



Casa abierta al tiempo  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa



División de

**C**iencias **B**iológicas y de la **S**alud

**Efecto de un pretratamiento enzimático en la  
hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de  
lirio acuático.**

**TESIS**

Para obtener el grado de

**Maestro en Biotecnología**

Presenta

**E. en B. Francisco Ignacio Ramírez Estrada**

Comité tutorial

**Directora: Dra. Florina Ramírez Vives**

**Asesores: Dr. Ernesto Favela Torres**

**Dra. Isabelle Perraud Gaime**

La maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de CONACyT con la referencia 001465.

Ciudad de México a 07 de enero de 2020

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**“Efecto de un pretratamiento enzimático en la hidrólisis y acidogénesis de la  
fracción sólida de lirio acuático.”**

Que presentó:

**E. en B. Francisco Ignacio Ramírez Estrada**

**Comité tutorial:**

**Directora:** Dra. Florina Ramírez Vives

**Asesor:** Dr. Ernesto Favela Torres

**Asesora:** Dra. Isabelle Perraud Gaimé

**Jurado:**

**Presidente:**

Dr. Ernesto Favela Torres  
Universidad Autónoma Metropolitana



---

**Secretaria:**

Dra. Reyna Isabel Rodríguez Pimentel  
Universidad Tecnológica de Nezahualcóyotl



---

**Vocal:**

Dr. Quentin Paul Carboué  
Universidad Autónoma Metropolitana



---

**Vocal:**

Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández  
Universidad Autónoma Metropolitana



---

## Agradecimientos

*Primero, quiero dar gracias a Dios por darme salud, fe y paciencia para guiarme por este camino y por haber concluido este trabajo.*

*A mis padres Ada Luz y Adrian por darme la educación que ahora tengo, enseñarme buenos valores desde pequeño, por la fortaleza y apoyo que me han brindado y sobre todo por confiar en mí en todo momento.*

*A mi hermano Adrian y a mi cuñada Flor por sus buenas consejas, creer en mí y por el apoyo incondicional.*

*A mis abuelos, que en paz descansen, por bendecirme desde el cielo.*

*A mi directora de tesis, doctora Florina por todo el conocimiento brindado en la realización de este trabajo, por su paciencia y dedicación y sobre todo por guiarme y enseñarme todos estos años, he aprendido mucho de usted, no solo como profesionalista sino como persona.*

*A mis asesores, doctor Ernesto y doctora Isabelle por enseñarme nuevas técnicas biotecnológicas, por estar pendientes siempre de mi trabajo, por la amistad brindada y sobre todo por la crítica constructiva aportada en este trabajo.*

*A todos los sinodales por los comentarios realizados en este trabajo.*

*A Daría por estar presente en todo momento y sobre todo por el amor y cariño que me has brindado.*

*A Jess, Clara y Sac (las picudas) por los grandes momentos vividos en el transcurso de esta maestría y por el gran apoyo intelectual y personal que me brindaron.*

*A toda la generación de Maestría en Biotecnología 2017 – 2019.*

*A los Doctores, colegas y compañeros por ayudarme y apoyarme en el laboratorio W-106, W-104, W-102, PP 4 y CIBAG en especial al Dr. Monroy, la Dra. Gloria, Lala, Rosalinda, Ulises, Coni, Cinthia, Pepe, Rosario, Gerardo, Nohemí, Fernando, Carlos y Cesar.*

*A toda mi familia Ramírez y Estrada por todo el apoyo brindado a lo largo de mi carrera profesional.*

*A doña lichis por todo el apoyo recibido durante todo este tiempo.*

*A mis amigos del voleibol de esta gran institución, por darme la oportunidad de formar parte de la selección panteras negras y por la gran amistad que me brindaron, en especial, al Lic. Palacios, Miguel, Alejandro, Humbie, Alex, Sam, Vidal, Gerardo, Darí, Lau y Ame.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la UAM y al posgrado en Biotecnología por el apoyo recibido para la realización de mis estudios de maestría.*

*Con todo mi cariño y agradecimiento dedico esta tesis a todas las personas que me apoyaron durante estos años de trabajo*

*Mil gracias*

## Resumen

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una planta invasora que debe ser removida de los cuerpos de agua por los problemas que ocasiona. La digestión anaerobia es una alternativa para la producción de biogás. Los compuestos lignocelulósicos presentes en la planta hacen que la hidrólisis sea lenta, retardando el tiempo de la digestión anaerobia. En este trabajo se presenta el estudio del efecto de un pretratamiento enzimático para mejorar la hidrólisis de la fracción sólida del lirio acuático y producir una mayor concentración de compuestos solubles. La fracción sólida de lirio fue fermentada en reactores hidrolíticos anaerobios de lecho escurrido (RHALE) en lote.

Para evaluar el efecto de este pretratamiento se llevaron a cabo tres cinéticas:

En la primera cinética se determinó el efecto de un extracto enzimático comercial (EEC) de la marca Novozymes<sup>(R)</sup>, en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático. Los ensayos se realizaron por triplicado en reactores RHALE en lotes de 300 mL, incubados a 30 °C, durante 20 días. Se realizaron 4 tratamientos (R1= Lirio + Lodos + Extracto Enzimático, R2= Lirio + Extracto Enzimático, R3= Lirio + Lodos y R4= Lirio.). Los mejores resultados en este estudio se obtuvieron con el reactor 1 que contenía el EEC y lodos, con una reducción de SV del 37% y una velocidad de producción de compuestos solubles de 0.14 gDQO.d<sup>-1</sup>.

En la segunda cinética se determinó el efecto de los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* para mejorar la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático. Para lograr este objetivo se realizaron 3 tratamientos con sus respectivos triplicados (1=*Trichoderma* + Lirio, 2= *Aspergillus* + Lirio y 3= Lirio (control)). Las columnas usadas para la fermentación sólida fueron conectadas a un metabolímetro para realizar un análisis respirométrico. Los resultados de este análisis mostraron una producción máxima de CO<sub>2</sub> por arriba de 160 mg/gMSI en todos los tratamientos, siendo el tratamiento con la cepa de *Trichoderma* la que presentó la máxima producción de CO<sub>2</sub>. Transcurridas 150 h de la fermentación, las masas con enzimas fueron empacados en los RHALE como en el estudio anterior. Se realizaron 3 tratamientos con sus respectivos triplicados (R1= Lirio+Lodos+Masa

de *Trichoderma*, R2= Lirio+Lodos + Masa de *Aspergillus*, R3= Lirio+Lodos+Masa de Lirio). Los mejores resultados mostraron eficiencias de reducción de sólidos volátiles de 28 % para los reactores con hongos y una mejor velocidad de producción de DQO de 0.2 gDQO.d<sup>-1</sup>, no hubo diferencia significativa respecto a los tratamientos con hongos.

En una tercera cinética la producción de enzimas se llevó a cabo por medio de la fermentación sólida con *Trichoderma harzianum* y *Aspegillus niger*, usando como sustrato la fracción sólida de lirio acuático durante 7 y 5 días, obteniendo las mejores actividades con la cepa de *Trichoderma* a los 5 días de fermentación con valores de 177 U/g<sub>MS</sub> para xilanasas y 45 U/g<sub>MS</sub> para celulasas.

La masa fermentada de *Trichoderma harzianum* y el extracto enzimático extraído de esta masa, se mezclaron con la fracción sólida de lirio para llevar a cabo la hidrólisis y acidogénesis en reactores RHALE. Se realizaron 3 tratamientos con sus respectivos triplicados (R1= Lirio + Lodos + Masa de *Trichoderma*, R2= Lirio + Lodos + extracto de *Trichoderma* y R3= Lirio + Lodos como control). Los mejores resultados mostraron eficiencias de reducción de sólidos de 33 % para el pretratamiento con la masa fúngica, con una velocidad de producción de DQO de 0.1 gDQO.d<sup>-1</sup>

En los 3 estudios los AGV presentes en la mezcla de lixiviados representaron entre el 80 y 90 % de la concentración de la DQO soluble recuperada en el lixiviado y el ácido acético presentó el mayor porcentaje en la mezcla.

## Abstract

The water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) is an invasive plant that must be eliminated from the bodies of water due to the problems it causes. Anaerobic digestion is an alternative for biogas production. The lignocellulosic compounds present in the plant make hydrolysis slow, delaying the time of anaerobic digestion. This paper presents the study of the effect of an enzymatic pretreatment to improve the hydrolysis of the solid fraction of the water hyacinth and produce a higher concentration of soluble compounds. The solid fraction of lily was fermented in anaerobic drained bed hydrolytic reactors (RHALE) in batch.

To evaluate the effect of this pretreatment, three kinetics were carried out:

In the first kinetics the effect of a commercial enzyme extract (CEE) of the brand Novozymes was determined, in the hydrolysis and acidogenesis of the solid fraction of water hyacinth. The tests were performed in triplicate in 300 mL RHALE reactors, incubated at 30 ° C, for 20 days. Four treatments were performed (R1 = water hyacinth + Sludge + Enzyme Extract, R2 = water hyacinth + Enzyme Extract, R3 = water hyacinth + Sludge and R4 = water hyacinth). The best results in this study were obtained with reactor 1 containing the EEC and sludge, with an-SV reduction of 37% and a production rate of soluble compounds of 0.14 gDQO.d<sup>-1</sup>.

In the second kinetics the effect of the fungi *Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum* was determined to improve the hydrolysis and acidogenesis of the solid fraction of the water hyacinth. To achieve this goal, 3 treatments were carried out with their respective triplicates (1 = *Trichoderma* + water hyacinth, 2 = *Aspergillus* + water hyacinth and 3 = water hyacinth (control)). The columns used for solid fermentation were connected to a metabolimeter to perform a respirometric analysis. The results of this analysis showed a maximum production of CO<sub>2</sub> above 160 mg/g<sub>MSI</sub> in all the treatments, being the treatment with the *Trichoderma* strain the one that presented the maximum production of CO<sub>2</sub>. After 150 hours of fermentation, the masses with enzymes were packed in the RHALE as in the previous study. Three treatments were performed with their respective triplicates (R1 = water hyacinth +

Sludge + *Trichoderma* Mass, R2 = water hyacinth + Sludge + *Aspergillus* Mass, R3 = water hyacinth + Sludge + water hyacinth Mass). The best results showed 28% volatile solids reduction efficiencies for fungal reactors and a better COD production rate of 0.2 g COD.d<sup>-1</sup>, there was no significant difference with respect to fungal treatments.

In a third kinetics the production of enzymes was carried out through solid fermentation with *Trichoderma harzianum* and *Aspergillus niger*, using as a substrate the solid fraction of water hyacinth for 7 and 5 days, obtaining the best activities with the *Trichoderma* strain at 5 days of fermentation with values of 177 U / g<sub>MS</sub> for xylanases and 45 U / g<sub>MS</sub> for cellulases.

The fermented dough of *Trichoderma harzianum* and the enzyme extract extracted from this dough were mixed with the solid water hyacinth fraction to carry out hydrolysis and acidogenesis in RHALE reactors. Three treatments were performed with their respective triplicates (R1 = water hyacinth + Sludge + *Trichoderma* Mass, R2 = water hyacinth + Sludge + *Trichoderma* extract and R3 = water hyacinth + Sludge as control). The best results showed solids reduction efficiencies of 33% for pretreatment with the fungal mass, with a COD production rate of 0.1 gDQO.d<sup>-1</sup>

In all 3 studies, the volatile fatty acids present in the leachate mixture represented between 80 and 90% of the concentration of soluble COD recovered in the leachate and acetic acid had the highest percentage in the mixture.

## Índice

Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	vi
Índice de tablas.....	xii
Índice de figuras .....	xiii
Nomenclatura.....	xv
<b>CAPITULO 1.....</b>	<b>1</b>
1. Introducción.....	1
1.1. Lirio acuático ( <i>Eichhornia crassipes</i> ).....	1
1.2. Digestión anaerobia.....	2
1.2.1. Hidrólisis.....	3
1.2.2. Acidogénesis.....	3
1.2.3. Acetogénesis.....	5
1.2.4. Metanogénesis.....	5
1.3. Digestión anaerobia de residuos sólidos en 2 etapas.....	6
1.4. Reactor hidrolítico anaerobio de lecho escurrido (RHALE).....	7
1.5. Compuestos lignocelulósicos presentes en el lirio acuático.....	8
1.5.1. Celulosa.....	8
1.5.2. Hemicelulosa.....	9
1.5.3. Lignina.....	10
1.6. Problemática de los compuestos lignocelulósicos en la DA.....	10
1.7. Pretratamientos para la biomasa lignocelulósica.....	11
1.8. Microorganismos empleados para la hidrólisis de compuestos lignocelulósicos.....	14
1.9. Hongos filamentosos implicados en la hidrólisis enzimática.....	15
1.10. Enzimas implicadas en la hidrólisis de compuestos lignocelulósicos.....	17
1.10.1. Celulasas.....	18
1.10.2. Xilanasas.....	19
1.11. Antecedentes.....	20
1.11.1. Producción de enzimas.....	20
1.11.2. Digestión anaerobia.....	23
1.12. Justificación.....	24

1.13.	Hipótesis .....	24
1.14.	Objetivos .....	25
1.14.1.	General.....	25
1.14.2.	Particulares.....	25
<b>CAPITULO 2</b>	.....	25
2.	Materiales y métodos.....	25
2.1.	Estandarización de técnicas analíticas. ....	25
2.2.	Recolección del lirio acuático del CIBAC. ....	26
2.3.	Molienda de la planta.....	26
2.4.	Separación de la fracción sólida y líquida. ....	26
2.5.	Caracterización del lirio acuático. ....	26
2.6.	Caracterización del inóculo.....	27
2.7.	Efecto de un extracto enzimático comercial en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático. ....	27
2.7.1.	Pretratamiento enzimático. ....	27
2.7.2.	Hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida (bagazo) de lirio acuático en reactores de lecho escurrido (RHALE) en lote. ....	28
2.8.	Pretratamiento enzimático de la fracción sólida de lirio con dos cepas de hongos filamentosos .....	30
2.8.1.	Selección de las cepas fúngicas.....	30
2.8.2.	Propagación de las cepas.....	30
2.9.	Efecto de los hongos <i>Aspergillus niger</i> C28B25 y <i>Trichoderma harzianum</i> PBLA en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático. ....	31
2.9.1.	Crecimiento de los hongos.....	31
2.9.2.	Fermentación en medio sólido (análisis respirométrico) de las cepas fúngicas para la producción de enzimas. ....	31
2.9.3.	Hidrólisis y acidogénesis de bagazo de lirio inoculado con las cepas fúngicas en los RHALE .....	33
2.10.	Medición de las actividades enzimáticas de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> .....	34
2.10.1.	Crecimiento de los hongos. ....	34
2.10.2.	Extracción de las enzimas producidas por las cepas fúngicas.....	34
2.10.3.	Determinación de las actividades enzimáticas.....	34
2.10.4.	Cuantificación de las actividades enzimáticas.....	34
2.10.4.1.	Actividad de celulasas. ....	35

2.10.4.2. Actividad de xilanasas .....	35
2.11. Hidrólisis y acidogénesis del bagazo de lirio en los RHALE con la adición de la masa y extracto enzimáticos de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	36
2.12. Análisis estadístico.....	37
<b>CAPITULO 3</b> .....	37
3. Resultados y discusión.....	37
3.1. Estandarización de las técnicas analíticas.....	37
3.2. Recolección y caracterización de la fracción sólida del lirio acuático.....	39
3.3. Cinéticas en lote para determinar el efecto de un extracto enzimático comercial en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático. ....	40
3.3.1. Comportamiento y producción de los lixiviados generados en los RHALE. ....	42
3.4. Efecto de los hongos <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático. ....	50
3.4.1. Respuesta de la fermentación en medio sólido de los hongos <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> , analizado por respirometría.....	50
3.4.2. Hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático en reactores RHALE: efecto de los pretratamientos fúngicos.....	53
3.4.3. Comportamiento y producción de los compuestos solubles en los lixiviados de los RHALE. 54	
3.5. Determinación de las actividades enzimáticas de los hongos <i>Aspergillus</i> y <i>Trichoderma</i> y efecto de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático. ....	60
3.5.1. Actividades enzimáticas de <i>A. niger</i> y <i>T. harzianum</i> .....	60
3.6. Efecto de la masa fermentada y del extracto de <i>T. harzianum</i> en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático en los RHALE bajo distintos tratamientos.....	64
3.6.1. Evolución y producción de compuestos solubles en los lixiviados de los RHALE. 67	
4. Conclusiones.....	75
<b>CAPITULO 5</b> .....	77
5. Bibliografía.....	77
<b>CAPITULO 6</b> .....	93
6. Anexos .....	93
6.1. Técnicas analíticas .....	93
6.1.1. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) por el método de reflujo cerrado .....	93
6.1.2. Determinación de azúcares totales .....	95

6.1.3. Determinación de pH de la fracción sólida.....	97
6.1.4. Determinación de sólidos en la fracción sólida (bagazo).....	97
6.1.5. Determinación de las actividades enzimáticas.....	98
6.1.6. Determinación de los ácidos grasos volátiles.....	100

## Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de pretratamientos para la biomasa lignocelulósica (Menon y Rao, 2012).	13
Tabla 2. Enzimas producidas por hongos a partir del lirio acuático.	22
Tabla 3. Variables de respuesta y técnicas analíticas.	26
Tabla 4. Complejos enzimáticos utilizados en la hidrólisis de la fracción sólida de lirio acuático.	27
Tabla 5. Diseño experimental de la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático en los RHALE.	28
Tabla 6. Diseño experimental de la fermentación en medio sólido con las cepas fúngicas en las columnas.	32
Tabla 7. Diseño experimental para la hidrólisis y acidogénesis del bagazo de lirio acuático en los RHALE.	33
Tabla 8. Diseño experimental para la hidrólisis y acidogénesis del bagazo de lirio acuático en los RHALE adicionando la masa y extracto enzimáticos de <i>T. harzianum</i> .	36
Tabla 9. Caracterización fisicoquímica de la fracción sólida del lirio acuático.	39
Tabla 10. Variables respuesta de la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático en presencia y ausencia de extracto enzimático, al inicio y final de las cinéticas en los RHALE.	41
Tabla 11. Variables respuesta de la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático al inicio y después de 20 días de fermentación.	53
Tabla 12. Comparación de Actividades de xilanasas y celulasas en U/g <sub>MS</sub> y U/mL.	62
Tabla 13. Resultados de las variables analizadas en la fermentación de la fracción sólida de lirio acuático en los RHALE.	67
Tabla 14. Resumen de las variables más importantes obtenidas en los tres estudios.	73
Tabla 15. Elaboración de la curva patrón de DQO.	94
Tabla 16. Elaboración de la curva patrón de azúcares totales.	96

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema representativo de las reacciones llevadas a cabo durante la digestión anaerobia de materiales poliméricos (Gujer y Zehnder, 1983). .....	6
Figura 2. Esquema del reactor hidrolítico anaerobio de lecho escurrido (RHALE). .....	8
Figura 3. Hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio en reactores en lote. ....	29
Figura 4. Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> C28B25 en bagazo de lirio acuático. ....	31
Figura 5. Crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> PBLA en bagazo de lirio acuático. ....	31
Figura 6. Columnas empacadas con bagazo de lirio acuático en mezcla con las cepas fúngicas, conectadas a un metabolímetro para medir la respiración en la FMS. ....	32
Figura 7. Curva patrón de DQO y ecuación de la recta. ....	38
Figura 8. Curva patrón de azúcares totales y ecuación de la recta. ....	38
Figura 9. Curva patrón de azúcares reductores y ecuación de la recta. ....	39
Figura 10. Perfil de pH en los lixiviados producidos en los RHALE, durante la fermentación de la fracción sólida de lirio acuático. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio. ....	43
Figura 11. Evolución de la DQO soluble en los lixiviados de los RHALE. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio. ....	43
Figura 12. Producción de azúcares totales en los lixiviados a partir de la hidrólisis de la fracción sólida de lirio acuático bajo los distintos tratamientos. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio. ....	45
Figura 13. Concentración de los AGV en el reactor R1. ....	47
Figura 14. Volumen acumulado de lixiviados producidos en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio bajo los distintos tratamientos. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio. ....	47
Figura 15. Producción acumulada de DQO en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio. ....	48
Figura 16. Producción acumulada de azúcares totales en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático bajo los distintos tratamientos. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio. ....	49
Figura 17. DQO solubilizada en los lixiviados de los RHALE. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio. ....	49
Figura 18. Efecto del pretratamiento fúngico en la tasa de CO <sub>2</sub> y producción de CO <sub>2</sub> en los diferentes tratamientos. 1= <i>Trichoderma</i> + Lirio, 2= <i>Aspergillus</i> + Lirio y 3= Lirio (control). .....	51
Figura 19. Producción máxima de CO <sub>2</sub> en los distintos tratamientos. TH = tratamiento con <i>Trichoderma harzianum</i> , AN = tratamiento con <i>Aspergillus niger</i> y L = tratamiento control con fracción sólida de lirio. ....	52
Figura 20. Perfil de pH en los lixiviados producidos en los RHALE, durante la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático bajo los distintos tratamientos. R1= Lirio+Lodos+Masa <i>Trichoderma</i> , R2= Lirio+Lodos + Masa <i>Aspergillus</i> , R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS. ....	54
Figura 21. Evolución de la concentración de DQO soluble en los lixiviados de los RHALE. R1= Lirio+Lodos+Masa <i>Trichoderma</i> , R2= Lirio+Lodos + Masa <i>Aspergillus</i> , R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS. ....	56

Figura 22. Concentración de los AGV totales en los RHALE. R1= Lirio+Lodos+Masa <i>Trichoderma</i> , R2= Lirio+Lodos + Masa <i>Aspergillus</i> , R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS.....	57
Figura 23. Relación de la concentración de DQO y AGV producidos en el lixiviado del RHALE con la masa de <i>Aspergillus niger</i> .....	59
Figura 24. Volumen acumulado de lixiviados producidos en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio bajo los distintos tratamientos. R1= Lirio+Lodos+Masa <i>Trichoderma</i> , R2= Lirio+Lodos + Masa <i>Aspergillus</i> , R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS.....	59
Figura 25. Producción acumulada de DQO en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio. R1= Lirio+Lodos+Masa <i>Trichoderma</i> , R2= Lirio+Lodos + Masa <i>Aspergillus</i> , R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS. ....	60
Figura 26. Actividades de xilanasas y celulasas con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> a 7 días de incubación. TH = <i>Trichoderma harzianum</i> , AN = <i>Aspergillus niger</i> . .....	61
Figura 27. Actividades de xilanasas y celulasas con <i>Trichoderma harzianum</i> a 5 días de incubación. TH = <i>Trichoderma harzianum</i> .....	62
Figura 28. Actividades enzimáticas de xilanasas y celulasas de <i>T. harzianum</i> al inicio de la fermentación de la fracción sólida de lirio acuático. R1 = Masa fermentada de <i>T. harzianum</i> , lirio y lodos; R2 = Extracto enzimático de <i>T. harzianum</i> , lirio y lodos; R3 = Lirio y lodos (control); LIX R1 = Lixiviado de R1; LIX R2 = Lixiviado de R2 y LIX R3 = Lixiviado de R3. ....	64
Figura 29. Perfil de pH en los lixiviados de los RHALE. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control). ....	68
Figura 30. Evolución de la concentración de DQO soluble en los lixiviados de los RHALE. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control). ....	68
Figura 31. Concentración de los AGV totales en los RHALE. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control). ....	69
Figura 32. Volumen acumulado de lixiviados producidos en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio bajo los distintos tratamientos. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control). ....	71
Figura 33. Producción acumulada de DQO en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático con los distintos tratamientos. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control). ....	72
Figura 34. Producción acumulada de AGV convertida a DQO en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control). ....	72

## Nomenclatura

$\Delta G$	Energía libre de Gibbs
$\eta$ SV	Reducción de sólidos volátiles
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AGCL	Ácidos grasos de cadena larga
AGV	Ácidos grasos volátiles
CBH	Celobiohidrolasas
CIBAC	Centro de investigaciones biológicas y acuícolas de Cuernanco
COV	Carga orgánica volumétrica
DA	Digestión anaerobia
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DQO	Demanda química de oxígeno
EE	Extracto enzimático
FMS	Fermentación en medio sólido
FORSU	Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos
GH	Glicosil hidrolasas
ha	Hectáreas
MF	Masa fermentada
MS	Materia seca
PDA	Papa dextrosa agar
pH	Coeficiente de acidez o basicidad de una solución
RHALE	Reactor anaerobio de lecho escurrido
rpm	Revoluciones por minuto
TRH	Tiempo de retención hidráulico
TRS	Tiempo de retención de sólidos
UAMI	Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
UASB	Reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente
UI	Unidad de actividad enzimática

# CAPITULO 1

## 1. Introducción.

### 1.1. Lirio acuático (*Eichhornia crassipes*).

El lirio acuático o jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) es una planta acuática flotante de agua dulce que crece en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se reproduce asexualmente, a través de estolones, y sexualmente a través de semillas que son difíciles de controlar, además, la semilla puede permanecer inactiva hasta por 20 años (Rezania *et al.*, 2015b). Es considerada una planta indeseable; debido a la serie de problemas que acarrea su presencia, estas plantas acuáticas agotan el oxígeno disuelto en el agua y ponen en peligro la salud de los animales acuáticos, también bloquean los ríos, el sistema de drenaje y el transporte de agua. Como planta invasora, ha causado un enorme desastre ecológico y económico en todo el mundo (Lu *et al.*, 2007, Villamagna y Murphy, 2010).

