



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN

FACULTAD DE INGENIERÍA

UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DE RESIDUOS
ALIMENTICIOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS
DURANTE LA FERMENTACIÓN OSCURA”**

TESIS

PRESENTADA POR:

ELBA ADRIANA CHABLE NETZAHUAL

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRA EN INGENIERÍA

OPCIÓN AMBIENTAL

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2020

Aunque este trabajo hubiere servido para el Examen de Grado y hubiera sido aprobado por el Sínodo, sólo el autor es responsable de las doctrinas emitidas en él.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Yucatán, por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

RESUMEN

Se investigó el efecto del pretratamiento de los residuos alimenticios en la producción de biogás durante un proceso de fermentación oscura (FO). Los residuos alimenticios fueron recolectados en un restaurante de la ciudad de Mérida, su composición fue principalmente de pastas, arroz, vegetales y leguminosas. Inicialmente, fueron pretratados por diferentes tiempos (5, 10 y 15 días) mediante una fermentación en estado sólido (FES) cuyo propósito fue que el inóculo, constituido por hongos, segregara enzimas hidrolíticas capaces de romper los enlaces en los carbohidratos estructurales, produciendo partículas más fácilmente degradables. Posteriormente se sometieron a un proceso de hidrólisis enzimática para conseguir la solubilización de los carbohidratos. Se encontró que el tiempo óptimo de FES es de 10 días, donde se obtuvo una concentración máxima de 3.12 g/L de carbohidratos solubles. El producto hidrolizado fue utilizado como sustrato en un proceso de FO para la producción de biogás. El volumen máximo acumulado se obtuvo a los 10 días de FES, igual a 362.74 mL. El análisis del efluente muestra eficiencias de remoción para sólidos totales (ST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) del 99%, así como del 80% para carbohidratos solubles. Los resultados demuestran que la aplicación de un pretratamiento al sustrato de la FO mejora la producción de biogás.

ABSTRACT

The effect of pretreatment of food residues on biogas production during a dark fermentation (DF) process was investigated. The food waste was collected from a restaurant in Mérida city. It was mainly composed of pasta, rice, vegetables and legumes. Initially, the food waste was pretreated during different times (5, 10 and 15 days) through a solid state fermentation (SSF) process whose purpose was to get the inoculum (constituted by fungi) segregate hydrolytic enzymes capable of breaking down the bonds in the carbohydrates structure and therefore, produce more easily degradable particles. Subsequently, the waste was subjected to an enzymatic hydrolysis process to achieve the solubilization of carbohydrates. It was found that the optimal time of SSF was 10 days, where a maximum concentration of 3.12 g / L of soluble carbohydrates was obtained. The hydrolyzed product was used as substrate in a DF process for the production of biogas. The maximum accumulated volume was obtained after 10 days of SSF, equal to 362.74 mL. Effluent analysis show removal efficiencies of total solids (TS) and volatile suspended solids (VSS) of 99%, as well as 80% for soluble carbohydrates. The results show that the application of a pretreatment process to the DF substrate improves the biogas production.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
Introducción	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.1.1. Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Digestión anaerobia	4
2.2 El biogás como fuente de energía.....	6
2.3 Procesos de la digestión anaerobia	7
2.3.1 Fase de hidrólisis.....	8
2.3.2 Fase acidogénica o fermentativa	8
2.1.1 Fase acetogénica	9
2.1.2 Fase metanogénica	11
2.2 Factores que afectan al proceso de digestión anaerobia.....	13
2.2.1 Temperatura	13
2.2.2 pH.....	14
2.2.3 Tiempo de retención hidráulica.....	14
2.2.4 Relación C/N.....	15
2.2.5 Tipo de sustrato y composición	15
2.3 Residuos sólidos generados en Mérida con potencial para producción biogás	16
2.1 Pretratamiento del sustrato para digestión anaerobia.....	17
2.2 Fermentación en estado sólido como pretratamiento biológico	19
2.2.1 Consideraciones para la elección del tratamiento	20
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.....	23
3.1 Obtención de residuos y caracterización.....	23
3.2 Cultivo de los hongos e inoculación para el pretratamiento	23
3.3 Origen del inóculo bacteriano.....	24
3.4 Reactor y procedimiento experimental	24
3.5 Métodos analíticos	26

3.6	Análisis de datos	28
3.6.1	Medidas de Tendencia Central y de dispersión	28
3.6.2	Análisis de varianza de una vía	28
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		30
4.1	Caracterización del residuo	30
4.2	Hidrólisis	30
4.2.1	Análisis de varianza	35
4.3	Fermentación oscura	35
4.4	Análisis final	39
4.4.1	Sólidos	39
4.4.2	Carbohidratos	40
4.4.3	Demanda química de oxígeno	42
4.4.4	Ácidos grasos volátiles (AGV's)	42
CONCLUSIONES		45
Referencias		46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Potencial teórico de producción de biogás de diferentes componentes de los residuos alimenticios.	7
Tabla 2. Caracterización de residuos.....	23
Tabla 3. Principales características de los residuos alimenticios.....	31
Tabla 4. Concentraciones máximas y finales de glucosa	33
Tabla 5. Rendimiento e incremento de carbohidratos.....	33
Tabla 6. DQO (soluble) inicial y final en la hidrólisis enzimática.	34
Tabla 7. Coeficientes de Gompertz.....	37
Tabla 8. Remociones del tratamiento de FO.....	39
Tabla 9. Tasas de consumo y producción de biogás de las diferentes concentraciones de carbohidratos obtenidos en la FES.	40
Tabla 10. AGV's y etanol	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías metabólicas típicas para la conversión de sustrato a hidrógeno ...	10
Figura 2. Acetogénesis por hidrogenación.	11
Figura 3. Rutas principales para la formación de metano..	12
Figura 4. Proceso de la digestión anaerobia.	13
figura 5. Esquema del reactor batch propuesto para la producción de hidrógeno.	26
Figura 6. Diagrama del procedimiento.....	27
Figura 7. Cinética para la obtención de carbohidratos solubles. a) 5 días; b) 10 días; c) 15 días.....	32
Figura 8. Diferencia de medias para sacarosa	36
Figura 9. Diferencia de medias para glucosa	36
Figura 10. Producción acumulada de biogás.....	37

CAPÍTULO 1

Introducción

Una de las principales características que presenta el sistema económico mundial actual es que ha basado el desarrollo de las sociedades en el crecimiento constante del consumo de bienes y servicios, esto brinda un mejor nivel de vida a la población en general, pero tiene como consecuencia una generación incontrolable de desechos.

La generación de residuos es uno de los problemas ambientales más graves que los gobiernos deben enfrentar; en las últimas décadas, su ritmo de crecimiento ha sido acelerado, con una mezcla cada vez más heterogénea y peligrosa tanto para la salud como para el ambiente.

Los residuos sólidos urbanos (procedentes de las actividades domésticas, establecimientos, vías públicas y los resultantes de su limpieza) son generados por las grandes urbes en cantidades considerables y la mayor parte son depositados sin previo tratamiento en sitios de disposición final que no cumplen con los requerimientos normativos, como pueden ser tiraderos a cielo abierto o sitios controlados.

Dentro de un sitio de disposición final se llevan a cabo distintas transformaciones y reacciones químicas que generan subproductos, uno de estos procesos es la lixiviación de la fracción orgánica de los residuos, al no ser retirada ni tratada adecuadamente puede infiltrarse hasta el manto acuífero, proceso acelerado por las condiciones geológicas y suma permeabilidad del suelo prevaleciente en Yucatán.

Debido a que el agua subterránea es la principal fuente de abastecimiento para este Estado y a su alta susceptibilidad a la contaminación por las características del suelo antes mencionadas, es importante considerar el tratamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU).

Una de las alternativas para el tratamiento del FORSU es la digestión anaerobia (DA), generalmente utilizada en el tratamiento de aguas residuales para estabilizar sólidos, solubilizar la materia orgánica, inactivar patógenos y degradar altas concentraciones de sólidos suspendidos, obteniendo como productos finales principalmente CH_4 , dióxido de carbono (CO_2) más trazas de otros gases. Sin embargo, en las etapas intermedias también es posible producir H_2 , mediante el proceso de fermentación oscura, en el cual los sustratos orgánicos son degradados por bacterias anaerobias en ausencia tanto de luz como oxígeno para producir biohidrógeno. Éste, así como el CH_4 , es susceptible a la utilización como biocombustible. Todo a partir de fuentes renovables y accesibles como los residuos sólidos orgánicos, especialmente residuos de comida.

Siendo así, la producción de biogás no solo podría contribuir a la resolución del problema del desperdicio de alimentos, sino también producir una fuente de energía. Sin embargo, los nutrientes almacenados en los residuos de alimentos se encuentran en forma de macromoléculas (como el almidón o proteínas) que deben dividirse en formas utilizables antes de ser digeridas por microorganismos, por ello se hace necesario realizar un pretratamiento al sustrato, cuyo objetivo sea incrementar la disposición de estos nutrientes a los microorganismos.

Considerando lo anterior, para contribuir a la minimización de los impactos negativos que conlleva una incorrecta disposición final de los residuos orgánicos como son la generación de olores, gases de efecto invernadero y su función como medio de propagación de plagas o enfermedades; así también considerando la generación de energías limpias alternas a los combustibles fósiles, en el presente proyecto se propone evaluar el efecto del pretratamiento de residuos alimenticios en la producción de biogás a través de un proceso de fermentación oscura.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de un pretratamiento biológico de residuos alimenticios sobre la producción de biogás en un proceso de fermentación oscura (FO).

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar el efecto de la fermentación en estado sólido (FES) en la composición final de carbohidratos durante una hidrólisis enzimática de residuos alimenticios.
- Determinar las rutas metabólicas seguidas durante el proceso de fermentación oscura (FO) para la producción de biogás.
- Comprobar si existe relación entre el pretratamiento y la composición final del digestato de la FO.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Digestión anaerobia

Ante el gran reto de garantizar el cumplimiento de la demanda de energía, desde años atrás se ha dado inicio a investigaciones encaminadas hacia su obtención desde fuentes alternas y limpias, con el fin de contrarrestar los efectos negativos de los gases de efecto invernadero generados a partir de los combustibles fósiles.

Como resultado, se ha venido estudiando el proceso de digestión anaerobia (DA), puesto que se ha considerado una alternativa y eficiente tecnología que no sólo contribuye a la producción de un biocombustible, el biogás, sino al tratamiento de los residuos orgánicos. Gran parte de su importancia se debe al bajo costo y disponibilidad de los sustratos que se pueden transformar para utilizarse en diversas actividades (calefacción, electricidad, combustión, etc.) (Bharathiraja *et al.*, 2018).

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el que la materia orgánica es metabolizada a biogás por un conjunto de microorganismos en ausencia de oxígeno (Zhang *et al.*, 2016). En la actualidad es ampliamente utilizada para reducir de manera rentable el volumen de biomasa (sustrato) que pueden ser lodos provenientes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, masa lignocelulósica, estiércol y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (Uckun *et al.*, 2016).

El FORSU está compuesto principalmente de residuos alimenticios, considerado uno de los problemas ambientales más severos debido a la cantidad desechada (Zhang *et al.*, 2015). Hacia 2009, el promedio de generación per cápita de 23 países en desarrollo fue de 0.77 kg/persona-d (Troschinetz & Mihelcic, 2009). En el presente se tiene una generación anual de aproximadamente 1 billón de toneladas por año, que podrían aumentar a 3 para 2025 (Troschinetz & Mihelcic, 2009; Lee & Chiu, 2012). Estas cifras muestran el reto que representa su adecuado manejo y tratamiento, principalmente en las grandes ciudades donde comúnmente son dispuestos en rellenos sanitarios controlados o tiraderos a cielo abierto (Ramos *et al.*, 2012; Moreno-Andrade *et al.*, 2015).

La composición del FORSU (principalmente carbohidratos, lípidos y proteínas), que constituye una fuente económica para la obtención de biocombustibles y su grado de biodegradabilidad, lo hacen un excelente sustrato que puede ser tratado mediante DA (Mata-Alvarez *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2015; Moreno-Andrade, *et al.*, 2015;), esto brinda no solamente una oportunidad para la obtención de energía, también contribuye a su manejo sostenible, evitando así una mayor contaminación del ambiente (Xu *et al.*, 2018). Además, el lodo obtenido después del proceso, llamado digestato, tiene un alto valor como fertilizante en cultivos, pudiendo reemplazar a los fertilizantes minerales comerciales (Bharathiraja *et al.*, 2018).

Durante la digestión anaerobia, los sustratos como el FORSU son sometidos a complejas transformaciones que consisten en una serie de reacciones bioquímicas llevadas a cabo bajo condiciones anóxicas (Bouallagui *et al.*, 2005; Adekunle & Okolie, 2015). Cada etapa de este proceso es realizada por grupos de microorganismos especializados, con diferentes tasas de crecimiento que trabajan en un ambiente de interrelación y bajo condiciones ambientales específicas (pH, presión parcial, etc.) (Uckun *et al.*, 2015; Bharathiraja *et al.*, 2018). Comprende cuatro pasos principales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

En la primera etapa, las moléculas insolubles son hidrolizadas por bacterias hidrolíticas a sus monómeros para hacerlos disponibles en la etapa de acidogénesis, donde, a partir de ellos, son producidos los ácidos grasos volátiles (AGV's), alcoholes e hidrógeno por acción de bacterias fermentativas. La acidogénesis es seguida por la acetogénesis, las bacterias acetógenas degradan los AGV's y alcoholes hasta obtener ácido acético. El último paso de la digestión anaerobia es la metanogénesis, en ella los microorganismos metanogénicos degradan el acetato para generar metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) (bacterias acetogénicas) y consumen el hidrógeno para producir también metano (hidrogenotróficas) (De la Torre & Goma, 1981; Dinopoulou *et al.*, 1988; Bagi *et al.*, 1997; Bharathiraja *et al.*, 2018).

En la práctica, los investigadores procuran la optimización de cada una de las etapas para obtener mejores resultados en cuanto a rendimiento de biogás y

producción total, además de conseguir un efluente estabilizado, con una considerable reducción en la demanda química de oxígeno (DQO).

