Jalisco). Se secó a temperatura ambiente y se molió con un molino de cuchillas a un tamaño de fibra entre 0.5 y 4.0 cm. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con agua potable con una duración de 1 hora cada uno y se secó a temperatura ambiente por 3 días. Finalmente, el bagazo se tamizó con una malla No. 18 con una apertura de 2 mm.

3.2. Sacarificación

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en un reactor de vidrio con un volumen de trabajo de 10 L (modelo U1 TPLC/FAM-10000, Prendo, Puebla, México), integrado con un agitador vertical helicoidal y con control manual de agitación. La temperatura fue controlada empleando un recirculador de agua integrado a dicho reactor (modelo Techne FTE10DPC, Bibby Scientific, Stone Staffordshire, Reino Unido). Al terminar la hidrólisis enzimática los hidrolizados obtenidos se filtraron con una coladera de malla fina comercial (Plásticos Terrones, Ciudad de México, México) para eliminar las fibras de bagazo y, posteriormente, con una franela blanca 100% algodón para eliminar el exceso de sólidos. La fracción líquida se almacenó a 4°C por no más de 5 días hasta su utilización.

3.2.1. Hidrólisis con la enzima individual

La hidrólisis enzimática se realizó dispersando 87.57 g de bagazo tamizado por litro de buffer de citrato (50 mM a pH 6.0). La enzima Cellulase 50 XL (ENZIQUIM™, México) fue adicionada a una concentración de 0.53 mg de proteína/L. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 45°C y una agitación de 100 rpm. Estas condiciones fueron establecidas con anterioridad por el grupo de investigación, mientras que el tiempo de la hidrólisis se determinó mediante una cinética de producción de AT y DQO (Sección 4.1 de resultados).

3.2.2. Hidrólisis con la mezcla enzimática

Se utilizaron dos condiciones de hidrólisis con la mezcla binaria Cellulase 50 XL - Viscozyme L. En primera instancia, para la Mezcla 1 se utilizaron las condiciones óptimas para la mezcla determinadas con anterioridad por el grupo de trabajo, las cuales indicaban la utilización de 75 g de bagazo por litro de buffer de citrato (50 mM a pH 4.0) y la adición de la enzima Cellulase 50 XL y Viscozyme L (Novozymes™, Dinamarca) a una concentración de 1.0 mg proteína/L y 0.1 mg de proteína/L, respectivamente. Esta reacción se llevó a cabo a una temperatura de 40°C y una agitación de 100 rpm. En segunda instancia, para la Mezcla 2 se utilizaron las condiciones de hidrólisis con la enzima individual Cellulase 50 XL (Sección 3.2.1), adicionando Viscozyme L a una concentración de 0.1 mg de proteína/L. Los tiempos de hidrólisis para ambas condiciones se determinaron mediante una cinética de producción de AT y DQO (Sección 4.1 de resultados). Asimismo, las actividades de las enzimas empleadas se presentan en el anexo 1.

3.3. Inóculo

Como inóculo se utilizó lodo granular anaerobio de un reactor UASB utilizado para el tratamiento de vinazas tequileras de Casa Herradura™. El lodo fue tratado térmicamente a 105°C por 24 horas de acuerdo con lo reportado por Contreras-Dávila et al. 2017. Posteriormente se determinó el contenido de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV).

3.4. Medio mineral

El medio mineral utilizado fue modificado de Contreras-Dávila et al. (2017), cambiando los sulfatos ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) por cloruros. Este medio estuvo compuesto por (g/L): $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 4.5; Na_2HPO_4 , 0.635; K_2HPO_4 , 0.125; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1; ZnCl_2 , 0.075; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.021; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.011; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0035.

3.5. Operación del reactor

Se utilizó un CSTR (Applikon modelo Z310210011) con un volumen de trabajo de 1 L, equipado con un controlador automático de agitación, pH, y temperatura (Figura 3). El CSTR se operó en dos experimentos distintos, correspondientes al hidrolizado obtenido con la enzima individual (Experimento 1) y los hidrolizados obtenidos con las mezclas enzimáticas (Experimento 2). Para ambos experimentos se siguió el mismo procedimiento de arranque en el reactor. El reactor se inoculó con 4.5 g de SSV/L de lodo tratado térmicamente. Previo al inicio de la operación, se desplazó el volumen de espacio de cabeza del CSTR con una mezcla de gases CO₂-N₂ (80:20 v:v) por 10 minutos para propiciar un ambiente anaerobio. El reactor se operó en lote por 24 horas con una concentración de hidrolizado equivalente a 10 g DQO/L (Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona y Razo-Flores, 2018).

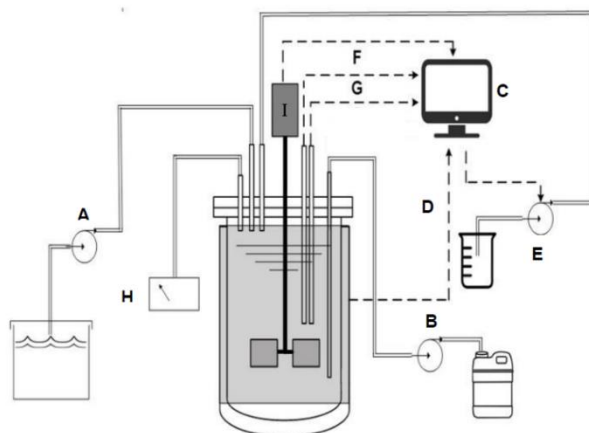


Figura 3. Esquema del reactor CSTR. A: Bomba de alimentación, B: Bomba de efluente, C: Computadora, D: Chaqueta térmica, E: bomba de NaOH, F: Sensor de pH, G: Sensor de temperatura, H: Contador de gas, I: Rotor. Adaptado de Montoya-Rosales, et al. (2019).

Una vez iniciado el proceso en continuo se evaluaron diferentes COV tal como se describe en la Tabla 2. El experimento 1 corresponde a los hidrolizados obtenidos con la enzima individual Cellulase 50 XL donde se evaluaron COV de 44 a 120 g DQO/L-d a un TRH de 6 horas, ajustando la concentración del hidrolizado.

Posteriormente, se evaluaron COV de 72 y 90 g DQO/L-d a un TRH de 10 y 8 horas, respectivamente, con hidrolizado sin diluir. El experimento 2 corresponde a la evaluación de la mezcla enzimática Cellulase 50 XL – Viscozyme L, con cargas de entre 44 y 80 g DQO/L-d a un TRH de 6 horas. Para ambos experimentos los cambios de COV fueron realizados después del transcurso de 20 TRHs y cuando la variación en la producción del gas fue menor a 10% durante tres días consecutivos (estado estable). La agitación, temperatura y pH se controlaron en valores de 300 rpm, 37 °C y 5.5, respectivamente.

Tabla 2. Condiciones de operación del CSTR alimentado con hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave a un TRH de 6 h.

Experimento	Periodo	Concentración de sustrato (g DQO/L)	COV (g DQO/L-d)	Hidrolizado
1	I	11.0	44	Enzima individual
	II	13.0	52	
	III	15.0	60	
	IV	20.0	80	
	V	25.0	100	
	VI	30.0	120	
	VII	15.0	60	
	VIII*	30	72	
	IX**	30	90	
2	I	11.0	44	Mezcla 1
	II	13.0	52	
	III	15.0	60	
	IV	15.0	60	Mezcla 2
	V	17.5	70	
	VI	20.0	80	
	VII	13.0	52	
	VIII	17.5	70	
	IX	20.0	80	

*TRH = 10 horas; ** TRH = 8 horas.

TRH: tiempo de retención hidráulico, COV: carga orgánica volumétrica.

3.6. Evaluación del desempeño del CSTR

El desempeño de los reactores se evaluó a partir de la VVPH, el RMH, el rendimiento específico de producción de hidrógeno (REH) y el costo de producción de hidrógeno. Así mismo se evaluó el porcentaje de acetato homoacetogénico. La Tabla 3 muestra las ecuaciones que se utilizaron para el cálculo de estas variables. Complementario a esto se realizó el balance de masa del CSTR en término de equivalentes de electrones (eq e⁻) siguiendo el procedimiento reportado previamente (Contreras-Dávila et al., 2017).

3.7. Métodos analíticos

La determinación de DQO soluble, SST y SSV se llevó a cabo por los métodos estándar APHA 5220, 2540-B y 2450-E, respectivamente (APHA AWWA/WEF, 2012). La concentración de AT se realizó por el método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). La producción de gas se midió por medio de un dispositivo de desplazamiento de líquido (modelo MVG-10, Prendo, México) y su composición se analizó mediante cromatografía de gases con detector de conductividad térmica (Carrillo-Reyes et al., 2012). Por otra parte, la concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs) se determinó utilizando electroforesis capilar de acuerdo con lo establecido previamente (Davila-Vazquez et al., 2008a).

3.8. Análisis estadísticos

El efecto de la COV sobre la VVPH y el REH se evaluó mediante un análisis de varianza, con la prueba Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) así como un análisis de correlación empleando la prueba r de Spearman ($p < 0.05$) utilizando los valores promedios de los estados estables durante la operación del CSTR. Estos análisis fueron realizados mediante el Software R versión 3.5.1. y sólo se llevaron a cabo para el experimento 1, correspondiente a los hidrolizados obtenidos con la enzima individual, debido a que no se obtuvieron suficientes datos para los análisis correspondientes al experimento 2.

Tabla 3. Ecuaciones para evaluar el desempeño del reactor.

Ecuaciones	Variables
$VVPH = \frac{V_{H_2\text{producido}}}{t \times V_r}$	(1) $V_{H_2\text{producido}}$ = Volumen a condiciones estándar (0°C y 1 atm).
$RMH = \frac{\text{mol de } H_2\text{producido}}{\text{mol de } AT_{\text{consumido}}}$	(2) t = Tiempo. V_r = Volumen del reactor CSTR
$REH = \frac{VVPH \times \frac{V_{\text{hidrolizado}}}{Vel_{\text{consumo}}}}{[\text{sustrato}]}$	(3) $V_{\text{hidrolizado}}$ = Volumen de hidrolizado obtenido en el reactor de 10 L.
$\text{Costo L de hidrolizado} = \frac{\$_{\text{enzima}} + \$_{\text{buffer}}}{V_{\text{hidrolizado}}}$	(4) Vel_{consumo} = Volumen de hidrolizado consumido por día en función de la carga orgánica.
$\text{Costo de producción de } H_2 = \frac{\text{costo L de hidrolizado} \div [\text{sustrato}]}{REH}$	(5) $[\text{sustrato}]$ = Concentración de bagazo utilizado por lote en la hidrólisis.
$\text{Costo de producción de } H_2 = \frac{\$ \text{ L de hidrolizado} \div [\text{sustrato}]}{REH}$	(6) $\$_{\text{enzima}}$ = Costo de la(s) enzima(s) utilizada en el reactor de 10 L.
$\text{Acetato homoacetogénico} = \frac{2[Ace] + 2[But] - [Prop] - H_2}{6}$	(7) $\$_{\text{buffer}}$ = Costo del buffer utilizado en el reactor de 10 L
$\text{Acetato homoacetogénico (\%)} = \frac{\text{Acetato homoacetogénico}}{\text{Acetato total}} \times 100$	(8) $[AT]$ = Concentración de azúcares totales en el hidrolizado.
$\text{Rendimiento de sacarificación} = \frac{[AT]}{[\text{sustrato}]}$	(9)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Hidrólisis enzimática

Para determinar el tiempo óptimo de las diferentes hidrólisis se realizó un seguimiento en la concentración de AT y DQO soluble liberados durante las hidrólisis enzimáticas. Es importante mencionar que todos los valores de DQO a los que se hace referencia a lo largo del documento corresponden a la fracción soluble.