En condiciones ambientales favorables, el lirio acuático puede producir 140 millones de plantas hijas al año; estas plantas cubren un área en el agua de 1.40 km<sup>2</sup> con una biomasa fresca de 28,000 toneladas (Lu *et al.*, 2007).

Su distribución en México es sumamente amplia, ya que crece en una gran diversidad de hábitats dulceacuícolas localizados desde el nivel del mar hasta los 2,250 metros de altitud.

Estas plantas amenazan seriamente los sistemas acuáticos de lagos y ríos (Chu *et al.*, 2006) y deben ser removidas cada año. Por lo tanto, la utilización eficiente de la biomasa del jacinto de agua tiene que ser considerada.

Algunos estudios han reportado el uso de esta planta como adsorbente para metales pesados presente en aguas contaminadas (Murithi *et al.*, 2014); para la fitorremediación (Vijetha *et al.*, 2014); como suplemento proteico en la alimentación de rumiantes (Mako *et al.*, 2011); como antimicrobiano en el efecto de los extractivos (Tharamaiselvi y Jayanathi 2012), como productor de fitoesteroles para la industria farmacéutica (Fileto-Pérez *et al.*, 2015); para la producción de biogás (Ochieng y Kaseje 2014; ; Hernández *et al.*, 2016); como biocombustible (Bergier *et al.*, 2012;

Manivannan *et al.*, 2012; Awasthi *et al.*, 2013; Fileto-Pérez *et al.* 2013; Manivannan y Narendhirakannan 2014).

La biomasa del lirio acuático tiene monosacáridos y polisacáridos que contienen diferentes tipos de azúcares. Los carbohidratos poliméricos en la planta son principalmente celulosa y hemicelulosa (Rezania *et al.*, 2015a). El contenido de celulosa en el tallo de la planta es más bajo que el contenido en las raíces (Lara-Serrano *et al.*, 2016). El crecimiento tan rápido de la planta, así como la biomasa que se genera y los altos contenidos de celulosa y hemicelulosa, hacen que se considere un material lignocelulósico adecuado para la generación de bioenergía (Rezania *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2017).

El lirio acuático puede ser transformado en biogás por medio de la digestión anaerobia (DA), (O'Sullivan *et al.*, 2010; Kunatsa, 2013; Njogu *et al.*, 2015); Hernández *et al.*, 2016).

## **1.2. Digestión anaerobia.**

Para que se lleve a cabo el proceso de digestión anaerobia, son indispensables una serie de procesos, los cuales tienen como objetivo la degradación anaerobia del material orgánico, mediante un proceso en multi etapas formado por varias reacciones en serie y en paralelo (López *et al.*, 2017).

En la actualidad diferentes autores han considerado que la digestión anaerobia está conformada por cuatro fases sucesivas: (1) la hidrólisis, donde los polímeros de alto peso molecular son degradados a monómeros solubles, (2) la acidogénesis en donde los monómeros solubles son fermentados en ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, y butírico principalmente; (3) la acetogénesis, en donde los productos generados en la etapa anterior son convertidos en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono y (4) la metanogénesis, etapa final encargada de la producción de metano a partir del ácido acético o de mezclas de hidrógeno y dióxido de carbono (Montalvo y Guerrero, 2003).

### **1.2.1. Hidrólisis.**

Las enzimas excretadas por las bacterias hidrolíticas y fermentadoras (llamadas “exo-enzimas”) convierten el material complejo no disuelto en compuestos disueltos de menor peso molecular, que pueden pasar a través de las paredes y membranas celulares de las bacterias que los consumen. Durante los procesos enzimáticos de hidrólisis, las proteínas son hidrolizadas a aminoácidos, los polisacáridos a azúcares simples y los lípidos a ácidos grasos de cadena larga (AGCL). La hidrólisis es muy sensible a la temperatura y fluctuaciones en la misma. Esta etapa es por lo general el primer paso. Aunque en algunos casos incluya un paso preparatorio, es decir, un pretratamiento fisicoquímico o conminución, para que se pueda llevar a cabo.

La hidrólisis puede considerarse el paso limitante durante la digestión anaerobia de sustratos complejos. Sin embargo, por lo general esto no es debido solamente a la falta de actividad enzimática, si no a la disponibilidad de área superficial libre en las partículas y a la estructura general del sustrato sólido (Chandler *et al.*, 1980). Las bacterias de muchos géneros son los responsables de la hidrólisis. Entre estas destacan: *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Propioni-bacterium*, *Sphingomonas*, *Sporobacterium*, *Megasphaera*, *Bifidobacterium*, entre otros.

### **1.2.2. Acidogénesis.**

Los compuestos disueltos presentes en las células de las bacterias fermentativas son fermentados en compuestos simples, los cuales son excretados. Los productos durante esta fase incluyen ácidos grasos volátiles (AGV), alcoholes, ácido láctico, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>S; así como, en material celular nuevo. Durante la acidogénesis, los productos de la hidrólisis (aminoácidos, azúcares simples, AGCL), los cuales son compuestos solubles relativamente pequeños, se difunden en el interior de las células bacterianas a través de la membrana celular y, posteriormente, son fermentados u oxidados anaeróbicamente. La acidogénesis es una reacción muy común y se lleva a cabo por un grupo grande de microorganismos hidrolíticos y no hidrolíticos. Alrededor de un 1% de todas las bacterias conocidas son fermentadoras (facultativas). Los productos de la acidificación consisten en una variedad de compuestos orgánicos pequeños, principalmente AGV, es decir, acetato y ácidos orgánicos superiores como propionato y butirato, así como H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ácido láctico,

etanol y amonio. Característicamente, los compuestos neutros como azúcares y proteínas se convierten a AGV y ácido carbónico, siendo los productos principales de la reacción. Por lo tanto, los organismos fermentativos son designados comúnmente como microorganismos acidificantes o acidogénicos. El tipo de productos finales dependerá de las condiciones en las que se encuentre el medio en el reactor. Se dice que el  $\Delta G^\circ$  para las reacciones acidogénicas son menos favorables energéticamente con sacarosa como sustrato, ya que depende fuertemente de la concentración de  $H_2$  que prevalece. Si el  $H_2$  se remueve eficientemente por organismos consumidores de  $H_2$ , como las arqueas metanógenas, el acetato será el producto final principal. Sin embargo, si se retarda la metanogénesis y se acumula  $H_2$ , algunos productos más reducidos como propionato y butirato aparecerán y, posiblemente algunos otros compuestos aún más reducidos como lactato y alcoholes.

La acidogénesis es la etapa de conversión más rápida en la cadena trófica anaerobia. El  $\Delta G^\circ$  de las reacciones acidificantes es el más alto que todas las conversiones anaerobias, dando como resultado velocidades de crecimiento de las bacterias, diez o veinte veces más altas y rendimientos y velocidades de conversión, cinco veces mayores comparados con las reacciones metanogénicas. Por esa razón, los reactores anaerobios son susceptibles a la acidificación, es decir, a repentinas caídas de pH, cuando existen sobrecargas en los reactores o perturbaciones por compuestos tóxicos. Una vez que se ha consumido la alcalinidad por los ácidos producidos, el pH comienza a bajar, resultando en concentraciones más altas de AGV no disociados, y generando una inhibición más severa de la metanogénesis. Esto último, obviamente conduce a una acumulación más rápida de AGV y, subsecuentemente, a una caída de pH. La mayoría de los microorganismos acidogénicos también participan de la hidrólisis. Los géneros *Clostridium*, *Paenibacillus* y *Ruminococcus* están presentes en todas las fases del proceso de fermentación, pero son dominantes en la fase acidogénica. Los géneros *Cytophaga*, *Flavobacterium* y *Bacteroides* representan el segundo grupo más grande de bacterias durante las dos primeras fases de la descomposición anaeróbica de la materia orgánica. Sin embargo, en la fase metanogénica

representan menos del 5% del total de los microorganismos. Esto indica que estos grupos son los principales responsables de la degradación de compuestos monoméricos.

### **1.2.3. Acetogénesis.**

Los productos de la fermentación son transformados en acetato, hidrógeno ( $H_2$ ) y  $CO_2$ , así como en nuevo material celular. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), diferentes al acetato, que son producidos durante la acidogénesis, son convertidos posteriormente a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por las bacterias acetogénicas. Los principales sustratos acetogénicos son el propionato y butirato, los cuales son intermediarios importantes en la digestión anaerobia. Desde el punto de vista termodinámico y en condiciones estándar, el  $\Delta G^\circ$  de la reacción es positivo, por lo que ésta no se produce espontáneamente. El mantenimiento de una baja concentración de hidrógeno desplaza el equilibrio de la reacción de modo que el  $\Delta G^\circ$  se vuelve negativo.

El lactato, etanol, metanol e inclusive el  $H_2$  y  $CO_2$ , son convertidos homoacetogénicamente hasta acetato. Algunos homoacetógenos pueden usar el  $CO_2$  como aceptor de electrones en el metabolismo energético. Además del  $H_2$ , los donadores de electrones para la acetogénesis, incluyen una variedad de compuestos carbonados. La mayoría de las bacterias que llevan a cabo la acetogénesis son Gram positivas y pertenecen al género *Clostridium*.

### **1.2.4. Metanogénesis.**

El acetato, bicarbonato, ácido fórmico o metanol son convertidos a metano,  $CO_2$  y nuevo material celular. Las arqueas metanogénicas se encargan de lograr el paso final en la conversión anaerobia global de la materia orgánica a metano y dióxido de carbono. Durante esta última etapa de la degradación anaerobia de la materia orgánica, el grupo de las arqueas metanogénicas se encarga de reducir el dióxido de carbono utilizando al hidrógeno como donador de electrones y de descarboxilar el acetato para formar  $CH_4$ .

Las arqueas metanógenas son anaerobios obligados, con un espectro de sustratos muy reducido. Algunas únicamente pueden utilizar cierto tipo de sustratos como el

acetato, metilaminas, metanol, formiato, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> y CO. En general para el manejo de bioreactores los metanógenos se clasifican en dos grandes grupos: los que convierten el acetato o metanógenos acetoclásticos y los que utilizan el hidrógeno o metanógenos hidrogenotróficos.

En la figura 1 se representa de manera general las cuatro etapas de la digestión anaerobia. Los números indican el grupo de bacterias involucrado: 1. Bacterias hidrolíticas y fermentativas, 2. Bacterias acetogénicas, 3. Bacterias homoacetogénicas, 4. Metanógenos hidrogenotróficos, 5. Metanógenos acetoclásticos.

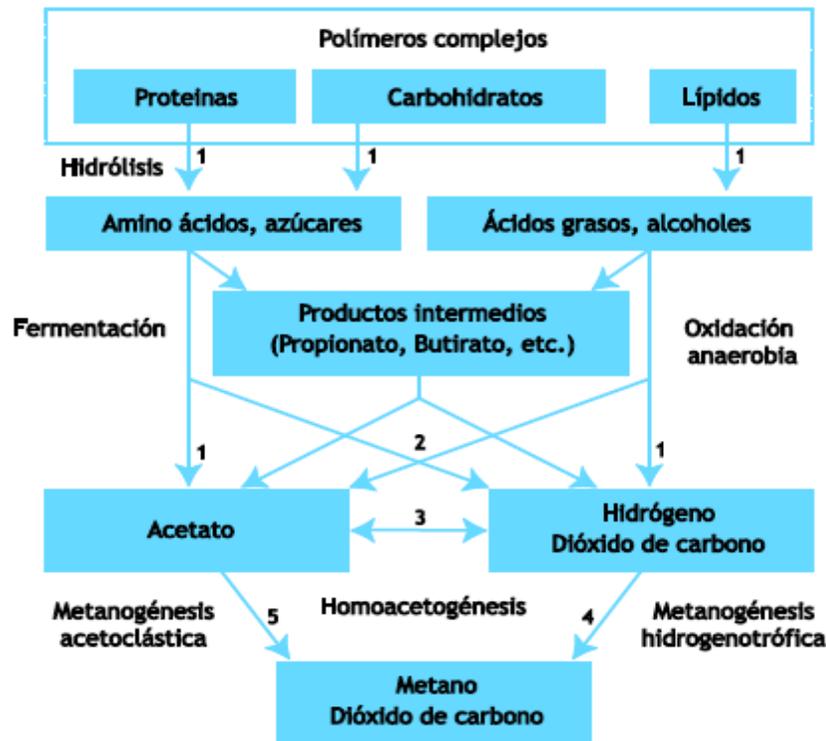


Figura 1. Esquema representativo de las reacciones llevadas a cabo durante la digestión anaerobia de materiales poliméricos (Gujer y Zehnder, 1983).

### 1.3. Digestión anaerobia de residuos sólidos en 2 etapas.

Cuando se tratan residuos sólidos con altas cargas orgánicas es recomendable hacer el proceso de la digestión anaerobia en dos etapas, (Bouallagui *et al.*, 2005; Vavilin *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2001). Este proceso se compone de dos reactores separados, uno para la hidrólisis y acidogénesis y otro para la acetogénesis y metanogénesis (Koppar y Pullammanapallil, 2008). Esta separación física hace

posible evitar problemas de operación por la inhibición con amonio y AGV que se puedan producir en altas concentraciones en las fases de hidrólisis y acidogénesis, ya que en cada uno de los reactores es posible controlar de mejor manera, las condiciones para la actividad de los microorganismos involucrados en las dos etapas (Shin *et al.*, 2001; Vavilin *et al.*, 2001; Cirne *et al.*, 2007). Algunos de los parámetros que se pueden controlar son bajos tiempo de retención hidráulico o de sólidos (TRH o TRS), producción y consumo de ácidos separados físicamente entre sí para mantener los niveles de pH adecuado en cada fase (Tchobanoglous *et al.*, 1993; Mata Álvarez, 2003).

Las principales ventajas de realizar la digestión anaerobia de los residuos sólidos en dos etapas se mencionan a continuación (Ariunbaatar *et al.*, 2014):

1. Incremento de la estabilidad de cada uno de los reactores con un mejor control de pH.
2. Incremento en la actividad específica de los metanógenos resultando un rendimiento de metano más alto.
3. Permite una mayor velocidad de carga.
4. Incremento de la eficiencia de reducción de DQO y SV.
5. Alto potencial para remover patógenos.
6. Reducción de la cantidad del residuo sólido.

#### **1.4. Reactor hidrolítico anaerobio de lecho escurrido (RHALE)**

En este trabajo se usó un prototipo de reactor hidrolítico anaerobio de lecho escurrido (RHALE) para llevar a cabo la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático. La figura 2 muestra un esquema del RHALE, el cual consiste en un cilindro adaptado con una placa en la parte inferior con orificios distribuidos en el área total de la placa, los cuales permiten el paso del líquido de escurrimiento conteniendo la materia orgánica que es arrastrada (lixiviado) y evitan la salida de la fracción sólida empacada, después de la placa con orificios, el reactor, termina con una forma cónica para la recolección del lixiviado. En la parte central superior tiene adaptado un cilindro el cual sirve para la adición del material sólido y dos orificios uno de cada lado de este cilindro en los cuales están adaptadas mangueras de plástico, una para la salida del biogás producido y otra para la adición del líquido de

escurrimiento. Para obtener la fracción digerida del material orgánico (digestato), el reactor tiene adaptado un cilindro horizontal en un costado y ubicado por encima de la placa con orificios que permite la salida de los lixiviados (adaptado de Rodríguez *et al.*, 2015).

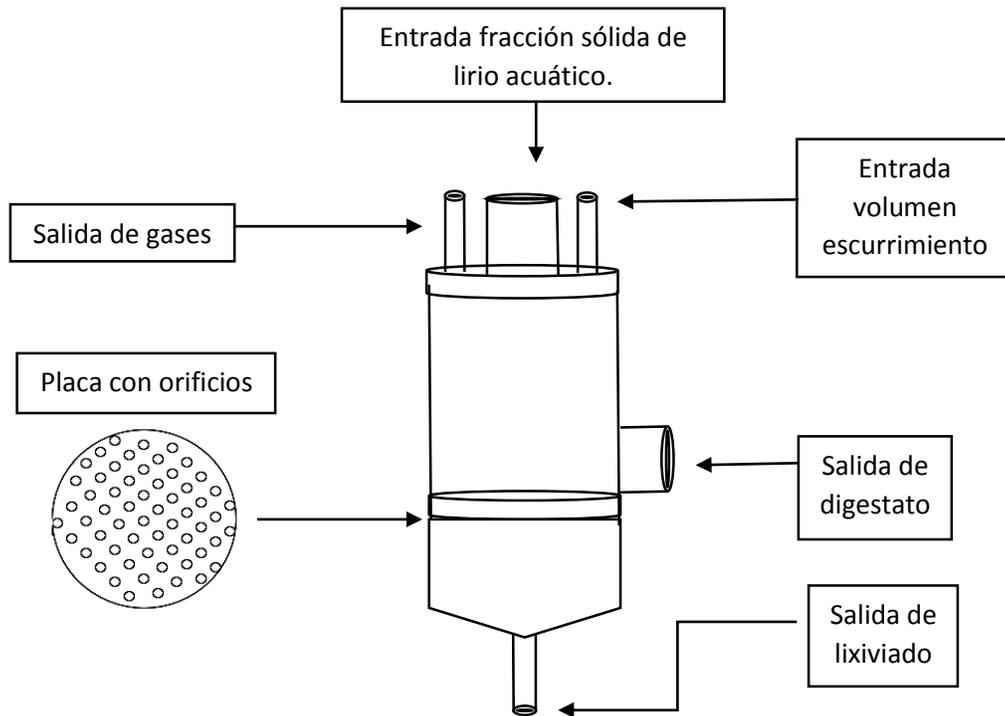


Figura 2. Esquema del reactor hidrolítico anaerobio de lecho escurrido (RHALE).

### 1.5. Compuestos lignocelulósicos presentes en el lirio acuático.

Dado que la biomasa de lirio acuático contiene estructuras de polisacáridos principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina es importante describir algunas de las características de estos polisacáridos.

#### 1.5.1. Celulosa.

La celulosa es uno de los materiales más utilizados desde tiempos remotos, y en la actualidad es la fuente de combustibles orgánicos, compuestos químicos, fibras y materiales necesarios para cubrir necesidades humanas tales como el papel, la pulpa, las maderas, etc. (Eriksson, 1989; Lynd *et al.*, 1999). El contenido de celulosa

en las plantas depende del grupo taxonómico al que pertenezcan y oscila entre 35 y 50% en peso seco. La celulosa se encuentra embebida en una matriz compuesta de un número de moléculas (pectinas, proteínas, almidón y lípidos), la hemicelulosa y lignina comprenden del 20 al 35%, y del 5 al 30% en peso seco en las plantas, respectivamente (Peters, 2006). En el lirio acuático el porcentaje de celulosa en peso seco oscila entre 18 y 25%.

El arreglo de las moléculas de celulosa en la pared celular de las plantas es jerárquico. La configuración tridimensional es estabilizada mediante interacciones de Van der Waals, y consiste en 30 moléculas lineales, de entre 10,000 y 14,000 unidades de glucosa, que forman una estructura conocida como protofibrilla; ésta a su vez se asocia con otras protofibrillas para formar la fibrilla de celulosa (Klemm, *et al.*, 2005). Por último, las fibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Sarath *et al.*, 2008). Dentro de las fibras de celulosa se distinguen diferentes regiones que van desde las más organizadas (región cristalina) hasta las desordenadas (región amorfa).

La naturaleza estructural de la celulosa cristalina la vuelve insoluble en la mayoría de los solventes incluyendo el agua, y evita que sea atacada por enzimas microbianas, a este fenómeno se le conoce como recalcitrancia. Las regiones menos ordenadas se conocen como celulosa para-cristalina, y las regiones amorfas están compuestas de estructuras secundarias, que se encuentran en menor proporción dentro del arreglo molecular de la celulosa, tales como microfibrillas en forma de rosca o vueltas, o regiones vacías que dan forma a microporos superficiales y capilares (Wilder y Albersheim, 1973). Esta heterogeneidad hace que las fibras sean capaces de hincharse cuando están parcialmente hidratadas, dando como resultado que las cavidades y microporos se hagan lo suficientemente amplias para permitir la penetración de moléculas más grandes, desde nutrientes hasta enzimas.

### **1.5.2. Hemicelulosa.**

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. A diferencia de la celulosa su estructura no es homogénea (Wilder y Albersheim,

1973). Está formada por pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y compuestos fenólicos (como el ácido ferúlico y p-cumárico), las hemicelulosas son polidispersas y altamente ramificadas, con sustituyentes de diferentes tipos (Bidlack *et al.*, 1992). La frecuencia y composición de las cadenas depende de cada especie vegetal en particular y del método con el que fueron extraídas, el porcentaje de hemicelulosa en el lirio acuático se encuentra entre 32 - 55%.

Se considera que las moléculas de hemicelulosa se encuentran altamente entrecruzadas mediante puentes diferúlicos formando una red en la que se encuentran embebidas las microfibrillas de celulosa, al tiempo que proteínas de la pared celular también forman puentes con el ácido ferúlico, dándole gran resistencia e insolubilidad a toda la estructura (Bauer *et al.*, 1973). Estas propiedades, junto con la lignina, contribuyen a la elevada recalcitrancia de los materiales celulósicos.

### **1.5.3. Lignina.**

La lignina es un heteropolímero fenólico sin una composición estereoquímica regular, con una función protectora de los otros dos componentes polisacáridos, la celulosa y la hemicelulosa (colectivamente llamados holocelulosa) (Aust, 1995; Masai *et al.*, 2007).

La lignina representa el 20-30% del peso seco de la madera (Quiroz y Folch, 2011) y le brinda rigidez a la pared celular de plantas, es por ello que su degradación resulta altamente compleja y difícil. El porcentaje de lignina en el lirio acuático es entre 3-10% en peso seco. Su estructura se basa en la polimerización de tres alcoholes fenilpropílicos aromáticos: alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico (Quiroz y Folch, 2011). Debido a su conformación, la lignina es una molécula insoluble en agua y junto a la hemicelulosa forman una matriz que encapsula a las moléculas de celulosa, impidiendo su degradación.

### **1.6. Problemática de los compuestos lignocelulósicos en la DA.**

Los compuestos de alto peso molecular presentes en el lirio acuático, como son celulosa, hemicelulosa y lignina deben ser primero hidrolizados, para

posteriormente, ser fermentados a ácidos orgánicos, alcoholes, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Debido a la presencia de estos compuestos en el lirio acuático se considera que es el paso limitante, ya que el tiempo de conversión a monómeros más simples (como hexosas y pentosas) es muy lento. Esto es debido a que la lignina es muy resistente a la degradación por parte de los microorganismos anaeróbicos afectando también la biodegradabilidad de la celulosa y hemicelulosa (Sleat y Mah, 1987; Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991; Veeken y Hamelers, 1999). Los principales productos de la hidrólisis de la celulosa son celobiosa y glucosa, mientras que la hemicelulosa produce pentosas, hexosas y ácidos urónicos. La tasa de hidrólisis depende, también, del tamaño de las partículas, debido fundamentalmente a la disponibilidad de superficie para la adsorción de las enzimas hidrolíticas (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991; Hills y Nakano, 1984).