2.2 El biogás como fuente de energía

La fuerte dependencia a los combustibles fósiles para la producción mundial de energía ha resultado en un drástico agotamiento de las reservas, así como un aumento considerable en los precios de éstas (Balat y Balat, 2009; Guo *et al.*, 2010; Singh y Wahid, 2015). Asimismo, el consumo masivo de combustibles fósiles también ha causado graves efectos ecológicos y medioambientales, como el calentamiento global asociado a la liberación continua de gases de efecto invernadero, siendo el más conocido el CO₂ (Chong *et al.*, 2009; Singh y Wahid, 2015).

La producción biológica de biogás (vía DA) a partir del FORSU representa una alternativa de solución sustentable a los dos problemas anteriores (Dung *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la quema de este biocombustible no incrementa sustancialmente la emisión de CO₂ en la atmósfera, ya que corresponde al mismo CO₂ que se liberarían a partir de su descomposición. Además, el carbono liberado es reabsorbido por las plantas para realizar la fotosíntesis (Environmental benefits of biomethane, 2012).

Estudios sugieren un gran potencial para la recuperación de energía. Li *et al.*, (2015) hallaron que es posible obtener una tasa de 0.4-0.5 l CH₄/gSV (Li *et al.*, 2018). En la revisión elaborada por Chien *et al.*, (2018), se encontró un rendimiento máximo de 0.642 m³ CH₄/Kg de SV utilizando como sustrato residuos alimenticios. En la Tabla 1, se muestra la producción teórica de biogás a partir de los componentes de los residuos alimenticios.

Tabla 1. Potencial teórico de producción de biogás de diferentes componentes de los residuos alimenticios.

Componente	Reacción	Biogás (l/g)	CH ₄ (%)
Lípidos	$C_{50}H_{90}O_6 + 24.5H_2O \rightarrow 34.75CH_4 + 15.25CO_2$	1.425	69.5
Carbohidratos	$C_6H_{10}O_5 + H_2O \rightarrow 3CH_4 + 3CO_2$	0.830	50.0
Proteínas	$C_{16}H_{24}O_5N_4 + 14.5H_2O \rightarrow 8.25CH_4 + 3.75CO_2 + 4NH_4^+ + 4HCO_3^-$	0.921	68.8

Fuente: (Wang *et al.*, 2018)

Por otra parte, la generación del metano puede estimarse a partir de la remoción de la DQO, se ha demostrado que la eliminación de 1 kg de DQO produce 0.35 m³ de CH₄ a temperatura y presión estándar (Zhang *et al.*, 2017)

Existen numerosas plantas de biogás instaladas en países de la Unión Europea, Norteamérica y a pequeña escala, en China e India. En Europa, el biogás es principalmente utilizado para la generación de electricidad y ha tenido un importante crecimiento desde 2009, año en el que se generaban 25.2 TWh, en 2020, se espera un incremento hasta llegar a 63.3 TWh. En América del Norte, se han recuperado 155 millones de MJ utilizados para electricidad y calor, todo a partir de residuos orgánicos municipales (Uckun *et al.*, 2016).

2.3 Procesos de la digestión anaerobia

En la DA, la materia orgánica es descompuesta bioquímicamente en ausencia de oxígeno por parte de una variedad de microorganismos para producir energía en forma de ATP. De acuerdo con Mathew *et al.* (2014), la DA consta de cuatro pasos:

1. En la hidrólisis, la materia orgánica compleja, es decir, carbohidratos, proteínas y lípidos se hidrolizan a sus monómeros más simples: azúcares, aminoácidos y ácidos grasos, respectivamente.
2. En la acidogénesis, los microorganismos acidógenos convierten los productos de hidrólisis en ácidos grasos volátiles (AGV), H₂, CO₂ y trazas de H₂S, etanol y NH₃.
3. Las bacterias acetogénicas convierten los AGV en ácido acético, H₂, CO₂ y trazas de otros. Esta es la etapa acetogénica.

4. Finalmente, en la metanogénesis, las bacterias metanogénicas convierten el ácido acético, H_2 y CO_2 en CH_4 y CO_2 .

En los próximos párrafos se explican a detalle cada uno de los procesos.

2.3.1 Fase de hidrólisis

En esta fase, los polímeros orgánicos (carbohidratos, proteínas y grasas) se hidrolizan a sus respectivos monómeros (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos) mediante enzimas extracelulares para facilitar el transporte de nutrientes a través de la membrana celular (Uckun *et al.*, 2016).

De acuerdo con lo reportado por varios investigadores, la etapa de hidrólisis se considera como el paso limitante de la velocidad para la degradación de sustratos orgánicos complejos debido a que puede existir formación de subproductos tóxicos (compuestos heterocíclicos complejos) o de ácidos grasos volátiles no deseables (Yuan & Zhu, 2016).

Bacterias anaerobias estrictas, pertenecientes al género *Clostridium* y anaerobias facultativas, como *Streptococcus* participan en ella. Para lograr la biodegradación, los microorganismos secretan diferentes tipos de enzimas, llamadas enzimas extracelulares, que "cortan" las moléculas más grandes en trozos más pequeños que los microorganismos pueden llevar a la célula y usar como fuente de energía y nutrición (Adekunle & Okolie, 2015)

Con el fin de mejorar la hidrólisis de la biomasa, ésta es generalmente pretratada para lograr que la compleja matriz de sustrato sea más susceptible a los microorganismos y ataques enzimáticos (Uckun *et al.*, 2016).

2.3.2 Fase acidogénica o fermentativa

Los monómeros producidos en la fase hidrolítica son absorbidos por diferentes bacterias anaeróbicas facultativas y obligadas y se degradan nuevamente en ácidos orgánicos de cadena corta como ácido butírico, propanoico, acético, alcoholes, hidrógeno y dióxido de carbono (Adekunle & Okolie, 2015).

Es en esta etapa donde se lleva a cabo la mayor producción de H^+ mediante la fermentación oscura (FO), proceso que consiste en la degradación de sustratos orgánicos por parte de bacterias anaeróbicas en un ambiente privado de luz y oxígeno para producir biohidrógeno (Levin *et al.*, 2004; Manish y Banerjee, 2008).

La descomposición y conversión de polímeros complejos como los carbohidratos en biohidrógeno se lleva a cabo a través de una serie de reacciones bioquímicas como se resume en la Figura 1 (Karthic & Shiny, 2012). El primer paso de este tipo de fermentación es la glucólisis, en la cual la glucosa se convierte en piruvato, (producto intermedio más importante en la FO) con la consecuente formación del dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida (NADH). En condiciones anaeróbicas, el piruvato puede convertirse en acetil-CoA mediante la reacción catalizada por piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR). Los productos de la reacción, además de acetil-CoA y CO_2 , incluyen también ferredoxina reducida, implicada en la reducción de las [FeFe]- hidrogenasas, que posteriormente reducen los protones produciendo hidrógeno (Muyzer y Stams, 2008; Barton y Fauque, 2009).

El piruvato puede oxidarse anaeróbicamente siguiendo una de dos rutas metabólicas: 1) la vía piruvato: formiato liasa (Pfl) o la piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (Pfor) dependiendo del cultivo bacteriano empleado (Bundhoo & Mohee, 2016).

Un dato interesante aportado por Uckun *et al.* (2016) muestra que, si el contenido de carbohidratos del sustrato es alto, la producción de hidrógeno será alta y el biogás generado se puede recolectar directamente para usarlo como biocombustible.

2.3.3 Fase acetogénica

Los productos obtenidos en la fase acidogénica se consumen como sustratos para los otros microorganismos, activos en la tercera fase (Martí, 2006).

En la acetogénesis, los ácidos grasos volátiles se convierten en ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno. El ácido acético es producido por dos diferentes

mecanismos: acetogénesis por hidrogenación, en la cual se produce acetato (CH_3COO^-) como producto final de la reducción de dióxido de carbono (CO_2) más hidrogeno y la acetogénesis por deshidrogenación en donde las bacterias son inhibidas por pocas cantidades de oxígeno (O_2) y por lo tanto solo sobreviven en asociaciones con microorganismos que consumen hidrogeno como las bacterias homoacetogénicas (fermentación láctica) y bacterias sulfato reductoras (Figura 2) (Corrales *et al.*, 2015).

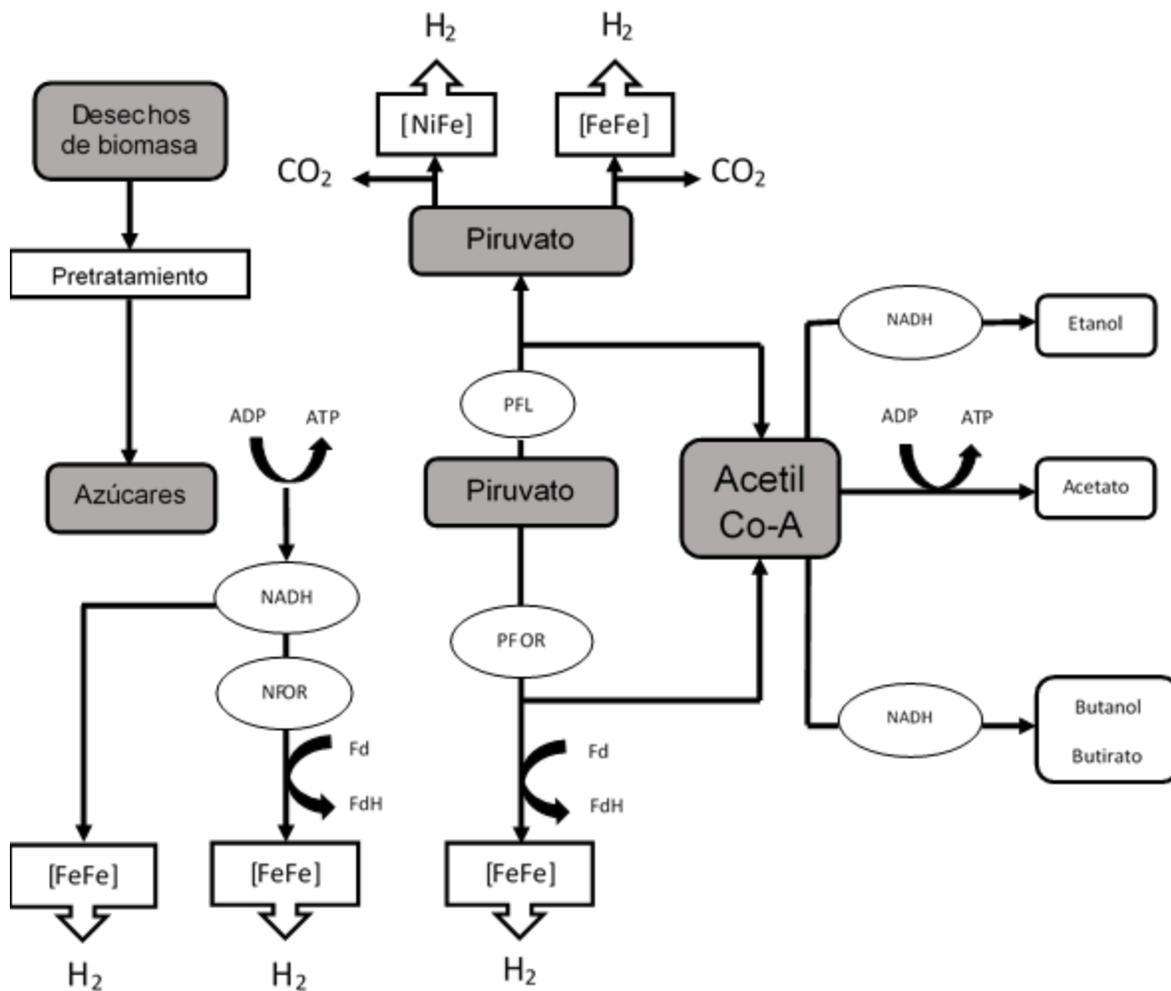


Figura 1. Vías metabólicas típicas para la conversión de sustrato a hidrógeno
Fuente: (Yan *et al.*, 2017)

Dentro de los géneros más sobresalientes de las bacterias homoacetogénicas se encuentran *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum* y *Acetobacterium woodii* (Acuña, 2012).



Figura 2. Acetogénesis por hidrogenación.

Fuente: (Corrales *et al.*, 2015)

Es importante que los organismos que llevan a cabo las reacciones de oxidación anaeróbica colaboren con el siguiente grupo, los microorganismos formadores de metano. Esta colaboración depende de la presión parcial del hidrógeno presente en el sistema. En la oxidación anaeróbica, los protones se utilizan como aceptores de electrones finales que conducen a la producción de H₂. Sin embargo, estas reacciones de oxidación solo pueden ocurrir si la presión parcial del hidrógeno es baja, lo que explica por qué la colaboración con los metanógenos es muy importante ya que consumirán continuamente el H₂ para producir metano. Por lo tanto, durante esta relación simbiótica, se produce una transferencia de hidrógeno entre especies (Adekunle & Okolie, 2015) .

2.3.4 Fase metanogénica

En la fase metanogénica, se lleva a cabo la producción de metano y dióxido de carbono por parte de bacterias metanogénicas a partir de los productos de la acetogénesis en condiciones anaeróbicas estrictas (Teghammar, 2014).

La formación de metano se produce a partir de dos rutas principales, cuyas reacciones se muestran en la Figura 3. La primera, es la acetoclástica en la cual los microorganismos crecen principalmente en su sustrato (acetato) y la segunda, es la hidrogenotrófica en donde los microorganismos crecen en sustratos como hidrógeno (H) y dióxido de carbono (CO₂). Su metabolismo se caracteriza por integrar las vías biosintéticas y bioenergéticas para la producción de ATP, además en ausencia de hidrógeno, oxidan compuestos para la obtención de electrones (Corrales *et al.*, 2015).