Para el hidrolizado con la enzima individual se tomaron muestras a los 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 150, 180 y 240 minutos para las tres primeras cinéticas, obteniéndose un tiempo óptimo de hidrólisis de 80 minutos (Figura 4). La caracterización del hidrolizado en términos de DQO y AT para 21 lotes de hidrolizado fue de 30.2 ± 2.0 g DQO/L y 15.8 ± 1.0 g AT/L, respectivamente, con un rendimiento de sacarificación promedio de 0.18 g de AT/g de bagazo.

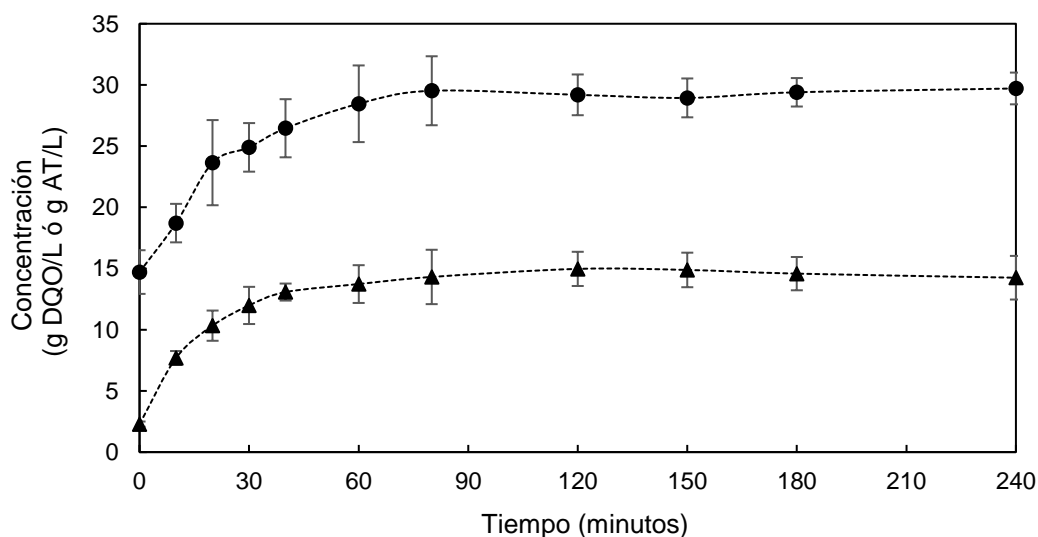


Figura 4. Cinética de la sacarificación del bagazo de agave obtenida con la enzima Cellulase 50 XL en función de los AT (▲) y la DQO soluble (●). AT: azúcares totales, DQO: demanda química de oxígeno.

Los valores de DQO y AT obtenidos son menores, en comparación con los reportados para hidrolizados utilizando la enzima nacional Stonezyme (Tabla 4).

No obstante, la DQO se encuentra dentro del intervalo de valores reportados para la enzima Celluclast 1.5 L (25 - 42 g DQO/L), mientras que en términos de AT, éstos fueron mayores a los reportados para las citadas hidrólisis con Celluclast 1.5L (5.3 - 12.5 g AT/L) (Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona y Razo-Flores, 2018). Respecto al rendimiento de sacarificación, que fue de 18 g AT/g bagazo, este se encuentra dentro del intervalo reportado para hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave (0.15 a 0.30 g AT/g bagazo), aunque es relativamente bajo tomando en cuenta la concentración de azúcares obtenidos (15.8 g AT/L), lo cual se explica por la alta concentración de bagazo utilizado para la hidrólisis (87.6 g de bagazo/L).

Por su parte, para los hidrolizados correspondientes a la mezcla enzimática se realizó el seguimiento de dos lotes de hidrolizados con la Mezcla 1 y tres lotes de hidrolizados para la Mezcla 2. Los tiempos óptimos para las hidrólisis fueron de 2 horas para la Mezcla 1 (Figura 5) y de 90 minutos para la Mezcla 2 (Figura 6), siendo este último muy similar al tiempo óptimo para la enzima Cellulase 50 XL de manera individual. En cuanto a la caracterización, para la Mezcla 1 se obtuvieron concentraciones de 38.1 ± 3.0 g DQO/L y 16.4 ± 1.2 g AT/L para los dos lotes preparados, mientras que para la Mezcla 2 se realizaron un total de 10 lotes de hidrolizado, obteniéndose concentraciones promedio de 36.9 ± 2.1 g DQO/L y 20.3 ± 0.8 g AT/L. En este último caso, se observó una mayor concentración de AT comparado con otros hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave, siendo la concentración de azúcares más alta reportada hasta ahora (Tabla 4).

Respecto a la concentración de DQO obtenida en este estudio con las mezclas Cellulase 50 XL - Viscozyme L, ambos valores fueron menores a lo reportado por otros autores con la mezcla enzimática Celluclast 1.5L - Viscozyme L. Por otra parte, el rendimiento de sacarificación obtenido para ambos hidrolizados (Mezcla 1 y 2) fue cercano a la media de valores reportados para hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave (Tabla 4).

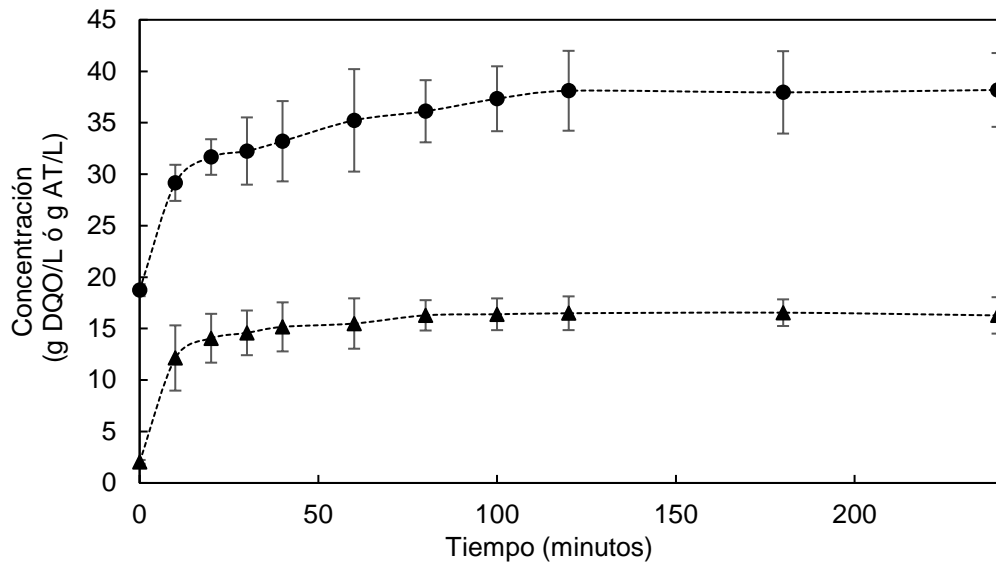


Figura 5. Cinética de la sacarificación del bagazo de agave obtenida con la Mezcla 1 (Cellulase 50 XL - Viscozyme L) en función de los AT (\blacktriangle) y la DQO soluble (\bullet). AT: azúcares totales, DQO: demanda química de oxígeno.

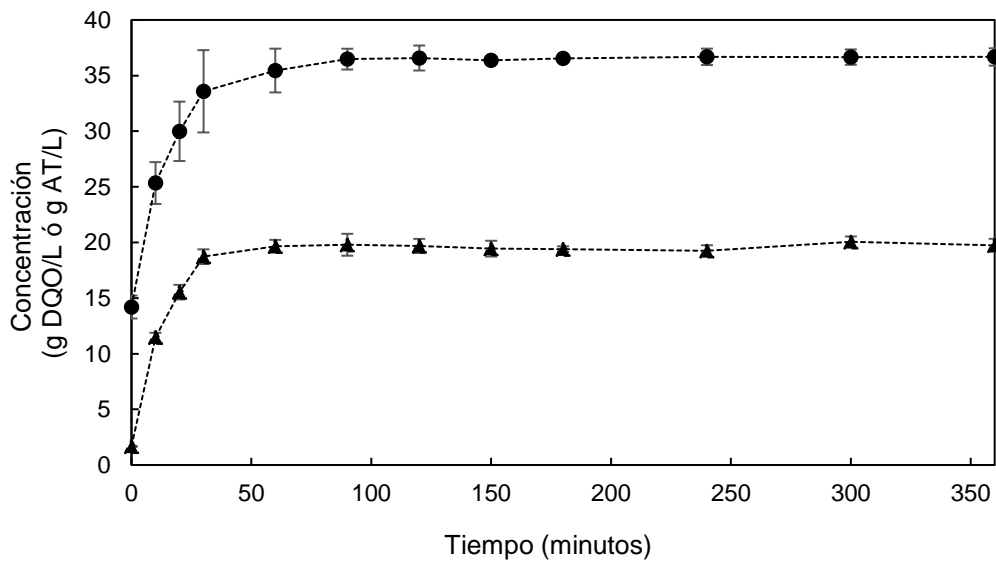


Figura 6. Cinética de la sacarificación del bagazo de agave obtenida con la Mezcla 2 (Cellulase 50 XL - Viscozyme L) en función de los AT (\blacktriangle) y la DQO soluble (\bullet). AT: azúcares totales, DQO: demanda química de oxígeno.

Tabla 4. Hidrolizados de bagazo de agave obtenidas con diferentes preparaciones enzimáticas.