### **1.7. Pretratamientos para la biomasa lignocelulósica.**

Una de las etapas más importantes para la conversión de biomasa lignocelulósica en productos para los biocombustibles es el tratamiento de la biomasa. Aunque existen numerosos estudios de procesos en los que se realizan hidrólisis y conversión a productos sin pasar por una etapa previa de tratamiento (Ji *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2014), es bien sabido que el efecto del pretratamiento de estos materiales es más beneficioso en la obtención de mejores resultados. Los objetivos del proceso de un pretratamiento son principalmente reducir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la porosidad de los materiales lignocelulósicos, además de eliminar la lignina y la hemicelulosa. Todo pretratamiento debe cumplir con una serie de requisitos: (1) mejorar la formación de azúcares o la capacidad de formarlos posteriormente en la hidrólisis, (2) evitar la degradación o pérdida de los hidratos de carbono, (3) evitar la formación de subproductos que puedan inhibir etapas posteriores como en los procesos de hidrólisis y fermentación, (4) evitar la formación de sustancias tóxicas que puedan ocasionar un daño ambiental y finalmente (5) deben de ser rentables (Kumar *et al.*, 2009; Mosier *et al.*, 2005, Menon y Rao, 2012). Por ello, se requiere de un pretratamiento que facilite la disponibilidad de sus componentes para ser consumidos por los microorganismos que llevan a cabo la digestión anaerobia. El propósito del pretratamiento es alterar la estructura física y

química del sustrato con el fin de hacer que los biopolímeros se vuelvan más susceptible a una mayor hidrólisis.

Existen diferentes tipos de pretratamientos, en los cuales se encuentran los físicos, químicos y biológicos. Los métodos de pretratamiento químico y físico para la biomasa lignocelulósica son ampliamente utilizados en varios estudios (Sun y Cheng, 2002).

Los pretratamientos físicos, cuyo principal efecto es la reducción del tamaño de las partículas, producen un aumento en la tasa de hidrólisis, y si esta fase es la limitante del proceso anaerobio, supone un beneficio para el proceso general, produciendo menores tiempos de retención y tamaños de reactores menores.

El pretratamiento químico a menudo implica grandes cantidades de productos químicos a alta concentración con el fin de degradar la lignina y permitir que los microorganismos productores de celulasa hidrolicen fácilmente la celulosa. A pesar de que los métodos químicos no requieren mucho tiempo, consumen grandes cantidades de energía y generan desechos tóxicos (Kumar *et al.* 2009). Los tratamientos biológicos, sin embargo, son amigables con el ambiente.

La tabla 1 presenta algunos pretratamientos físicos, químicos y biológicos con las ventajas y desventajas que cada uno proporciona.

Tabla 1. Tipos de pretratamientos para la biomasa lignocelulósica (Menon y Rao, 2012).

Procesos de tratamiento	Ventajas	Limitaciones y desventajas
<b>Tratamientos físicos</b>		
1. Fragmentación mecánica y pirólisis	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduce la cristalinidad de la celulosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mayor consumo de energía de la que se puede obtener de la biomasa</li> </ul>
2. Explosión de vapor	<ul style="list-style-type: none"> <li>Degradación de la hemicelulosa y transformación de la lignina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Destrucción de una porción de la fracción de xilano</li> <li>Ruptura incompleta de la lignina</li> <li>Generación de compuestos inhibidores de microorganismos</li> </ul>
3. Explosión de fibra de amoníaco	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aumenta la superficie de acceso</li> <li>No forma compuestos inhibidores para las etapas siguientes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No es eficiente para biomasa con alto contenido de lignina</li> </ul>
4. Explosión con CO <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduce el contenido de lignina</li> <li>No produce residuos tóxicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No es eficiente para biomasa contenido de lignina</li> </ul>
5. Pirólisis por impulsos de campo eléctrico	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obtención de productos gaseosos y líquidos en condiciones ambientales</li> <li>Altera las células vegetales</li> <li>Requiere de un equipamiento simple</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Temperatura elevada</li> <li>Producción de ceniza</li> <li>Proceso en desarrollo</li> </ul>
<b>Tratamientos químicos</b>		
1. Ozonólisis	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduce el contenido de lignina</li> <li>No produce residuos tóxicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Requiere grandes cantidades de ozono</li> <li>Alto costo</li> </ul>
2. Hidrólisis ácida	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hidroliza la hemicelulosa a xilosa y otros azúcares</li> <li>Altera la estructura de la lignina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Corrosión de equipo</li> <li>Formación de sustancias tóxicas</li> <li>Alto costo</li> </ul>
3. Hidrólisis alcalina	<ul style="list-style-type: none"> <li>Elimina la hemicelulosa y la lignina</li> <li>Aumenta la superficie de acceso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Requiere largos tiempos de residencia</li> <li>Formación de sales irre recuperables y que se incorporan a la biomasa</li> </ul>
4. Organosolventes	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hidrólisis de la lignina y la hemicelulosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los disolventes necesitan ser drenados del reactor, evaporado, condensados y reciclados</li> <li>Alto costo</li> </ul>
<b>Tratamientos biológicos</b>		
1. Hidrólisis enzimática	<ul style="list-style-type: none"> <li>Degrada la celulosa, hemicelulosa y lignina dependiendo del microorganismo</li> <li>Requiere poca energía</li> <li>No produce residuos tóxicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hidrólisis lenta</li> </ul>

### **1.8. Microorganismos empleados para la hidrólisis de compuestos lignocelulósicos.**

El uso de microorganismos tanto en el pretratamiento biológico como en la producción de enzimas es crucial (Amriani *et al.*, 2016). La hidrólisis enzimática se considera el método más eficiente y menos contaminante para generar hexosas y pentosas a partir de compuestos lignocelulósicos. Sin embargo, el costo de las enzimas hidrolíticas, como la celulasa y hemicelulasa, sigue siendo muy elevado (Amriani *et al.*, 2016). Por ello, se puede recurrir a la producción de enzimas que producen los hongos lignocelulolíticos. El primer aspecto a considerar en el desarrollo de un sistema de producción de enzimas es la selección del microorganismo adecuado para el proceso. Las características más deseables para la selección de un microorganismo productor de enzimas es que el microorganismo no debe ser patógeno, ni estar asociado con la producción de toxinas. Las enzimas son los catalizadores biológicos naturales que permiten que los procesos químicos que hacen posible la vida ocurran a la velocidad necesaria. Estos catalizadores también se pueden utilizar para acelerar reacciones químicas fuera de su ámbito biológico (Montiel y Bustos, 2014).

El material celulósico es particularmente atractivo como fuente de carbono y energía debido a su bajo costo y su gran abundancia. Sin embargo, debido a su carácter recalcitrante solamente ciertos organismos (como bacterias y hongos) producen las enzimas necesarias para utilizarlo (Béguin y Aubert, 1994). Los microorganismos con capacidad de producir enzimas con actividad celulolítica, son principalmente degradadores de carbohidratos y generalmente son incapaces de utilizar proteínas o lípidos como nutrientes para su crecimiento. Entre las bacterias que presentan actividad celulolítica destacan *Cellulomonas* y *Cytophaga* (Enoch *et al.*, 2011); sin embargo, los hongos son más utilizados, principalmente por su capacidad para utilizar distintos tipos de carbohidratos y no verse inhibidos por las concentraciones elevadas de otros azúcares en el medio (represión catabólica), como ocurre con las bacterias (Ali *et al.* 2011). Los hongos tienen más éxito que las bacterias en la hidrólisis de la celulosa presente en materiales de origen lignocelulósico, ya que

poseen la capacidad de excretar celulasas que pueden ser aisladas del medio de cultivo, así como del micelio.

Se han identificado dos importantes grupos con capacidades celulolíticas. El primero de ellos es el grupo anaeróbico, que comprende géneros bacterianos (*Clostridium* y *Ruminococcus*) y fúngicos (*Anaeromyces mucronatus*, *Caecomyces communis*, *Cyllumyces aberencis*, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces* sp. y *Piromyces* sp.), (Cazemier *et al.*, 2003; Warnecke *et al.*, 2007; Doi, 2007; Teunissen y Op den Camp, 1993).

El segundo grupo incluye especies aeróbicas habitantes de los suelos, especialmente los boscosos, tales como las bacterias *Cellulomonas* (Elberson *et al.*, 2000) y *Streptomyces* (Alani *et al.*, 2008), y los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera (Baldrian y Valaskova, 2008; Martínez *et al.*, 2005).

### **1.9. Hongos filamentosos implicados en la hidrólisis enzimática.**

Las especies fúngicas producen importantes clases de enzimas que juegan un papel clave en la descomposición de materiales orgánicos, particularmente los derivados de plantas. Estas enzimas pueden aplicarse en diversas áreas industriales como la producción de biocombustibles a partir de biomasa vegetal (Chandel *et al.*, 2012). Muchas de estas enzimas son producidas por hongos, como los de los géneros *Aspergillus*, *Neurospora* y *Trichoderma*.

Las especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* se utilizan por varias compañías como productores de enzimas que destruyen la biomasa lignocelulósica (Banerjee *et al.*, 2010). *Trichoderma reesei* tiene un gran conjunto de enzimas involucradas en la degradación de la celulosa (Selig *et al.*, 2008), mientras que *Aspergillus niger* produce principalmente enzimas que degradan la hemicelulosa (Stricker *et al.* 2008).

Algunas especies de *Aspergillus*, como *A. niger* y *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (Kozakiewicz 1989).

Los hongos del género *Aspergillus* son económicamente importante, y se utilizan en numerosas fermentaciones, incluyendo la producción de ácidos orgánicos y biosurfactantes, y también es el más utilizado en la producción de enzimas (Hag *et al.*, 2003). Este tipo de hongos tienen la capacidad de descomponer biomasa celulósica en glucosa, la cual puede convertirse en productos de valor agregado y energía, la celulasa se ha convertido en uno de los multicomponentes más investigados en los sistemas enzimáticos (Tengerdy y Szakacs, 2003).

Dentro de los hongos filamentosos con mayor capacidad de degradación de fibra de origen vegetal, se encuentra el género *Trichoderma*. Los hongos de este género son colonizadores de materiales celulósicos y, por lo tanto, a menudo pueden encontrarse en cualquier material vegetal en descomposición; así como, en la rizósfera de plantas, donde se puede inducir resistencia sistémica frente a patógenos (Schuster y Schmoll, 2010). La producción de celulasas por el género *Trichoderma* está sujeta a una serie de controles genéticos y bioquímicos. Uno de los controles más importantes sobre la actividad de estas enzimas es la inhibición por producto final. La última enzima de la secuencia de hidrólisis de celulosa, la celobiasa, es inhibida por glucosa. Probablemente, el inconveniente más grave del complejo de celulasas de *Trichoderma* es su ineficiencia debido a su baja actividad específica. Hasta hace poco, las cepas disponibles producían celulasas con actividad específica de alrededor de 0.6 U/mg de proteína (Montenecourrt, 1983). Las celulasas producidas por este hongo filamentosos tienen un alto interés industrial, ya que se utilizan ampliamente en las industrias alimentaria, textil y de pulpa y papel (Domingues *et al.*, 2000).

*Trichoderma reesei* es un ascomiceto del que históricamente se han aislado celulasas y xilanasas con aplicaciones industriales (en las industrias de los alimentos, humana y animal, farmacéutica, textil, del papel y la pulpa, y energética), por lo que sus enzimas han sido ampliamente estudiadas y han servido como modelo de la degradación de la celulosa (Druzhinina *et al.*, 2006; Esposito y da Silva, 1998; Nevalainen *et al.*, 1994).

Otra especie importante del género *Trichoderma* es *T. harzianum*. A este hongo se le puede encontrar en suelos y materiales orgánicos, pues puede adaptarse a diferentes condiciones ambientales, lo que le facilita su amplia distribución. *T. harzianum* es también conocido por su capacidad de producción de toxinas y antibióticos. En una etapa temprana de crecimiento, *T. harzianum* muestra un micelio color blanco y, eventualmente, desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación. Las colonias de *T. harzianum* crecen y maduran rápidamente, a los cinco días de incubación en medio de cultivo agar de papa y dextrosa (PDA) a 25 °C. Las especies de este género prefieren un pH ácido de 4.5 - 5 y se desarrollan en áreas con un excesivo contenido de humedad. Además, *T. harzianum*, produce enzimas hidrolíticas que degradan componentes de la pared celular de muchos microorganismos, que pueden ser utilizados como fuente de nutrientes (Romero *et al.*, 2009). *Trichoderma harzianum* es un hongo filamentoso (Samuels, 2006) y un agente de biocontrol reconocido que es efectivo contra hongos fitopatógenos (Kücük *et al.*, 2007). *T. reesei* es el hongo celulolítico mejor estudiado para la producción de enzimas (Adav *et al.*, 2012; Peciulyte *et al.*, 2014). Sin embargo, *T. harzianum* también produce enzimas capaces de hidrolizar y metabolizar la celulosa presente en la biomasa vegetal (Benoliel *et al.*, 2013; Vizoná *et al.*, 2012). Los estudios sobre cepas de *T. harzianum* muestran que es capaz de producir un complejo celulolítico con mayor actividad de betaglucosidasa que la mostrada por *T. reesei* (Benoliel *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2016). También se han detectado endoglucanasa, xilanasas y actividades de celobiohidrolasa (De Castro *et al.*, 2010). Aunque las enzimas producidas por *T. harzianum* albergan un gran potencial biotecnológico, la mayoría de los estudios en esta especie han sido dirigidas hacia el área de control biológico (Perazzolli *et al.*, 2012; Marzano *et al.*, 2013).

#### **1.10. Enzimas implicadas en la hidrólisis de compuestos lignocelulósicos.**

La hidrólisis enzimática de la celulosa es catalizada por tres enzimas: la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa que hidroliza los enlaces  $\beta$ -1,4 en las regiones amorfas internas de la celulosa dando largos fragmentos solubles, la exo- $\beta$ -1,4-glucanasa que separa el disacárido celobiosa desde los extremos reductores de la molécula y la  $\beta$ -

glucosidasa que lleva a cabo la hidrólisis de la celobiosa dando como producto moléculas de glucosa (Withers, 2001).

### 1.10.1. Celulasas.

Las celulasas son enzimas que hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4- glucosídicos de la celulosa dando como productos primarios glucosa, celobiosa y oligosacáridos. Este grupo del sistema complejo de enzimas es el más ampliamente estudiado ya que comprende las endoglucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas. Las celulasas son glicosil-hidrolasas, y utilizan dos mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales. Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición (mecanismo de retención) y otro tipo en el que se pierde la posición (mecanismo de inversión) (Whiters, 2001). Las glicosil-hidrolasas se clasifican con base en su secuencia de aminoácidos. Este tipo de clasificación por familias permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su mecanismo de acción y determinar las relaciones evolutivas entre ellas. De acuerdo con el sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grandes grupos:

*Endoglucanasas:* Éstas son 1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4) que se agrupan en las familias 5, 6, 8, 9 y 12 principalmente, de las glicosil-hidrolasas. La nomenclatura EC (Enzyme Commission numbers) representa un esquema de clasificación numérica para las enzimas, con base en las reacciones químicas que catalizan. Las endoglucanasas actúan de forma azarosa sobre las regiones de celulosa amorfa en el interior del polisacárido, generando oligosacáridos de diferentes tamaños y, por lo tanto, nuevas cadenas terminales.

*Exoglucanasas:* Producen principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor y están representadas por dos grupos de enzimas: exocelobiohidrolasas o celobiohidrolasas (CBH) (1,4- $\beta$ -Dglucancelobiohidrolasas) (EC 3.2.1.91) que liberan unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor y exoglucohidrolasas (1,4- $\beta$ -D-glucan glucohidrolasas) (EC 3.2.1.74) que liberan unidades de glucosa a partir del extremo no reductor e incluyen también actividad de las celobiohidrolasas produciendo celobiosa por ataque en el extremo no reductor del polímero.

$\beta$ -Glucosidasas: ; $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasas

(EC 3.2.1.21) hidrolizan celobiosa y otros  $\beta$ -1,4-oligoglucósidos de cadena corta para formar glucosa, siendo ésta el resultado final de la acción degradativa del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa.

### **1.10.2. Xilanasas.**

Las enzimas más relevantes, con relación a la ruptura de la estructura de la lignocelulosa, son las xilanasas, estas enzimas poseen actividad endo- $\beta$ -1,4-xilanasas, es decir, hidrolizan el enlace glucosídico presente en la cadena principal del polímero con lo que facilitan el acceso a otras enzimas para la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa presentes en la lignocelulosa. Cabe destacar que la actividad de las xilanasas puede ser clasificada como ayudante en la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, pero también cumplen un rol principal en la degradación de la hemicelulosa. Las xilanasas comprenden un grupo de enzimas capaces de hidrolizar sustratos ricos en xilano. Estas enzimas han sido usadas extensamente en procesos industriales tales como la industria del papel y en la alimentaria (Gerber *et al.*, 1997; Coughlan y Hazlewood, 1993). Los hongos filamentosos son comúnmente utilizados para producir xilanasas y se ha conseguido mejorar los rendimientos de su producción modificando algunas de sus condiciones de cultivo (Haltrich *et al.*, 1996). Se ha estudiado que las xilanasas mejoran la hidrólisis de lignocelulosa efectuada por la acción de celulasas (Hu *et al.*, 2011), esto se explica porque la principal limitante en la degradación de las fibras de celulosa es el acceso que tienen las enzimas a ésta, por lo tanto, al degradar el xilano presente en el sustrato se logra una liberación de las fibras, y con ello una mejor acción de celulasas (Hu *et al.*, 2011).

Las xilanasas pueden ser clasificadas dentro de las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas (GH10 y GH11), (Henrissay *et al.*, 1991). Aun cuando ambos tipos de enzimas hidrolizan los enlaces endo- $\beta$ -1,4-xilanasas presentes en las moléculas de xilano, existen diferencias estructurales y del sustrato sobre el que actúan ambas familias. Las GH10 suelen tener pesos moleculares más altos y menores puntos isoeléctricos que las GH11, y estas últimas no hidrolizan xilanos muy sustituidos (Kim, 2014).

### 1.11. Antecedentes

Debido al alto contenido de compuestos lignocelulósicos en el lirio acuático tales como celulosa (18-25%), hemicelulosa (32-55%) y lignina (3-10%) como lo reportan algunos autores (Bhattacharya y Kumar, 2010; Bolenz *et al.*, 1990; Poddar *et al.*, 1991; Gressel, 2008) hace que esta tenga una alta recalcitrancia ya que difícilmente estos compuestos son degradados a compuestos más simples como glucosa que pueda ser aprovechada por sistemas biológicos para obtener diferentes tipos de productos orgánicos no contaminantes. La abundancia de esta planta en los cuerpos de agua, además de su incontrolable y rápido crecimiento, ocasiona daños hacia actividades recreativas e industriales, generando problemas de salud humana y a los ecosistemas. Entre los efectos negativos más importantes pueden citarse la pérdida de agua de cuerpos de agua por transevaporación, la disminución de oxígeno disuelto, la alteración irreversible de ecosistemas, además de ser nichos para la reproducción de mosquitos vectores de enfermedades (Rezania *et al.*, 2015). Se estima que en México existen alrededor de 40,000 ha con presencia de lirio, Prácticamente todos los lagos de México tienen problemas con esta especie (Vibrans, 2009; Carrión *et al.*, 2012). El manejo de la planta presenta problemas debido a su alto contenido de humedad (95 %), lo que encarece su transporte y disposición (Martínez y Gómez, 2007); por ello, se le considera como una biomasa potencial para la implementación de estrategias sustentables: una de ellas es la producción de enzimas y otra la digestión anaerobia para la producción de biogás. Algunos autores que han reportado trabajos sobre estas dos estrategias se describen a continuación.

#### 1.11.1. Producción de enzimas

- Deshpande *et al.*, (2008) evaluaron la producción de xilanasas con un cultivo mixto de *Trichoderma reesei* QM 9414 mutante (*T. reesei* METRO) y *Aspergillus niger*, obteniendo 168,73 UI/g<sub>ms</sub> a los 9 días de fermentación, bajo las siguientes condiciones: lirio acuático seco, pretratado con ácido sulfúrico y empapado con nutrientes. Los autores concluyeron que el lirio acuático

debido a su biomasa lignocelulósica es un sustrato potencial para la producción de enzimas sacarificantes (celulolíticas y ligninolíticas).

- En 2011 Zhao *et al.*, utilizando lirio acuático como sustrato y una cepa de *Trichoderma reesei* SEMCC-3.217, mostraron que la adición de salvado de trigo, CaCl<sub>2</sub>, tween 80 y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tuvo un efecto significativo en la producción de celulasas, obteniendo altos rendimientos. La optimización mejoró la producción en cuatro veces (13.4 UI/g<sub>ms</sub>), después de 7 días de fermentación con respecto a un control sin salvado de trigo y los otros compuestos.
- Manivannan y Narendhirakannan (2014) midieron la producción de xilanasas con una cepa de *Trichoderma reesei* NRRL – 3652 y alcanzaron a los 5 días de fermentación 21.47 UI/mL, usando lirio acuático seco, pretratado con ácido sulfúrico y empapado con nutrientes.
- Amriani *et al.*, en 2016, estudiaron la producción de celulasas con *A. niger*, usando lirio acuático seco a 105 °C y molido a un tamaño de partícula entre 0.1 - 1 mm, seguido de una fermentación sólida con *G. boninense* (hongo de la pudrición blanca), 70% de humedad a 30 °C, durante 7 días, como pretratamiento para degradar la lignina, reportaron una producción máxima de celulasas de 1.035 UI/mL a los 7 días de fermentación. Concluyendo que el uso de microorganismos tanto en el pretratamiento biológico como en la producción de enzimas es crucial y que la hidrólisis enzimática se considera el método más eficiente y menos contaminante para generar glucosa a partir de compuestos lignocelulósicos.
- Pothiraj *et al.*, (2016), trabajando con lirio acuático y los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride* para la producción de celulasas, mostraron una actividad de 68.3 UI/mL con *Trichoderma viride* mientras que con *Aspergillus niger* la actividad fue de 46.3 UI/mL. Las condiciones óptimas para las celulasas fueron una concentración de sustrato del 5% (p/v) y un periodo de incubación de 6 días.
- Evaluando la producción de celulasas con un extracto a partir de *Pleurotus ostreatus* y empleando como sustrato lirio acuático, Tovar *et al.*, 2017,

obtuvieron la mayor producción de celulasas a las 24 horas de cultivo las cuales fueron 12.83 UI/g<sub>ms</sub> hojas y 9.92 UI/g<sub>ms</sub> para el bulbo. Concluyeron que con el extracto enzimático crudo de *P. ostreatus* es posible obtener mayor actividad enzimática en comparación a la inoculación con micelio-agar. Así mismo, obtuvieron mayor actividad enzimática al emplear como sustrato hoja de lirio acuático.

La tabla 2 presenta de forma resumida los trabajos sobre la producción de algunas enzimas lignocelulósicas, producidas por hongos filamentosos del género *Aspergillus* y *Trichoderma*, en donde se observa que las celulasas y xilanasas son las más reportadas.

Tabla 2. Enzimas producidas por hongos a partir del lirio acuático.