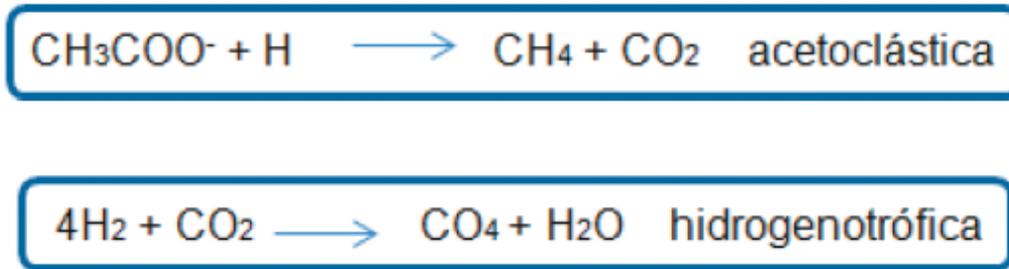


Figura 3. Rutas principales para la formación de metano.
Fuente:(Corrales *et al.*, 2015).

La metanogénesis es la etapa más importante en el proceso de digestión anaeróbica porque en ésta se llevan a cabo las reacciones bioquímicas más lentas, asimismo, se encuentra considerablemente influenciada por las condiciones operativas, como la composición del sustrato, la velocidad de flujo de alimentación (tiempo de retención hidráulico, TRH), temperatura, agitación y el pH. La sobrecarga del digester, los cambios de temperatura o la entrada de una gran cantidad de oxígeno pueden resultar en la inhibición de la producción de metano (Irvan *et al.*, 2016).

Los organismos metanogénicos se clasifican dentro del dominio *Archaea*, y, morfológicamente, pueden ser bacilos cortos y largos, cocos con diferentes asociaciones celulares, células en forma de placas y metanógenos filamentosos, existiendo tanto Gram positivos como Gram negativos dependiendo del sustrato sobre el que crecen. El análisis del ARNr 16S ha permitido identificar aproximadamente 90 especies de metanógenas distribuidas en 5 clases distintas: *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanomicrobiota*, *Methanopyri* y *Methanosarcinales* (Corrales *et al.*, 2015).

La Figura 4 resume todo el proceso de digestión anaerobia, incluyendo la identificación de las cuatro etapas descritas anteriormente.

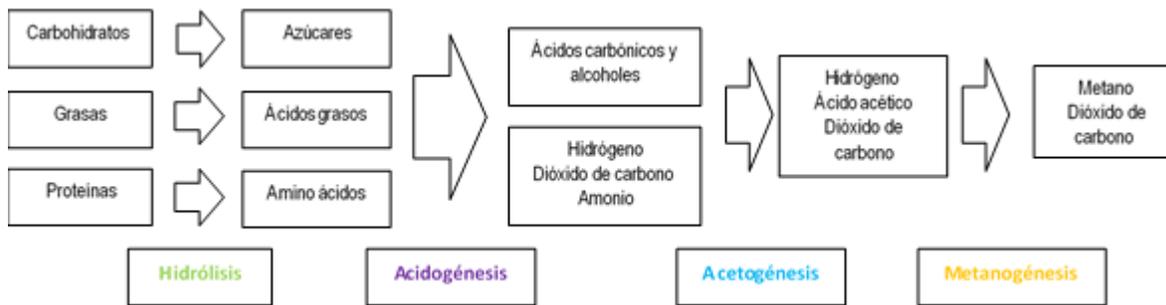


Figura 4. Proceso de la digestión anaerobia.
Fuente: (Al Seadi *et al.*, 2008)

2.4 Factores que afectan al proceso de digestión anaerobia

El consorcio de microorganismos encargados de la digestión anaerobia trabaja de manera conjunta y antagónica al mismo tiempo, resultando en cambios dentro del sistema como respuesta a las diferentes condiciones ambientales a las que son expuestos.

Los factores que influyen de manera más importante en este proceso son los siguientes:

2.4.1 Temperatura

Este parámetro tiene influencia sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos, la actividad enzimática, características del sustrato, estabilidad del sistema y, por lo tanto, en el rendimiento del biogás (Dela-Rubia *et al.*, 2002; Forster-Cameiro *et al.*, 2008; Bouallagui *et al.*, 2010; Riau *et al.*, 2010).

A temperaturas termofílicas (55°-70°) es notable el aumento de la actividad enzimática debido a mayores velocidades de reacción, lo que brinda al sistema una gran capacidad de carga orgánica incrementando así la productividad de biogás en comparación con un ambiente mesofílico (37°) (He *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2015).

No obstante, en este último se requiere una menor cantidad de energía y es posible tener control del proceso, esto es, el sistema no es altamente sensible a los cambios en las condiciones ambientales (Karagiannidis & Perkoulidis, 2009; Kwietniewska *et al.*, 2014), se disminuye el riesgo de generación de sustancias inhibitoras tales

como el ión amonio y el exceso de AGV's que provocan la acidificación, reduciendo la actividad metanogénica (Fezzani & Cheikh, 2010; Kwietniewska & Tys, 2014).

Las desventajas de la condición mesofílica radican en la escasa biodegradabilidad del efluente y el desequilibrio en los nutrientes (Bowen, Dolfing *et al.*, 2014). Así, las condiciones óptimas para la DA son termofílicas para las fases de hidrólisis/acidogénesis y mesofílicas para metanogénesis (Lee *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2015).

2.4.2 pH

Los desbalances en el pH son creados especialmente durante la hidrólisis de lípidos y proteínas, debido a la posible acumulación de amonio y AGV's. La consecuente disminución del pH inhibe la actividad de las enzimas extracelulares y la velocidad de hidrólisis, haciendo de esta etapa una limitante para los posteriores procesos (Uckun *et al.*, 2016).

Por otro lado, el exceso de amonio inhibe la síntesis de enzimas metanogénicas, crea un desbalance de iones positivos y deficiencias de potasio, provocando lisis en las células (Mata-Alvarez, 2003).

Durante la etapa fermentativa (acidogénesis) es conveniente que el pH ronde entre 5.5 y 6.5 mientras en la metanogénesis sea de 6.5-8.2 (Ward *et al.*, 2008; Appels *et al.*, 2008; Ogejo *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2015).

2.4.3 Tiempo de retención hidráulica

El tiempo de retención hidráulica (TRH) se refiere al tiempo requerido para completar la degradación del sustrato. Para establecer un TRH efectivo se debe tomar en cuenta el tipo de sustrato, la carga orgánica y la temperatura a la que se realiza la DA (Ekama & Wentzel, 2008; Mao *et al.*, 2015).

Cuando se tienen tiempos de retención menores al óptimo, el medio se acidifica por acumulación de AGV's mientras que valores mayores sugieren que los componentes dentro del digestor no están siendo efectivamente utilizados por el inóculo. Cuando el TRH es corto y la tasa de crecimiento bacteriano es menor a su

pérdida, el sistema puede fallar al ocurrir un “lavado” del inóculo (Nagamani & Ramasamy, 1999).

2.4.4 Relación C/N

Este parámetro se encuentra estrechamente relacionado con el pH (Kwietniewska & Tys, 2014). Estudios han comprobado que para degradar de manera óptima residuos orgánicos se requiere una relación de entre 20 y 35 (Khalid *et al.*, 2011). Cuando este valor es menor significa que el sustrato es rico en proteínas (y por lo tanto en nitrógeno), en consecuencia, se tendrá un exceso de amonio que puede acidificar el medio y disminuir la degradación de compuestos de carbono. Cuando, por el contrario, esta proporción es mayor, la cantidad de nitrógeno resulta insuficiente para el crecimiento de la masa celular (Zhang *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2015).

2.4.5 Tipo de sustrato y composición

Una gran variedad de biomasa puede usarse como sustrato de la DA, no obstante, es importante que cumpla con los requerimientos nutricionales de los microorganismos en lo que se refiere a energía y componentes vitales para la síntesis de nuevas células, tales como elementos traza y vitaminas (Aslanzadeh, 2014).

La composición del sustrato afecta la calidad del digestato, influye en la cantidad de nutrientes finales que pudieran ser aprovechados por las plantas cuando se usa como fertilizante y en la concentración de metales contaminantes (Adekunle & Okolie, 2015).

Algunos de los sustratos más comunes en plantas de biogás alrededor del mundo son los siguientes:

- Estiércol de animales
- Residuos agrícolas y derivados
- Aguas residuales
- FORSU (particularmente residuos de comida)

(Adekunle & Okolie, 2015).

Cuando el sustrato no contiene los macro o micronutrientes necesarios para el desarrollo del inóculo, tales como fósforo, potasio, magnesio y sulfuro se resulta necesario añadirlos para prevenir inhibiciones (El-Mashad & Zhang, 2010; Zhang & Jahng, 2012).

2.5 Residuos sólidos generados en Mérida con potencial para producción biogás

En el año 2004, se realizó una estimación de la generación per cápita de residuos sólidos que indicó un valor de 0.843 kg/d para el municipio de Mérida (PEPGIR, 2012), mismo que incrementó para 2012 a cerca de 1 kg/d (SEDUMA, 2012).

En el Diagnóstico Básico para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos se determinó que, del total de los residuos sólidos generados, 37.9% son orgánicos, al mismo tiempo, 25.5% de la fracción anterior corresponde a los residuos alimenticios (Gutiérrez *et al.*, 2012).

Dentro de las principales fuentes de residuos alimenticios se encuentra el sector restaurantero, presente en Yucatán con 10,382 establecimientos, en los que se incluyen las cafeterías escolares y negocios familiares (Censos económicos, 2014).

Tomando en cuenta que, para maximizar la cantidad de biogás procedente del proceso de fermentación oscura, el metabolismo de la bacteria debe enfocarse hacia la producción de ácidos grasos volátiles y que éstos son mayormente procedentes de la fermentación de carbohidratos o proteínas (Zahedi *et al.*, 2013), se consideró la utilización de los residuos de comida provenientes de un restaurante para la producción de biogás mediante digestión anaerobia.

En la bibliografía pueden encontrarse numerosos estudios que consideran los residuos de comida como sustrato para la generación de biogás; Cadavid y Bolaños (2015) utilizaron una mezcla de frutas y verduras colectadas de un mercado con un contenido de 90.3% de sólidos totales, 85.9% de carbohidratos 2.3% de nitrógeno, 7.3% de hidrógeno y 35.3% de oxígeno.

En otro estudio, la mezcla de residuos de alimentos proveniente de un restaurante con 29% de sólidos totales, 25.3% sólidos volátiles, una relación carbono-nitrógeno (C/N) de 27, 48.3% carbono y 6% hidrógeno, tuvo un rendimiento teórico de 52.5% de CH₄ y 0.93 m³/kg SV de biogás (Solarte *et al.*, 2017).

La mezcla de los residuos orgánicos proveniente de una cafetería escolar, con 21.2% de sólidos totales, 13.9% de carbohidratos, pH 5.15, 3.68 nitrógeno y 9.7% de carbono tuvo una producción máxima de 437 mL de biogás a una concentración de 1.2 g SVT (sólidos volátiles totales). En este estudio, la mezcla se compuso principalmente de frutas, verduras, y harinas (Berrelleza *et al.*, 2016).

De los residuos orgánicos recolectados de la cafetería escolar de la UNAM Campus Juriquilla, de Querétaro, México, cuya composición fue: 62.7% residuos vegetales, 8.2% residuos cárnicos y 7.2% harinas (incluye pasta, tortillas y pan) se obtuvieron las siguientes características: densidad 1115 kg/m³, sólidos totales 155 g/L, sólidos volátiles 142 g/L, sólidos fijos 13 g/L, carbohidratos 47.5 g/L, DQO 343 g/L, pH 8 y nitrógeno amoniacal 400 mg/L (Moreno *et al.*, 2015).

Deenpanraj *et al.*, (2017) demostraron que con un pretratamiento de ultrasonido al sustrato de la digestión anaerobia (codigestión de residuos alimenticios y aves de corral) se lograba una remoción de hasta 61.83% de los Sólidos totales (ST), 65.21% de los SV y 54.66% de la DQO, valores más altos que en el grupo al que no se le aplicó tratamiento alguno; 57.94, 58.83 y 50.19% para ST, SV y DQO respectivamente. Respecto a la obtención de biogás, se logró un rendimiento de 821 ml/d para el mismo pretratamiento, frente a los 712.6 ml/d en el grupo control (Deenpanraj *et al.*, 2017).

2.6 Pretratamiento del sustrato para digestión anaerobia

En la DA, la hidrólisis es el paso limitante. Con el objetivo de mejorar el desempeño en esta etapa y con ello la producción de biogás se puede recurrir al uso de un pretratamiento, que puede ser mecánico, térmico, químico o biológico (Salem *et al.*, 2018).

El objetivo de estos pretratamientos es solubilizar los compuestos orgánicos, especialmente los recalcitrantes, para hacerlos más biodegradables. Adicionalmente, el pretratamiento favorece la reducción de la biomasa, logrando menores volúmenes de lodo y una mayor producción de biogás (Deenpanraj *et al.*, 2017).

Es importante mencionar que el método de pretratamiento debe seleccionarse en función de las características del sustrato y los bioprocesos posteriores (Raud *et al.*, 2015, Carrere *et al.*, 2016). Karthukeyan *et al.* (2017) consideran cuatro categorías:

1. Físico y mecánico: su objetivo es incrementar el área de superficie disponible del sustrato para el contacto con los microorganismos que se encargan de la hidrólisis de las macromoléculas. Facilita el fácil manejo y la alimentación del sustrato en los digestores, así como la digestión/fermentación al requerir tiempos de retención más cortos. La molienda, picado, trituración, prensado centrifugación-lisis, colisión de líquidos y homogeneización de alta presión son algunos de las técnicas consideradas dentro de esta categoría. Cabe mencionar que la composición original del sustrato no resulta afectada. Los requerimientos de energía para pueden ser altos.
2. Térmico: dado que se opera a temperaturas y presiones elevadas, ayuda a solubilizar una mayor cantidad de azúcares al incrementar la actividad hidrolítica y proporciona una pulpa más homogénea para alimentar los reactores. Es un procedimiento fácil y rápido respecto a otras técnicas. Otra ventaja importante es que el sustrato esteriliza, es decir, se desactivan los microorganismos nativos no deseados (por ejemplo, bacterias productoras de ácido láctico) que podrían afectar los rendimientos de CH₄ o H₂. Por otro lado, este pretratamiento también favorece la formación de compuestos recalcitrantes (como melanoidinas) a más de 150 ° C (con un tiempo de retención corto) o <100 ° C (tiempo de retención más largo) que puede afectar la recuperación del producto.
3. Químico: en este se modifican las propiedades físico-químicas y biológicas del sustrato. Es un proceso rápido que requiere un alto control con el fin evitar

la acumulación de inhibidores como furanos o fenoles, ácidos grasos de cadena larga o compuestos recalcitrantes. Se sabe que el tratamiento previo con ácido es eficaz para solubilizar carbohidratos, mientras que el tratamiento previo con álcali es eficaz en la solubilización de proteínas y lignina, así como en la saponificación de lípidos.