Enzimas utilizadas	Condiciones de hidrólisis				DQO (g/L)	AT (g/L)	Relación AT/DQO	Aportación de la enzima + buffer		Rendimiento de sacarificación (g AT/g bagazo)	SSV (g/L)	Referencia
	Tiempo de hidrólisis (h)	Bagazo utilizado (g/L)	pH	Temperatura (C°)				DQO (%)	AT (%)			
Celluclast 1.5 L	10	40	4.5	45	42	12	0.28	60	NR	0.30	15.5	Contreras-Dávila et al., 2017
Celluclast 1.5 L	12	35	5.5	40	25	5.3	0.21	64	NR	0.15	NR	Montiel Corona y Razo-Flores, 2018
Celluclast 1.5 L -Viscozyme L	6	50	5.0	40	39.7	12.6	0.32	58	32	0.25	29.1	Montoya-Rosales et al., 2019
Stonezyme	7	78.8	6.0	50	59	17.5	0.31	65	20	0.22	36.3	Montoya-Rosales et al., 2019
Cellulase 50 XL	2	87.6	6.0	43	30.2	15.8	0.53	27	3	0.18	15.2	Experimento 1
Cellulase 50 XL - Viscozyme L	2	75	4.0	40	38.1	16.4	0.43	48	12.5	0.22	14.7	Experimento 2 ^a
Cellulase 50 XL - Viscozyme L	1.6	87.6	6.0	43	36.9	20.3	0.55	36	8	0.23	18.7	Experimento 2 ^b

^aMezcla 1, ^bMezcla 2, NR no reportado, DQO: demanda química de oxígeno, AT: azúcares totales, SSV: sólidos suspendidos volátiles.

De manera general, los tiempos obtenidos tanto para la hidrólisis con la enzima individual como para las hidrólisis con la mezcla enzimática son considerablemente menores a lo reportado en otros trabajos, entre 6 y 12 horas, utilizando enzimas comerciales para la hidrólisis enzimática de bagazo de agave (Tabla 4), lo cual podría representar una ventaja operacional y en los costos de producción de H₂. Además, es importante destacar que, los tres hidrolizados obtenidos, tanto para la enzima individual como con la mezcla enzimática, cuentan con poca aportación de la enzima en términos de DQO y AT (Tabla 4), siendo la preparación de Cellulase 50 XL de forma individual la que tiene un menor aporte. Desde una perspectiva general, un menor aporte de la preparación enzimática en términos de AT y DQO representa una ventaja ya que implica que una mayor parte del H₂ que se obtenga en los ensayos de fermentación oscura provendrá del material lignocelulósico y no de la enzima como ha sido reportado con anterioridad (Montoya-Rosales, 2018).

En la Tabla 4 los valores presentados de concentración de AT y DQO, así como los rendimientos de sacarificación (g de AT liberados por g de bagazo) contemplan la aportación de la o las enzimas utilizadas durante la hidrólisis. Sin embargo, al ajustar los rendimientos de sacarificación, eliminando la aportación de las enzimas, para la enzima Cellulase 50 XL de manera individual, la Mezcla 1 y la Mezcla 2, los rendimientos resultan de 0.17, 0.19 y 0.21 g AT/g bagazo, respectivamente, valores muy similares a los obtenidos al ajustar los rendimientos para la mezcla Celluclast 1.5 L - Viscozyme L de 0.20 g AT/g bagazo, y para la enzima individual Stonezyme de 0.18 g AT/g bagazo. Lo anterior indica que la enzima Cellulase 50 XL, utilizada de manera individual y en mezcla, y las dos preparaciones enzimáticas anteriormente mencionadas (Celluclast 1.5 L - Viscozyme L y Stonezyme), poseen una capacidad de liberación de AT similar bajo las condiciones en las que fueron evaluadas.

4.2. Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos con la enzima individual

El CSTR fue operado por un total de 70 días durante el experimento 1, con un total de nueve periodos tal como se indica en la Tabla 2. Durante todo el tiempo de operación, el porcentaje de hidrógeno en el gas se mantuvo en un promedio de $44.9 \pm 3.5 \%$ y no se observó metano en ninguno de los periodos de operación.

La Figura 7 muestra la VVPH en función del tiempo a través de las distintas COV evaluadas. Del periodo I al III se aumentó la carga de 44 g DQO/L-d a 60 g DQO/L-d observándose un aumento en la VVPH de 3.7 ± 0.2 L H₂/L-d hasta un valor máximo de 6.1 L H₂/L-d en el día 22 (periodo III); posterior a este punto la VVPH regresó a 5.7 L H₂/L-d, producción muy cercana a la obtenida durante los primeros días del cambio de carga de este mismo periodo, donde se esperaba que se estabilizara el reactor. Sin embargo, debido a un fallo operacional, la VVPH disminuyó drásticamente hasta estabilizarse en 4.5 ± 0.1 L H₂/L, una velocidad cercana a la obtenida en el estado estable del periodo II (4.7 ± 0.1 L H₂/L-d). Un fenómeno similar fue reportado por Olmos-Hernández (2018), en el que después de un fallo operacional, la producción de hidrógeno se estabilizó en un valor cercano a la producción obtenida en la carga anterior al fallo.

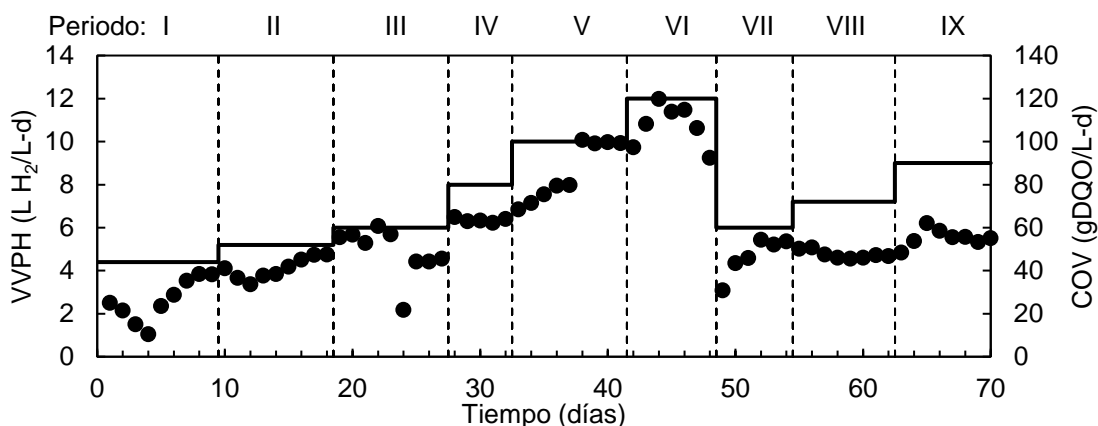


Figura 7. Desempeño del CSTR durante los distintos periodos de operación empleando los hidrolizados obtenidos con la enzima individual Cellulase 50XL. VVPH (●), COV (-). VVPH: velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, COV: carga orgánica volumétrica.

En los periodos IV a VI se aumentó la COV de 80 g DQO/L-d a 120 g DQO/L-d, correspondiendo el último valor a la carga más alta alimentada al reactor con hidrolizado sin diluir. En estos periodos se observó la misma tendencia que en periodos anteriores, un aumento de la VVPH con el aumento de la COV. Sin embargo, durante el periodo VI, después de alcanzar el estado estable por 3 días, la producción de hidrógeno y el consumo de azúcares disminuyó drásticamente (Figuras 7 y 8). La máxima VVPH observada durante toda la operación del reactor fue de 11.6 ± 0.3 L H₂/L-d durante los tres días anteriores a la caída en la producción de H₂ a la carga de 120 g DQO/L-d (periodo VI); esta VVPH es mayor a la reportada con la enzima nacional Stonezyme de 2.2 ± 0.03 L H₂/L-d y cercana al máximo reportado de 12.9 ± 0.1 L H₂/L-d para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave obtenidos con una mezcla enzimática (Celluclast 1-5L - Viscozyme) a una carga de 90 g DQO/L-d. Sin embargo, dado que la VVPH observada con la COV de 120 g DQO/L-d (periodo VI) no alcanzó un estado estable por la caída en la producción de H₂, el valor máximo de VVPH en este trabajo es considerado el obtenido con la COV de 100 g DOQ/L-d, que fue de 9.9 ± 0.03 L H₂/L-d.

Por otra parte, el periodo VII corresponde a una réplica de las condiciones del periodo III, obteniéndose una VVPH de 5.3 ± 0.1 L H₂/L-d, valor cercano al que se esperaba se estabilizará el reactor antes del fallo operacional anteriormente mencionado. Finalmente, a fin de conocer si el desempeño del reactor podría alcanzar condiciones de estabilidad al alimentar hidrolizado sin diluir, se decidió incrementar el TRH a 10 y 8 horas para los periodos VIII y IX, respectivamente. Ambos periodos mostraron producciones estables de hidrógeno, con VVPH de 4.7 ± 0.06 H₂/L-d en el periodo VIII y 5.5 ± 0.1 H₂/L-d en el periodo IX, que son similares a las obtenidas a las cargas de 52 y 60 g DQO/L-d con un TRH de 6 horas (periodos II y VII, respectivamente).

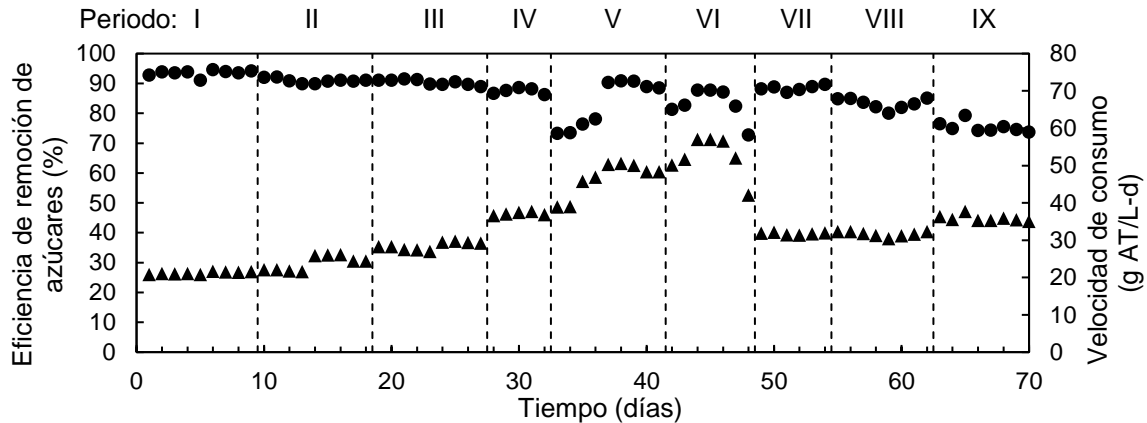


Figura 8. Desempeño en el porcentaje de remoción de azúcares (●) y velocidad de consumo de azúcares (▲) empleando los hidrolizados obtenidos con la enzima individual Cellulase 50 XL. AT: azúcares totales.