<b>Enzima</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Referencia</b>
Celulasa	<i>Aspergillus niger</i>	Pothiraj <i>et al.</i> , 2016
Celulasa	<i>Trichoderma viride</i>	Pothiraj <i>et al.</i> , 2016
Celulasa	<i>Aspergillus niger</i>	Amriani <i>et al.</i> , 2016
Celulasa	<i>Trichoderma reesei</i> SEMCC – 3.217	Zhao <i>et al.</i> , 2011
Celulasa	<i>Trichoderma reesei</i>	Deshpande <i>et al.</i> , 2009
Celulasa	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus nidulans</i>	Ali y El – Dein, 2008
Celulasa	<i>Trichoderma reesei</i>	Mukhopadhyay y Nandi, 1999
$\beta$ - glucosidasa	<i>Rhizopus oryzae</i>	Karmakar y Ray, 2011
Xilanasas	<i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652	Manivannan y Narendhirakannan, 2014
Xilanasas	<i>Aspergillus flavus</i>	Saha <i>et al.</i> , 2012
Xilanasas	<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	Deshpande <i>et al.</i> , 2008

### 1.11.2. Digestión anaerobia.

- Jagadish *et al.*, 2012, reportan la digestión anaerobia de lirio usando la planta cortada en trozos de 2 cm y expuestas al sol durante 7 días; posteriormente, secada al horno durante 6 horas. La planta seca fue molida y mezclada con lodos primarios. Se hicieron 5 tratamientos usando 4 g de polvo de lirio acuático con diferentes cantidades de lodos y agua. El mejor rendimiento obtenido fue el tratamiento de 25% agua y 75% lodo primario con un resultado de 0.44 L de biogás /gsv.
- Hernández en 2016 estudiaron la digestión anaerobia de la fracción líquida (jugo) de lirio acuático en mezcla con agua residual urbana en reactores por lote, bajo distintas proporciones (25, 50, 75 y 100% de jugo de lirio). Los resultados mostraron que a una proporción de jugo del 75% y 25% de agua residual, la producción de biogás fue mayor con una cantidad de metano acumulada de 289 mL y con eficiencias de remoción de azúcares totales, DQO y sólidos mayores al 80%.
- En 2016, Ramírez estudió la producción de biogás a partir de lirio acuático triturado y en mezcla con agua residual municipal bajo diferentes combinaciones (lirio completo, jugo y bagazo), inoculados con lodos anaerobios e incubados a 35 °C durante 25 días. Concluyendo que cuando el lirio acuático se encuentra en mezcla con agua residual se obtiene una mayor producción de biogás con un 45% de metano, mientras que la digestión anaerobia de lirio solo y de la fracción sólida, el biogás producido contiene menos del 10% de metano, esto debido a una mayor concentración de compuestos lignocelulósicos que son recalcitrantes y no pudieron ser convertidos a metano durante el tiempo que duró el estudio.
- Ramírez en 2017, evaluaron las dos primeras etapas de la digestión anaerobia: hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático en reactores hidrolíticos anaerobios de lecho escurrido (RHALE) con diferentes volúmenes del líquido de escurrimiento; observando que el mejor volumen de escurrimiento fue del 10 % respecto a la masa empacada. Bajo estas

condiciones obtuvieron en promedio el 40% de reducción de sólidos volátiles y altas concentraciones de compuestos solubles en forma de DQO y AGV entre los 30 – 33 días de incubación a 30 °C.

- Estudios en continuo realizados por Hernández en 2019, sobre la digestión anaerobia de lirio acuático en dos etapas: hidrólisis y acidogénesis en un RHALE y metanogénesis de los lixiviados en mezcla con agua residual urbana en un UASB, mostraron que en el reactor de hidrólisis y acidogénesis se obtuvieron eficiencia de reducción de sólidos volátiles y DQO del 37 y 30% respectivamente. El lixiviado en mezcla con agua residual a una COV de 4.5 gDQO/Lr.d, produjo 7 L<sub>biogas</sub>/d con una composición de metano del 72%, concluyendo que la DA del lirio es más rápida separando el proceso en dos etapas.

### **1.12. Justificación**

Debido al crecimiento tan rápido del lirio acuático y a la serie de problemas que acarrea su presencia en los cuerpos de agua, se propone la digestión anaerobia en dos etapas, como una alternativa para un manejo sustentable de esta planta. Los compuestos lignocelulósicos presentes en el lirio acuático tales como celulosa, hemicelulosa y lignina, hacen que la hidrólisis de la fracción sólida en la primera etapa de la digestión anaerobia sea lenta, debido al tiempo en el que tardan dichos compuestos en solubilizarse a compuestos más simples, por ello un pretratamiento con hongos lignocelulolíticos, puede mejorar la hidrólisis de estos biopolímeros y mejorar la producción de compuestos solubles, principalmente los ácidos grasos volátiles en esta primera etapa.

### **1.13. Hipótesis**

Un pretratamiento enzimático fúngico de la fracción sólida del lirio acuático aumentará la tasa de hidrólisis de sus compuestos lignocelulósicos y la producción de compuestos solubles en la acidogénesis.

## **1.14. Objetivos**

### **1.14.1. General**

Evaluar el efecto de un pretratamiento enzimático, a partir de hongos filamentosos, sobre la hidrólisis de los compuestos lignocelulósicos de la fracción sólida del lirio acuático y en la producción de compuestos solubles (AGV) en la etapa acidogénica.

### **1.14.2. Particulares**

- Caracterizar fisicoquímicamente la fracción sólida del lirio acuático.
- Evaluar el efecto de un extracto enzimático comercial en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático.
- Medir el efecto de un pretratamiento con *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático.
- Determinar las actividades enzimáticas de los hongos y evaluar el efecto en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio con *Trichoderma harzianum*.

## **CAPITULO 2**

### **2. Materiales y métodos**

#### **2.1. Estandarización de técnicas analíticas.**

Se realizaron curvas patrón para la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) por el método de reflujo cerrado (APHA, 2005), la técnica de azúcares totales (Dubois, 1956) y la determinación de los ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases.

La tabla 3, muestra las técnicas analíticas que se usaron para la determinación de todas las variables.

Tabla 3. Variables de respuesta y técnicas analíticas.

Variable	Técnica
pH	El pH se determina con un potenciómetro HANNA instruments HI 255
Ácidos grasos volátiles (AGV)	Cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID), con un cromatógrafo Agilent modelo 7820A.
Azúcares totales	Técnica colorimétrica: Fenol-sulfúrico (Dubois, 1956)
Demanda química de oxígeno (DQO)	Por el método de Reflujo cerrado, (APHA, 2005)
Determinación de sólidos (ST, SF, SV)	Por gravimetría (APHA, 2005)
Actividad enzimática	Por el método de DNS (Miller, 1960)

En el capítulo 6 (anexos), se describen detalladamente las técnicas utilizadas.

## 2.2. Recolección del lirio acuático del CIBAC.

Las plantas de lirio antes de su extracción del cuerpo de agua se enjuagaron con agua del mismo lago para remover sólidos adheridos en toda la planta. Una vez que se extrajeron las plantas del cuerpo de agua se depositaron en un costal con orificios para favorecer el escurrimiento del exceso de agua y se transportaron al laboratorio.

## 2.3. Molienda de la planta.

Cada planta se cortó en trozos y se molió a un tamaño de partícula de 0.5 cm en un molino marca TOR-REY-M12-FS.

## 2.4. Separación de la fracción sólida y líquida.

La fracción sólida del lirio fue prensada manualmente para separarla de la líquida por medio de una malla o tamiz de 0.073 mm.

## 2.5. Caracterización del lirio acuático.

La fracción sólida (bagazo) resultante se caracterizó con base a los siguientes parámetros: DQO, pH, azúcares totales, pH y sólidos por medio de los métodos descritos en la tabla 2.

## 2.6. Caracterización del inóculo.

El inóculo utilizado en las cinéticas fueron lodos anaerobios del reactor que trata la fracción acuosa de lirio en mezcla con agua residual municipal. Se caracterizaron por medio de la determinación de sólidos totales (ST), fijos (SF) y volátiles (SV).

## 2.7. Efecto de un extracto enzimático comercial en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático.

### 2.7.1. Pretratamiento enzimático.

Antes de llevar a cabo la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio, se hizo un pretratamiento con enzimas comerciales de la marca Novozymes®, La tabla 4 muestra la cantidad utilizada de cada uno de los complejos enzimáticos comerciales con sus respectivas actividades. Considerando que la fracción sólida del lirio tiene en promedio 80% de humedad y, por lo tanto, de cada kilogramo se obtienen 200 g de materia seca, se hizo el cálculo para obtener la dosis recomendada por el fabricante de cada una de las preparaciones enzimáticas. A 600 g de fracción sólida de lirio húmeda se le adicionó las distintas cantidades de los complejos enzimáticos. La fracción sólida más las enzimas fueron incubadas a 50 °C durante 24 horas.

Tabla 4. Complejos enzimáticos utilizados en la hidrólisis de la fracción sólida de lirio acuático.

<b>Complejo enzimático</b>	<b>Descripción</b>	<b>Complejo enzimático (mL/600 g de lirio húmedo)</b>	<b>Actividad enzimática**</b>
NS22086	Complejo de celulasas	4.8	600 U <sub>CMCasa</sub> /mL
NS22083	Complejo de xilanasas	1.2	700 U <sub>xilanasas</sub> /mL

NS22018	$\beta$ -glucosidasas	1.2	300 CBU/mL
NS22019	Cóctel enzimático	1.2	119 FBG/mL
NS22002	Complejo de hemicelulasas	1.2	54 FBG/mL

Donde:  $U_{CMCasa}$ =Actividad carboximetilcelulasa;  $U_{xilanasa}$ =Actividad xilanasa; CBU=Actividad celobiasa; FBG=Actividad Beta-Glucanasa Fúngica.

### 2.7.2. Hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida (bagazo) de lirio acuático en reactores de lecho escurrido (RHALE) en lote.

La fracción sólida recolectada en primavera de 2018 fue inoculada con lodos anaerobios. Se hicieron 4 tratamientos con y sin los complejos enzimáticos, como se muestra en el diseño experimental en la tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental de la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático en los RHALE.

Tratamientos	Bagazo (g)	Bagazo + Enzima (g)	Lodos (mL)	Agua (mL)
R1	0	100	25	0
R2	0	100	0	25
R3	100	0	25	0
R4	100	0	0	25

Donde: R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio.

Los reactores consistieron en columnas de vidrio de 300 mL de volumen, se realizaron 4 tratamientos diferentes con sus respectivos triplicados (figura 3). El tratamiento R1 fue empacado con la fracción sólida de lirio acuático previamente tratados con el complejo enzimático (50 °C durante 24 h, se le adicionó agua para iniciar con la misma humedad) y se mezclaron con lodos anaerobios, el R2 fue empacado solo con la fracción sólida del lirio acuático previamente tratado con el complejo enzimático, el R3 fue empacado con la fracción sólida de lirio en mezcla con lodos anaerobios provenientes de un reactor UASB que trataba el jugo de lirio y el R4 consistió en empacar el reactor con sólo la fracción sólida del lirio acuático; para los tratamientos que se le agregaron lodos anaerobios se inocularon con una proporción del 25% (V/V), equivalentes a 0.6 g<sub>SV</sub>/100 g<sub>bagazo</sub>. A todos los reactores se le adicionó un volumen de escurrimiento del 10% respecto al volumen de operación del reactor (10 mL). El escurrimiento del lecho se hizo con agua del grifo para evitar la influencia de otros microorganismos externos al inóculo, la cinética duro 20 días y fue incubada a una temperatura de 30 ± 2 °C, se midió pH, DQO y sólidos al inicio y al final de las cinéticas de los biosólidos, del lixiviado producido se analizaron las variables de volumen de lixiviado, pH, DQO y AGV.



Figura 3. Hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio en reactores en lote.

## **2.8. Pretratamiento enzimático de la fracción sólida de lirio con dos cepas de hongos filamentosos**

### **2.8.1. Selección de las cepas fúngicas.**

Con base en la bibliografía consultada los géneros fúngicos mayormente utilizados para la producción de enzimas son *Aspergillus* y *Trichoderma*, (Banerjee *et al.*, 2010). Se seleccionaron dos cepas de hongos filamentosos: *Aspergillus niger* (C28B25) del laboratorio W-104 y *Trichoderma harzianum* (PBLA) de la planta piloto 4 de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. *Trichoderma* tiene un gran conjunto de enzimas involucradas en la degradación de la celulosa y hemicelulosa (Selig *et al.*, 2008), mientras que *Aspergillus niger* produce principalmente enzimas que degradan las hemicelulosas (Stricker *et al.*, 2008).

### **2.8.2. Propagación de las cepas.**

Las cepas fueron propagadas en cajas Petri con medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa) mediante resiembras periódicas a 30 °C (el tiempo puede variar hasta 7 días y esto dependerá de la cepa), para su conservación fueron guardadas en refrigeración a 4°C.

Para la producción del inóculo para la fermentación en medio sólido (FMS) se realizó la siembra de la cepa en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDA estéril (121 lb/plg<sup>2</sup> durante 15 minutos). Los matraces fueron incubados a 30 °C por 120 horas. Pasado el tiempo de incubación se cosecharon las esporas agregando una solución estéril de tween 80 (1% v/v) a cada matraz. La suspensión fue homogenizada con un agitador magnético, se tomó una alícuota de la suspensión (25 µL) para realizar la cuenta de las esporas en cámara de Neubauer y observadas en un microscopio OLYMPUS, serie BH2-RFCA.

## 2.9. Efecto de los hongos *Aspergillus niger* C28B25 y *Trichoderma harzianum* PBLA en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático.

### 2.9.1. Crecimiento de los hongos

La masa fúngica para la fermentación en medio sólido se realizó con la siembra de las cepas fúngicas en matraces Erlenmeyer de 250 mL, usando 30 g de la fracción sólida (bagazo) del lirio acuático estéril fresco (121 lb/plg<sup>2</sup> durante 15 minutos) con un contenido de humedad del 79 %. Los matraces fueron incubados a 30 °C por 120 horas. Como se muestra en las figuras 4 y 5.



Figura 4. Crecimiento de *Aspergillus niger* C28B25 en bagazo de lirio acuático.



Figura 5. Crecimiento de *Trichoderma harzianum* PBLA en bagazo de lirio acuático.

### 2.9.2. Fermentación en medio sólido (análisis respirométrico) de las cepas fúngicas para la producción de enzimas.

La fermentación en medio sólido se realizó en columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno y 20 cm de longitud. Se llenaron con aproximadamente 9 g de fracción sólida de lirio acuático fresco y 1 g de la masa de los hongos obtenida previamente de la fermentación sólida con bagazo de lirio estéril (equivalentes al 10% del volumen final), se realizaron 3 tratamientos con sus respectivos triplicados, como se muestra en la tabla 6. El bagazo de lirio fresco no fue esterilizado.

Tabla 6. Diseño experimental de la fermentación en medio sólido con las cepas fúngicas en las columnas.

Tratamientos	Lirio fresco (g)	Masa <i>A. niger</i> (g)	Masa <i>T. harzianum</i> (g)
1	9	0	1
2	9	1	0
3	10	0	0

Las columnas se colocaron en un baño con agua a temperatura controlada de 30 °C y un flujo de aire no estéril de 20 mL/min por 150 horas. Todas las columnas estuvieron conectadas a un metabolímetro para realizar un análisis de respirometría, con la finalidad de conocer el tiempo de máxima producción de CO<sub>2</sub>. El metabolímetro cuenta con un “software” que indica la producción de gases durante la cinética. Las columnas usadas para este trabajo se muestran en la figura 6.



Figura 6. Columnas empacadas con bagazo de lirio acuático en mezcla con las cepas fúngicas, conectadas a un metabolímetro para medir la respiración en la FMS.

### 2.9.3. Hidrólisis y acidogénesis de bagazo de lirio inoculado con las cepas fúngicas en los RHALE

La fracción sólida recolectada en otoño de 2018 fue empacada en reactores hidrolíticos de lecho escurrido (RHALE) en lote, inoculada con lodos anaerobios y usando la masa fúngica obtenida después de la FMS como fuente de enzimas, según el diseño experimental presentado en la Tabla 7.

Tabla 7. Diseño experimental para la hidrólisis y acidogénesis del bagazo de lirio acuático en los RHALE.

Tratamientos	Bagazo fresco (g)	Lirio fresco (g)	Masa <i>A. niger</i> (g)	Masa <i>T. harzianum</i> (g)	Lodos anaerobios (g <sub>sv</sub> )
R1	90	0	0	10	0.6
R2	90	0	10	0	0.6
R3	90	10	0	0	0.6

R1= Lirio+Lodos+Masa *Trichoderma*, R2= Lirio+Lodos + Masa *Aspergillus*, R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS.

Los reactores consistieron en columnas de vidrio de 300 mL de volumen, se realizaron 3 tratamientos diferentes con sus respectivos triplicados, el tratamiento R1 consistió en empacar el reactor con la fracción sólida del lirio acuático en mezcla con lodos anaerobios y el 10% de la masa de *Trichoderma* obtenida de la fermentación anterior, el R2 fue empacado con la fracción sólida de lirio en mezcla con lodos anaerobios y el 10% de la masa de *Aspergillus*; el R3 fue empacado con la fracción sólida de lirio acuático en mezcla con lodos anaerobios y 10% de la masa del control de la fermentación anterior, para todos los tratamientos que se le agregaron lodos anaerobios se inocularon con 0.6 g<sub>sv</sub>/100 g<sub>bagazo</sub>. A todos los reactores se le adicionó diariamente un volumen de escurrimiento del 10% respecto a la masa empacada (10 mL) con agua del grifo.

## **2.10. Medición de las actividades enzimáticas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum*.**

### **2.10.1. Crecimiento de los hongos.**

El inóculo para la fermentación en medio sólido se realizó con la siembra de las cepas fúngicas en matraces Erlenmeyer de 250 mL, usando 30 g de la fracción sólida (bagazo) del lirio acuático fresco estéril (121 lb/plg<sup>2</sup> durante 15 minutos). Los matraces fueron incubados a 30 °C durante 5 días.

### **2.10.2. Extracción de las enzimas producidas por las cepas fúngicas.**

Transcurridos los 5 días de fermentación, se tomó 1 g de masa fermentada (MF) y se diluyó en 4 mL de Tris HCL al 20 mM pH 7.2. Se agitó en vortex durante 1 min. Posteriormente, se centrifugó a 3600 rpm durante 15 minutos y se tomó 1 mL del sobrenadante. Las muestras se congelaron hasta su análisis. Esto fue realizado por duplicado.

### **2.10.3. Determinación de las actividades enzimáticas.**

Las actividades enzimáticas se determinaron midiendo los azúcares reductores liberados de la hidrólisis, por el método de DNS (Miller 1960). Según el método, los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. Cuando el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él, se desarrolla un cambio de color parecido al café (con variaciones de amarillo hasta café). El cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica, leídas por espectrofotometría a una determinada longitud de onda. La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determina haciendo una interpolación con una curva patrón según el azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración.

### **2.10.4. Cuantificación de las actividades enzimáticas.**

Preparación de la curva patrón

- En 1 tubo de ensayo se colocó 1 mL de solución de glucosa o dextrosa 5 mg/mL; posteriormente, se realizó una dilución en serie

(de 5 mg/mL a 0.078 mg/mL) en el resto de los tubos y se agregaron 1.5 mL de reactivo de DNS.

Preparación del blanco:

- En 2 tubos de ensayo se agregó 1 mL de agua destilada y 1.5 mL de DNS a cada tubo.

Preparación de los sustratos:

- En 3 tubos de ensayo se añadieron 0.9 mL de sustrato de xilano de abedul (0.25% en buffer de acetatos), 1.5 mL de DNS y 0.1 mL de buffer de acetatos 0.1 M a pH =5.2.
- En 3 tubos de ensayo se pusieron 0.9 mL de sustrato de carboximetil celulosa (0.25% en buffer de acetatos), 1.5 mL de DNS y 0.1 mL de buffer de acetatos 0.1 M a pH =5.2.

Preparación de tubos control para los distintos tratamientos:

- Dependiendo del número de tratamientos se prepara un tubo de ensayo control que contiene 0.9 mL de buffer, 0.1 mL de extracto de la MF y 1.5 mL de DNS.

#### **2.10.4.1. Actividad de celulasas.**

1. Se colocaron tubos de ensayo en un baño con agua a 40 °C con 0.9 mL de sustrato de carboximetilcelulosa (0.25% p/v)
2. Cada 10 segundos se adicionaron 0.1 mL del extracto obtenido de la MF en el tubo correspondiente.
3. Se incubó por 30 min.

Posteriormente para detener la reacción se adicionó 1.5 mL de reactivo DNS cada 10 segundos a cada tubo, como en el punto 2. Esto para detener la reacción de los tubos en el mismo tiempo, es decir, después de los 30 min.

#### **2.10.4.2. Actividad de xilanasas**

1. Se colocaron tubos de ensayo en un baño con agua a 40 °C con 0.9 mL de sustrato de Xilano de abedul (0.25% p/v)

2. Cada 10 segundos se adicionaron 0.1 mL de extracto obtenido de la MF en el tubo correspondiente.
3. Se incubo por 15 min.
4. Para detener la reacción se adicionaron 1.5 mL de reactivo DNS cada 10 segundos a cada tubo, como en el punto 2. Esto para detener la reacción de los tubos en el mismo tiempo, es decir, después de los 30 min.

Posteriormente las muestras se incubaron en baño maría a ebullición durante 10 minutos, se dejaron enfriar con agua a contracorriente y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm.

La cuantificación se hizo considerando que una unidad de actividad enzimática (UI) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcares reductores por minuto bajo las condiciones de ensayo.

### **2.11. Hidrólisis y acidogénesis del bagazo de lirio en los RHALE con la adición de la masa y extracto enzimáticos de *Trichoderma harzianum***

La fracción sólida recolectada en verano de 2019 fue empacada en reactores hidrolíticos de lecho escurrido (RHALE) en lote, usando la masa fúngica y el extracto enzimático de *T. harzianum* obtenido después de la FMS, según el diseño experimental presentado en la Tabla 8.

Tabla 8. Diseño experimental para la hidrólisis y acidogénesis del bagazo de lirio acuático en los RHALE adicionanado la masa y extracto enzimáticos de *T. harzianum*.

<b>Tratamientos</b>	<b>Bagazo (g)</b>	<b>Masa fermentada de <i>T. harzianum</i> (g)</b>	<b>Extracto enzimático de <i>T. harzianum</i> (mL)</b>	<b>Inoculo (g<sub>sv</sub>)</b>
R1	90	10	0	0.6
R2	100	0	10	0.6
R3	100	0	0	0.6

R1= Lirio+Lodos+Masa fermentada de *T. harzianum*., R2= Lirio+Lodos + Extracto enzimático de *T. harzianum*, R3= Lirio+Lodos (control).

Los reactores consistieron en columnas de vidrio de 300 mL de volumen, se realizaron 3 tratamientos diferentes con sus respectivos triplicados, el tratamiento R1 consistió en empacar el reactor con la fracción sólida del lirio acuático en mezcla con lodos anaerobios y el 10% (p/p) de la masa fermentada de *T. harzianum*. obtenida de la FMS, el R2 fue empacado con la fracción sólida de lirio en mezcla con lodos anaerobios y el 10% (p/v) del extracto enzimático de *T. harzianum*, este extracto se obtuvo tomando 20 g de la masa fermentada de *T. harzianum* en 50 mL de una solución estéril de tween 80 (1% v/v), el extracto fue filtrado con una gasa y el líquido recuperado fue de 40 mL el cual se tomó como el extracto enzimático; el R3 fue empacado con la fracción sólida de lirio acuático en mezcla con lodos anaerobios y sirvió como control para este ensayo. Los lodos anaerobios agregados en los tratamientos fueron con una proporción del 25% (v/v) que corresponde a 0.6 g<sub>SV</sub>/100 g<sub>bagazo</sub>. A todos los reactores se le adicionó diariamente un volumen de escurrimiento del 10% respecto a la masa empacada (10 mL), con agua del grifo.

### **2.12. Análisis estadístico.**

Con base a los resultados obtenidos se realizó un diseño completamente al azar (DCA) de un factor, para cada una de las variables obtenidas (DQO, reducción de sólidos, azúcares totales, CO<sub>2</sub>), con un nivel de significancia de 0.05, para el análisis estadístico de la actividad enzimática, al ser solo dos tratamientos con duplicado, se realizó una t de Student para muestras independientes, los análisis fueron realizados con el programa de SPSS ahora llamado PASW Statistics 18.

## **CAPITULO 3**

### **3. Resultados y discusión.**

#### **3.1. Estandarización de las técnicas analíticas.**

Las figuras 7, 8 y 9 muestran las curvas patrón usadas para la cuantificación de la demanda química de oxígeno (DQO), azúcares totales y los azúcares reductores para las actividades enzimáticas, en cada uno de los tratamientos realizados. Las curvas patrón, muestran una muy buena linealidad con una R<sup>2</sup> por arriba de 0.99, lo

que indica que fueron confiables para la cuantificación de los azúcares y la DQO producidas o consumidas durante la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático.