4. **Biológicos:** suele ser un proceso lento que requiere un tiempo de retención más prolongado, en éste, los microorganismos utilizan los azúcares libres como fuente principal de carbono. Existen pocos estudios de casos en los que se utilizan enzimas microbianas puras para el tratamiento previo en residuos de comida, ya que resulta costoso y requieren altas concentraciones de enzimas para lograr un resultado aceptable. Como opción para reducir los costos, pueden usarse enzimas crudas producidas a partir del lisado de biomasa (Kiran *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2016). Es necesario ampliar el conocimiento en este rubro, ya que aún no se sabe con certeza si los tratamientos biológicos constituyen una opción viable para el pretratamiento.

2.7 Fermentación en estado sólido como pretratamiento biológico

Considerando las desventajas de utilizar enzimas crudas o microbianas, para el presente proyecto se llevará a cabo una fermentación en estado sólido (FES) como pretratamiento a los residuos de comida. La FES es un proceso en el que los microorganismos crecen en un entorno sin agua libre o con un contenido muy bajo de ésta. Su importancia data de hace miles de años, principalmente para el procesamiento de alimentos como panes o quesos (Soccol *et al.*, 2017).

Como principales ventajas permite el uso de residuos sólidos agroindustriales como sustratos y por lo tanto facilita el manejo de los residuos de una planta, se requiere poca energía, se producen pocas cantidades de aguas residuales, no requiere el uso de solventes y los costos de operación son mínimos. Todo esto, con respecto a la fermentación sumergida, caso contrario a la FES, en la que los microorganismos crecen en un medio con alto contenido de agua (Farinas, 2015). Además de lo

anterior, la FES ofrece un ambiente con características muy parecidas al ambiente natural, no se requiere esterilización y resulta poco susceptible a la contaminación bacteriana y a la inhibición por el sustrato (Martins, 2011).

2.7.1 Consideraciones para la elección del tratamiento

Los factores más importantes que se deben considerar durante el desarrollo de una FES son el tipo de microorganismos y la elección de sustratos.

Los sustratos más prometedores incluyen residuos agrícolas y forestales, muy abundantes y normalmente se utilizan poco. Entre otros podrían mencionarse: bagazos, salvados de cereales, pulpa de café, mazorcas de maíz y paja. Estos materiales están compuestos básicamente por celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón y pectina (Soccol y Vandenberghe, 2003; Singhanía *et al.*, 2009; Farinas, 2015).

El conjunto de polisacáridos mencionados anteriormente son componentes estructurales, brindan resistencia, rigidez y son exclusivos de los vegetales, conocidos comúnmente como fibras. Tomando en cuenta que alrededor del 60% de los residuos de comida son vegetales, este sustrato presenta características que lo hacen susceptible de ser utilizado para la FES.

Los microorganismos que han brindado los mejores resultados durante la FES son los hongos filamentosos (o mohos), capaces de sintetizar cantidades considerables de enzimas y otros metabolitos en estas condiciones (Farinas, 2015). Pueden utilizarse igualmente levaduras y algunas especies de bacterias, (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* y *Lactobacillus sp.*) de las que se ha reportado una producción importante de enzimas en estado sólido (Singhanía *et al.*, 2009).

En la FES el metabolismo de los hongos puede transformar los carbohidratos estructurales en carbohidratos solubles no estructurales utilizando enzimas celulolíticas, así como hidrolizar proteínas y modificar la composición de aminoácidos del sustrato, facilitando de esta manera la hidrólisis en la FO (Yahmed *et al.*, 2017).

Los hongos filamentosos de los que más se tiene conocimiento son los pertenecientes al género *Aspergillus* y *Actinomycetes*. Sin embargo, el inóculo debe elegirse con base en la composición del sustrato. Por ejemplo, para la degradación de residuos lignocelulósicos, los “hongos de la madera” son los más indicados, entre ellos se encuentran los Basidiomycetes, Ascomycetes, y pertenecientes al género *Trichoderma* (Yoon *et al.*, 2014).

Fang *et al.*, (2018) estudiaron el efecto del pretratamiento de biomasa lignocelulósica utilizando las especies de hongos *Pleurotus Sajor Caju* y *Trametes Versicolor* en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV's) (precursores del biogás). El rendimiento de AGV's del sólido pretratado por *P. sajor-caju* se mejoró sustancialmente (240 mg de DQO/gSV) a los 14 días del tratamiento. Respecto al grupo de control (110 mg DQO/g VS), esto significó un incremento en aproximadamente 1.17 veces.

Por otro lado, Yahmed *et al.*, (2017), utilizaron una cepa de *Aspergillus fumigatus* para el pretratamiento vía FES de *Ulva sp.*, alga comúnmente conocida como lamillas. Observaron que la penetración del micelio en el sustrato aumenta el tamaño de los poros y de las áreas de superficie, permitiendo una mayor área de superficie disponible. Lo anterior facilita la accesibilidad de las enzimas haciendo al sustrato propenso a los ataques enzimáticos.

De acuerdo con sus resultados, la fermentación de las algas logró obtener un sustrato más fácilmente digerible, mejorando así el potencial bioquímico del metano.

Para comprobar la factibilidad de utilizar la FES como pretratamiento para la producción de biohidrógeno vía FO, Han *et al.*, (2015) emplearon residuos alimenticios como sustrato y los hongos *Aspergillus awamori* y *Aspergillus oryzae* para producir glucoamilasa y proteasa, respectivamente. Estas enzimas son utilizadas para el proceso de hidrólisis en el que se genera glucosa y nitrógeno amino libre (NAL), sustratos en la fermentación oscura.

La eficiencia de conversión del hidrolizado alcanzó el 82.8–87.2% al usar la FES como pretratamiento biológico, mismo que se llevó a cabo durante 24 h. Con esto

se concluye que la eficiencia de la fermentación de los residuos alimenticios podría mejorarse mediante la hidrólisis enzimática.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Obtención de residuos y caracterización

Los residuos fueron obtenidos de un restaurante. Antes de ser almacenados, se trituraron y mezclaron para garantizar su homogenización.

Esta muestra fue almacenada en un congelador para conservar sus características originales.

En la Tabla 2 se muestran los parámetros y métodos de análisis.

Tabla 2. Caracterización de residuos.

Análisis	Método de determinación
Humedad	NMX-F-083-1986. Determinación de humedad en Productos alimenticios.
Sólidos suspendidos totales	2540 D. Sólidos totales en suspensión secados a 103-105 °C. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20 th Edition, 1998.
Sólidos suspendidos volátiles	2540 E. Sólidos fijos y volátiles incinerados a 550 °C. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20 th Edition, 1998.
Carbohidratos	Dubois <i>et al</i> , 1956.
Proteínas	Análisis elemental en ambiente de oxígeno puro.
Lípidos	5520 D. Método de extracción por Soxhlet. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20 th Edition, 1998.
Relación C:N	Análisis elemental en ambiente de oxígeno puro.
Demanda química de oxígeno	5220 D. Reflujo cerrado, método colorimétrico. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20 th Edition, 1998.
pH	4500-H + B. Método electrométrico. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20 th Edition, 1998.

3.2 Cultivo de los hongos e inoculación para el pretratamiento

En vista de que el cultivo de hongos es sencillo y los mohos crecen en sustratos alimenticios como frutas y verduras, se obtuvo una colonia mediante la exposición

de éstas a condiciones de elevada humedad durante un periodo de 5 días hasta que se formó una colonia de hongos en la superficie del sustrato. Con esto también se garantizó el aislamiento de una cepa local, que además de reducir los costos de su cultivo requirió de un mínimo control para garantizar su adecuado desarrollo.

Esta 'pre-fermentación' se realizó en un recipiente con volumen aproximado de 500 ml de boca ancha, donde se colocó una porción de un vegetal (betabel). Se dispuso a la intemperie tapado con una malla para evitar la invasión por animales e insectos durante aproximadamente 5 días. Se observó diariamente para confirmar el crecimiento de hongos.

Con la colonia obtenida se llevó a cabo una siembra en el laboratorio, utilizando como medio de cultivo agar extracto de malta. Se incubó por 7 días a temperatura ambiente y posteriormente fueron resembradas las colonias que presentaron un mejor desarrollo. (Yahmed *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2018,). Una vez que las colonias aisladas crecieron en el medio sólido se repitió la resiembra, en este caso, en caldo extracto de malta. A partir de ésta se tomó el inóculo para la FES y se realizó el conteo en placa para confirmar la concentración de esporas añadidas al sustrato.

3.3 Origen del inóculo bacteriano

El lodo utilizado como inóculo para la FO se colectó de un digestor anaerobio para el tratamiento de aguas municipales. Las muestras se almacenaron a 4°C al momento de ser trasladadas a laboratorio. Este fue pretratado a 105°C por 24 h para evitar crecimiento de bacterias metanogénicas.

3.4 Reactor y procedimiento experimental

Para la FES se acondicionaron matraces Erlenmeyer de 250 ml como reactores. En cada uno se añadieron 15 g de residuo sólido seco, triturado y esterilizado, 70% de humedad relativa y 1 ml de inóculo (tomado de la siembra en caldo de cultivo). Todo se incubó en una estufa a 30°C (Fang *et al.*, 2018). La duración de la fermentación fue de 5, 10 y 15 días. Cada experimento se hizo por triplicado, más un control, es decir, una muestra sin inóculo (Yahmed *et al.*, 2017).

Una vez cumplido el tiempo de cada variante de FES se llevó a cabo una hidrólisis enzimática. En una botella para cultivo con capacidad de 2L se añadió el fermentado obtenido en la FES. Se adicionó aproximadamente 1 L de agua destilada a 55°C y 15 g de residuo sólido seco y triturado para obtener 3% en radio de masa/volumen. Las condiciones de operación fueron las siguientes:

- Volumen total: 1 L
- Temperatura: 55°C
- Agitación: 500 RPM
- Tiempo de operación: 11 h

Durante la hidrólisis se realizó una cinética de carbohidratos solubles cuyas muestras se tomaron cada 60 min. Al término de operación, el sustrato hidrolizado fue almacenado en un congelador para su uso en la FO.

En el caso de la FO, se utilizaron reactores batch con tres repeticiones, que consistieron en una botella serológica de 120 ml (Bansal *et al.* 2013). El reactor se alimentó con el sustrato hidrolizado y el inóculo, en una proporción 80:20 (%v/v) (Bansal *et al.* 2013). El aire del reactor fue purgado con nitrógeno gaseoso durante 30 s para permitir un medio anóxico (Wang *et al.* 2011).

Una vez agregados todos los elementos al reactor, se calentó a 37°C con agitación de 150 rpm/min para proveer el mejor contacto entre el sustrato y el consorcio microbiano (Kawagoshi *et al.* 2005; Cai & Wang 2016).

Cada reactor operó aproximadamente por 48 h, con medición del gas acumulado cada 60 min. El gas generado se recolectó por medio de una botella serológica de 120 mL.

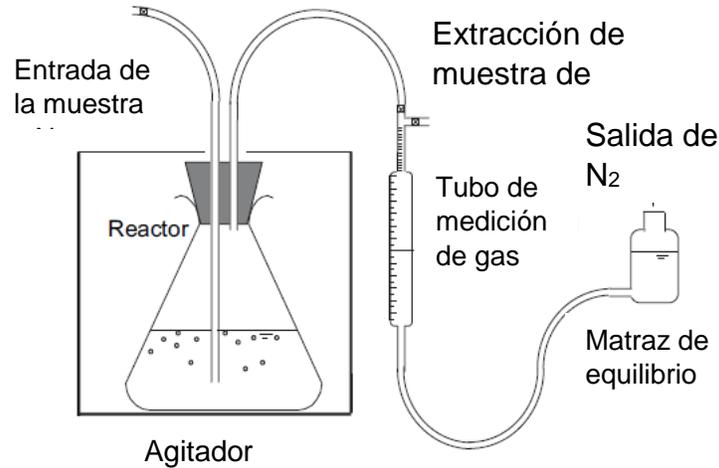


figura 5. Esquema del reactor batch propuesto para la producción de hidrógeno.

3.5 Métodos analíticos

Los residuos alimenticios, tanto del afluente como del efluente, fueron analizados para conocer sus características de pH, demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV), de acuerdo con los métodos establecidos por APHA-AWWA-WPCF (1998).

La cantidad de gas producido se midió por el método de desplazamiento de líquido (Mu *et al.* 2007; Cai *et al.* 2009; Cai & Wang 2016).

El efluente del reactor se analizó utilizando cromatografía de gases para determinar la cantidad de ácidos grasos volátiles (AGV) y etanol.

En la Figura 6 se muestra un resumen del procedimiento.