La Figura 8 muestra el consumo de azúcares en los diferentes periodos de operación del reactor, observándose un aumento en la velocidad de consumo conforme se aumentó la carga orgánica del periodo I al V, hasta que, en el periodo VI se observó una caída drástica, siendo esto congruente con la caída en la VVPH. Lo anterior puede deberse a 1) una inhibición por sustrato, la cual es alcanzada a una cierta relación entre la concentración del sustrato y los microorganismos, 2) una inhibición por producto debido a la alta concentración de AGVs, de 15 g/L (Elbeshbishy et al., 2017; Hafez et al., 2010), o 3) estar relacionado a algún componente en el hidrolizado sin diluir. Por su parte, en el periodo VII, al regresar a la carga orgánica de 60 g DQO/L-d ocurrió una recuperación del sistema hasta llegar a un estado estable cercano a lo obtenido en el periodo III, que corresponde a la misma COV. Mientras tanto, para los periodos VIII y IX, se observa una ligera disminución en la eficiencia de remoción de AT en comparación a los TRH de 6 horas, contrastando con que el aumento de TRH se relaciona con un aumento en la eficiencia de remoción (Arooj et al., 2008). Esto podría deberse a una inhibición parcial por alguno de los tres factores anteriormente mencionados, pero que se ve atenuado por el cambio en el TRH.

Tabla 5. Desempeño del CSTR alimentado con hidrolizados obtenidos con la enzima individual Cellulase 50 XL en la producción de H₂ y metabolitos en los estados estables de cada periodo operacional. En todos los casos n=3.

Periodo	COV (g DQO/L-d)	AT alimentados (g AT/L-d)	SSV alimentados (g/L)	H ₂ (%)	VVPH (L H ₂ /L-d)	RMH (mol H ₂ /mol azúcar consumido)	REH (L H ₂ /kg bagazo)	Remoción AT (%)	AGV (g/L)				Homoacetogénesis (%)
									Formiato	Acetato	Butirato	Lactato	
I	44	23	6.7	40	3.7 ± 0.2	1.4 ± 0.07	25.7 ± 1.2	94	0.02 ± 0.02	2.1 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.00	21
II	52	27	8.0	43	4.7 ± 0.1	1.5 ± 0.10	23.5 ± 0.7	91	0.8 ± 0.2	4.2 ± 0.2	2.5 ± 0.5	0.00	34
III	60	32	9.2	43	4.5 ± 0.08	1.2 ± 0.03	23.5 ± 0.4	90	1.8 ± 0.5	4.1 ± 0.5	2.9 ± 0.3	0.00	37
IV	80	42	12.3	43	6.3 ± 0.07	1.4 ± 0.03	22.8 ± 0.7	88	1.3 ± 0.2	5.4 ± 0.5	3.7 ± 0.2	0.00	36
V	100	53	15.3	48	9.9 ± 0.03	1.6 ± 0.04	32.5 ± 0.1	89	3.7 ± 0.7	4.6 ± 0.7	4.4 ± 0.1	0.00	31
VI	120	63	18.4	48	11.6 ± 0.3	1.6 ± 0.04	29.5 ± 0.8	88	5.8 ± 0.3	4.9 ± 0.3	4.3 ± 0.2	0.00	27
VII	60	32	9.2	49	5.3 ± 0.1	1.4 ± 0.04	27.5 ± 0.6	89	3.4 ± 0.2	4.7 ± 0.3	2.2 ± 0.2	0.00	31
VIII	72	38	11.0	46	4.7 ± 0.06	1.2 ± 0.02	20.0 ± 0.3	83	4.4 ± 0.5	3.2 ± 0.3	2.0 ± 0.05	0.00	31
IX	90	48	13.8	48	5.5 ± 0.1	1.2 ± 0.03	18.8 ± 0.4	75	5.0 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.3 ± 0.7	1.4 ± 0.3	37

COV: carga orgánica volumétrica, DQO: demanda química de oxígeno, AT: azúcares totales, SSV: sólidos suspendidos volátiles, VVPH: velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, RMH: rendimiento molar de hidrógeno, REH: rendimiento específico de hidrógeno, AGV: ácidos grasos volátiles.

En cuanto a los metabolitos generados durante la operación, estos se presentan en la Tabla 5. Se observó acetato, butirato y formiato, principalmente, sin la presencia de lactato o propionato durante los estados estables, exceptuando el periodo IX en el que se observó la presencia de lactato a una baja concentración en comparación a los demás metabolitos medidos. La presencia predominante de acetato y butirato se relaciona con la producción de hidrógeno por la fermentación tipo acetato-butirato (Lee y Rittmann, 2009), mientras que la presencia de formiato ya había sido reportada con anterioridad en la producción de hidrógeno en lote con hidrolizado de bagazo de agave utilizando la enzima Cellulase 50 XL (Tapia-Rodríguez et al., 2019), y puede deberse a una baja actividad de la formiato hidrógeno liasa, encargada de oxidar el formiato producido como un producto final de la fermentación ácido mixta o como intermediario de otras rutas metabólicas (Palomo-Briones et al., 2018; Sinha et al., 2015).

Los RMH obtenidos (Tabla 5) fueron de alrededor de 35% del rendimiento teórico para los sistemas de fermentación oscura (4 moles de H₂/mol de hexosa consumida), atribuyéndose el bajo rendimiento a dos razones principales: (1) la aparición de rutas metabólicas asociadas al consumo de hidrógeno, como la homoacetogénesis, y (2) la acumulación de formiato en lugar de su conversión a hidrógeno. Al respecto, se calculó que entre 21 y 37 % del acetato presente en este sistema corresponde a acetato homoacetogénico, mientras que el formiato se encontró en concentraciones de hasta 5.8 ± 0.3 g/L.

La concentración de SSV para los estados estables fue de 3.0 ± 0.2, 4.7 ± 0.3, 5.1 ± 0.3, 6.6 ± 0.3, 7.0 ± 0.5, 9.3 ± 2.9, 4.8 ± .5, 11.5 ± 0.3, 12.7 ± 0.1 g SSV/L para los periodos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX, respectivamente. El aumento en la concentración de sólidos puede explicarse de dos maneras, en primer lugar, debido a la proporción del hidrolizado que se usó para obtener cada COV y su respectivo contenido de sólidos que, a pesar de haber sido filtrado, aún contenía una concentración de sólidos considerable de 18.5 ± 2.8 g SST y 15.2 ± 1.6 g

SSV/L y, en segundo lugar, por un aumento de la biomasa generada durante la operación del reactor.

En la Figura 9 se presenta el balance de electrones durante la operación del reactor. Se observa que el acetato y butirato representaron aproximadamente 55% de los electrones disponibles a partir del periodo II. Respecto a los demás metabolitos producidos, la presencia de lactato y propionato se observó al inicio de los periodos V y VII (datos no mostrados), pero dejaron de detectarse conforme se llegó al estado estable de cada periodo, a diferencia del formiato cuya producción se mantuvo estable a partir del periodo II y representó entre 2 y 9 % de los electrones durante toda la operación. Finalmente, el H₂ producido representó entre 3 y 7% del total de los electrones, lo cual es congruente con lo reportado anteriormente para producción de hidrógeno en continuo en CSTR alimentado con hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave, donde representó entre 3.5 y 10% de los electrones totales (Contreras-Dávila et al., 2017; Olmos-Hernández, 2018).

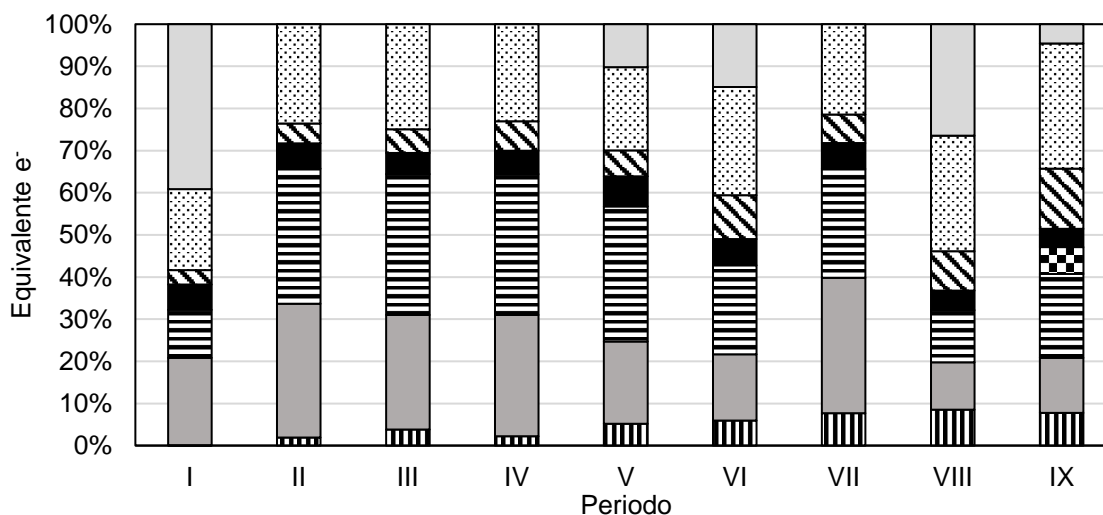


Figura 9. Balance de electrones para los estados estables del CSTR empleando los hidrolizados a partir de la enzima individual Cellulase 50 XL. Acetato (■), butirato (▨), formiato (▩), lactato (⊠), H₂ (■), azúcares residuales (▧), biomasa (SSV) (▩) no determinado(□).

En la Tabla 6 se muestra el balance de electrones para días específicos de los estados estables de producción de hidrógeno. Este balance considera los SSV como biomasa, con lo cual es posible explicar hasta un 100% de los equivalentes de electrones que entraron al sistema como DQO. Sin embargo, parte de los SSV considerados como biomasa pueden ser sólidos propios del hidrolizado que no son degradados durante su paso por el sistema, por lo que el porcentaje de DQO que es posible explicar podría estar sobreestimado. En este aspecto es importante mencionar que, para todos los periodos, exceptuando el periodo VIII, la cantidad de SSV en el efluente es menor a los SSV presentes en la alimentación, sugiriendo que parte de estos fueron degradados. Sin embargo, no es posible hacer un análisis completo sobre qué fracción de SSV corresponde a biomasa y a hidrolizado.

Tabla 6. Balance de electrones de días específicos de los estados estables del CSTR empleando los hidrolizados a partir de la enzima individual Cellulase 50 XL.