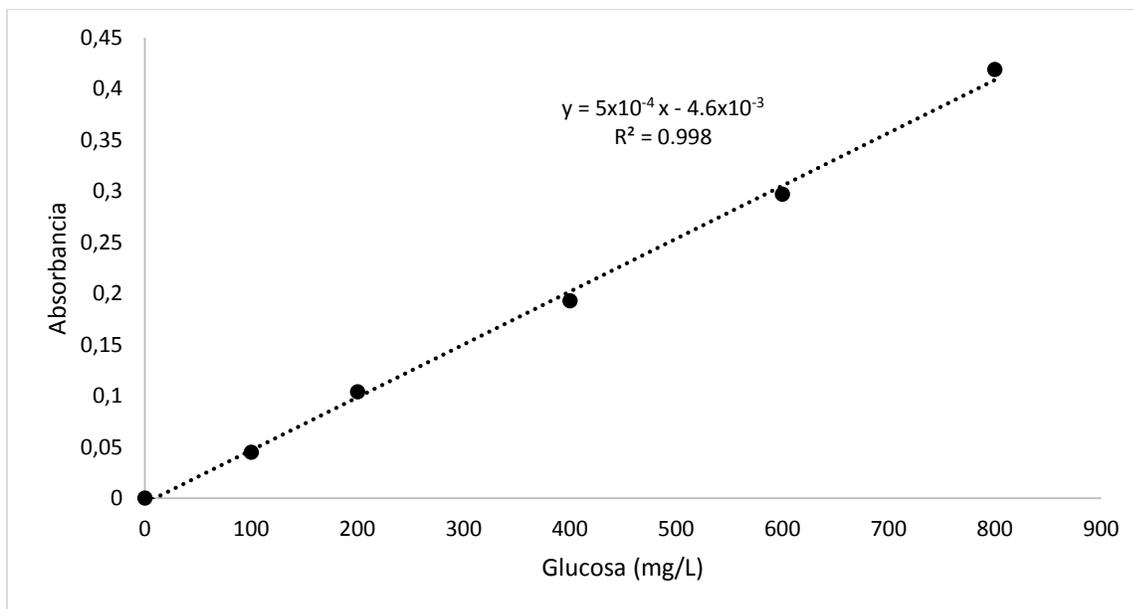


Figura 7. Curva patrón de DQO y ecuación de la recta.

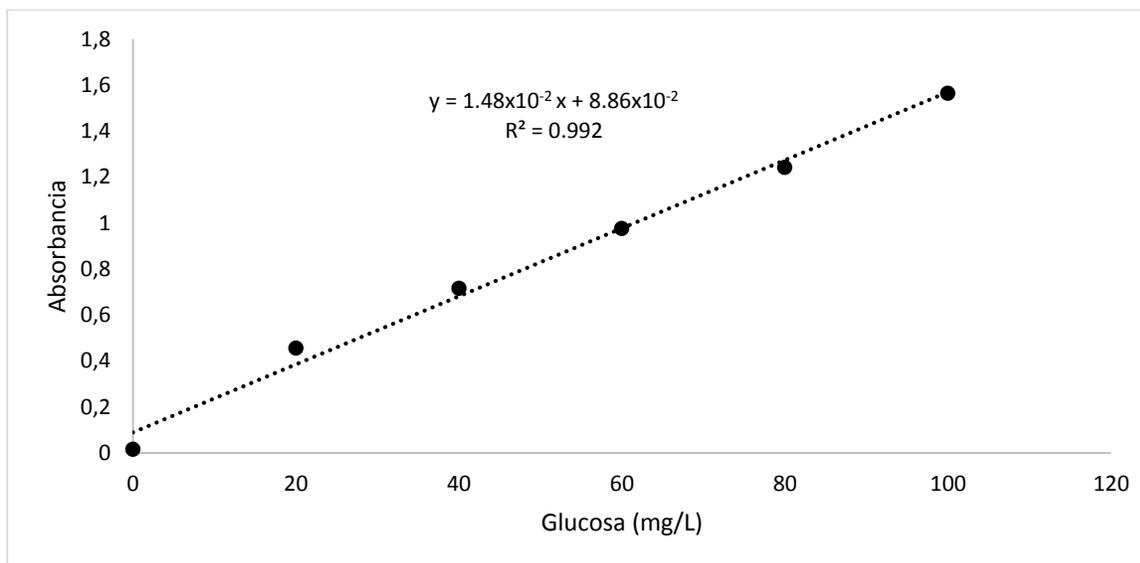


Figura 8. Curva patrón de azúcares totales y ecuación de la recta.

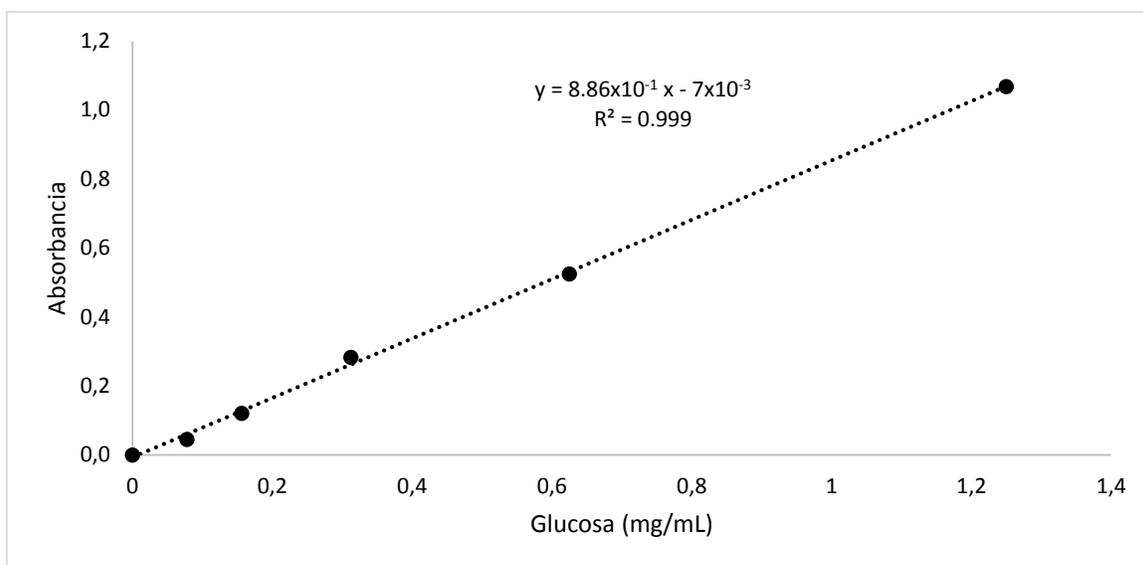


Figura 9. Curva patrón de azúcares reductores y ecuación de la recta.

### 3.2. Recolección y caracterización de la fracción sólida del lirio acuático.

La recolección del lirio acuático se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco (CIBAC). La tabla 9 muestra los resultados de la caracterización de la fracción sólida del lirio acuático en la temporada de primavera y otoño de 2018 y en la de verano de 2019.

Tabla 9. Caracterización fisicoquímica de la fracción sólida del lirio acuático.

Variable	Primavera 18	Otoño 18	Verano 19
pH	7.13 ± 0.1	6.46 ± 0.04	6.80 ± 0.09
Sólidos totales (g/kg <sub>bagazo</sub> )	122.45 ± 2.62	185 ± 5.2	165 ± 4.6
Sólidos fijos (g/kg <sub>bagazo</sub> )	14.96 ± 0.37	23 ± 0.51	19 ± 0.13
Sólidos volátiles (g/kg <sub>bagazo</sub> )	107.5 ± 3	162 ± 4.7	146 ± 4.7
DQO (g <sub>DQO</sub> /g <sub>SV</sub> )	0.84 ± 0.03	1.2 ± 0.14	0.6 ± 0.06
Azúcares totales (g <sub>Azúcares</sub> /g <sub>SV</sub> )	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.09 ± 0.005

Se puede observar que el valor de pH del bagazo en primavera de 2018 y verano de 2019 tiende a la neutralidad, mientras que en el otoño de 2018 el pH se encuentra ligeramente ácido, en otoño se observa una mayor cantidad de materia orgánica

representada en sólidos volátiles y DQO respecto a primavera y verano, esto se puede deber a las temporadas de lluvias y por ende a que el lirio se compone principalmente de plantas adultas y tiene la capacidad de absorber una gran cantidad de agua y compuestos inorgánicos del agua. Los sólidos volátiles (SV) representan el 88 % respecto a los sólidos totales en todas las temporadas, esta cantidad tanto de DQO como de SV pueden ser aprovechados como sustrato para los microorganismos anaerobios. Los sólidos fijos (12% de los sólidos totales) están asociados a las sales y/o compuestos inorgánicos (cenizas) y pueden estar representando los nutrientes y algunos metales que la planta toma del lago de Cuemanco, como lo mencionan Miranda y Lot (1999).

### **3.3. Cinéticas en lote para determinar el efecto de un extracto enzimático comercial en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático.**

La Tabla 10 muestra los resultados de las variables analizadas en los distintos tratamientos de los RHALE al inicio y final de las cinéticas. La masa empacada para cada tratamiento fue de 100 g con un contenido de humedad entre 87 y 88% como se describe en el capítulo 2 sección 7.2. Se puede observar que en todos los tratamientos presentan una disminución en el pH al final de las cinéticas, debido a una acumulación de compuestos solubles provenientes de la fermentación, como ácidos grasos volátiles producidos de los sólidos volátiles del lirio. Este comportamiento ha sido reportado por Rodríguez *et al.*, (2015), que utilizaron la fracción sólida de residuos urbanos (FORSU) en este mismo tipo de reactores y por Hernández, (2019) que trabajo la digestión anaerobia de lirio acuático en dos etapas, en un reactor RHALE en continuo para la hidrólisis y acidogénesis y en un UASB para la metanogénesis de la fracción líquida de lirio en mezcla con agua residual y lixiviados del RHALE.

En la tabla 10 se observa que la DQO y los azúcares disminuyen al final de las cinéticas, no hubo diferencias significativas en los tratamientos en la reducción de la DQO en el biosólido (para R1 fue de 38%, R2 de 41%, R3 de 37 % y R4 de 39%), sin embargo para los azúcares totales, la mayor reducción de azúcares se obtuvo

en los reactores R1 y R2 que contenían extracto enzimático con reducciones del 49 y 47% respectivamente, respecto a los a los reactores R3 y R4 (39 y 36%respectivamente).

Tabla 10. Variables respuesta de la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático en presencia y ausencia de extracto enzimático, al inicio y final de las cinéticas en los RHALE.

Tratamiento	Día	pH	DQO (g)	Azúcares (g)	ST ( $g_{ST}/$ $kg_{Bagazo}$ )	SV ( $g_{SV}/$ $kg_{Bagazo}$ )	$\eta$ SV (%)
R1	0	7.01 ± 0.02	26 ± 0.2	6 ± 0.2	136±7.9	125± 1.6	37 ± 3
	20	6.71 ± 0.09	16 ± 6	3.1 ± 2	95±9	78±6.5	
R2	0	6.88 ± 0.07	22 ± 1,7	4.1 ± 0.3	134±5	118 ±5	30 ± 5
	20	5.85 ± 0.6	13 ±7	2.2 ± 1	91±6	82.5±6.5	
R3	0	7.39 ± 0.02	22 ± 0.001	4.8 ± 0.16	129± 0.26	111±0.095	32 ± 0.4
	20	6.55 ± 0.3	14 ± 4	2.9 ± 3	86± 0.64	75.5± 0.42	
R4	0	7.13 ± 0.1	21 ± 0.2	3.7 ± 0.2	121 ± 0.74	106± 0.25	29 ± 0.5
	20	6.19 ± 0.85	13 ± 3	2.37 ± 5	82± 4.9	75.5±0.42	

Donde: R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio.

La fracción sólida (R1) que se inoculó con lodos anaerobios más el extracto enzimático presentó la mayor reducción de sólidos volátiles (37%) respecto a los demás tratamientos, ya que al hacer el análisis estadístico los demás tratamientos no presentaron diferencia significativa entre R2, R3 y R4. siendo 1.3 veces mayor la reducción del R1 con respecto al control (R3). Hernández, (2019) evaluó la digestión anaerobia de lirio acuático en dos etapas, en un reactor RHALE en continuo para la hidrólisis y acidogénesis y en un UASB para la metanogénesis de la fracción sólida en mezcla con AR y lixiviados. La primera cinética lo realizó en lote en un RHALE de 6 L, reportando una reducción de sólidos volátiles del 42 % a 50 días de cinética, por otra parte, Ramírez, en su tesis de Especialización (2017), trabajó con la fracción sólida de lirio en reactores RHALE, reportando una reducción de sólidos volátiles del 40 % a 30 días de cinética, estos valores fueron cercanos a los obtenidos en este análisis con el reactor R1, pero en un tiempo de cinética menor (20 días). Con estos resultados se puede decir que el agregar el extracto enzimático

se favoreció la hidrólisis de los compuestos lignocelulósicos presentes en la fracción sólida del lirio acuático, favoreciendo la solubilización de los compuestos orgánicos como se muestra en la figura 11.

### **3.3.1. Comportamiento y producción de los lixiviados generados en los RHALE.**

La figura 10 muestra el perfil de pH de los lixiviados producidos en los RHALE a través del tiempo. Puede observarse, que en los tratamientos R1 y R2 a los cuales se les agregó el EE presentan un descenso en el pH en los primeros 3 días, aumentando su valor entre 5.5 y 6 al final de la cinética. El pH de los lixiviados de los tratamientos R3 y R4 aumentan ligeramente en los 3 primeros días; posteriormente, existe un descenso importante después del día 6 permaneciendo constante hasta el final de la cinética. Algunos autores sugieren que el pH óptimo para mejorar la actividad de las bacterias en la hidrólisis y acidogénesis está comprendido entre 4 y 6.5 (Yu *et al.*, 2002) rango en el cual se encontraron todos los tratamientos.

La disminución en el pH en el caso de algunos reactores se puede deber a una mayor acumulación de AGV que se producen en la etapa acidogénica, ya que el  $\Delta G^\circ$  de las reacciones acidificantes es el más alto que todas las conversiones anaerobias en esta etapa. Por esa razón, los reactores anaerobios son susceptibles a la acidificación, es decir, a repentinas caídas de pH, cuando existen sobrecargas en los reactores o perturbaciones por compuestos tóxicos. Una vez que se ha consumido la alcalinidad por los ácidos producidos, el pH comienza a bajar, resultando en concentraciones más altas de AGV no disociados. Esto último, obviamente conduce a una acumulación más rápida de AGV y, subsecuentemente, a una caída de pH (Van Lier *et al.*, 2007).

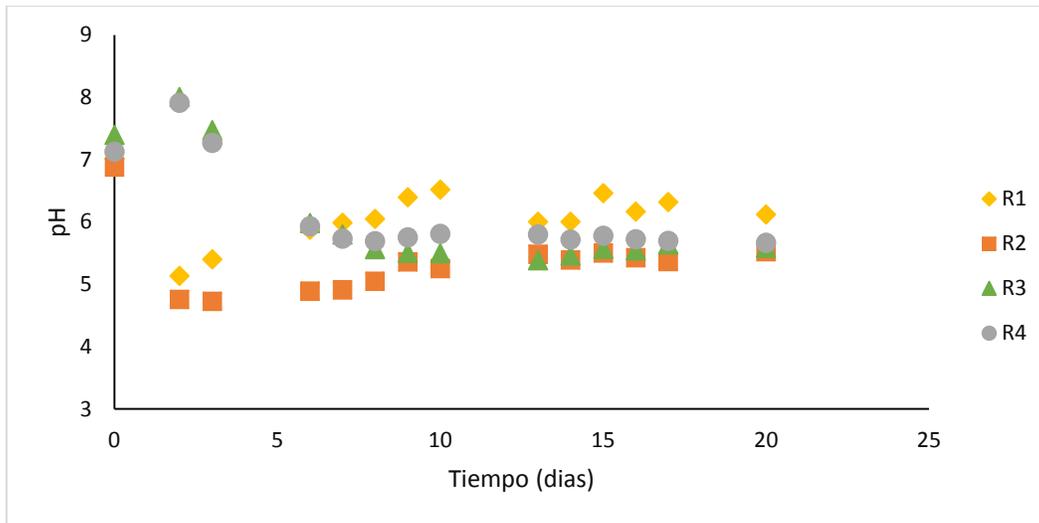


Figura 10. Perfil de pH en los lixiviados producidos en los RHALE, durante la fermentación de la fracción sólida de lirio acuático. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio.

La figura 11 muestra la evolución de la DQO soluble en los lixiviados de los distintos tratamientos.

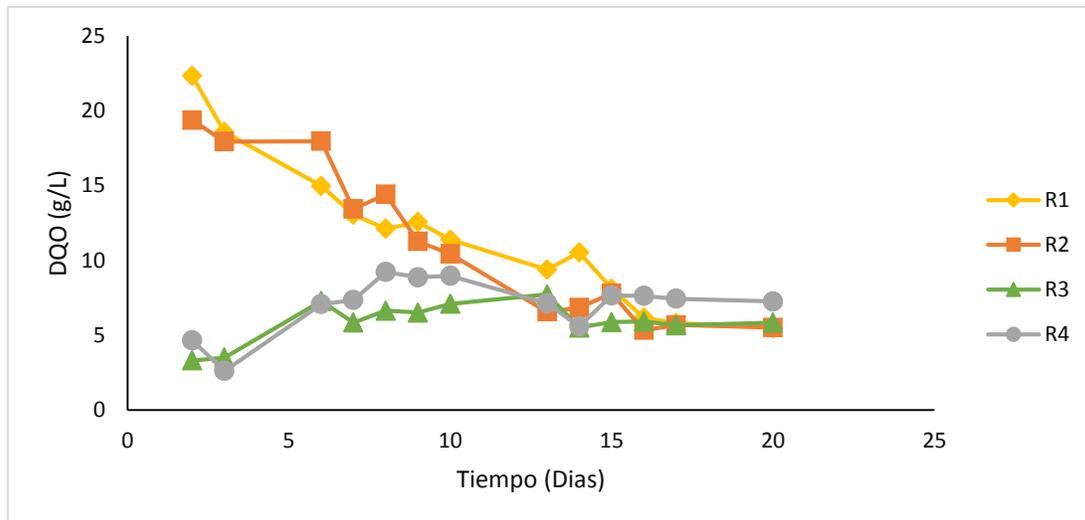


Figura 11. Evolución de la DQO soluble en los lixiviados de los RHALE. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio.

Se puede observar que a los 3 días de fermentación los reactores que contenían el extracto enzimático (R1 y R2), presentan la mayor concentración de DQO soluble (22.3 g/L y 19.4 g/L respectivamente); sin embargo, a partir de los 3 días se empieza a ver una disminución importante en la DQO que coincide con un aumento en el pH

que pudo haber favorecido la formación de otros compuestos como gases que no se cuantificaron ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ). Los reactores R3 y R4 muestran un aumento de la DQO soluble del día 2 al 8, disminuyendo al final de las cinéticas a valores similares a los obtenidos en los reactores R1 y R2 con una concentración final promedio de 5 g/L.

La disminución de la DQO en los reactores R1 y R2 se puede explicar, debido a que estos tratamientos contenían EE y se le realizó un pretratamiento a 50 °C durante 24 horas, esto para activar a las enzimas (recomendaciones del fabricante), este tratamiento previo, pudo aumentar la velocidad de hidrólisis de la fracción sólida del lirio obteniendo altas concentraciones de DQO soluble en los primeros días de cinética. La disminución de la DQO se debe a los productos de la fermentación, ya que pueden ser muy variados, entre ellos la formación de gases como el hidrógeno y  $\text{CO}_2$  que pudieron haber estado presentes principalmente en los primeros días de la fermentación, dado que el pH en los reactores R1 y R2 disminuyó considerablemente (Fig 10). En los procesos fermentativos existen diferentes destinos de los sustratos orgánicos hidrolizados, ya que los productos de la acidificación consisten en una variedad de compuestos orgánicos pequeños, principalmente AGV, es decir, acetato y ácidos orgánicos superiores como propionato y butirato, así como  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , ácido láctico, etanol y amonio (Gujer y Zehnder, 1983). Los compuestos neutros como los azúcares provenientes de la hidrólisis se convierten en AGV,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , siendo los productos principales de la reacción (Van Lier *et al.*, 2017). El tipo de productos finales dependerá de las condiciones en las que se encuentre el medio en el reactor, es decir, si el  $\text{H}_2$  no se remueve eficientemente por organismos consumidores de este gas, los productos finales pueden ser ácido propiónico y butírico y algunos otros compuestos aún más reducidos como lactato y alcoholes.

La producción de azúcares totales en los lixiviados se muestra en la figura 12. Se puede observar que la tendencia de los tratamientos es similar a la producción de DQO (figura 11) ya que a partir de los 3 días de fermentación los reactores R1 y R2 presentan una disminución considerable de los azúcares totales hasta su total consumo en el día 15. La producción de azúcares totales en los reactores R3 y R4

son muy bajas, indicando una menor hidrólisis en los polímeros presentes en la fracción sólida de lirio acuático.

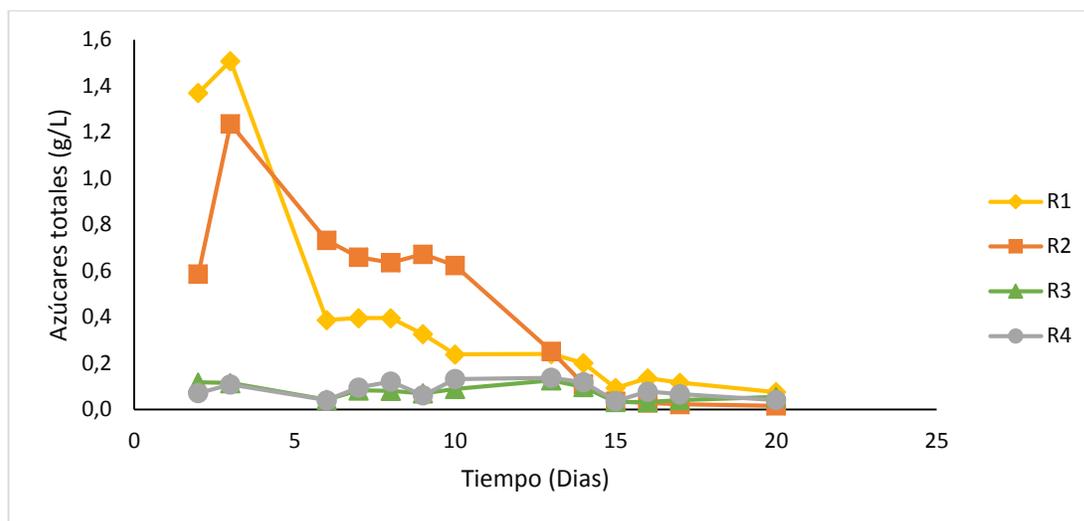


Figura 12. Producción de azúcares totales en los lixiviados a partir de la hidrólisis de la fracción sólida de lirio acuático bajo los distintos tratamientos. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio.

La disminución de los azúcares totales en los reactores R1 y R2 se puede explicar debido a la gran variedad de productos formados de las fermentaciones que pueden ocurrir en la etapa acidogénica (acetato y ácidos orgánicos superiores como propionato y butirato, así como H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ácido láctico, etanol y amonio) como lo mencionan Gujer y Zehnder, en 1983, estos productos son a partir de los azúcares provenientes de la hidrólisis de los sustratos complejos (celulosa, hemicelulosa y lignina) del lirio, que fueron rápidamente hidrolizados por la acción del complejo enzimático adicionado en estos reactores.