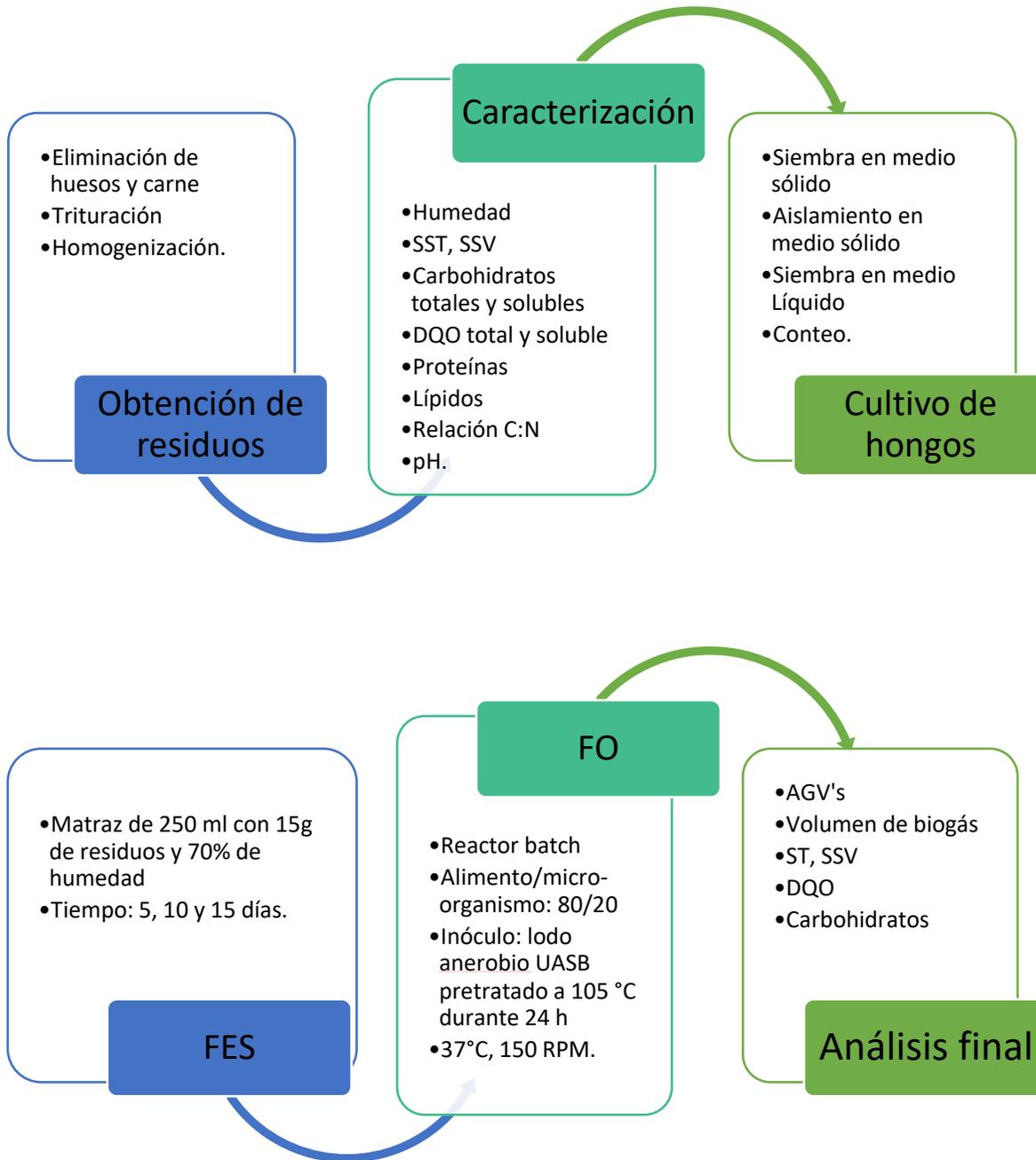


Figura 6. Diagrama del procedimiento

3.6 Análisis de datos

3.6.1 Medidas de Tendencia Central y de dispersión

Se calculó la media, varianza, desviación estándar y coeficiente de variación de los datos obtenidos en la etapa de fermentación oscura.

3.6.2 Análisis de varianza de una vía

Para la determinación del tiempo óptimo de fermentación en estado sólido efectuó un análisis de varianza de una sola vía de la siguiente forma:

$$y = \mu + \tau_i + \varepsilon$$

Donde:

y: concentración de carbohidratos solubles

μ : es la media global o gran media

τ_i : efecto de la variación del tiempo de fermentación en estado sólido

ε : es el error aleatorio

La cinética de carbohidratos solubles pudo ser analizada utilizando una covarianza:

$$y = \mu + \tau_i + B_j + \varepsilon$$

Donde:

y: concentración de carbohidratos solubles

μ : es la media global o gran media

τ_i : efecto de la variación del tiempo de fermentación en estado sólido

B_j : efecto del transcurso del tiempo durante el tratamiento

ε : es el error aleatorio

Para la determinación de la concentración óptima de carbohidratos solubles en la fermentación oscura también se realizó un análisis de varianza de una sola vía:

$$y = \mu + \tau_i + \varepsilon$$

Donde:

y: producción de H_2

μ : es la media global o gran media

τ_i : efecto de la variación de la concentración de carbohidratos solubles en la producción de hidrógeno

ε : es el error aleatorio

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización del residuo

Los residuos alimenticios fueron obtenidos de un restaurante de la ciudad de Mérida (Anexo I). Los principales componentes de la muestra fueron:

- Pastas
- Arroz
- Tortillas de maíz
- Vegetales diversos
- Leguminosas (frijol, lentejas)

Los huesos y carne fueron retirados de la mezcla para evitar obstrucciones al momento de triturar.

La trituración se llevó a cabo en una licuadora marca Oster modelo 60-91T2, tratando de añadir la menor cantidad de agua posible.

Una vez homogeneizados los residuos, se procedió a su secado en un horno a 60°C por 24 h para proceder con las determinaciones. Una vez que estuvieron completamente secos fueron triturados con ayuda de un mortero y almacenados a temperatura ambiente.

Los resultados de las pruebas de caracterización del residuo se muestran en la Tabla 3.

4.2 Hidrólisis

De acuerdo con los resultados obtenidos en el conteo en placa, el sustrato de la FES se inoculó con una concentración de 4×10^7 esporas/ml.

El objetivo de este procedimiento fue crear un soporte de crecimiento a los hongos que permitiera la segregación de enzimas hidrolíticas. Se supuso que a mayor tiempo de FES se generaría una mayor cantidad de éstas y como consecuencia, la hidrólisis de los carbohidratos estructurales se vería beneficiada. Es decir, se esperaba un notable incremento en la concentración de carbohidratos solubles,

indicativo de una eficiente degradación de carbohidratos estructurales, después de llevarse a cabo un proceso de hidrólisis enzimática.

Tabla 3. Principales características de los residuos alimenticios.

Componente		Valor	Unidad
Humedad		76.85±0.28	%
Sólidos suspendidos totales		17.33±0.39	%
Sólidos suspendidos volátiles		99.85±0.06	%
Carbohidratos totales	Glucosa	69.69±2.62	mg/g ST
	Sacarosa	101±3.90	mg/g ST
Carbohidratos solubles	Glucosa	11.55±0.44	mg/g ST
	Sacarosa	14.49±0.66	mg/g ST
Proteínas		6.42±0.42	%
Lípidos		13.66±2.86	%
Relación C:N		8:1	
DQO total		556.15 ± 29.50	mg/g ST
DQO soluble		305.28 ± 13.48	mg/g ST

Fuente: elaboración propia

Lo anterior se basó en la confirmación que han dado varios estudios, donde enzimas como lacasas, peroxidases, celulasas, xilasas, entre otras, han sido producidas mediante la FES (Rodríguez & Sanromán, 2006; Bansal *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2018; Ng *et al.*, 2010). Ng *et al.*, (2010), mencionan que es un método preferible y eficaz para la producción de enzimas porque éstas se encuentran en altas concentraciones en el medio, además de permitir bajos costos de operación.

Han *et al.* (2015), estudiaron la factibilidad de combinar la FES con la producción de H₂ utilizando residuos alimenticios, los cuales fueron primeramente sometidos 4 días a FES por los hongos *Aspergillus awamori* y *Aspergillus oryzae*, para la producción de glucomilasa y proteasa respectivamente, enzimas posteriormente usadas para la obtención de un sustrato hidrolizado rico tanto en glucosa como nitrógeno amino libre que mejorara la producción de H₂. La máxima concentración alcanzada fue de 36.9 g/L.

En la Figura 7 se muestran las gráficas obtenidas en la cinética de producción de carbohidratos solubles. Todas muestran un mismo comportamiento: incremento constante dentro de las primeras horas, alcanzando su producción máxima entre las horas 5 o 6, posterior a esto, su concentración sufre un decaimiento. En las Tablas 3 y 4 se presentan las concentraciones de carbohidratos máximas y finales obtenidas del sustrato hidrolizado.

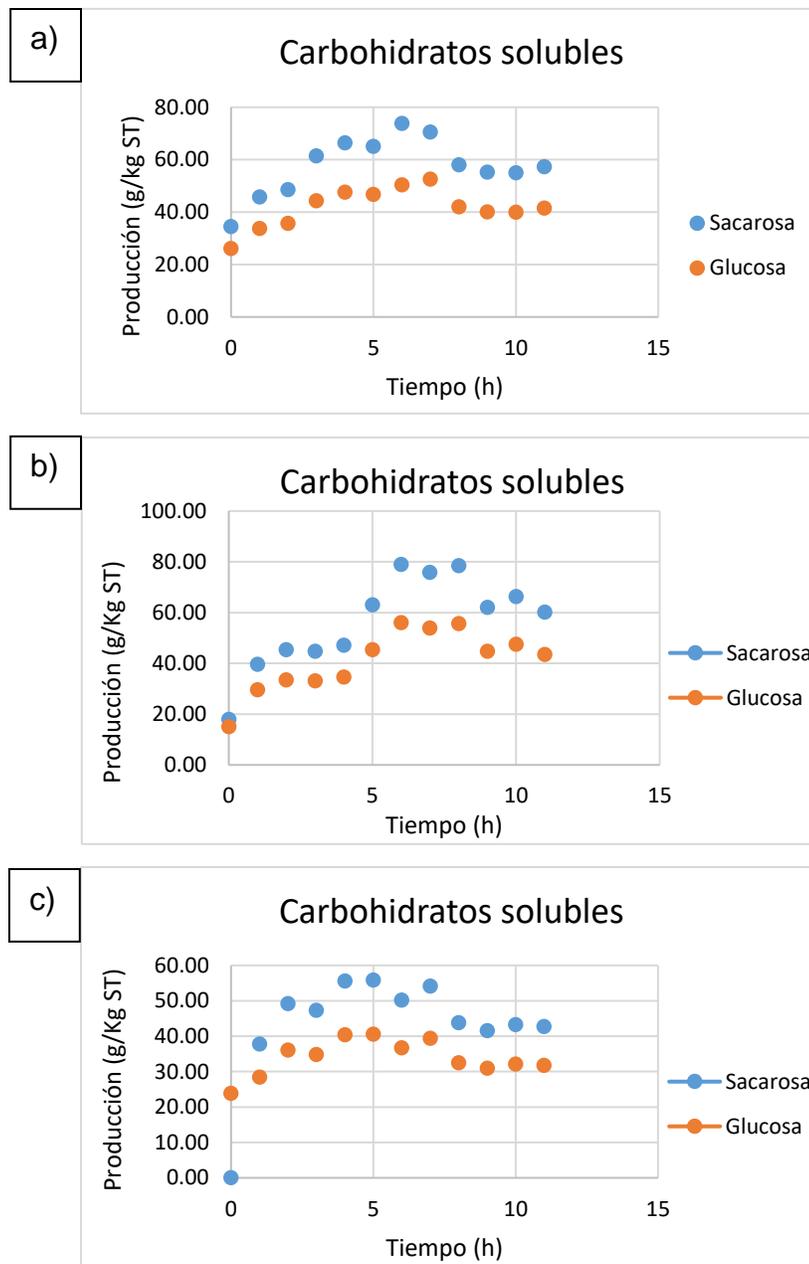


Figura 7. Cinética para la obtención de carbohidratos solubles. a) 5 días; b) 10 días; c) 15 días.

Tabla 4. Concentraciones máximas y finales de glucosa

FES (d)	Concentración máxima (g/L)		Concentración final (g/L)	
	Sacarosa	Glucosa	Sacarosa	Glucosa
5	2.22	1.58	1.72	1.25
10	2.37	1.58	1.82	1.30
15	1.67	1.22	1.28	0.95

Tabla 5. Rendimiento e incremento de carbohidratos.

FES (d)	Rendimiento (mg/g residuo)		Incremento de carbohidratos solubles iniciales a finales (%)	
	Sacarosa	Glucosa	Sacarosa	Glucosa
5	57.33	41.66	295.7	261.8
10	60.66	43.33	318.6	275.2
15	42.66	31.66	194.4	174.1

*Se refiere al aumento entre la concentración del residuo original y el resultado de la hidrólisis.

Los resultados contrastan con Zhang *et al.*, (2013), Han *et al.*, (2015) y Han *et al.*, (2016), quienes obtuvieron valores finales de glucosa considerablemente mayores en su proceso de hidrólisis: 54.2 para el radio 30% (w/v), 15.52 g/L y 21.7 g/L para radios de 4% y 5% (w/v) respectivamente.

Esto puede deberse a varios factores. Es probable que el tipo de hongo utilizado en este estudio no sea capaz de segregar las enzimas necesarias para lograr el rompimiento de los enlaces que forman las macromoléculas del residuo. Por ejemplo, Fang *et al.*, (2018) mencionan que los hongos pertenecientes al género *Pleurotus* no son capaces de secretar la enzima lignina peroxidasa, cuya función es precisamente degradar las complejas cadenas de lignina. En este caso, el sustrato de la FES fue el digestato sólido obtenido de una planta de biogás, en el que se encontraron altos contenidos de lignina, celulosa y hemicelulosa. En contraste, el hongo *Trametes versicolor* presenta una alta actividad de lacasas en este mismo sustrato, rompiendo los anillos fenólicos de la lignina para transformarlos a radicales fenólicos (Tavares *et al.*, 2006).

Debido a que el sustrato utilizado se conformó principalmente por vegetales, cereales y harinas, se esperaría una alta actividad de la enzima amilasa. Enzima

capaz de hidrolizar las moléculas de almidón que conforman dichos alimentos, a azúcares fermentables como sacarosa y glucosa (sacarificación) (Reyna *et al.*, 2015). Sin embargo, la baja concentración de estos monosacáridos en el presente experimento indica una baja generación de amilasas por parte del hongo.

Asimismo, se esperaría la segregación de la enzima proteasa, cuyo objetivo es el rompimiento de los enlaces peptídicos de las proteínas, debido a la existencia de leguminosas como frijol y lentejas en el sustrato (Pleissner *et al.*, 2013).

Los valores de DQO soluble presentados en la Tabla 6 confirman la interferencia de actividad bacteriana con la actividad enzimática de los hongos en la hidrólisis. Este sería el principal motivo por el que las concentraciones de sacarosa y glucosa muestran una disminución después de 6 horas de proceso hidrolítico.