Equivalente e ⁻ (%)	Periodo (día)								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
	9	18	26	30	40	46	53	61	69
Formiato	0.1	1.6	5.1	2.2	5.1	7.0	8.1	9.6	7.8
Acetato	19.3	32.2	24.6	26.1	22.1	18.6	30.7	12.1	13.4
Butirato	13.1	28.1	32.4	34.3	32.4	24.9	29.4	12.4	21.0
Lactato	0.0	0.0	0.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	5.7
H ₂	6.2	6.5	5.3	5.6	7.1	6.8	6.2	4.7	4.2
Azúcares residuales	3.2	4.9	6.0	6.4	6.4	7.4	7.0	9.5	14.3
Biomasa (SSV)	19.2	24.2	23.0	24.4	19.8	25.7	20.0	27.5	29.9
Total	61.1	97.5	96.4	99.0	92.9	90.4	101.4	75.8	96.3

SSV: sólidos suspendidos volátiles.

4.3. Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos con mezclas enzimáticas.

El CSTR fue operado por un total de 50 días durante el experimento 2, incluyendo tres periodos iniciales con el hidrolizado obtenido con la Mezcla 1 y seis periodos

para la Mezcla 2 tal como se indica en la Tabla 2. Durante todo el tiempo de operación, el porcentaje de hidrógeno en el gas se mantuvo en un promedio de $46.8 \pm 1.9 \%$, exceptuando el periodo IX que tuvo un porcentaje de 39%, y no se observó metano en ninguno de los periodos de operación. Estos valores son cercanos a lo obtenido en el experimento 1 con la enzima individual.

La Figura 10 muestra la VVPH en función del tiempo a través de las distintas COV evaluadas. Del periodo I al III la COV incrementó de 44 g DQO/L-d a 60 g DQO/L-d con el hidrolizado de la Mezcla 1. Sin embargo, la VVPH para los primeros dos periodos se mantuvo en torno a 3.5 L H₂/L-d, mientras que para el periodo III la VVPH aumentó a 4.6 ± 0.04 L H₂/L-d. Este valor es ligeramente menor a lo obtenido en el experimento 1 donde se obtuvo una VVPH de 5.3 ± 0.1 L H₂/L-d para la carga de 60 g DQO/L-d (Tabla 5 periodo VII), lo cual puede deberse a una menor cantidad de azúcares alimentados al sistema, influenciado tanto por la dilución necesaria para alcanzar la COV por periodo, como a una menor proporción de AT/DQO (0.43, Tabla 4), resultando en una menor concentración de AT en la alimentación (aproximadamente 28% menor) con respecto al experimento 1 con la enzima individual.

Posteriormente, a partir del periodo IV en adelante, se utilizó la Mezcla 2, esto se debió principalmente a que la concentración de Cellulase 50 XL y las condiciones de hidrólisis utilizadas en la Mezcla 1 no eran comparables respecto a lo utilizado en el experimento 1 con la enzima individual. Por tal razón, en el periodo IV se aplicó la COV de 60 g DQO/L-d. De manera interesante, la VVPH disminuyó respecto a la del periodo III y se mantuvo constante para los estados estables de 60 y 70 g DQO/L-d con valores de 4.0 ± 0.06 y 4.15 ± 0.03 L H₂/L-d, respectivamente. Mientras que en los primeros días del cambio de carga a 80 g DQO/L-d, la VVPH comenzó a caer hasta 2.3 L H₂/L-d, por lo cual se redujo la COV a 52 g DQO/L-d en el periodo VII.

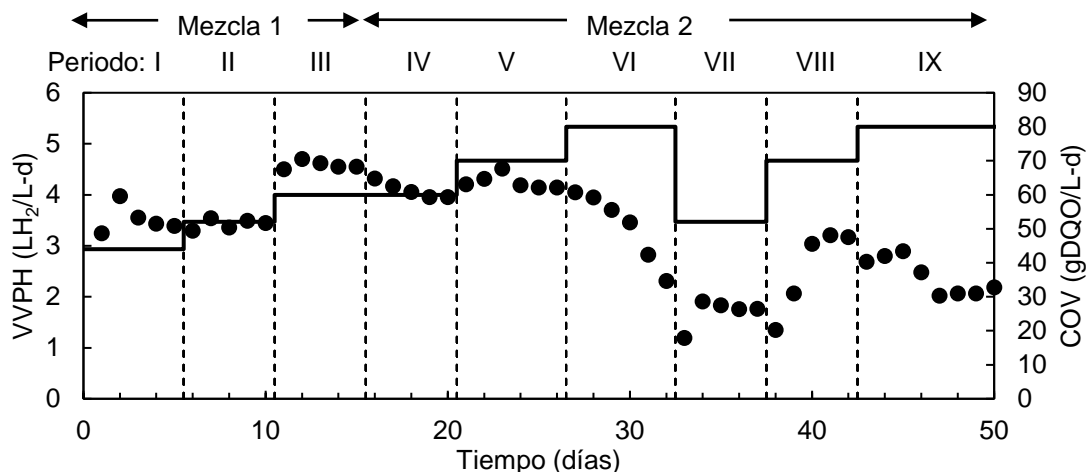


Figura 10. Desempeño del CSTR durante los distintos periodos de operación empleando los hidrolizados obtenidos con las mezclas enzimáticas de Cellulase 50 XL – Viscozyme L. VVPH (●), COV (-). VVPH: velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, COV: carga orgánica volumétrica.

Las VVPH obtenidas durante los periodos IV a VI son menores a lo obtenido en el experimento 1 con la enzima individual que fueron de 4.5 ± 0.08 y 6.3 ± 0.07 L H₂/L-d para las COV de 60 y 80 g DQO/L-d, respectivamente, lo cual resulta contradictorio ya que se esperaba un mejor desempeño debido a la mayor cantidad de azúcares alimentados al reactor. Una posible razón puede ser por la formación de lactato (Tabla 7), cuya producción ha sido asociada con la presencia de bacterias ácido-lácticas que pueden resultar perjudiciales en la producción de H₂ (Lee y Rittmann, 2009; Noike et al., 2002 Palomo-Briones et al., 2018).

Después de la caída en la VVPH, se cambió la COV a 52 g DQO/L-d para estabilizar el reactor y, posteriormente, se decidió volver a las cargas anteriores de 70 y 80 g DQO/L-d. No obstante, se observó una menor producción de hidrógeno del esperado para ambas cargas utilizando el hidrolizado con la Mezcla 2, así como una disminución importante en el rendimiento molar de hidrógeno (Tabla 7). Es importante mencionar que durante la caída en la producción de H₂, tanto para el periodo III como para el periodo VI, no se observó una disminución en el porcentaje de remoción de azúcares o velocidad de consumo de azúcares (Figura

11), lo cual podría ser explicado por un cambio en las rutas metabólicas hacia otras rutas no productoras de hidrógeno, siendo una de las más comunes la solventogénesis (Mazzoli, 2012; Saady, 2013). En este aspecto, se realizó un análisis para la determinación de etanol, acetona y butanol por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en ingles). Contrario a lo que se esperaba, únicamente se observó una baja concentración de etanol entre 0.18 y 0.29 g/L durante todo el experimento 2, por lo que las rutas metabólicas pudieron desviarse hacia otros metabolitos no determinados.

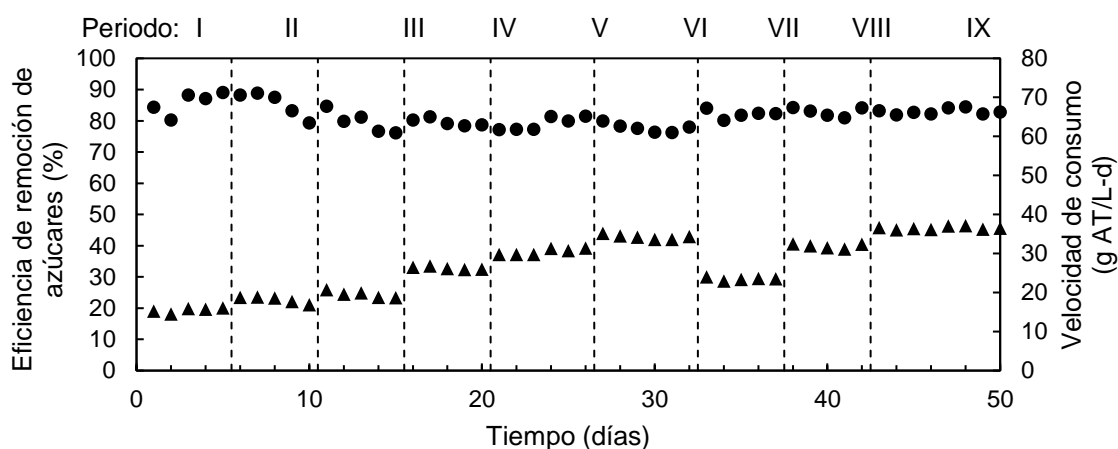


Figura 11. Desempeño en el porcentaje de remoción de azúcares (●) y velocidad de consumo de azúcares (▲) empleando los hidrolizados obtenidos con la mezcla enzimática Cellulase 50 XL - Viscozyme L. AT: azúcares totales.

Respecto a los RMH obtenidos para los primeros tres periodos donde se utilizó la Mezcla 1, estos fueron alrededor 43 % del rendimiento teórico de 4 moles de H_2 /mol de hexosa consumida, mientras que para los periodos IV a IX, correspondientes a la Mezcla 2, disminuyó de 31% hasta 11.5% del rendimiento teórico. En este aspecto, el RMH pudo ser afectado por un cambio en las rutas metabólicas hacia otras rutas no productoras de H_2 , y en menor medida, por la homoacetogénesis presente en el sistema, la cual fue cercana a lo apreciado en el experimento 1, calculándose que entre un 20 y 39% del acetato presente en el sistema corresponde a acetato homoacetogénico.

Tabla 7. Desempeño del CSTR alimentado con hidrolizados obtenidos con las mezclas enzimáticas Cellulase 50 XL - Viscozyme L en la producción de H₂ y metabolitos en los estados estables de cada periodo operacional. En todos los casos n=3.