La figura 13 muestra la evolución de todos los AGV producidos en el lixiviado del reactor R1, siendo el ácido acético el AGV que se encuentra en mayor concentración, seguido de los ácidos butírico y propiónico. El ácido acético muestra una acumulación en el reactor a partir del día 3 y hasta el final de la cinética, debido probablemente a que las condiciones de pH no se vieron favorecidas para que este ácido se convirtiera en metano. Altas concentraciones de AGV pueden inhibir las fases acetogénica y metanogénica de la digestión anaerobia (Batstone *et al.*, 2003; Pind *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando la digestión anaerobia

se lleva a cabo en dos etapas y en distintos reactores (RHALE y UASB) estas altas concentraciones (sin sobrepasar las concentraciones de inhibición) son favorables para tener altos rendimientos de metano en una segunda etapa, especialmente si predomina el ácido acético, ya que es el precursor directo para la metanogénesis (Vavilin *et al.*, 2008). En 1995 Ahring *et al.*, mencionan que son necesarias concentraciones de ácido acético muy altas para que llegue a afectar la producción de metano, por encima de  $4000 \text{ mg L}^{-1}$  o más, y concluyen que concentraciones de ácidos grasos volátiles por debajo de  $3000 \text{ mg acético L}^{-1}$  no producen ninguna disminución de la producción de metano. El ácido propiónico puede acumularse debido a una acumulación de hidrógeno en el sistema, ya que una presión parcial de hidrógeno elevada inhibe severamente a las bacterias que degradan este ácido. Por lo tanto, el hidrógeno es también un compuesto intermedio importante del proceso anaeróbico que debe ser cuantificado ya que su acumulación en el medio provoca la inhibición de la acetogénesis y, consecuentemente, la acumulación de ácidos grasos volátiles con más de dos átomos de carbono. En la figura se puede observar que cuando el ácido acético se acumula se empiezan a acumular también los otros AGV. Los AGV de los otros reactores dieron como resultado una menor concentración en los lixiviados, concluyendo que al agregar el extracto enzimático se favoreció la hidrólisis de los polímeros del lirio y también la formación de AGV en las fermentaciones de los azúcares, predominando el acetato que es el principal precursor en la producción de metano.

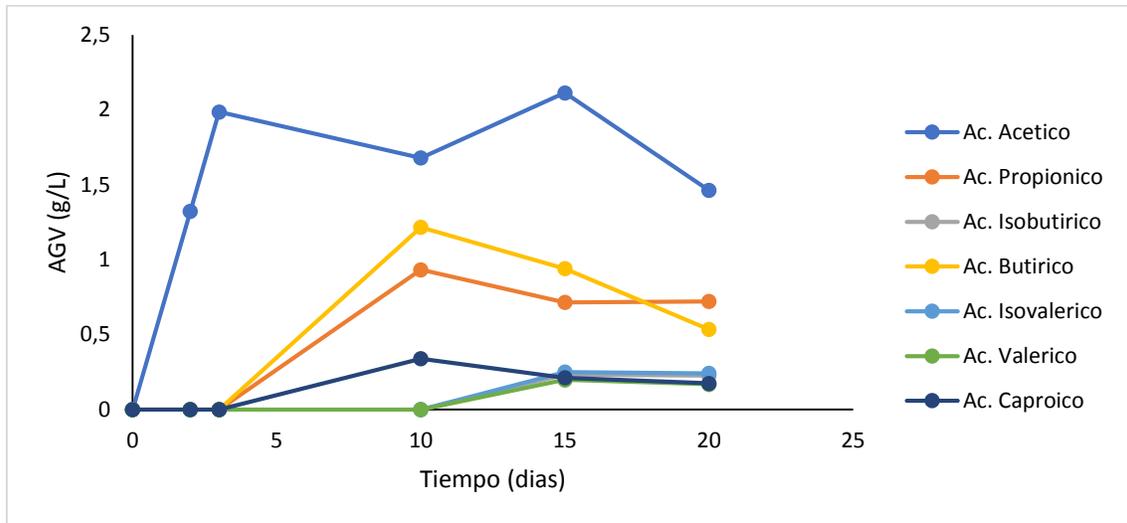


Figura 13. Concentración de los AGV en el reactor R1.

La figura 14 muestra el volumen acumulado de los lixiviados producidos en cada uno de los reactores. Presentándose una tendencia similar en todos los tratamientos y esto era de esperarse, ya que a cada uno de los reactores se les adicionó el mismo volumen de escurrimiento (0.1L/Lrd), recuperando el 92 %  $\pm$  1.2 del volumen total agregado.

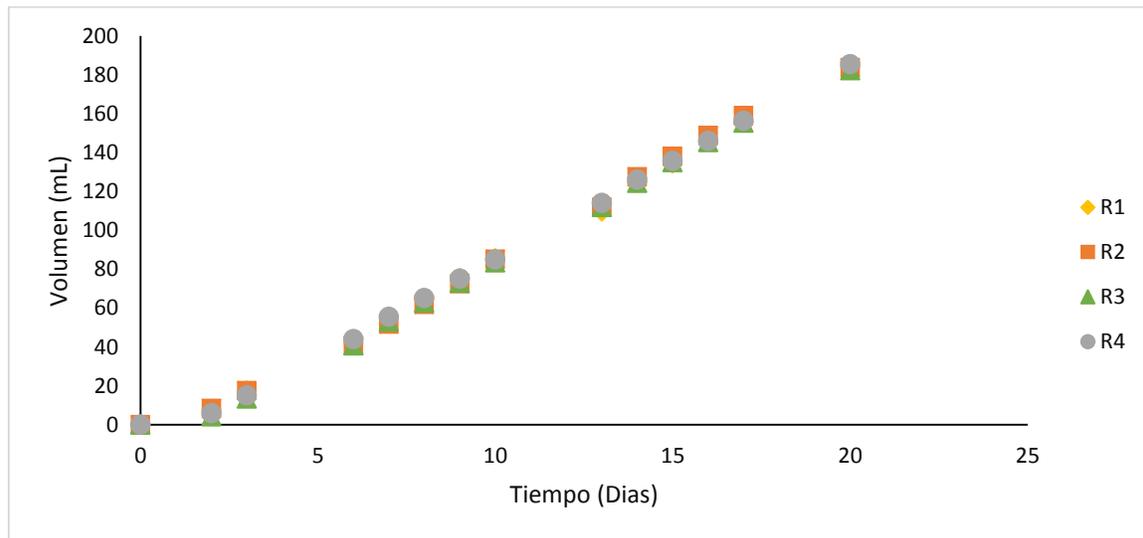


Figura 14. Volumen acumulado de lixiviados producidos en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio bajo los distintos tratamientos. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio.

Al calcular la DQO acumulada con base al volumen de lixiviado producido, se obtiene la figura 15. Se observa que los reactores R1 y R2, presentan la mayor cantidad de DQO acumulada, con velocidades de producción similares (0.13 y 0.14 gDQO.d), respectivamente. Al realizar el análisis estadístico no hubo diferencia significativa entre estos tratamientos, pero si con los resultados de los reactores R3 y R4 que mostraron velocidades de 0.06 y 0.07 gDQO.d<sup>-1</sup>, respectivamente.

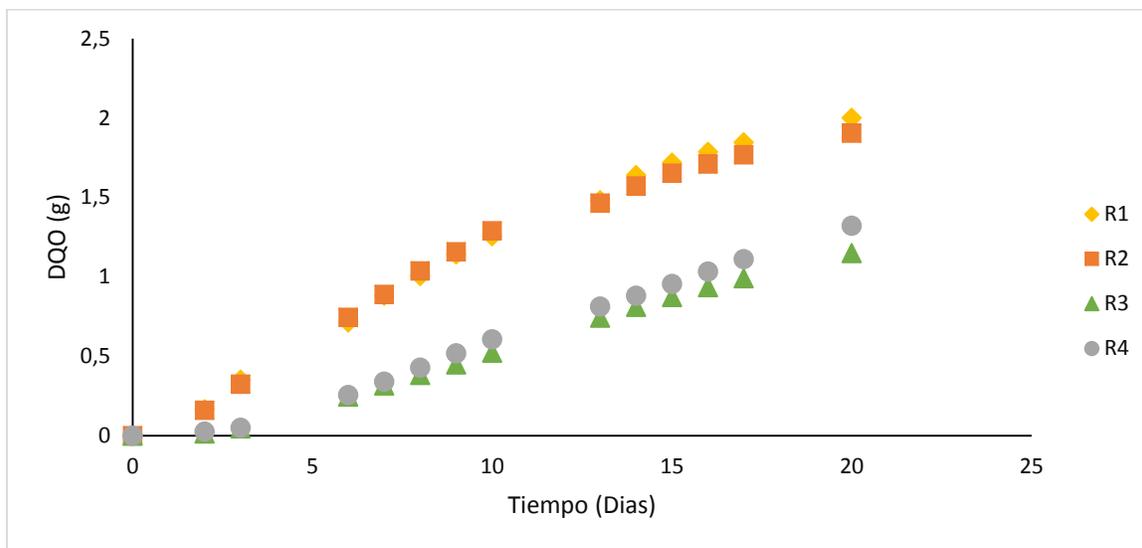


Figura 15. Producción acumulada de DQO en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio.

Graficando los azúcares totales acumulados con base al volumen de lixiviado producido, se obtiene la figura 16. Se observa que las mayores velocidades de producción fueron similares para los reactores R1 y R2 (0.06 gAzúcares.d). Realizando el análisis estadístico no hubo diferencia significativa entre estos tratamientos, pero si entre los reactores R3 y R4 que presentaron velocidades de producción de 0.012 y 0.014 gAzúcares.d, respectivamente, mostrando una mayor hidrólisis de los compuestos lignocelulósicos del lirio al agregar el extracto enzimático.

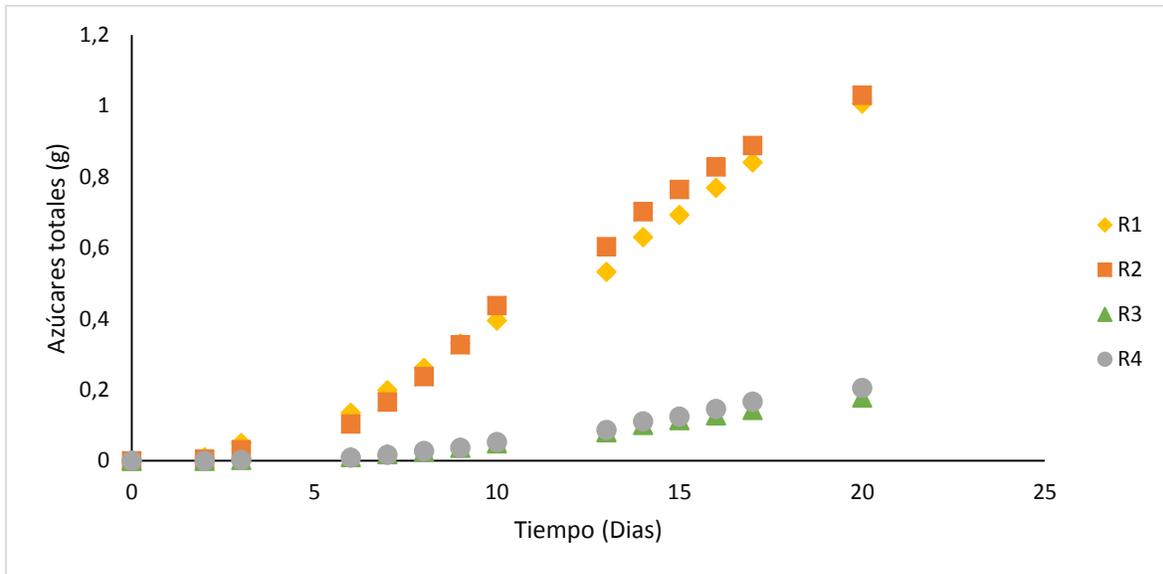


Figura 16. Producción acumulada de azúcares totales en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático bajo los distintos tratamientos. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio

La figura 17 muestra la DQO solubilizada (%) en los lixiviados para cada uno de los tratamientos. Se observa que los tratamientos R1 y R2 presentan las eficiencias más altas (20 y 21 %), respectivamente en comparación a los reactores R3 y R4 que fueron de 14 y 16%, confirmado que el extracto enzimático favoreció la acumulación de DQO soluble en los lixiviados.

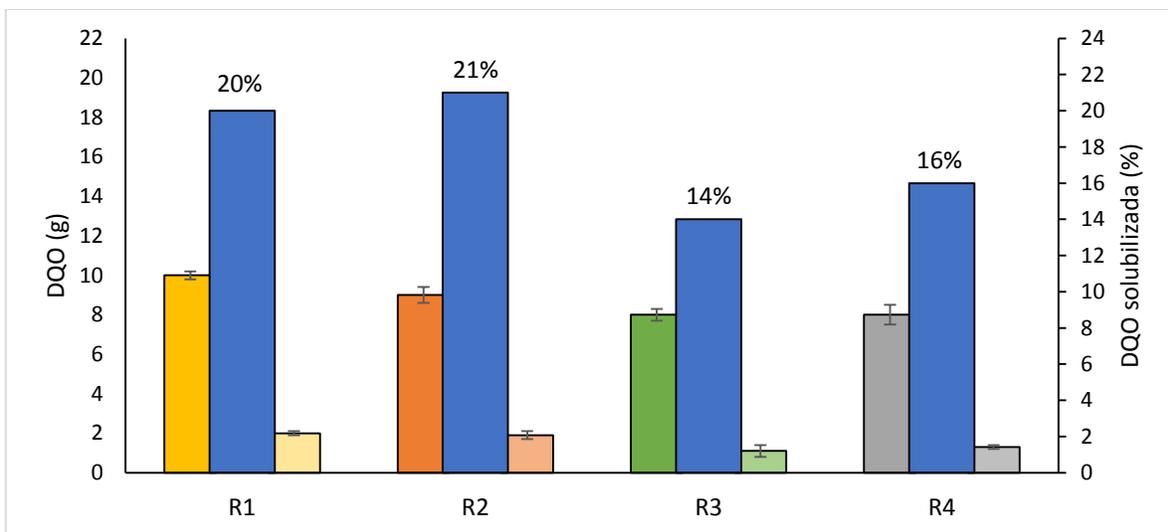


Figura 17. DQO solubilizada en los lixiviados de los RHALE. R1= Lirio+ Lodos+ Extracto Enzimático, R2= Lirio+ Extracto Enzimático, R3= Lirio+Lodos y R4= Lirio.

Con el reactor R3 el cual contenía extracto enzimático, lodos anaerobios y lirio fresco, se obtuvo la mayor reducción de sólidos volátiles (37%), una velocidad de producción de DQO de  $0.13 \text{ gDQO}\cdot\text{d}^{-1}$  y un 20% de DQO solubilizada en los lixiviados, esta se encuentra representada entre un 80 y 85% de los AGV, predominando el ácido acético el cual es el precursor directo para la producción de metano, la implementación del extracto enzimático beneficio la conversión de compuestos de alto peso molecular (lignocelulósicos) a compuestos solubles, se redujo el tiempo de cinética a 20 días, respecto a otros estudios en el 2017 y 2019 que fueron entre 30 y 50 días, obteniendo resultados cercanos o mejores en la reducción de SV.

#### **3.4. Efecto de los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida del lirio acuático.**

En este estudio se monitoreó la fermentación en estado sólido por medio de un metabolímetro como se describió en el capítulo 2, sección 9.2.

##### **3.4.1. Respuesta de la fermentación en medio sólido de los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum*, analizado por respirometría.**

El sistema de fermentación en medio sólido (FMS) fue monitoreado mediante un metabolímetro. Con la finalidad de conocer el tiempo de máxima producción de  $\text{CO}_2$  se realizaron cultivos con tiempos de incubación de 150 horas. Debido a que la presencia del lirio acuático en este tipo de fermentación dificulta la estimulación de la biomasa, el crecimiento se determinó indirectamente a través de la producción de  $\text{CO}_2$ . Como lo menciona Critter *et al.*, (2004), la medición de la respiración permite estudiar la actividad microbiana, donde el consumo de  $\text{O}_2$  y la producción de  $\text{CO}_2$  depende de factores como biomasa microbiana, temperatura, pH, entre otros.

La figura 18 muestra los perfiles de las tasas de producción de  $\text{CO}_2$  y de la máxima producción de  $\text{CO}_2$ , durante la fermentación en medio sólido de los hongos sobre bagazo de lirio acuático no esteril, monitoreada en el metabolímetro. En los 3 tratamientos se obtuvieron valores de producción de  $\text{CO}_2$  por arriba de  $160 \text{ mg/gMSI}$ , valores más altos a los reportados por López *et al.*, (2014) que fueron  $70 - 100 \text{ mg}$

CO<sub>2</sub>/g<sub>MSI</sub>, estos autores variaron la temperatura, pH, actividad de agua y humedad obteniendo la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> a las 23 horas con *T. harzianum* utilizando aserrín como soporte para la FMS. Durante este estudio se observó que todos los tratamientos tuvieron una tendencia similar respecto a la tasa de CO<sub>2</sub>, sin embargo, en todos ellos, se observaron diferentes fases que hacen referencia a los procesos de asimilación y degradación de los compuestos, debido probablemente a que el soporte (fracción sólida de lirio) no fue esterilizado como lo hacen otros autores, motivo por el cual se pudo tener perfiles de respiración de los diferentes microorganismos nativos que contiene el lirio, que pudieron haber competido con los hongos por el sustrato, por lo que, desde el inicio de la fermentación se observa una producción de CO<sub>2</sub> importante en todos los tratamientos a diferencia de una cinética normal (curva de crecimiento normal).

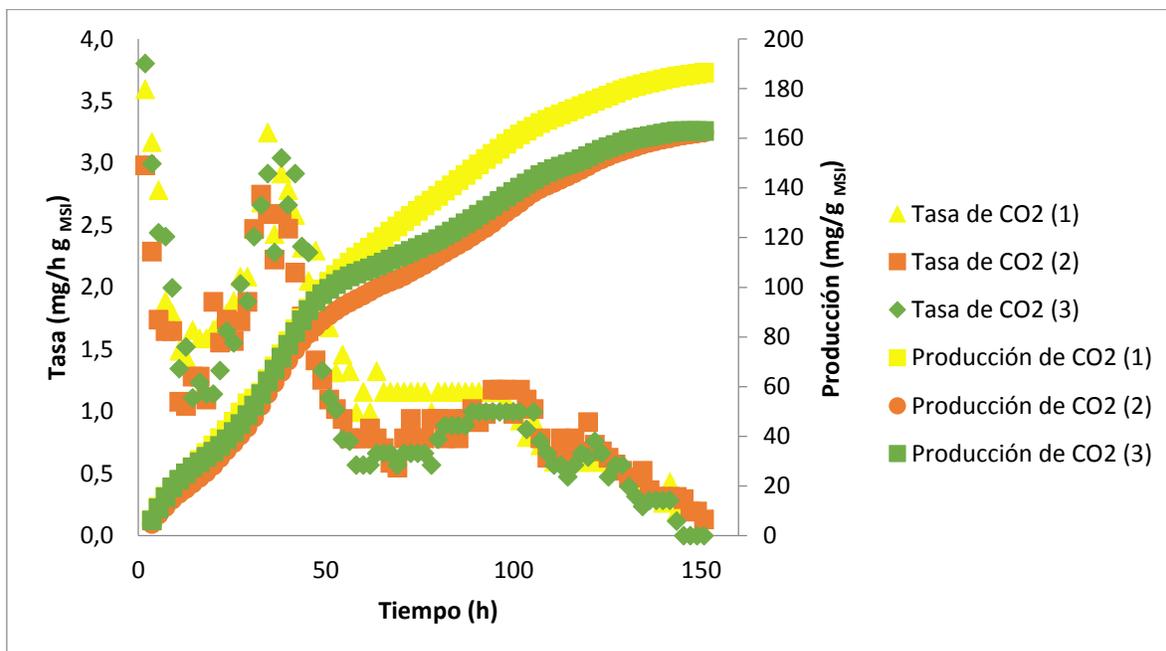


Figura 18. Efecto del pretratamiento fúngico en la tasa de CO<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> en los diferentes tratamientos. 1= *Trichoderma* + Lirio, 2= *Aspergillus* + Lirio y 3= Lirio (control).

El crecimiento de *T. harzianum* probablemente se llevó a cabo entre las 10 y las 50 horas de cinética como lo reportan López *et al.*, (2014). No se observó una fase de adaptación al inicio de la cinética, este comportamiento también se puede deber a que, desde la recolección de lirio hasta el empacado en las columnas, el bagazo de

lirio no fue esterilizado, por lo que no hubo control sobre las condiciones iniciales. Por otra parte, se puede observar una fase exponencial entre las 15 y 35 horas en todos los tratamientos, donde se vio incrementado el consumo de O<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> que puede ser atribuida a la hidrólisis enzimática llevada a cabo por la acción de los hongos; y posteriormente una fase de declive entre las 40 y 70 horas, debida a la poca actividad de los microorganismos por la baja disponibilidad de los nutrientes y condiciones adversas para su crecimiento. Se observa una menor fase exponencial entre las 75 y 100 horas de cinética, debido probablemente a la presencia de otros microorganismos por las condiciones en que se hicieron las cinéticas como ya se explicó antes. Critter *et al*, (2004), mencionan que la medición de la respiración permite estudiar la actividad microbiana, donde el consumo de O<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> depende de factores como biomasa microbiana, temperatura, pH, entre otros.

La figura 19 muestra que la mayor producción de CO<sub>2</sub>, se obtuvo con la cepa de *Trichoderma harzianum*, presentando diferencia significativa entre los demás tratamientos.

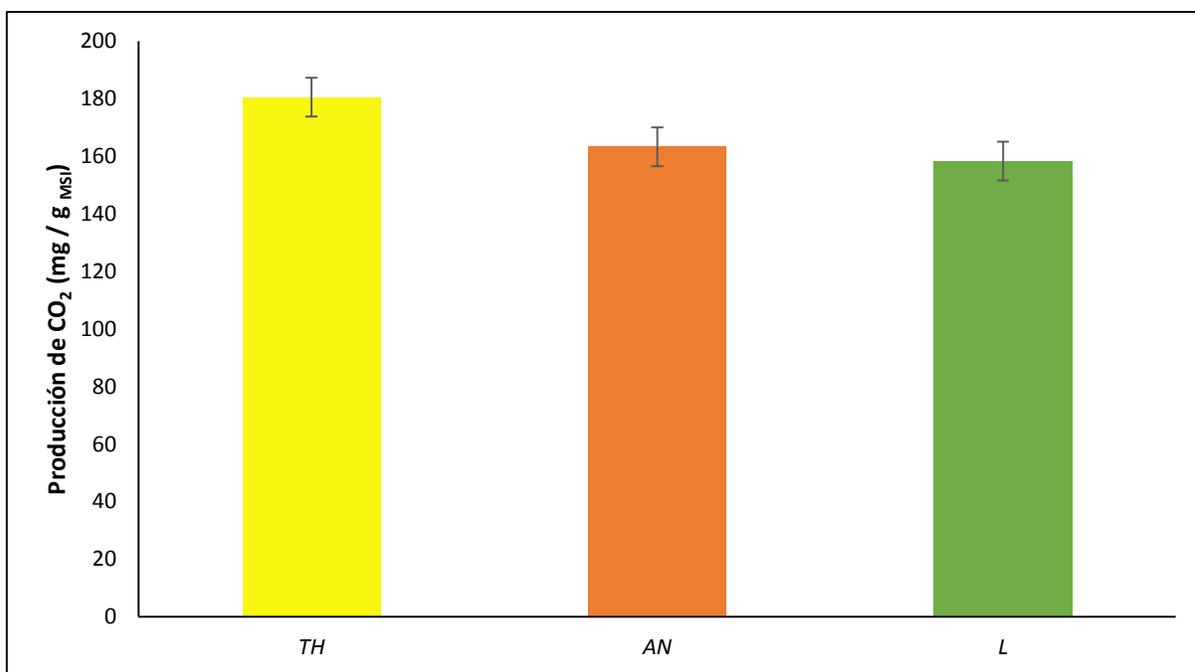


Figura 19. Producción máxima de CO<sub>2</sub> en los distintos tratamientos. TH = tratamiento con *Trichoderma harzianum*, AN = tratamiento con *Aspergillus niger* y L = tratamiento control con fracción sólida de lirio.

### 3.4.2. Hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático en reactores RHALE: efecto de los pretratamientos fúngicos.

La Tabla 11 muestra los resultados de las variables analizadas en los distintos tratamientos en los RHALE al inicio y final de las cinéticas. Los reactores fueron empacados con 100 g de masa con un contenido de humedad entre 81 y 82%, como fue descrito en el capítulo 2, sección 9.3. Se puede observar que en todos los tratamientos presentan una disminución en el pH al final de las cinéticas. La disminución en el pH puede ser debido a la acumulación de compuestos solubles provenientes de la fermentación, principalmente los ácidos grasos volátiles producidos de la hidrólisis y acidogénesis de los biopolímeros presentes en el lirio. Este mismo comportamiento ha sido reportado por Rodríguez *et al.*, (2015), Ramírez, (2017) y Hernández, (2019) que utilizaron la fracción sólida de residuos urbanos (FORSU) y la fracción sólida de lirio acuático para llevar a cabo la hidrólisis y acidogénesis, en este mismo tipo de reactores.