Tabla 6. DQO (soluble) inicial y final en la hidrólisis enzimática.

FES (d)	DQO Inicial (g/L)	DQO Final (g/L)
5	21.51	7.34
10	11.63	7.01
15	21.20	12.9

Cabe destacar que se hizo lo posible por evitar estas interferencias, como mantener cubierta la tapa del reactor, esterilizar el recipiente del mismo, la cristalería y el sustrato.

El crecimiento de bacterias anaerobias resultaría ser el más favorecido, como resultado de la poca solubilidad del O₂ en altas temperaturas, la baja transferencia del mismo y las condiciones del reactor. No obstante, también pudo haber coexistencia tanto de bacterias anaerobias como aerobias o facultativas.

En condiciones anaerobias, las bacterias utilizan la glucosa como fuentes de carbono y energía para producir ácidos grasos como el propanoico, acético, butírico, alcoholes y acetato. Se recomienda su determinación en investigaciones posteriores para confirmar la presencia de bacterias anaerobias.

4.2.1 Análisis de varianza

Con el fin de identificar el tiempo óptimo de FES se realizó un análisis de varianza (para sacarosa y glucosa) de una vía de efectos fijos utilizando el software computacional Statgraphics Centurion XVII®.

Carbohidrato	Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Sacarosa	Entre grupos	0.537742	5	0.107548	15.17	0.0024
	Intra grupos	0.04255	6	0.00709167		
	Total (corr)	0.580292	11			
Glucosa	Entre grupos	0.243142	5	0.0486283	15.90	0.0021
	Intra grupos	0.01835	6	0.00305833		
	Total (corr)	0.261492	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los carbohidratos (sacarosa y glucosa) entre un nivel de FES y otro, con un nivel del 5% de significación.

Posteriormente, con la prueba de las Diferencias Mínimas Significativas, se obtuvieron los gráficos de las Figuras 8 y 9. En estos se especifica que la FES a los 10 días presenta la concentración más alta de glucosa con un 95% de confianza.

Las literales sobre cada factor indican los grupos que son homogéneos entre sí y los que presentan diferencia significativa de acuerdo con la Prueba de Rangos Múltiples cuando $\alpha=0.05$.

4.3 Fermentación oscura

Una vez realizada la hidrólisis enzimática, se llevó a cabo el proceso de FO. Los resultados de la cinética de producción de biogás se presentan en la Figura 10. De acuerdo con la Tabla 7, entre las 11 y 15 horas, tiene lugar el periodo de latencia,

la producción exponencial de biogás se observa desde las 15 hasta las 35 horas aprox. El tiempo de vida para todos los reactores fue de 48 horas aproximadamente.

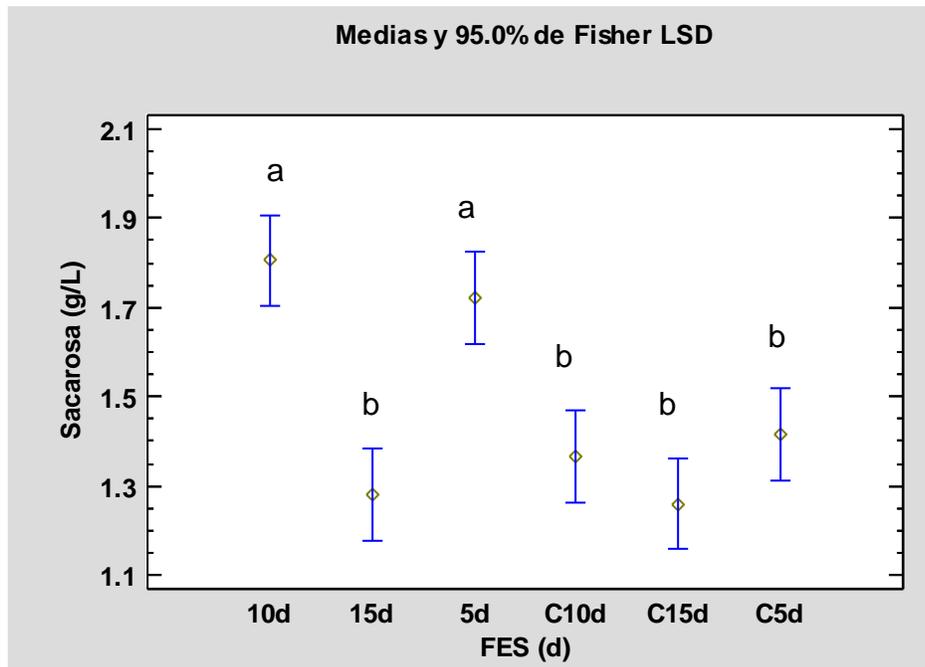


Figura 8. Diferencia de medias para sacarosa

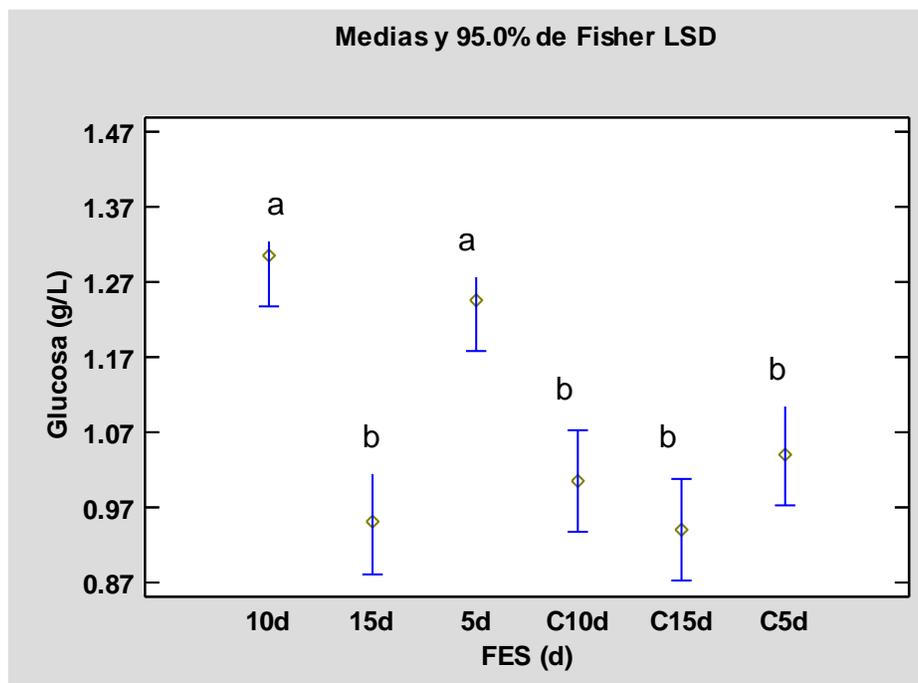
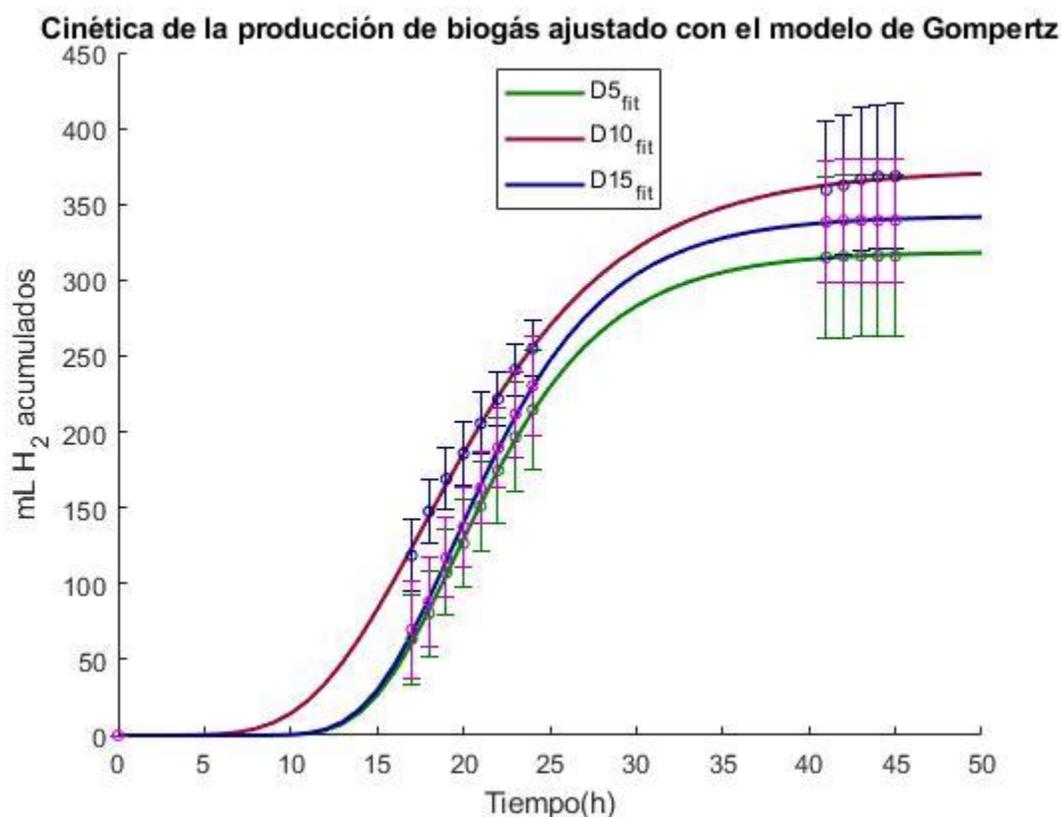


Figura 9. Diferencia de medias para glucosa

Tabla 7. Coeficientes de Gompertz

Tratamientos	H_{max} (mL)	R_{max} (mL/h)	λ (h)
5 días	318.63	23.76	14.56
10 días	372.64	21.12	11.16
15 días	342.27	25.35	14.46

**Figura 10.** Producción acumulada de biogás.

En la gráfica anterior puede observarse que a los 10 días de FES se obtienen los mejores resultados. Para el mismo tiempo, el rendimiento máximo acumulado fue de 177.89 mL de biogás/g SV o 327.20 mL/g DQOt añadido como rendimiento específico. Estos resultados son semejantes a los presentados por Kafle & Kim (2013), quienes obtuvieron 398 mL/gDQOt, utilizando residuos de frutas como sustrato de la digestión anaerobia, cuya duración fue de aproximadamente 45 días.

Lo anterior podría indicar una buena productividad de biogás en el presente experimento, en el que la fermentación oscura únicamente tuvo lugar 48 horas.

Para el pretratamiento de 15 días también se mejora considerablemente el período de latencia (11.16 h), 3 horas menos que los tratamientos de 5 y 15 días. Este resultado es congruente con el presentado por varios autores, entre ellos Han *et al.*, (2016), quien también utilizó residuos alimenticios para la producción de H₂.

Es algunos experimentos, es posible no encontrar una fase de latencia, Ramos *et al.*, (2012) comprobaron que, para concentraciones menores a 10 mg/L ST añadido, no existe esta fase, mientras que para concentraciones mayores sí se encuentra presente. En el presente estudio, la concentración añadida fue de 30 mg ST/L, lo que explica la presencia de la fase de latencia. Indican, además, que la complejidad y tipo de sustrato también influyen en este parámetro; cuando se utiliza un residuo homogéneo, la fase de latencia se observa considerablemente reducida, como lo demostraron Li Dong *et al.*, (2009) cuando compararon la producción de H₂ mediante FO de tres sustratos: arroz, papa y lechuga, esta última presentó aproximadamente 12 horas de latencia mientras que en los anteriores tratamientos no estuvo presente.

Nkemka & Murto (2013) mencionan que sus resultados fueron notablemente mejorados (57% respecto al residuo sin tratamiento) al utilizar como sustrato residuos hidrolizados de paja de trigo, consiguieron un rendimiento máximo de 280 mL/g SV a los 31 días de digestión. Sin embargo, se menciona que el método resulta en un alto costo debido a que se utilizó la enzima comercial Cellic C Htech para realizar el pretratamiento, específica para materiales lignocelulósicos.

Lo anterior apoya el hecho de que utilizar enzimas de origen biológico como pretratamiento resulta en una opción viable para mejorar la producción de biogás

4.4 Análisis final

Posterior a la fermentación oscura, se realizó un análisis del efluente del reactor con el fin de analizar la eficiencia del tratamiento.

En la Tabla 8 se muestran las remociones de DQO, sólidos y carbohidratos en comparación con los valores iniciales.

Tabla 8. Remociones del tratamiento de FO.

	Inicial	FES (d)	Después de la hidrólisis	Después de la FO	Variación (%)
DQO soluble (g/L)	16.68	5	7.34	10.40	41.69
		10	10.32	12.69	22.97
		15	12.9	13.15	1.94
Sólidos (g/L)	Totales: 30 Solubles: 27.24	5	-	0.02	99
		10	-	0.03	99
		15	-	0.021	99
		15	-	0.02	99
Carbohidratos solubles (g/L)	0.782	5	2.97	0.62	79.12
		10	3.12	1.09	65.06
		15	2.23	0.44	80.27

Como se discutió en la sección de Hidrólisis, la DQO se incrementó al final de ésta, indicativo de actividad microbiana.

4.4.1 Sólidos

Los sólidos volátiles y carbohidratos solubles disminuyeron considerablemente (Tabla 8). Como parte de su investigación, Ramos *et al.*, (2012) reportaron una remoción máxima del 80% SV al utilizar 1 g/L de concentración inicial, en este estudio, se demostró que, al incrementar este parámetro, las remociones de ST y DQOt disminuyeron.

Se ha confirmado por estudios anteriores, que la fase de hidrólisis es el paso limitante de la digestión anaerobia, debido a que la mayor parte del sustrato se encuentra en forma particulada, por ello, Ramos *et al.*, (2012) mencionan el requerimiento de un proceso de solubilización previo. En este estudio, se utilizó la

FES para obtener enzimas que transformaran el sustrato a cadenas cortas mediante la hidrólisis y lograr así una mayor degradación y/o solubilización.