Periodo	COV (g DQO/L-d)	AT alimentados (g AT/L-d)	SSV alimentados (g/L)	H ₂ (%)	VVPH (L H ₂ /L-d)	RMH (mol H ₂ /mol azúcar consumido)	REH (L H ₂ /kg bagazo)	Remoción AT (%)	AGV (g/L)				Homo-acetogénesis (%)
									Formiato	Acetato	Butirato	Lactato	
I ^a	44	18	5.3	49	3.5 ± 0.10	1.7 ± 0.06	33.9 ± 0.8	88	0.00	1.5 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.00	21
II ^a	52	21	6.3	44	3.5 ± 0.05	1.6 ± 0.10	28.5 ± 0.6	83	0.00	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.2	0.00	34
III ^a	60	25	7.2	44	4.6 ± 0.04	1.9 ± 0.01	32.9 ± 0.3	78	0.00	2.1 ± 0.4	1.4 ± 0.04	0.6 ± 0.25	37
IV ^b	60	33	8.7	47	4.0 ± 0.06	1.3 ± 0.01	25.2 ± 0.1	79	0.90 ± 0.12	2.2 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.09	36
V ^b	70	39	10.2	47	4.1 ± 0.03	1.1 ± 0.01	22.5 ± 0.1	81	1.2 ± 0.4	2.6 ± 0.3	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.3	31
VI ^b	80	44	11.7	45	2.9 ± 0.6	0.71 ± 0.15	13.6 ± 2.7	77	1.0 ± 0.3	2.7 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.1 ± 0.04	27
VII ^b	52	29	7.6	46	1.8 ± 0.04	0.63 ± 0.02	13.0 ± 0.3	82	0.24 ± 0.13	2.2 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.08	31
VIII ^b	70	39	10.2	44	3.1 ± 0.09	0.80 ± 0.03	17.0 ± 0.5	82	0.00	2.4 ± 0.2	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2	31
IX ^b	80	44	11.7	39	2.1 ± 0.07	0.46 ± 0.02	10.0 ± 0.3	83	0.73 ± 0.09	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.08	0.73 ± 0.2	37

a: Mezcla 1, b: Mezcla 2, COV: carga orgánica volumétrica, DQO: demanda química de oxígeno, AT: azúcares totales, SSV: sólidos suspendidos volátiles, VVPH: velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, RMH: rendimiento molar de hidrógeno, REH: rendimiento específico de hidrógeno, AGV: ácidos grasos volátiles.

En cuanto al análisis de metabolitos, el metabolito principal durante los estados estables de la operación del reactor fue el acetato, el cual aumentó gradualmente durante los tres periodos que utilizaron la Mezcla 1 de 1.48 hasta 2.11 g/L, mientras que al utilizar la Mezcla 2, la producción de este compuesto fue relativamente constante, entre 2.17 y 2.67 g/L (excepto en el periodo IX). Estas concentraciones se encuentran por debajo de lo reportado durante el experimento 1 con la utilización de hidrolizados con la enzima individual, donde se obtuvo acetato de 2.14 a 5.43 g/L con las COV de 44 a 80 g DQO/L-d. Fenómeno similar ocurre con el butirato, cuyas concentraciones fueron mucho menores a las esperadas a estas cargas. Lo anterior se encuentra directamente relacionado a la baja producción de hidrógeno, la cual es llevada a cabo por la vía de fermentación de acetato-butirato (Lee y Rittmann, 2009).

Por su parte, la presencia de lactato se observó en el periodo III de la Mezcla 1 y en todos los periodos correspondientes a la Mezcla 2. La presencia de este metabolito afecta negativamente la producción de hidrógeno ya que su formación puede implicar la presencia de bacterias ácido lácticas que compiten por la fuente de carbono y son capaces de producir compuestos inhibitorios como las bacteriocinas (Noike et al., 2002; Palomo-Briones et al., 2018). Respecto al formiato, se observaron concentraciones de entre 0.24 y 1.16 g/L durante toda la operación con la Mezcla 2, con excepción del periodo VIII, por lo que no figuró entre los metabolitos principales a diferencia del experimento 1.

En conjunto, el análisis de los metabolitos mencionado sugiere que se llevó a cabo una fermentación del tipo ácido mixta. Sin embargo, el análisis de los metabolitos medidos únicamente en forma de AGV, como formiato, acetato, propionato, lactato y butirato, y el análisis para los principales productos de la solventogénesis no logra elucidar completamente las rutas metabólicas que se llevaron a cabo durante la operación del reactor y que, posiblemente, produjeron la caída en la producción de H₂ durante los periodos VI y IX.

La diferencia en la producción de H₂ entre ambos experimentos del reactor utilizando los hidrolizados obtenidos con la enzima individual y la mezcla enzimática, y entre el mismo experimento donde se utilizaron las dos condiciones de hidrólisis, puede deberse a la composición de los hidrolizados y sus características específicas, como el grado de polimerización de los azúcares y los componentes de las propias enzimas (Montoya-Rosales et al., 2019). En este aspecto, se ha observado en ensayos en lote que el tipo de carbohidratos utilizado como sustrato para la producción de H₂ puede seleccionar la estructura de la comunidad microbiana y los patrones de fermentación (Chatellard et al., 2016). Por lo anterior, resulta necesario un análisis más profundo de los azúcares que componen el hidrolizado y como afectan el desempeño en la producción de H₂, para poder explicar el cambio observado en las rutas metabólicas.

Por su parte, la concentración de SSV para los estados estables fue de 1.9 ± 0.2 , 2.6 ± 0.2 , 2.7 ± 0.2 , 4.0 ± 0.4 , 4.7 ± 0.5 , 5.9 ± 0.3 , 4.2 ± 0.3 , 5.1 ± 0.6 y 6.1 ± 0.5 g SSV/L para los periodos I a IX, respectivamente, observándose un aumento gradual de los sólidos al aumentar la COV, tal como sucedió en el experimento 1 con la enzima individual. Es importante mencionar que la menor cantidad de SSV en comparación al experimento 1 se ve relacionada con una mayor concentración de DQO en los hidrolizados, ya que a pesar de que la concentración de SST y SSV es ligeramente menor para el caso de la Mezcla 1 (18.4 ± 1.1 g SST/L y 14.7 ± 1.2 g SSV/L) y aproximadamente un 20% mayor para la Mezcla 2 (21.78 ± 1.4 g SST/L y 18.72 ± 1.3 g SSV/L) respecto al hidrolizado obtenido con la enzima individual, la cantidad de hidrolizado necesario para alcanzar las COV en cada periodo es entre 22 y 26 % menor, lo cual conlleva a una menor entrada de sólidos al sistema comparado con el experimento 1.

La Figura 12 muestra el balance de electrones para el experimento 2, en esta se observa una disminución gradual de los equivalentes de electrones no determinados para los tres periodos utilizando el hidrolizado de la Mezcla 1, por el aumento de metabolitos e hidrógeno producidos; en este aspecto el butirato y

acetato representaron entre 12 y 19% de los electrones disponibles, mientras el hidrógeno representó aproximadamente un 2.5%, siendo este porcentaje relativamente bajo al ser comparado con lo obtenido con la enzima individual.

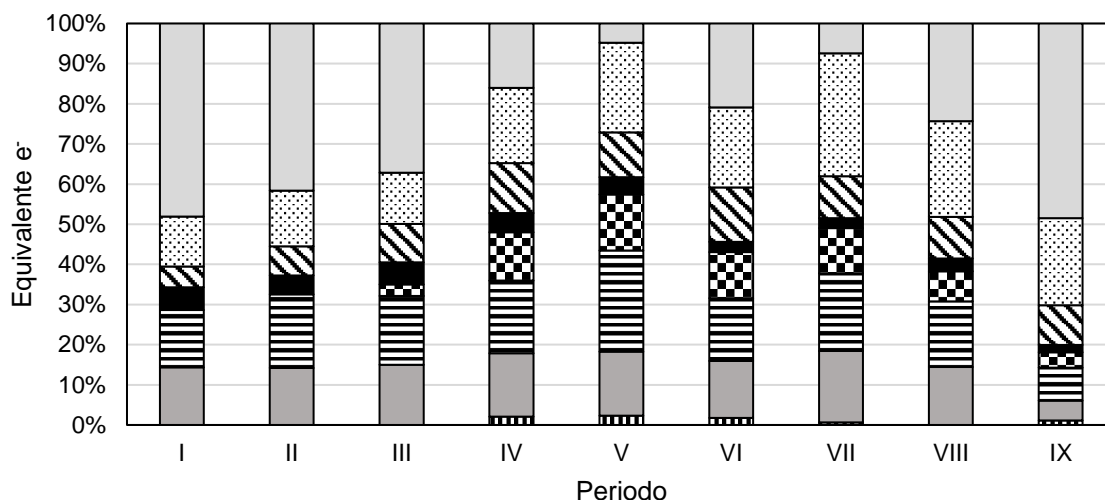


Figura 12. Balance de electrones para los estados estables del CSTR empleando los hidrolizados a partir de la mezcla enzimática Cellulase 50 XL - Viscozyme L. Acetato (■), butirato (▨), formiato (▧), lactato (▣), H₂ (■), azúcares residuales (▤), biomasa (SSV) (▩) no determinado (□).

Por su parte, para el cambio del hidrolizado a la Mezcla 2 en el periodo IV, se observa un cambio en la distribución de los electrones con el aumento en la formación de formiato y lactato, representando este último un sumidero de electrones importante de hasta 10 % de los equivalentes de electrones durante la operación. Además, para los periodos IV y V con la Mezcla 2 es posible explicar más del 80% de la distribución de la DQO alimentada, sin embargo durante la primera caída en la VVPH en el periodo VI y al comparar los periodos con la misma carga, antes y después de la caída de la producción de H₂, (V y VIII, VII y IX), se observa una disminución en la distribución de los equivalentes de electrones, existiendo un desvío de los electrones disponibles hacia la producción de otros metabolitos que no fueron analizados como lo puede ser el valerato, caproato, e isopropanol, o bien la formación de exopolímeros (Carrillo-Reyes et al., 2012; Saady, 2013). Cabe destacar que este comportamiento metabólico pudo ser

influenciado por la composición específica de los hidrolizados obtenidos con las mezclas enzimáticas.

La Tabla 8 muestra el balance de electrones para días específicos de los estados estables de producción de H₂ para el experimento 2. Este balance considera los SSV como biomasa, pudiendo cuantificar hasta 92 % de los equivalentes de electrones que entraron al sistema como DQO soluble, lo cual puede ser atribuido a los SSV propios al hidrolizado como se explicó para el experimento 1. Además, tal como sucedió en el experimento 1, para todos los periodos los SSV en el efluente son menores a los SSV presentes en la alimentación y no es posible discernir la proporción que corresponde al aumento de biomasa y la que proviene del hidrolizado.

Tabla 8. Balance de electrones de días específicos de los estados estables del CSTR empleando los hidrolizados a partir de la mezcla enzimática.

Equivalente e ⁻ (%)	Periodo (día)								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
	4	10	15	19	26	31	36	41	50
Formiato	0.0	0.0	0.0	2.3	1.4	2.2	0.3	0.0	1.1
Acetato	16.5	12.2	12.0	17.2	13.7	14.2	20.0	14.7	5.1
Butirato	18.0	14.7	13.7	20.9	25.3	16.1	21.4	16.1	9.6
Lactato	0.0	0.0	7.8	12.6	16.0	11.6	11.9	8.3	4.8
H ₂	5.6	5.5	5.4	4.7	4.2	2.5	2.4	3.3	1.9
Azúcares residuales	5.6	4.7	10.4	12.6	10.8	13.9	10.3	11.2	10.1
Biomasa (SSV)	11.9	13.9	12.8	17.9	20.6	20.1	23.4	22.9	22.4
Total	57.6	51.0	62.1	88.2	92.0	80.6	89.7	76.5	55.1

SSV: sólidos suspendidos volátiles.