Tabla 11. Variables respuesta de la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático al inicio y después de 20 días de fermentación.

Tratamiento	Días	pH	DQO (g)	ST (g <sub>ST</sub> /kg <sub>Bagazo</sub> )	SV (g <sub>SV</sub> /kg <sub>Bagazo</sub> )	η SV (%)
R1	0	6.79 ± 0.07	39 ± 2	185 ± 5	162 ± 5	28 ± 4
	20	5.97 ± 0.18	25 ± 3	134 ± 9	117 ± 9	
R2	0	6.83 ± 0.02	46 ± 5	185 ± 3	163 ± 2	28 ± 1
	20	5.2 ± 0.09	27 ± 0.5	131 ± 1	117 ± 0.5	
R3	0	6.74 ± 0.001	43 ± 3	181 ± 2	158 ± 2	21 ± 6
	20	6.19 ± 0.3	28 ± 2	142 ± 9	125 ± 9	

R1= Lirio+Lodos+Masa de *Trichoderma*, R2= Lirio+Lodos + Masa de *Aspergillus*, R3= Lirio+Lodos+Masa de Lirio después de FMS.

Se observa que la DQO disminuye al final de las cinéticas en todos los tratamientos, las reducciones de DQO en los tratamientos fueron para el R1 de 36%, para el R2 de 42% y para el R3 de 34%. Las eficiencias de reducción de los sólidos volátiles fueron del 28 % para los reactores R1 y R2 los cuales no tuvieron diferencia significativa entre ellos, pero si hubo diferencia significativa con el reactor control (R3), siendo 1.3 veces mayor la reducción del R1 y R2 con respecto al control.

### 3.4.3. Comportamiento y producción de los compuestos solubles en los lixiviados de los RHALE.

La figura 20 muestra el perfil de pH de los lixiviados producidos en los RHALE a través del tiempo. El pH de la masa inicial empacada en los RHALE fue de 6.7 en promedio para todos los tratamientos. Los lixiviados se empezaron a producir a partir del día 4 y puede observarse, que en todos los tratamientos el pH disminuye alcanzando valores cercanos a 5 a partir del día 6 y permanecen constantes hasta el final de la fermentación. Estos valores de pH son similares a los reportados por Ramírez, (2017) y Hernández, (2019) quienes trabajaron con la fracción sólida de lirio en este mismo tipo de reactores.

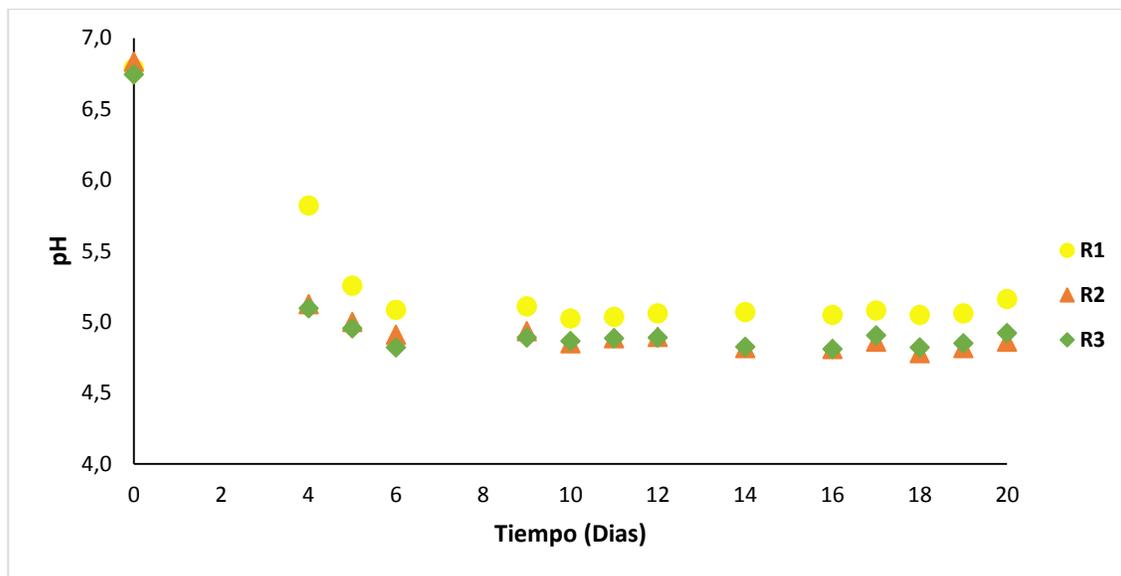


Figura 20. Perfil de pH en los lixiviados producidos en los RHALE, durante la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático bajo los distintos tratamientos. R1= Lirio+Lodos+Masa *Trichoderma*, R2= Lirio+Lodos + Masa *Aspergillus*, R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS.

La disminución en el pH se debe principalmente a una acumulación de AGV que se producen en la etapa acidogénica, ya que el  $\Delta G^\circ$  de las reacciones acidificantes es el más alto de todas las conversiones anaerobias en esta etapa. Por esa razón, los reactores anaerobios son susceptibles a la acidificación, es decir, a repentinas caídas de pH. Una vez que se ha consumido la alcalinidad por los ácidos producidos, el pH comienza a bajar, resultando en concentraciones más altas de

AGV no disociados, (van Lier *et al.*, 2007). Algunos autores sugieren que el pH óptimo para mejorar la actividad enzimática en la hidrólisis de los polímeros de alto peso molecular se encuentra entre 4 y 6.5 (Yu *et al.*, 2002) rango en el cual se encontraron todos los tratamientos.

La evolución de la DQO en los lixiviados de los distintos tratamientos se muestra en la figura 21. Se observa, que a partir del día 5 se alcanza la mayor concentración de DQO soluble en los lixiviados y permanece constante hasta el día 12 de fermentación, presentando la mayor concentración promedio de 30 g/L en el reactor R2, que contenía la masa de *A. niger*. En el caso de los reactores R1 y R3 no hubo diferencia entre estos dos tratamientos, ya que la fracción sólida de lirio no fue esterilizada cuando se realizó la fermentación en medio sólido por lo que probablemente la producción de DQO en estos reactores se debió solo a los microorganismos nativos del lirio y a los lodos anaerobios, en la figura 18 se observó este comportamiento. A partir del día 12 se observa que la DQO soluble en todos los reactores comienza a disminuir, debido probablemente a la formación de compuestos gaseosos como el H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> que se formaron en la acumulación de algunos productos de las fermentaciones, ya que existen diferentes destinos de los sustratos orgánicos en la hidrólisis y acidogénesis anaerobia y los productos formados consisten en una variedad de compuestos orgánicos pequeños, principalmente AGV, es decir, acetato y ácidos orgánicos superiores como propionato y butirato, así como H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ácido láctico, y algunos alcoholes (Van Lier *et al.*, 2007

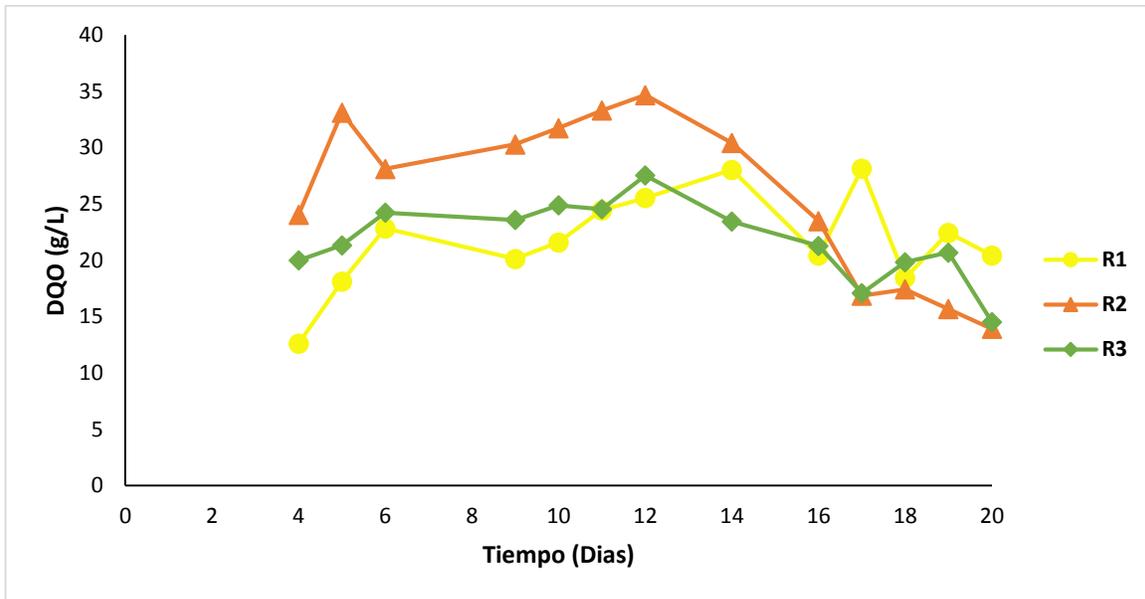


Figura 21. Evolución de la concentración de DQO soluble en los lixiviados de los RHALE. R1= Lirio+Lodos+Masa *Trichoderma*, R2= Lirio+Lodos + Masa *Aspergillus*, R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS.

Los azúcares totales en los lixiviados de los RHALE fueron cuantificados y tuvieron un comportamiento similar a la DQO soluble (figura 21), teniendo la máxima concentración con el tratamiento R2 la cual fue de 1 g/L a los 10 días de cinética, seguida del R3 (0.8 g/L) y R1 (0.4 g/L) después del día 10 los azúcares disminuyeron hasta el final de la cinética en todos los tratamientos. Para todos los casos las velocidades de producción de azúcares fueron muy bajas (para el R1 fue de 0.003 gAzúcares.d<sup>-1</sup>, R2 de 0.008 gAzúcares.d<sup>-1</sup> y R3 de 0.006 gAzúcares.d<sup>-1</sup>).

La figura 22 muestra la evolución de los AGV totales producidos en los lixiviados de los RHALE, donde se observa que la mayor concentración de AGV se obtuvo en el R2 (*Aspergillus niger*) a los 9 días de cinética, la cual fue de 28 g/L, respecto a los tratamientos R1 y R3, que fueron 13 y 20 g/L respectivamente, siendo los ácidos acético (25 g/L) y butírico (15 g/L) los AGV que se encontraron en mayor concentración, seguido del ácido propiónico (11 g/L), valérico (3 g/L) y caproico (2 g/L), los cuales se encontraron en una proporción del 45%, 28%, 19%, 4% y 3% respectivamente en el reactor R2.

La presencia de los ácidos como el propiónico, butírico, valérico y caproico puede ser debido a una acumulación de hidrógeno en el sistema, ya que una presión parcial de hidrógeno alta (mayor a  $10^{-4}$  atm), inhibe severamente a las bacterias que degradan este ácido (Hassan & Nelson, 2012). La presión de hidrógeno desempeña un papel importante en el control de procesos de fermentación anaeróbica. El ácido propiónico es convertido a ácido acético solamente si la presión de parcial de hidrogeno es menor de  $10^{-4}$  atm (Hassan & Nelson, 2012). Por lo tanto, el hidrógeno es también un intermediario importante del proceso anaeróbico que debe ser cuantificado ya que su acumulación en el medio provoca la inhibición de la acetogénesis y, consecuentemente, la acumulación de ácidos grasos volátiles con más de dos átomos de carbono. En este estudio el  $H_2$  no pudo ser cuantificado debido a que los reactores no estuvieron completamente cerrados.

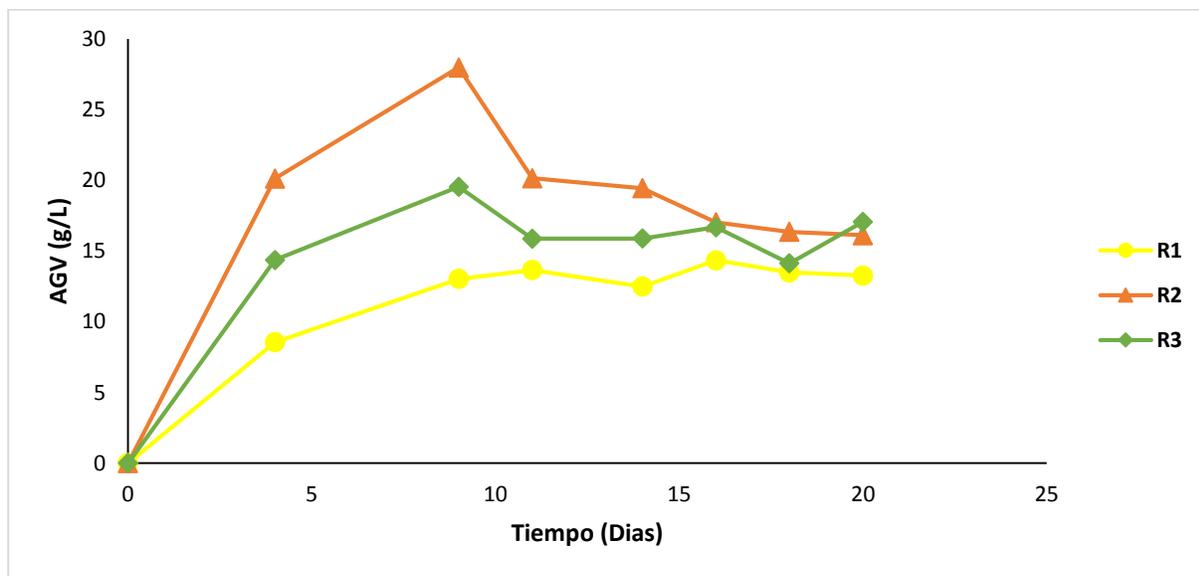


Figura 22. Concentración de los AGV totales en los RHALE. R1= Lirio+Lodos+Masa *Trichoderma*, R2= Lirio+Lodos + Masa *Aspergillus*, R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS.

Altas concentraciones de AGV pueden inhibir la digestión anaerobia (Batstone *et al.*, 2003; Pind *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando la digestión anaerobia se separa en dos etapas y en distintos reactores, esas altas concentraciones de AGV que son hidrolizados y fermentados en el RHALE son escurridos del lecho de tal forma que ya no resultan inhibitorios para la hidrólisis y acidogénesis. Los AGV son formados durante la acidogénesis - acetogénesis,

constituyendo mezclas de ácidos de cadenas hidrocarbonadas de 2, 3, 4 átomos de carbono y sus isómeros.

Son los ácidos propiónico y valérico los primeros que afectan el proceso, mientras que el butírico y el acético han de acumularse por encima de 100 mM para afectar la tasa de producción de metano. La acumulación de ácido propiónico juega un papel muy importante durante la degradación ya que tiene un efecto de inhibición en las poblaciones metanogénicas a concentraciones mayores de 1000 mg L<sup>-1</sup> (Juanga, 2005). Hanaki *et al.*, (1994), demostraron que el ácido propiónico es el más tóxico de los AGV. Sin embargo, si los lixiviados con altas concentraciones de AGV, son separados del RHALE, se pueden diluir con agua residual para ser alimentados a un reactor metanogénico con concentraciones que no resulten inhibitorias, considerando que el acético es el precursor directo para esta última etapa de la DA. Si se relaciona la información de las figuras con las concentraciones de la DQO y los AGV del tratamiento R2, el cual presentó los mejores resultados se obtiene la figura 23 y se puede ver que los AGV representan el 80 % de la concentración de la DQO soluble recuperada en el lixiviado, mientras que los azúcares residuales solamente representaron el 2%, el porcentaje restante (18%), pudo estar representado por otros compuestos orgánicos que no fueron cuantificados como el ácido láctico y etanol, entre otros proveniente de otro tipo de fermentación de los azúcares.

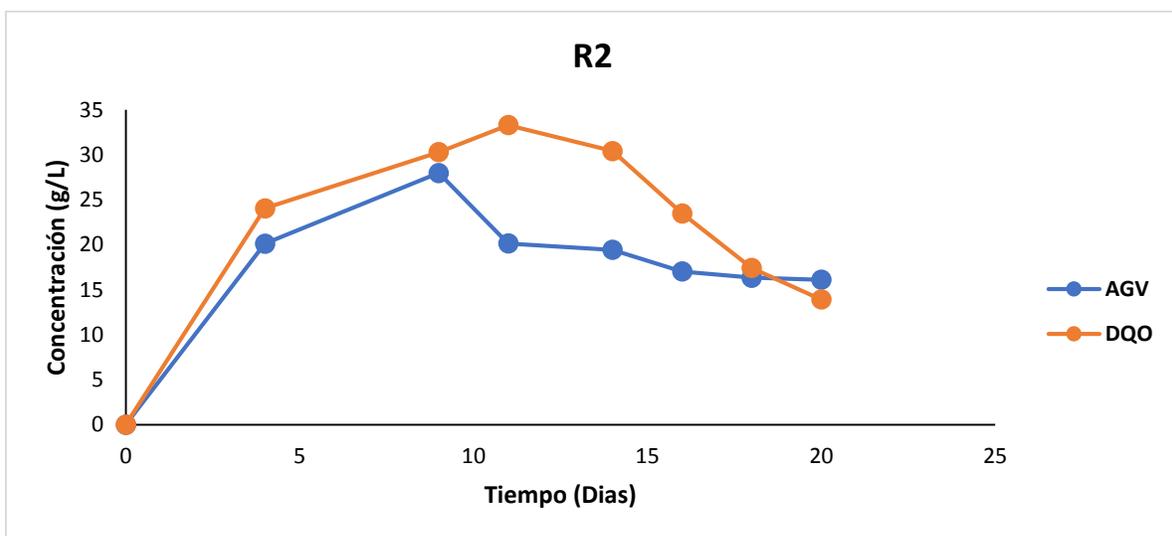


Figura 23. Relación de la concentración de DQO y AGV producidos en el lixiviado del RHALE con la masa de *Aspergillus niger*.

La figura 24 muestra el volumen recuperado y acumulado de los lixiviados producidos en cada uno de los reactores. Presentándose una tendencia similar en todos los tratamientos y esto era de esperarse, ya que a cada uno de los reactores se les adicionó el mismo volumen de escurrimiento (0.1L/Lrd), recuperando el 87 %  $\pm$  2 del volumen total agregado. Este valor recuperado es mayor que los volúmenes reportados por otros autores, donde se utilizan como sustrato la FORSU (Rodríguez *et al.*, 2015) y esto es debido a que el bagazo de lirio acuático se puede utilizar como agente texturizante ya que es un material muy poroso y se puede ver como una especie de esponja, lo que facilita el escurrimiento del lecho.

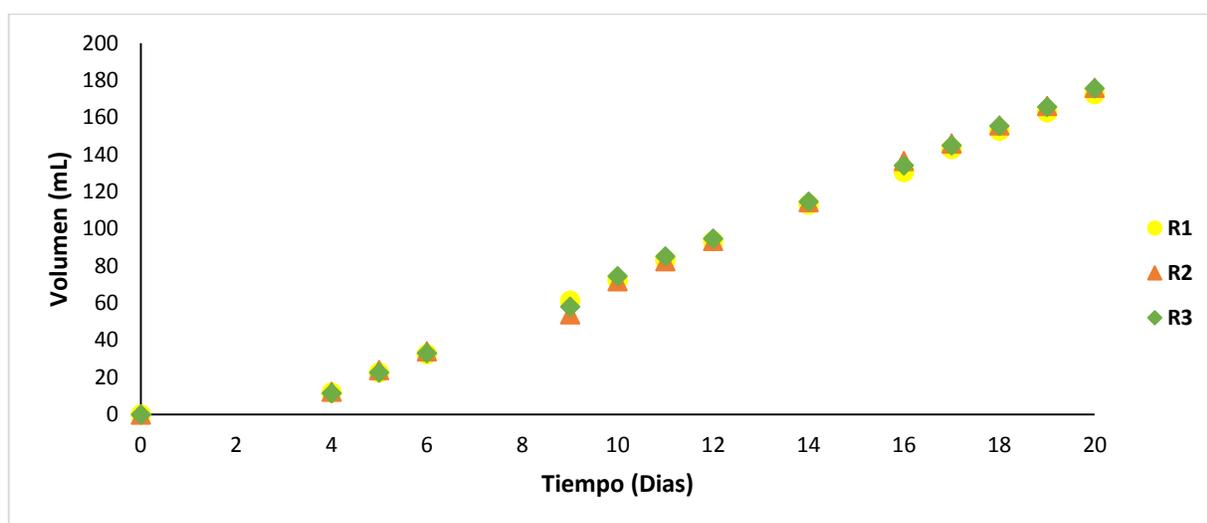


Figura 24. Volumen acumulado de lixiviados producidos en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio bajo los distintos tratamientos. R1= Lirio+Lodos+Masa *Trichoderma*, R2= Lirio+Lodos + Masa *Aspergillus*, R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS.

Si se calcula la DQO acumulada con base al volumen de lixiviado producido, se obtiene la figura 25. Se observa que el reactor R2 presenta la mayor cantidad de DQO acumulada, con una velocidad de hidrólisis de 0.27 gDQO.d<sup>-1</sup>. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos.

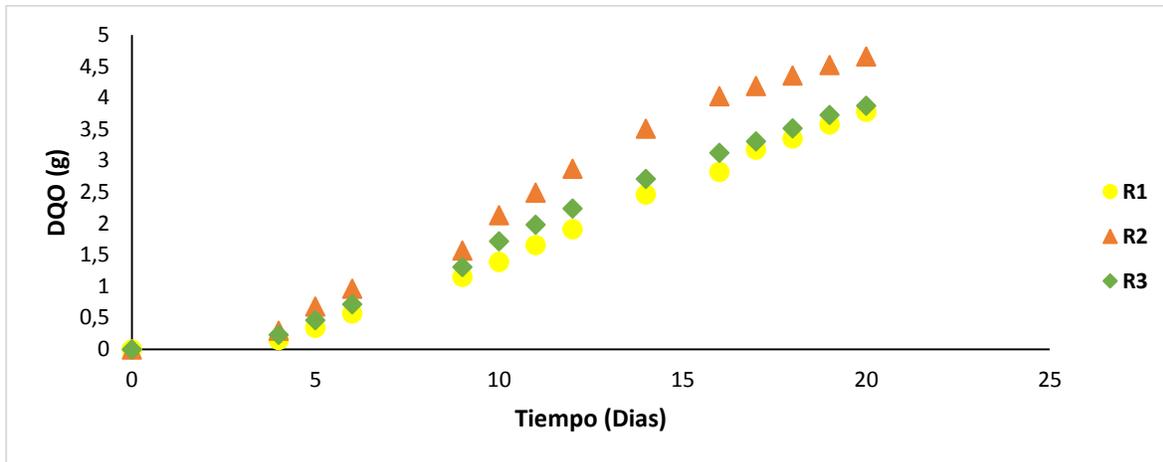


Figura 25. Producción acumulada de DQO en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio. R1= Lirio+Lodos+Masa *Trichoderma*, R2= Lirio+Lodos + Masa *Aspergillus*, R3= Lirio+Lodos+Masa Lirio después de FMS.

### 3.5. Determinación de las actividades enzimáticas de los hongos *Aspergillus* y *Trichoderma* y efecto de *Trichoderma harzianum* sobre la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático.

#### 3.5.1. Actividades enzimáticas de *A. niger* y *T. harzianum*

La figura 26, muestra las actividades enzimáticas de las dos cepas fúngicas a los 7 días de fermentación en la fracción sólida de lirio, como se describe en el capítulo 2, sección 10.1. Se observa que con *Trichoderma harzianum* se obtuvieron 71 U/g<sub>MS</sub> de xilanasas y 9 U/g<sub>MS</sub> de celulasas, valores más altos que los obtenidos con *Aspergillus niger* (28 U/g<sub>MS</sub> y 5 U/g<sub>MS</sub>) de xilanasas y celulasas respectivamente.