Las altas remociones de sólidos (99%) se atribuyen precisamente al pretratamiento aplicado al sustrato. Luo *et al.*, (2012) hallaron que a 60°C (en el presente estudio 55°C), es posible reducir hasta en un 50% la presencia de SSV sólo en la hidrólisis, utilizando la enzima α -amilasa en lodo activado como sustrato. Por otro lado, se ha logrado la eliminación de hasta 80% de sólidos totales con la aplicación de celulasas y pronasas E¹ en la hidrólisis enzimática.

Aunque en este estudio no fue posible la medición de los sólidos después del pretratamiento de los residuos, la alta remoción al final de la FO prueba que un alto porcentaje de éstos fue degradado en las etapas de FES e hidrólisis enzimática.

4.4.2 Carbohidratos

Tabla 9. Tasas de consumo y producción de biogás de las diferentes concentraciones de carbohidratos obtenidos en la FES.

Parámetros	Concentración inicial de carbohidratos g/l		
	5	10	15
	2.97	3.12	2.23
Concentración de carbohidratos en el efluente, g/L	0.62	1.09	0.44
Consumo de carbohidratos, %	79.12	65.06	80.27
Consumo de carbohidratos g/L	2.35	2.03	1.79
Producción acumulada de biogás, mL	318.63	372.64	342.27
Producción volumétrica de biogás, mL/L reactor	3982.88	4658.00	4278.38
Producción específica de biogás, mL/g carbohidrato removido	1694.04	2294.58	2390.15

Como se muestra en la Tabla 9, los consumos de carbohidratos solubles en los tres tratamientos se encuentran entre 65.06% y 80.27%. Estas variaciones son proporcionales a la concentración final del proceso hidrolítico, es decir, se obtuvo mayor remoción en el tratamiento con menor cantidad de carbohidratos solubles en el inicio (15 días). Estos resultados son considerablemente menores a los

¹ Tipo de enzima proteasa cuya función es hidrolizar compuestos proteínicos en aminoácidos.

presentados por Han *et al.*, (2015) y Han *et al.*, (2016), quienes reportan una remoción máxima de 98.2% con 29.8 g/L de glucosa al inicio de la FO, esto se debió probablemente al corto tiempo de retención (48 h), comparado con el estudio mencionado, donde el TRH fue de 72 h.

Puede observarse que el consumo de los carbohidratos disminuyó a medida que incrementó el tiempo de FES, sin embargo, esta tendencia se debe en mayor medida al TRH, de haberlo prolongado a más de 48h se considera se habrían mejorado los consumos.

El hecho de que existan altas producciones específicas, aun cuando la eliminación máxima de carbohidratos fue de apenas 80.27% es indicio de que la producción de biogás se llevó a cabo a partir de otras fuentes como las proteínas, presentes en las leguminosas del residuo (Akutso *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Alexandropolou, 2018). La realización de pruebas para determinar aminoácidos, tales como glutamato, treonina, prolina, etc., así como nitrógeno amoniacal (Xiao *et al.*, 2019), confirmarían la generación de biogás a partir de ellas.

La máxima producción volumétrica (4658 mL/L) se alcanzó en el tratamiento de 10 días, cantidad mucho mayor a los 1850 mL/L conseguidos por Moreno & Cruz (2014) y a los 3055.6 y 2592.6 por Moreno & Buitrón (2015), en ambas investigaciones se utilizaron residuos alimenticios como sustrato de la FO. Lo anterior se pudo haber logrado gracias a la composición del hidrolizado, materia de fácil degradación y disponible a los microorganismos, como carbohidratos y muy probablemente, aminoácidos, provenientes de las proteínas que conformaban el alimento.

Las remociones de carbohidratos solubles alcanzadas en el presente experimento (Tabla 8) podrían ser considerablemente menores a las que se obtuvieron por Han *et al.*, (2016) y Martínez (2019), debido a la complejidad del sustrato, ambos reportan porcentajes mayores a 90% cuando se utiliza un hidrolizado de residuos alimenticios (filtrado) y sacarosa como sustrato.

4.4.3 Demanda química de oxígeno

De acuerdo con la Tabla 8, no se obtuvieron remociones en la DQO soluble, contrario a lo esperado, hubo incrementos de 41.69%, 22.97% y 1.94% en los 5, 10 y 15 días de FES, indicando que el material biodegradable del residuo original fue degradado y solubilizado durante el proceso de FO (Zhu *et al.*, 2008).

Estos resultados coinciden con Zhu *et al.*, 2008, en cuyo estudio se detectó una concentración efluente de 7036 mg/L, mucho mayor a los 2220 mg/L del sustrato inicial.

Por otro lado, de Amonim *et al.*, (2012) reportan remociones máximas de 37% y mínimas de 10%, Bansal *et al.*, (2013) únicamente lograron 20% en uno de sus tratamientos cuando evaluaron el efecto de un pretratamiento al inóculo. Se han reportado incluso, remociones de apenas 1.9%, y 5.8% (Martín *et al.*, 2017; Whang y Zao, 2009), evidenciando una de las desventajas de la FO como tratamiento, escasa eficiencia en la eliminación de contaminantes.

El hecho de que haya poca o nula eliminación de la DQO soluble en los efluentes de la FO, es consecuencia de la degradación de los componentes complejos en otros fácilmente digeribles (como el H₂ y los AGV's) que aún pueden reducirse, el incremento ocurre entonces, por la hidrolización de una fracción de sustrato que antes se encontraba en forma de DQO total.

Los AGV's, son metabolitos a partir de los cuales es posible generar más energía en forma de biogás. Como se ha propuesto por otros investigadores (Corrales *et al.*, 2015), sería correcto continuar el tratamiento hasta una segunda etapa, donde ocurra la metanogénesis, se logre mejorar la remoción de la DQO y se obtenga un biogás rico en CH₄.

4.4.4 Ácidos grasos volátiles (AGV's)

En la Tabla 10 se enlistan los ácidos grasos y etanol producidos durante la FO.

Tabla 10. AGV's y etanol

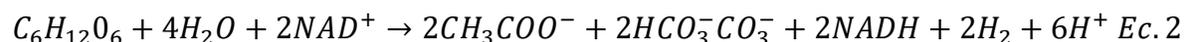
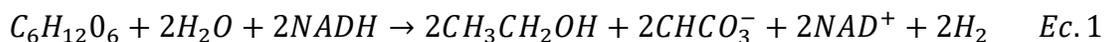
Tratamiento	AGV's y etanol (g/L)				
	Ác. acético	Ác. propanoico	Ác. butírico	Ác. pentanoico	Etanol
5d	4.300	0.327	1.068	0.014	0.265
10d	5.637	0.402	1.323	0.019	0.336
15d	6.398	0.444	1.158	0.016	0.384

Acorde con otros estudios donde se trataron residuos alimenticios, los ácidos grasos más abundantes en todos los casos fueron el acético y butírico. El primero presenta porcentajes de 71.90%, 73.04% y 76.16% mientras que el segundo de 17.87%, 22.14% y 13.78% para los 5, 10 y 15 días respectivamente.

Algunos autores utilizan los radios Ac. acético/AGV's totales y Ac. Butírico/ AGV's totales para definir la ruta metabólica principal de los microorganismos. En el presente estudio, la principal ruta fue la del ácido acético, cuyos radios son los siguientes: 0.76 g de ácido acético/ AGV's totales, 0.76 g de ácido acético/g AGV's totales y 0.76 g de ácido acético/g AGV's para 5, 10 y 15 días de FES respectivamente.

En la mayoría de los AGV's hallados, su producción incrementó a mayor tiempo de FES, excepto para el ácido butírico y el pentanoico.

Han *et al.*, (2015) señalan que la generación de ácido acético y etanol en la FO favorece la producción de H₂ como se indica en las Ecuaciones 1 y 2. Aunque la formación del ácido propanoico conlleva al consumo del mismo (Ecuación 3), por sus bajas concentraciones se asume que el H₂ es uno de los principales componentes del biogás.



En los compuestos proteínicos, la principal ruta metabólica para la producción de biogás corresponde al ácido butírico (Tapari *et al.*, 2019), su detección en este estudio confirma que una gran porción fue obtenida a partir de la degradación de las proteínas.

Como se ha mencionado anteriormente, ya que los AGV's generados en la FO aún son degradables (pueden reducirse a CO₂ y CH₄) es conveniente tratarlos mediante el acoplamiento de la metanogénesis, donde es posible eliminar hasta el 90% de la carga contaminante.

CONCLUSIONES

La FES tuvo un efecto positivo en la producción de carbohidratos solubles después de llevarse a cabo una hidrólisis enzimática, en la que se obtuvieron concentraciones de 2.97, 3.12 y 2.23 g/L de carbohidratos (glucosa y sacarosa).

El análisis estadístico ANOVA de una vía, mostró diferencias significativas entre las concentraciones de carbohidratos solubles obtenidas en los diferentes tiempos de pretratamiento, siendo 10 días el tiempo óptimo de FES.

Las principales rutas metabólicas identificadas por la cuantificación de AGV's fueron las del ácido acético y butírico, indicando la producción de biogás a partir de la digestión de carbohidratos y proteínas. Ya que las concentraciones de estos dos ácidos fueron mayores comparadas con la de los ácidos propanoico y pentanoico, se puede predecir que el H₂ será uno de los componentes principales del biogás.

El análisis del digestato mostró remociones del 99% para sólidos totales y solubles, esto significa que el pretratamiento aplicado al sustrato tuvo un efecto positivo al lograr la solubilización de una gran parte de sus componentes antes del proceso de FO. Las concentraciones totales de AGV's, 5.97, 7.71 y 8.4 g/L en el digestato para los 5, 10 y 15 días de FES respectivamente, demuestran una intensa actividad hidrolítica durante la FO.

Se obtuvieron remociones cercanas al 65 y 80% de carbohidratos solubles, derivado de la complejidad del sustrato y el corto tiempo de retención.

De acuerdo con la ecuación de Gompertz, el volumen máximo de biogás acumulado fue de 372.64 mL, correspondiente a 10 días de FES.

Referencias

- Acuña, P. A. (2012). *Acetogénesis*. New York: Springer Science & Business.
- Adekunle, K. F., & Okolie, J. A. (2015). A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6, 205-2012.
- Adekunle, K. F., & Okolie, J. A. (2015). A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Advances n Bioscience and Biotechnology*, 6, 205-2012.
- Al Seadi, T., Ruiz, D., Prassl, H., Kottner, M., Finsterwaldes, T., Volke, S., & Janssens, R. (2008). *Handbook of Biogas*. University of Southern Denmark, Esbjerg.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreve, J., & Dewil, R. (2008). Principles and potencial of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog Energy Combust*, 34, 755-81.
- Aslanzadeh, S. (2014). Pretreatment of cellulosic waste and high rate biogas Production. *Doctoral thesis on resource recovery University of Boras, Boras*, 1-50.
- Bagi, Z., Acs, N., Hovrath, B., Dobo, K., & Perei, K. R. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Rev*, 61, 262-80.
- Balat, M., & Balat, M. (2009). Political, economic and environmental impacts of biomass-based hydrogen. *Int. J. Hydrog. Energy*(34), 3589-3603.
- Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., & Soni, S. K. (2012). Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Wasre Management*, 32, 1341-1346.
- Bansal, S. K., Sreekrishan, T. R., & Singh, R. (2013). Effect of heat pretreated consortia on fermentative biohydrogen production from vegetable waste. *National Academy Science Letters*, 36, 125-131.
- Barton, L. L., & Fauque, G. D. (2009). Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Adv Appl Microbiol*(68).
- Berrelleza, L. G., Armendariz, F. J., Amaya, O., Certucha, M. T., & Pérez, S. (2016). GENERACIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS DEL COMEDOR DE LA UNIVERSIDAD DE SONORA. *Epistemus*, 20, 5-13.
- Bharathiraja , B., Sudharsana, T., Jayamuthunagai, J., Praveenkumar, R., Chozhavendhan, S., & Iyyappan, J. (2018). Biogas production- A review on

- composition, fuel properties, feed stock and principles of anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 570-582.
- Bouallagui, H., Touhami, Y., Cheikh, R. B., & Hamdi, M. (2005). Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetables wastes. *Process Biochemical*, 40, 989-995.
- Bouallagui, H., Rachdi, B., Gannoun, H., & Hamdi, M. (2009b). Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of abattoir wastewater and fruit and vegetable waste in anaerobic sequencing batch reactors. *Biodegradation*, 20, 401-409.
- Bowen, E. J., Dolfing, J., Davenport, R. J., Read, F. L., & Curtis, T. P. (2014). Low-temperature limitation of bioreactor sludge in anaerobic treatment of domestic wastewater. *Water Science Technology*, 10, 1004-13.
- Bundhoo, M. A., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 6713-6733.
- Cadavid, S., & Bolaños, I. V. (2015). Aprovechamiento de residuos orgánicos para la producción de energía renovable en una ciudad colombiana. *Energética*, 46, 23-28.
- Cai, J., & Wang, G. (2016). Comparison of different pre-treatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from intertidal sludge. *International Journal of Green Energy*, 13, 292-297.
- Cai, J., Wang, G., Li, Y., Zhu, D., & Pan, G. (2009). Enrichment and hydrogen production by marine anaerobic hydrogen-producing microflora. *Chinese Science Bulletin*, 54, 2656-2661.
- Carrere, H., Antonopoulou, G., Affes, R., Passos, F., Battimelli, A., Lyberatos, G., & Ferrer, I. (2016). Review of pretreatment strategies for improved feedstocks anaerobic biodegradability: from lab-scale research to full-scale application. *Bioresour. Technol.*(199), 386-397.
- Censos económicos. (2014). *La industria restaurantera en México*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- Chong, M. L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*(34), 3277-3287.
- Corrales, C. C., Antolinez, D. M., Bohórquez, J. A., & Corredor, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(23), 55-81.