Finalmente, es importante mencionar que el cambio en las rutas metabólicas fue de carácter irreversible, aún después de haber disminuido la COV. Este fenómeno contrasta con lo observado en el experimento 1, en la que después de una caída en la VVPH fue posible recuperar el sistema al disminuir la COV.

4.4. Efecto de la carga orgánica en la VVPH y el REH

En la Figura 13 se observan los resultados obtenidos del análisis de la VVPH y el REH en función a la COV con un diagrama de cajas para el experimento 1. El análisis estadístico muestra que existe un efecto significativo de la COV sobre la VVPH (ANOVA Kruskal-Wallis, valor $p < 0.0001$) con una relación directa en el incremento de la COV ($R = 0.98$, $p = 1.4 \times 10^{-13}$). En cuanto al REH, no existe un efecto significativo con la variación de la COV (ANOVA Kruskal-Wallis, valor $p < 0.05$; $R = 0.45$, $p = 0.06$).

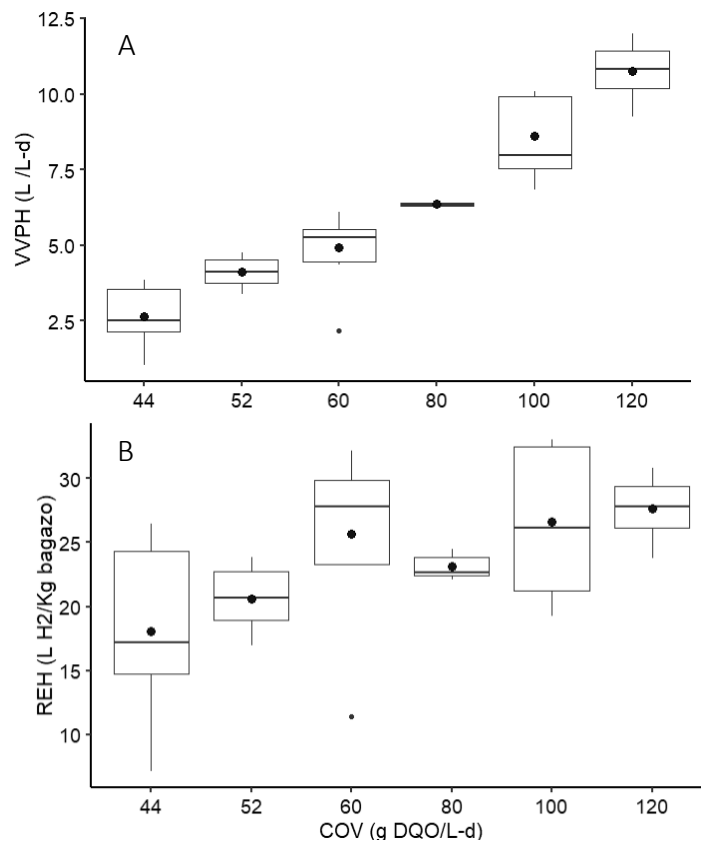


Figura 13. Diagrama de cajas que muestra el efecto de la COV en la VVPH (A) y el REH (B) en el CSTR empleando los hidrolizados obtenidos con la enzima individual del experimento 1. Las cajas se encuentran divididas por la mediana y contienen el 50% de los datos. Promedio de los valores (•). COV: carga orgánica volumétrica, VVPH: velocidad volumétrica de producción de hidrógeno.

Para la operación del experimento 2, no se realizó el análisis estadístico debido a que no se cuenta con suficientes datos por la pronta caída del reactor a la carga de 80 g DQO/L-d. Siendo el único efecto directamente observable el de la disminución de la producción de hidrógeno y el aumento de los metabolitos no determinados en el balance de electrones al aumentar la carga hasta 80 g DQO/L-d con la Mezcla 2. Debido a lo anterior, la carga de 70 g DQO/L-d con una producción de 4.15 ± 0.03 L H₂/L-d se considera la carga más adecuada para la producción de hidrógeno con hidrolizados obtenidos de bagazo de agave con mezclas binarias de las enzimas (Mezcla 2: Cellulase 50 XL - Viscozyme L). Este valor es menor al obtenido con la enzima individual de 9.9 ± 0.03 L H₂/L-d a 100 g DQO/L-d, pero se encuentra dentro del rango de valores reportados en el grupo de investigación (Tabla 9).

Respecto a los REH para el experimento 1, éstos se encontraron en un rango entre 22.8 ± 0.7 y 32.5 ± 0.1 L H₂/kg de bagazo, y el valor más alto se obtuvo a la COV de 100 g DQO/L-d, misma carga con la que se observó la VVPH máxima durante este experimento (Tabla 5). En cuanto al experimento 2, los REH variaron entre 28.5 ± 0.6 y 33.9 ± 0.8 L H₂/kg de bagazo para la Mezcla 1 y entre 10.0 ± 0.3 y 25.2 ± 0.1 L H₂/kg de bagazo para la Mezcla 2 (Tabla 6); para ambas mezclas los valores más altos de REH no corresponden a la COV a la que se alcanzó la VVPH máxima. En este sentido, los REH a la VVPH máxima resultaron de 32.9 ± 0.3 y 22.5 ± 0.1 L H₂/kg de bagazo para la Mezcla 1 y Mezcla 2, respectivamente. Mientras los REH de la enzima individual y la Mezcla 1 son muy similares, el obtenido con la Mezcla 2 se encuentra por debajo de estos valores, pero es comparable al observado a la COV de 60 g DQO/L-d durante el experimento 1 de 23.52 ± 0.41 L H₂/kg de bagazo (Tabla 5).

Tabla 9. Producción de hidrógeno en continuo a partir de hidrolizados de bagazo de agave en reactores CSTR.

Enzima	COV (g DQO/L-d)	VVPH (L H ₂ /L-d)	Costo del L H ₂ (MXN)	REH (L H ₂ /Kg bagazo)	Referencia
Celluclast 1.5L	52.2	2.53	\$18.7	55	Contreras-Dávila et al., 2017
Celluclast 1.5L	44	6	\$7.3	105	Montiel Corona y Razo-Flores, 2018
Celluclast 1.5L - Viscozyme L	80	12.9	\$19.6	115	Montoya-Rosales et al., 2019
Stonezyme	100	2.23	\$31.4	16	Montoya-Rosales et al., 2019
Cellulase 50 XL	100	9.94	\$9.2	32.5	Este trabajo ^a
Cellulase 50 XL - Viscozyme L	60	4.57	\$20.9	32.9	Este trabajo ^b
Cellulase 50 XL - Viscozyme L	70	4.15	\$16.6	22.5	Este trabajo ^c

^aEnzima individual, ^bMezcla 1, ^cMezcla 2

COV: carga orgánica volumétrica, DQO: demanda química de oxígeno, VVPH: velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, MXN: peso mexicano, REH: rendimiento específico de hidrógeno.

Por otra parte, al ser comparados los REH obtenidos con otros hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave utilizados en la producción continua de hidrógeno (Tabla 9), los resultados en ambos experimentos de este trabajo sólo superan el obtenido con la enzima Stonezyme de 16 L H₂/kg de bagazo, siendo este último el más bajo reportado a la fecha, y son menores al rango reportado para hidrolizados obtenidos con la enzima Celluclast 1.5 L, tanto de manera individual como en mezcla enzimática con la enzima Viscozyme L, de 55 a 115 L H₂/kg de bagazo. El bajo REH obtenido durante ambos experimentos puede ser

explicado con la relación que existe entre el rendimiento específico y la cantidad de sustrato utilizado durante la hidrólisis enzimática (Ecuación 3), siendo que durante este trabajo se utilizaron altas concentraciones de bagazo de agave de 70.0 a 87.6 g/L, en comparación a las concentraciones utilizadas en los trabajos anteriormente mencionados con la enzima Celluclast, que fueron de entre 35 y 50 g de bagazo/L.

Por lo anterior, una estrategia a probar es realizar hidrólisis con la enzima Cellulase 50 XL a concentraciones de bagazo más bajas a lo utilizado en este trabajo, lo cual podría reflejarse en un aumento del REH, siempre y cuando esta disminución en la concentración del sustrato no afecte negativamente la concentración de DQO y AT obtenidos en el hidrolizado.

4.5. Análisis de costos

El análisis de costos se realizó con base en el costo del hidrolizado, tomando en cuenta el precio del buffer (\$5.07 MXN/L), la enzima Cellulase 50 XL (\$1907.00 MXN/L), la enzima Viscozyme L (\$1094.00 MXN/L) y el REH obtenido como se había reportado con anterioridad (Olmos-Hernández, 2018).

En la Tabla 9 se presenta una comparación del desempeño y los costos de la producción de H₂ a partir de hidrolizados de bagazo de agave en reactores CSTR realizados dentro del grupo de trabajo. Para el experimento 1 se observa como el costo obtenido se encuentra entre los más bajos reportados hasta ahora, a una alta COV y con una buena VVPH, mientras que para el experimento 2 los costos de producción obtenidos son relativamente bajos respecto a los reportados con anterioridad. Sin embargo, las VVPH obtenidas de 4.57 y 4.15 H₂/L-d son mucho menores a las reportadas con la mezcla enzimática Celluclast 1.5 L - Viscozyme L y lo reportado con la enzima Cellulase 50 XL utilizada de manera individual durante el experimento 1. Por lo anterior, la utilización de la enzima Cellulase 50 XL de manera individual muestra un mejor equilibrio entre la VVPH y el costo de producción asociado, por lo que su aplicación en la hidrólisis de bagazo de agave

para la producción de hidrógeno podría resultar más viable que el de cualquiera de las mezclas estudiadas.

Finalmente, una estrategia que podría ser utilizada para disminuir el costo de los hidrolizados es la variación de las concentraciones de enzimas utilizadas durante la hidrólisis, ya que tal como se observa para la Mezcla 1 y la Mezcla 2, a pesar de que la primera tiene un REH y una VVPH más altos, el costo de producción de H₂ se ve afectado directamente por la adición de aproximadamente el doble de la enzima Cellulase 50 XL durante la preparación del hidrolizado.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. Conclusiones

Los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenidos con la enzima Cellulase 50 XL tanto de manera individual como en mezcla binaria con la enzima Viscozyme L son un sustrato viable para la producción de hidrógeno en continuo en reactores CSTR.

Para los hidrolizados con la enzima Cellulase 50 XL de manera individual se obtuvo una velocidad volumétrica de producción de hidrógeno máxima de 9.9 L H₂/L-d con un rendimiento específico de hidrógeno de 32.5 L H₂/kg bagazo a una carga orgánica volumétrica 100 g DQO/L-d, la cual es la carga más alta en la que se ha observado un estado estable utilizando hidrolizados de bagazo de agave. Respecto al hidrolizado obtenido con la mezcla enzimática Cellulase 50 XL - Viscozyme L, la utilización de ambas mezclas enzimáticas resultó en un aumento de demanda química de oxígeno soluble y azúcares totales en el hidrolizado, sin embargo, la producción de hidrógeno obtenido fue considerablemente menor, obteniéndose valores de velocidad volumétrica de producción de hidrógeno máximos y rendimientos específicos de hidrógeno de 4.6 L H₂/L -d, y 32.9 L H₂/kg bagazo para la Mezcla 1 a una carga orgánica volumétrica de 60 g DQO/L -d, y valores de 4.1 L H₂/L -d, y 22.5 L H₂/kg bagazo a 70 g DQO/L para la Mezcla 2.

Una mayor cantidad de azúcares no está directamente relacionada a una mayor producción de hidrógeno, tal como se observó al utilizar las mezclas enzimáticas que, contrario a lo que se esperaba, produjeron una menor cantidad de hidrógeno en comparación a la utilización de la enzima individual. Posiblemente, los componentes del hidrolizado que no fueron determinados, así como la cantidad y grado de polimerización de los azúcares determinaron el desempeño del reactor.

El costo de producción de hidrógeno para la enzima Cellulase 50 XL utilizada de manera individual (\$ 9.23 MN) se encuentra entre los más bajos reportados hasta ahora para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de

bagazo de agave, posicionando así a la enzima nacional Cellulase 50 XL como una opción viable frente a otras enzimas de importación. Por su parte, los costos de producción de hidrógeno para las mezclas enzimáticas resultaron relativamente bajos (\$20.87 y \$ 16.65 MN para la Mezcla 1 y Mezcla 2, respectivamente), sin embargo, la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno es considerablemente baja en comparación con otras mezclas enzimáticas y la utilización de la enzima Cellulase 50 XL individualmente, por lo que la utilización de la enzima de manera individual se posiciona sobre la utilización de la mezcla binaria.

5.2. Perspectivas

Se requiere de un análisis de costos más detallado que incluya el consumo energético durante la sacarificación y la operación del reactor, el costo de materiales y reactivos empleados, así como los costos asociados al transporte de los materiales, lo cual resulta de gran importancia en las hidrólisis que requieren de una gran cantidad de bagazo.

Como se ha demostrado, la cantidad de azúcares presentes en el hidrolizado no es el único factor para tomar en cuenta en la producción de hidrógeno en continuo, por lo que es necesario realizar un estudio más completo sobre la composición de los hidrolizados y un análisis sobre cómo los componentes presentes están relacionados con las rutas metabólicas durante la producción de hidrógeno.

Los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos con la enzima Cellulase 50 XL tienen un buen desempeño en la producción de hidrógeno en continuo y debido a su origen nacional, esta enzima podría ser adquirida con mayor facilidad. Sin embargo, los rendimientos específicos de hidrógeno bajos podrían afectar el escalamiento del proceso debido a las altas concentraciones de bagazo que se requieren, por lo que resulta importante realizar estudios sobre la sacarificación a menores concentraciones de bagazo que permitan mejorar su competitividad frente a otras las enzimas extranjeras.

REFERENCIAS

- APHA, 1997. Standar Methods for examination of water & wastewater. Retrieved from www.standardmethods.org.
- APHA/WWA/WEF, 2012. Standar Methods for examination of water & wastewater [WWW Document].
- Arooj, M.F., Han, S.K., Kim, S.H., Kim, D.H., Shin, H.S., 2008. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 3289–3294. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.04.022>
- Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R.I., Méndez-Acosta, H.O., 2016a. Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 897–904. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.016>
- Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R.I., Méndez-Acosta, H.O., 2016b. Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 897–904. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.016>
- Ask, M., Olofsson, K., Di Felice, T., Ruohonen, L., Penttilä, M., Lidén, G., Olsson, L., 2012. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochem.* 47, 1452–1459. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.016>
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L.B., Alatraste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2014. Decreasing methane production in hydrogenogenic UASB reactors fed with cheese whey. *Biomass and Bioenergy* 63, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.050>
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L.B., Alatraste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2012. Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 5591–5601. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.004>
- Caspeta, L., Caro-Bermúdez, M.A., Ponce-Noyola, T., Martínez, A., 2014. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl. Energy* 113, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.036>
- Chatellard, L., Trably, E., Carrère, H., 2016. The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. *Bioresour. Technol.* 221, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.084>
- Contreras-Dávila, C.A., Méndez-Acosta, H.O., Arellano-García, L., Alatraste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2017. Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chem. Eng. J.* 313, 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.084>
- Das, D., Veziroglu, T.N., 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6046–6057. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>
- Davila-Vazquez, G., Alatraste-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E., 2008a. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 4989–4997. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.065>
- Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatraste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., Rosales-Colunga, L.M., Razo-Flores, E., 2008b. Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 27–45. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9122-7>

- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E., 2009. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 4296–4304. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.063>
- Dubois, M., K.A.Gilles, J.K.Hamilton, P.A.Rebers, Fred.Smith, 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Elbeshbishy, E., Dhar, B.R., Nakhla, G., Lee, H.S., 2017. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>
- Elsharnouby, O., Hafez, H., Nakhla, G., El Naggar, M.H., 2013. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 4945–4966. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.032>
- Galindo-Hernández, K.L., Tapia-Rodríguez, A., Alatraste-Mondragón, F., Celis, L.B., Arreola-Vargas, J., Razo-Flores, E., 2018. Enhancing saccharification of Agave tequilana bagasse by oxidative delignification and enzymatic synergism for the production of hydrogen and methane. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 22116–22125. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.071>
- Garcia, N.F.L., Santos, F.R. da S., Bocchini, D.A., Paz, M.F. da, Fonseca, G.G., Leite, R.S.R., 2018. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. *Ind. Crops Prod.* 122, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.049>
- Gomez-Tovar, F., Celis, L.B., Razo-Flores, E., Alatraste-Mondragón, F., 2012. Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production. *Bioresour. Technol.* 116, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.109>
- Hafez, H., Nakhla, G., El. Naggar, M.H., Elbeshbishy, E., Baghchehsaraee, B., 2010. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.051>
- Hallenbeck, P.C., 2005. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* 52, 21–29.
- Hu, J., Arantes, V., Saddler, J.N., 2011. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnol. Biofuels* 4, 36. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-36>
- Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 569–582. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713–3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Lee, H.S., Rittmann, B.E., 2009. Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 749–758. <https://doi.org/10.1002/bit.22107>
- Łukajtis, R., Holowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., Kamiński, M., 2018. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 91, 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- Manish, S., Banerjee, R., 2008. Comparison of biohydrogen production processes. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.026>
- Massanet-Nicolau, J., Dinsdale, R., Guwy, A., Shipley, G., 2015. Utilising biohydrogen to increase methane production, energy yields and process efficiency via two stage anaerobic digestion of grass. *Bioresour. Technol.* 189, 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.116>

- Mazzoli, R., 2012. Development of Microorganisms for Cellulose-Biofuel Consolidated Bioprocessings: Metabolic Engineers' Tricks. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 3, e201210007. <https://doi.org/10.5936/csbj.201210007>
- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J.P., Carrère, H., 2014. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 32, 934–951. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.007>
- Montiel Corona, V., Razo-Flores, E., 2018. Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresour. Technol.* 249, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Montoya-Rosales, J. de J., 2018. Producción de hidrógeno en un reactor de filtro percolador: Evaluación de los hidrolizados de bagazo. Tesis de maestría en Ciencias Ambientales. Instituto Potosino De Investigación Científica Y Tecnológica, A.C.
- Montoya-Rosales, J. de J., Olmos-Hernández, D.K., Palomo-Briones, R., Montiel-Corona, V., Mari, A.G., Razo-Flores, E., 2019. Improvement of continuous hydrogen production using individual and binary enzymatic hydrolysates of agave bagasse in suspended-culture and biofilm reactors. *Bioresour. Technol.* 283, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.072>
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., Ohba, M., 2002. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1367–1371. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00120-9)
- Olmos-Hernández, D.K., 2018. Producción de biohidrógeno en un reactor de tanque agitado continuo: Evaluación de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos con enzimas comerciales. Tesis de maestría en Ciencias Ambientales. Instituto Potosino De Investigación Científica Y Tecnológica, A.C.
- Palomo-Briones, R., Trably, E., López-Lozano, N.E., Celis, L.B., Méndez-Acosta, H.O., Bernet, N., Razo-Flores, E., 2018. Hydrogen metabolic patterns driven by *Clostridium-Streptococcus* community shifts in a continuous stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2465–2475. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8737-7>
- Pawar, S.S., Nkemka, V.N., Zeidan, A.A., Murto, M., Van Niel, E.W.J., 2013. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* followed by biogas production in a two-step uncoupled process. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 9121–9130. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.075>
- Saady, N.M.C., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Shen Lee, W., Seak May Chua, A., Koon Yeoh, H., Cheng Ngoh, G., 2014. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chem. Eng. J.* 235, 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.002>
- Show, K.Y., Lee, D.J., Tay, J.H., Lin, C.Y., Chang, J.S., 2012. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15616–15631. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.109>
- Sinha, P., Roy, S., Das, D., 2015. Role of formate hydrogen lyase complex in hydrogen production in facultative anaerobes. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 8806–8815. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.076>
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review, *International Journal of Molecular Sciences.* <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Tanthapanichakoon, W., Jian, S.W., 2012. Bioethanol Production from Cellulose and Biomass- Derived Syngas 16, 1–8. <https://doi.org/10.4186/ej.2012.16.5.1>

- Tapia-Rodríguez, A., Ibarra-Faz, E., Razo-Flores, E., 2019. Hydrogen and methane production potential of agave bagasse enzymatic hydrolysates and comparative technoeconomic feasibility implications. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 17792–17801. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.087>
- Wang, J., Wan, W., 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>
- Wang, J., Yin, Y., 2017. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 4804–4823. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.135>

ANEXOS

Anexo 1

Se presenta la caracterización de las enzimas empleadas para la sacarificación del bagazo de agave en función de sus actividades celulíticas y hemicelulolíticas de las enzimas

Enzima	Celulasa (FPU/mL)	1-4- β - endoglucanasa (EGU/mL)	β - glucosidasa (U/mL) ^a	xilanasa (U/mL) ^b
Cellulase 50 XL	91	2416	36	5588
Viscozyme L	2	211.92	0.74	195

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

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