- Dang, Y., Sun, D., Woodadr, T. T., Wang, L. Y., Nevin, K. P., & Holmes, D. E. (2017). Stimulation of the anaerobic digestion of the dry organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) with carbon-based conductive materials. *Bioresource Technology*, *238*, 30-38.
- De la Torre, I., & Goma, G. (1981). Characterization of anaerobic microbial culture with high acidogenic activity. *Biotechnol Bioeng*, *23*, 185-99.
- Deenpanraj, B., Sivasubramanian, V., & Jayaraj, S. (2017). Effect of substrate pretreatment on biogas production through anaerobic digestion of food waste. *Hydrogen Energy*, 26522-26528.
- Dela-Rubia, M. A., Pérez, M., Romero, L. I., & Sales, D. (2002). Anaerobic mesophilic and termophilic municipal sludge digestion. *Chem. Biochem. Eng. Qual.*, *16*, 119-124.
- Dinopoulou, G., Rudd, T., & Lester, J. N. (1988). Anaerobic acidogenesis of a complex wastewater: the influence of operational parameters on reactor performance. *Biotechnol Bioeng*, *61*, 958-68.
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaying, K., & Yu, Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *Hydrogen Energy*, *34*, 812-820.
- Dung, T. N., Sen, B., Chen, C. C., Kumar, G., & Lin, C. Y. (2014). Food Waste to Bioenergy via Anaerobic Processes. *Energy Procedia*, 307-312.
- Ekama, G. A., & Wentzel, M. C. (2008). Organic material removal. *Biol Wastwater Treat*, 53.
- El-Mashad, H. M., & Zhang, R. (2010). Biogas production from co-digestion of dairy manure and food waste. *Bioresource Technology*, *101*(11), 4021-4028.
- Environmental benefits of biomethane*. (2012). Obtenido de <http://www.biomethane.org.uk/environmental-benefits-of-biomethane.html>
- Fang, W., Zhang, P., Zhang, X., Zhu, X., van Lier, J. B., & Spanjers, H. (2018). White rot fungi pretreatment to advance volatile fatty acid production from solid-state fermentation of solid digestate: Efficiency and mechanisms. *Energy*(162), 534-541.
- Farinas, C. S. (2015). Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *52*, 179-188.
- Fezzani, B., & Cheikh, R. B. (2010). Two phase anaerobic codigestion of olive mill wastes in semi-continuous digesters at mesophilic temperature. *Bioresource Technology*, *101*, 1628-1634.

- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrerè, H., & Steyer, J. P. (2010a). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. *Int. J. Hydrog. Energy*(35), 10660-10673.
- Gutiérrez Avedoy, V. J., Ramírez Hernández, I. F., Encarnación Aguilar, G., & Medina Arévalo, A. (2012). Diagnóstico Básico para la Gestión Integral de los Residuos. México, Cd. de México, México. Recuperado el 2 de 12 de 2017
- Han, w., Ye, M., Zhu, A. J., Zhao, H. T., & Li, Y. F. (2015). Batch dark fermentation from enzymatic hydrolyzed food waste for hydrogen production. *Bioresource Technology*(191), 24-29.
- Hay, J. W., Wu, T. Y., & Juan, J. C. (2013). Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: overview, economics, and future. *Biofuel Bioprod Bior*, 7, 334-52.
- He, R., Liu, X. F., Yan, Z. Y., Liao, Y. Z., & Li, X. D. (2007). Review of enhancing biogas production by additives. *China Biogás*, 5, 005.
- Irvan, Trisaki, B., Sosanty, F., & Tomiuchi, Y. (2016). Effect of Discontinuing Sodium Bicarbonate on Fermentation Process of Palm Oil Mill Effluent. *Asian J. Chem*, 28, 377-80.
- Kafle, G. K., & Kim, S. H. (2013). Anaerobic treatment of apple waste with swine manure for biogas production: Batch and continuous operation. *Applied Energy*, 103, 61-72.
- Karagiannidis, A., & Perkoulidis, G. (2009). A multi-criteria ranking of different technologies for the anaerobic digestion for energy recovery of the organic fraction of municipal solids wastes. *Bioresource Technology*, 100, 2355-60.
- Karthic, P., & Shiny, J. (2012). Comparisons and limitations of biohydrogen production processes: a review. *Int J Adv Eng Technol*, 342-56.
- Karthukeyan, O. P., Trably, E., Mehariya, S., Bernet, N., Wong, J. W., & Carrere, H. (2018). Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. *Bioresource Technology*, 249, 1025-1039.
- Kawagoshi, Y., Hino, N., Fujimoto, A., Nakao, M., Fujita, Y., Sugimura, S., & Furukawa, K. (2005). Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 524-530.
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., & Dawson, L. (2011). Review- the anerobic digestion of solid organic waste . *Waste Manage*, 1737-44.
- Kiran, E. U., Trzcinski, A. P., Ng, W. J., & Liu, Y. (2014). Bioconversion of food waste to energy: a review. *Fuel*(134), 389-399.

- Kwietniewska, E., & Tys, J. (2014). Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *34*, 491-500.
- Lee, D. H., & Chiu, L. H. (2012). Development of byohydrogen economy in the United States, China, Japan and India: with discussion of a chicken-and-egg debate. *J. Hydrogen Energy*, *37*, 15736-15745.
- Lee, M., Hidaka, T., Hagiwara, W., & Tsuno, H. (2009). Comparative performance and microbial diversity of hypertermophilic and termophilic co-digestion of kitchen garbage and excess sludge. *Bioresource Technology*, *69*, 578-85.
- Levin, D., Pitt, L., & Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy*, 173-85.
- Li, L., He, Q., Ma, Y., Wang, X., & Peng, X. (2015). Dynamics of microbial community in a mesophilic anaerobic digester treating food waste: relationship between community structure and process stability. *Bioresource Technology*, *189*, 113-120.
- Li, L., Peng, X., Wang, X., & Wu, D. (2018). Anaerobic digestion of food waste: a review focusing on process stability. *Bioresource Technology*, *248*, 20-28.
- Manish, S., & Banerjee, R. (2008). Comparison of biohydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy*, *33*, 279-86.
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *45*, 540-555.
- Martí, N. (2006). *Phosphorus Precipitation in Anaerobic Digestion Process*. Boca Ratón, Florida, USA: Universal-Publishers.
- Martins, S., Mussatto, S., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., & Aguilar, C. N. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, *29*, 375-373.
- Mata-Alvarez, J. (2003). Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. *IWA Publishing London*.
- Mata-Alvarez, j., Macé, S., & Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes, an overview of research achievements and perspectives. *Bioresourse Technology*, *74*(1), 3-16.
- Mathew, A. K., Bhui, I., Banerjee, S. N., Goswami, R., Shome, A., & Chakraborty, A. K. (2014). Biogas production from locally available aquatic weeds of Santiniketan through anaerobic digestion. *Clean Technol Environ Policy*.

- Mera, I., & Carrera, J. (2015). Obtención de glucosa a partir de almidón de Yuca *Manihot sultenta*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 3(1), 54-63.
- Moreno, I., Carillo, J., Santiago, S. G., & Bujanos, M. C. (2015). Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: Effect of HRT and microbial community analysis. *Hydrogen Energy Publications*, 17246-17252.
- Moreno-Andrade, I., Carrillo Reyes, J., G. Santiago, S., & Bujanos Adame, M. (2015). Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: Effect of HRT and microbial community analysis. *Hydrogen Energy*.
- Mu, Y., Yu, H. Q., & Wang, G. (s.f.). Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 947-953.
- Muyzer, G., & Stams, A. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 6, 441-54.
- Nagamani, B., & Ramasamy, K. (1999). Biogas production technology: an Indian perspective. *Curr Sci India*, 77(1), 44-55.
- Nagao, N., Tajima, N., Kawai, M., Niwa, C., Kurosawa, N., Matsuyama, T., . . . Toda, T. (2012). Maximum organic loading rate for the single-stage wet anaerobic digestion of food waste. *Bioresource Technology*, 118, 210-218.
- Ng, I. S., Li, C. W., Chan, S. P., Chir, J. L., Chen, P. T., Tong, C. G., . . . David Ho, T. H. (2010). High level production of a thermoacidophilic α -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*(101), 1310-1317.
- Ogejo, J. A., Wen, Z., Ignosh, J., Bendfeldt, E., & Collins, E. R. (2009). Biomethane technology. *Virginia Cooperative Extension*, 442-881.
- PEPGIR. (2012). Xalapa, Veracruz, México. Recuperado el 24 de Enero de 2017
- Pleissner, D., Lam, W. C., Sun, Z., & Ki Lin, C. S. (2013). Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. *Bioresource Technology*, 137, 139-146.
- Ramos, C., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., & Chamy, R. (2012). Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the biohydrogen production from cafeteria food waste. *Int J Hydrogen Energy*(37), 13288-95.
- Ramos, C., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., & Chamy, R. (2012). Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. *Hydrogen Energy*, 37, 13288-13295.

- Raud, M., Tutt, M., Olt, & Kikas, T. (2015). Effect of lignin content of lignocellulosic material on hydrolysis efficiency. *Agro. Res.*(13), 405-412.
- Reyna M, L., Robles, R., Reyes P, M., Mendoza R, Y., & Romero D, J. (2004). Hidrólisis enzimática del almidón. *Rev. Per. Quím. Ing. Quim.*, 7(1), 40-44.
- Riau, V., De la Rubia, M. A., & Pérez, M. (2010). Temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) to obtain class A biosolids: a semicontinuous study. *Bioresource Technology*, 101, 2706-2712.
- Rodríguez, S., & Sanromán, M. Á. (2006). Application of solid state fermentation to food industry- A review. *Journal of Food Engineering*, 291-302.
- Salem, A. H., Brunstermann, R., Mietzel, T., & Widmann, R. (2018). Effect of pre-treatment and hydraulic retention time on biohydrogen production from organic wastes. *International journal of hydrogen energy*, 43, 4856-4865.
- SEDUMA (Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente). (2012). *sedyma.yucatan.gob.mx*. Obtenido de <http://www.seduma.yucatan.gob.mx/ordenamiento-ecologico/index.php>
- Singh, L., & Wahid, Z. A. (2015). Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: a review. *J. Ind. Eng. Chem.*(28), 70-80.
- Singhania, P. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Padney, A. (2009). Recent Advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 13-18.
- Soccol, C. R., & Vandenberghe, L. P. (2003). Overview of solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 205-218.
- Soccol, C., Ferreira da Costa, E. S., Junior Letti, L. A., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & de Souza Vanderbergue, L. P. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Research and Innovation*, 1, 52-71.
- Solarte, J. C., Mariscal, J. P., & Aristizábal, B. H. (2017). Evaluación de la digestión y co-digestión anaerobia de residuos de comida y de poda en bioreactores a escala laboratorio. *Rev.Edu.Co.*, 105-116.
- Tavares, A., Coelho, M., Agapito, M., Coutinho, J., & Xavier, A. (2006). Optimization and modeling of lacasse production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Appl Biochem Biotechnol*(30), 215-42.
- Teghammar, A. (2014). Biogas Production from Lignocelluloses: Pretreatment, Substrate Characterization, Co-Digestion and Economic Evaluation. *Doctoral Thesis*. Chalmers University of Technology, Gothenburg.

- Troschinetz, A. M., & Mihelcic, J. R. (2009). Sustainable recycling of municipal solid waste in developing countries. *Waste manage*, 29, 915-923.
- Uckun Kiran, E., Stamatelatos, K., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2016). Production of biogas via anaerobic digestion. 259-301.
- Wang, P., Wang, H., Qiu, Y., Ren, L., & Jiang, B. (2018). Microbial characteristics in anaerobic digestion of food waste for methane production- A review. *Bioresource Technology*, 248, 29-36.
- Wang, P., Wang, H., Qiu, Y., Ren, L., & Jiang, B. (2018). Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production- A review. *Bioresource Technology*, 248, 29-36.
- Wang, Y. Y., Ai, P., Hu, C. X., & Zhang, Y. L. (2011). Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the fermentation pathway of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 390-396.
- Ward, A. J., Hobbs, P. J., & Jones, D. N. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99, 7928-40.
- Xu, F., Li, Y., Ge Xumeng, Yang, L., & Li, Y. (2018). Anaerobic digestion of food waste: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*(247), 1047-1058.
- Yahmed, N. B., Carrere, H., Marzouki, M. N., & Smaali, I. (2017). Enhancement of biogas production from *Ulva* sp. by using solid-state fermentation as biological pretreatment. *Algal Research*(27), 206-214.
- Yan, K., Liu, Y., Chai, J., & Sun, L. (2017). Catalytic application of layered double hydroxide-derived catalysts for the conversion of biomass-derived molecules. *Catal Sci Technol*, 7, 1622-45.
- Yin, Y., Liu, Y. J., Meng, S. J., Kiran, E. U., & Liu, Y. (2016). Enzymatic pretreatment of activated sludge, food waste and their mixture for enhanced bioenergy recovery and waste volume reduction via anaerobic digestion. *Appl. Energy*(179), 1131-1137.
- Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C., & Chua, A. S. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, 67, 319-338.
- Yuan, H., & Zhu, N. (2016). Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion. *Renewable Sustainable Energy Rev*, 58, 429-438.
- Zahedi, S., Sales, D., Romero, L. I., & Solera, R. (Febrero de 2013). Hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste in anaerobic

- thermophilic acidogenesis: Influence of organic loading rate and microbial content of the solid waste. *Bioresource Technology*, 191, 85-91.
- Zhang, A. Y.-Z., Sun, Z., Leung, C. C., Han, W., Lau, K. Y., Li, M., & Ki Li, C. S. (2013). Valorisation of bakery waste for succinic acid production. *Green Chemistry*, 2-30.
- Zhang, C., Wang, A., Jia, J., Zhao, L., & Song, W. (2017). Effect of parameters on anaerobic digestion EGSB reactor for producing biogas. *Procedia Engineering*, 205, 3749-3754.
- Zhang, L., & Jahng, D. (2012). Long-term anaerobic digestion of food waste stabilized by trace elements. *Waste Management*, 32(8), 1509-1515.
- Zhang, Q., Hu, J., & Lee, D. (2016). Biogas from anaerobic digestion process: Research updates. *Renewable energy*, 98}, 108-119.
- Zhang, T., Liu, L., Song, Z., Ren, G., Feng, Y., & Han, X. (2013). Biogas production by codigestion of goat manure with three crop residues. *PloS One*, 8, 66845.
- Zhang, Y. A., sun, Z., Leung, C. J., Han, W., & Lin, S. C. (2015). Batch dark fermentation from enzymatic hydrolyzed food waste for hydrogen production. *Bioresourcing Technology*, 191, 24-29.