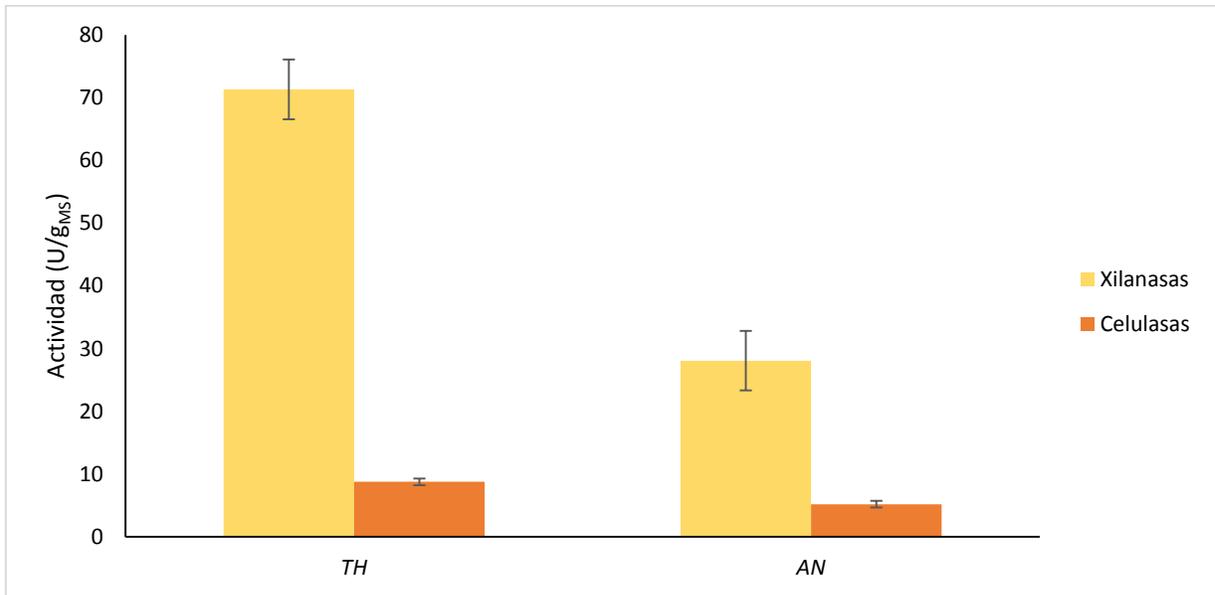


Figura 26. Actividades de xilanasas y celulasas con *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* a 7 días de incubación. TH = *Trichoderma harzianum*, AN = *Aspergillus niger*.

Debido a que *T. harzianum* presentó las mayores actividades, se llevaron a cabo dos fermentaciones más, disminuyendo el tiempo de la fermentación a 5 días (figura 27), esto, ya que otros autores han reportado que las actividades son mayores en menos tiempo de fermentación (Ali & El-Dein (2008); Saha et al., 2012). Se puede ver que a los 5 días las actividades enzimáticas tanto de xilanasas como de celulasas fueron mayores (164 – 177 U/g<sub>MS</sub> y 33 – 45 U/g<sub>MS</sub> que a los 7 días de fermentación con *T. harzianum*.

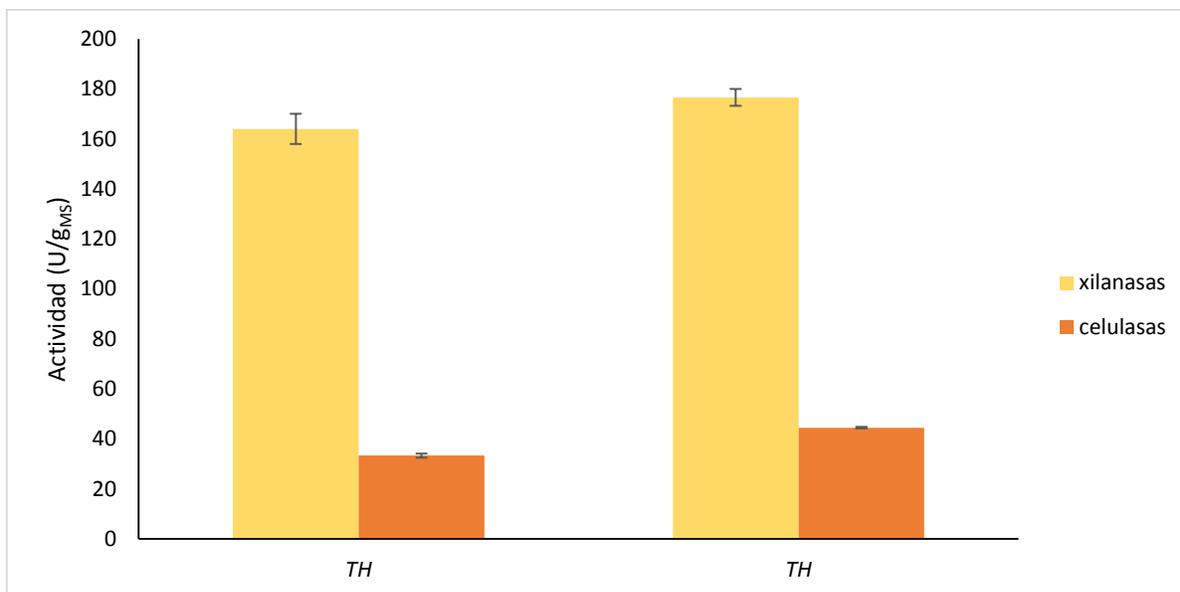


Figura 27. Actividades de xilanasas y celulasas con *Trichoderma harzianum* a 5 días de incubación. TH= *Trichoderma harzianum*

La tabla 12 compara las actividades obtenidas en este estudio con otros autores, indicando el tipo de enzima, así como los días de fermentación, los tratamientos realizados y las actividades tanto en U/g<sub>MS</sub> como en U/mL.

Tabla 12. Comparación de Actividades de xilanasas y celulasas en U/g<sub>MS</sub> y U/mL.

Enzima	Autor	Días	Microorganismo	U/g <sub>MS</sub>	U/mL
XILANASAS	En este estudio	7	<i>Aspergillus niger</i>	28	6
		5	<i>Trichoderma harzianum</i>	177	30
	Deshpande 2008	9	<i>Trichoderma reesei</i> y <i>Aspergillus niger</i>	169	-
	Manivannan 2014	5	<i>Trichoderma reesei</i>	-	21
CELULASAS	En este estudio	7	<i>Aspergillus niger</i>	5	1.2
		5	<i>Trichoderma harzianum</i>	45	7.6
	Zhao 2011	7	<i>Trichoderma reesei</i>	13	-
	Amriani 2016	7	<i>Aspergillus niger</i>	-	1
	Pothiraj 2016	6	<i>Trichoderma viride</i>		68.3
		6	<i>Aspergillus niger</i>		46.3

Manivannan y Narendhirakannan (2014), evaluaron la producción de xilanasas con una cepa de *Trichoderma reesei* NRRL – 3652 obteniendo a los 5 días de fermentación 21.47 UI/mL con lirio acuático seco, pretratado con ácido sulfúrico y empapado con nutriente. Deshpande (2008) evaluaron la producción de xilanasas con un cultivo mixto de *Trichoderma reesei* QM 9414 mutante (*T. reesei* METRO) y *Aspergillus niger*, obteniendo 168,73 UI/g<sub>MS</sub> a los 9 días de fermentación, bajo condiciones similares al experimento anterior.

En el caso de la producción de celulasas Tovar y colaboradores en el 2017 evaluaron un extracto celulolítico a partir de *Pleurotus ostreatus* empleando como sustrato lirio acuático seco y obtuvieron la mayor producción de celulasas a las 24 horas de cultivo las cuales fueron de 12.83 U/g<sub>MS</sub> para hoja y 9.92 U/g<sub>MS</sub> para bulbo. En el 2011 Zhao *et al.* Obtuvieron altos rendimientos en la producción de celulasa en FMS con *Trichoderma reesei* SEMCC-3.217 utilizando lirio acuático seco, revelaron que la adición de salvado de trigo, CaCl<sub>2</sub>, tween 80 y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tuvo un efecto significativo en la producción de celulasas. La optimización mejoró la producción en cuatro veces (13.4 UI/g<sub>MS</sub>) en comparación a su producción inicial (3.4 UI/g<sub>MS</sub>), después de 7 días de fermentación.

Amriani *et al.*, (2016) utilizaron lirio seco como sustrato para la producción de celulasas y *Aspergillus niger*, obtuvieron una actividad máxima de celulasas de 1.035 UI/mL a los 7 días de incubación, bajo las siguientes condiciones: humedad 75 –80%, pH inicial de 5.0 y temperatura de incubación de 30 °C.

Pothiraj *et al.*, (2016) utilizaron como sustrato el lirio acuático seco y los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride* para la producción de celulasas. Las condiciones óptimas para las celulasas fueron las siguientes: una concentración de sustrato del 5% (p / v) y un periodo de incubación de 6 días. *Trichoderma viride* mostró una actividad de 68.3 UI/mL, mientras que *Aspergillus niger* exhibió una actividad de 46.3 UI/mL.

Como se puede observar los resultados obtenidos a los 5 días de fermentación y comparando lo reportado por diversos autores, la actividad tanto de xilanasas como de celulasas producidas por *Trichoderma harzianum* utilizando la fracción sólida de lirio acuático fresco fueron similares o mejores a las reportadas por los autores, esto

es importante ya que las actividades obtenidas en este estudio fueron evaluadas a los 5 días de cultivo (164 – 177 U<sub>xilanasas</sub>/g<sub>MS</sub> y 33 – 45 U<sub>celulasas</sub>/g<sub>MS</sub>), mientras que las reportadas se han realizado entre 6 y 9 días de incubación, además el lirio acuático utilizado como sustrato para la FMS no fue secado, no se le agregó ningún nutriente, ni se le agregó ácido sulfúrico como lo realizan la mayoría de los autores citados, esto es debido a que el hongo crece sin problema a 30 °C y con el porcentaje de humedad que la fracción sólida del lirio acuático contiene (70 – 78%).

### 3.6. Efecto de la masa fermentada y del extracto de *T. harzianum* en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático en los RHALE bajo distintos tratamientos.

Para cuantificar el efecto de las actividades enzimáticas aportadas por la masa fermentada (MF) y un extracto de *T. harzianum* sobre la fracción sólida de lirio acuático en los RHALE, se midieron las actividades de las enzimas al inicio de las cinéticas y en los primeros lixiviados producidos (día 3), con la finalidad de saber si al tercer día todavía existe actividad de las enzimas para una futura recirculación. La figura 28 presenta estas actividades.

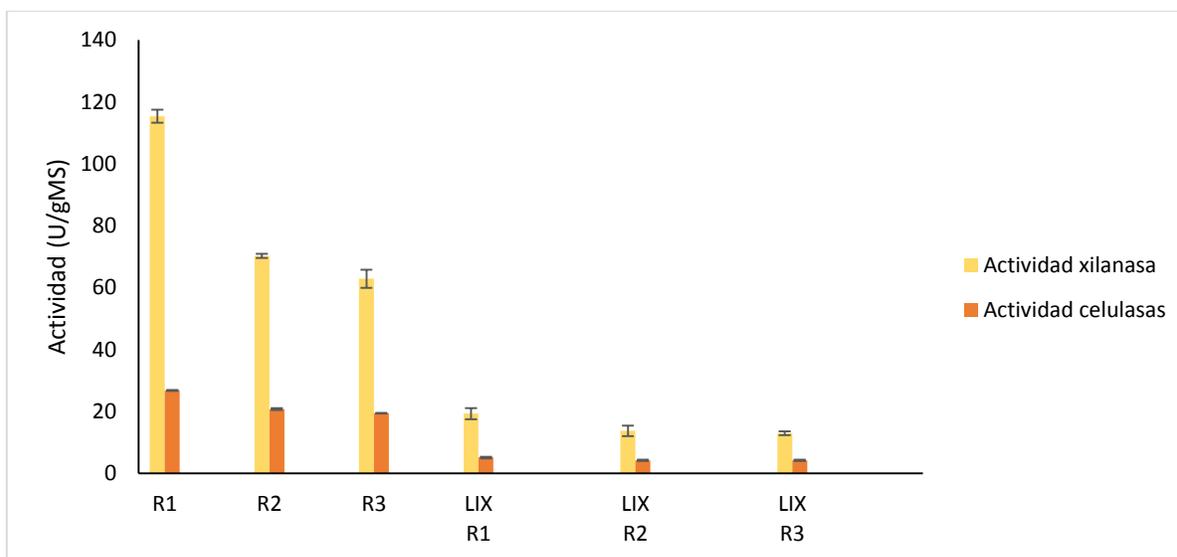


Figura 28. Actividades enzimáticas de xilanasas y celulasas de *T. harzianum* al inicio de la fermentación de la fracción sólida de lirio acuático. R1 = Masa fermentada de *T. harzianum*, lirio y lodos; R2 = Extracto enzimático de *T. harzianum*, lirio y lodos; R3 = Lirio y lodos (control); LIX R1 = Lixiviado de R1; LIX R2 = Lixiviado de R2 y LIX R3 = Lixiviado de R3.

Se observa que las mayores actividades se presentan con el reactor R1 con valores de 115 U/g<sub>MS</sub> para xilanasas y 27 U/g<sub>MS</sub> para celulasas. En el caso de R2 y R3 al inicio de la fermentación son similares con un valor de 70 y 63 U/g<sub>MS</sub> para xilanasas y de 21 y 19 U/g<sub>MS</sub> para celulasas. Este comportamiento pudo deberse a que al tratamiento R2 no se le agrego la cantidad requerida de enzimas, sino solo se le agrego el 10 % de extracto respecto a la masa empacada (10 mL). Los lixiviados a 3 días de fermentación contienen actividades enzimáticas entre el 17 y 20 % menos que las actividades de la masa inicial, por lo que no sería necesario hacer una recirculación del lixiviado en los RHALE.

Sin embargo, al final de la fermentación en los RHALE, las actividades de xilanasas presentaron una disminución del 70 %, respecto a la inicial (35 UI/g<sub>MS</sub> en R1, 33 UI/g<sub>MS</sub> en R2 y 28 UI/g<sub>MS</sub> en R3). En el caso de las celulasas no fueron detectadas al final de los tratamientos, esta ausencia de actividad enzimática pudo deberse a los cambios de pH a lo largo de la fermentación (Figura 31), inactivando las enzimas. Algunos autores reporten que cada enzima tiene un pH optimo (5 y 7). El pH óptimo para la acción de celulasas oscila entre 6 y 7, (Yamamoto *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2012), mientras que para las xilanasas oscila entre 5 y 5.4 (Zhaoxin *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2012).

Es de gran importancia que las actividades de las xilanasas sean mayores al inicio de la fermentación, ya que estas enzimas actúan como proteínas auxiliares para que las celulasas puedan hidrolizar la celulosa presente en la fracción sólida de lirio acuático. Para el caso de la hidrólisis de la hemicelulosa, las xilanasas también cumplen un rol importante ya que al degradar las cadenas de xilano facilitan el acceso de celulasas y de ellas mismas, junto a otras enzimas para la hidrólisis de este polímero que está presente en mayor proporción en el lirio acuático (Devia, 2014). Además, las enzimas más relevantes, con relación a la ruptura de la estructura de la lignocelulosa, son las xilanasas, estas enzimas poseen actividad endo- $\beta$ -1,4-xilanasas, es decir, hidrolizan el enlace glucosídico presente en la cadena principal del polímero con lo que facilitan el acceso a otras enzimas para la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa presentes en la lignocelulosa. La acción de  $\beta$ -D-xilosidasas resulta importante para la degradación de los extremos del

polímero, además de moléculas constituidas por pocas unidades de xilosa. A través de su actividad se logra obtener moléculas simples de xilosa. El resto de las enzimas presentes en la degradación del xilano son útiles para degradar las uniones que existen entre la cadena principal de la molécula y las distintas ramificaciones que presenta. A través de ellas se logra liberar otras moléculas de azúcar como arabinosa o glucosa (Devia, 2014).

Se destaca que las xilanasas pueden ser clasificadas dentro de las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas (GH10 y GH11), (Henrissay et al., 1991). Aun cuando ambos tipos de enzimas hidrolizan los enlaces endo- $\beta$ -1,4-xilanasas presentes en las moléculas de xilano, existen diferencias estructurales y del sustrato sobre el que actúan ambas familias. Las GH10 suelen tener pesos moleculares más altos y menores puntos isoeléctricos que las GH11, y estas últimas no hidrolizan xilanos muy sustituidos (Kim, 2014).

La tabla 13 presenta las variables analizadas en el inicio y al final de las cinéticas de los RHALE bajo los distintos tratamientos. Los reactores fueron empacados con 100 g de materia como se describe en el capítulo 2, sección 11. y con un contenido de humedad entre 84 y 85%. Se puede observar que en todos los tratamientos presentan una disminución en el pH al final de las cinéticas, debido a una acumulación de compuestos solubles provenientes de la fermentación, como ácidos grasos volátiles producidos de la hidrólisis de los sólidos de lirio. Este comportamiento ha sido reportado por Rodríguez *et al.* (2015) y Ramírez (2017), que utilizaron la fracción sólida de residuos urbanos (FORSU) y la fracción sólida del lirio acuático respectivamente, en este mismo tipo de reactores.

Tabla 13. Resultados de las variables analizadas en la fermentación de la fracción sólida de lirio acuático en los RHALE.

Tratamiento	Días	pH	Humedad (%)	DQO (g)	ST (g <sub>ST</sub> /gBagazo)	SV (g <sub>SV</sub> /gBagazo)	η SV (%)
R1	0	7.18±0.01	84 ± 0.01	21 ± 0.3	158 ± 0.01	137 ± 0.7	33 ± 0.5
	21	6.17±0.09	90 ± 1.2	15 ± 0.14	103 ± 1.2	91 ± 3	
R2	0	7.46±0.02	85 ± 0.6	21 ± 0.3	146 ± 0.6	128 ± 1	20 ± 3
	21	6.22 ± 2	89 ± 7	16 ± 0.5	112 ± 7	102 ± 6	
R3	0	7.66±0.03	85 ± 2	17 ± 0.2	154 ± 2	134 ± 2	18 ± 4
	21	6.40±0.001	88 ± 5	14 ± 0.1	121 ± 5	109 ± 5	

Donde: R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control).

Se observa que la DQO disminuye al final de las cinéticas, la reducción de la DQO en los reactores R1, R2 y R3 fue de 25, 24 y 19% respectivamente. Se observa también que la mayor reducción de sólidos volátiles se obtuvo con el reactor R1 empacado con el 10% de la masa fermentada de *T. harzianum* (33%) respecto al reactor R2 con el extracto (20%) y reactor control (18%), siendo 2 veces mayor la reducción del R1 con respecto al control. La reducción obtenida en el tratamiento R1 es mayor a la reportada por Rozy *et al.*, en 2017 (21% a los 40 días de cinética), los cuales utilizaron lirio acuático como sustrato variando diferentes factores fisicoquímicos como el tamaño de partícula, la concentración de inóculo, la temperatura y el pH, trabajando con digestores anaerobios en lote, sin separar la fracción sólida de lirio. Los resultados obtenidos con el reactor R1 mostraron que se presentó una buena hidrólisis de los polímeros presentes en el lirio acuático.

### 3.6.1. Evolución y producción de compuestos solubles en los lixiviados de los RHALE.

La figura 29 muestra el perfil de pH de los lixiviados producidos en los RHALE durante los días de fermentación. Puede observarse, que en todos los tratamientos el pH disminuye a valores entre 5.2 – 5.5 a los 8 días de cinética y permanece constante y con valores favorables para la degradación anaerobia del lirio acuático hasta el final de la cinética, valores a los reportados por Ramírez, (2017) y Hernández, (2019) quienes trabajaron con un sistema similar. Algunos autores mencionan que el pH óptimo para llevar a cabo el proceso de hidrólisis y

acidogénesis se encuentra entre 4 y 6.5 (Yu *et al.*, 2002) rango en el cual se encontraron todos los tratamientos.

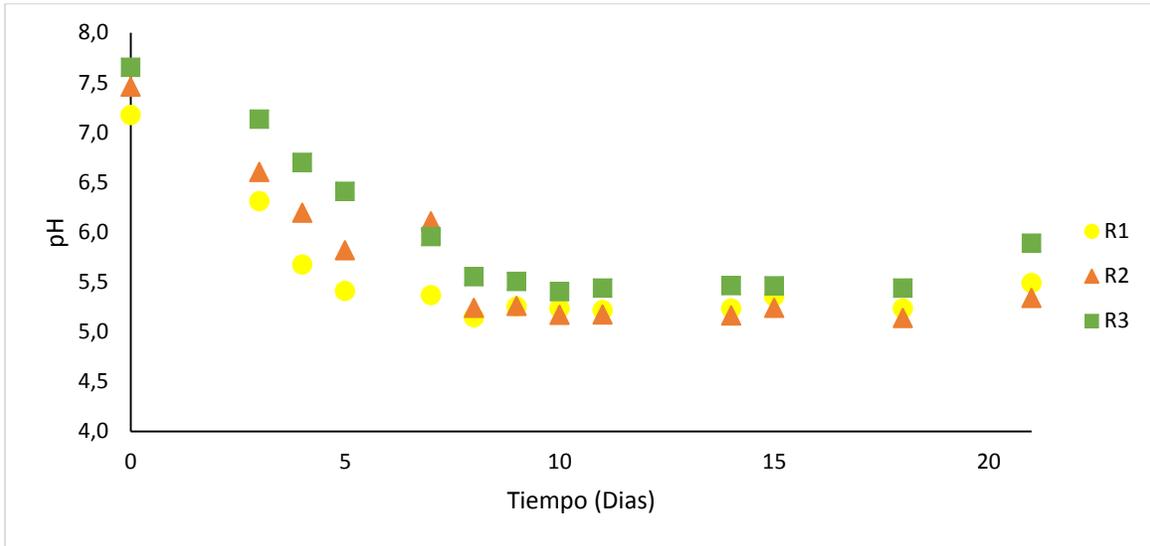


Figura 29. Perfil de pH en los lixiviados de los RHALE. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control).

La figura 30 muestra la evolución de la DQO de los lixiviados con los distintos tratamientos.

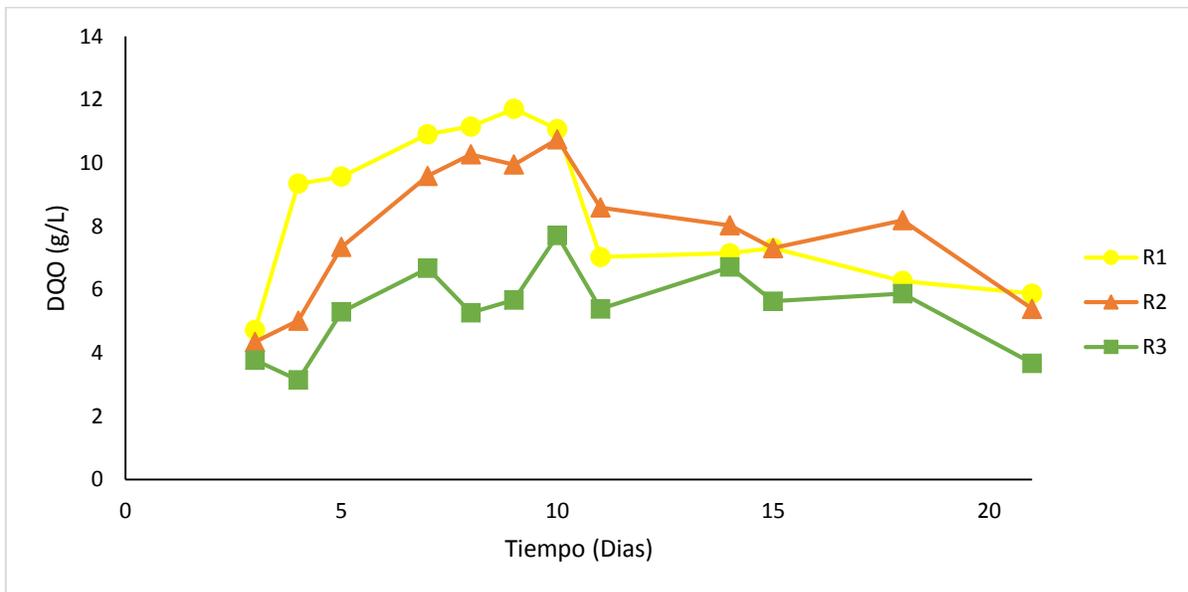


Figura 30. Evolución de la concentración de DQO soluble en los lixiviados de los RHALE. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control).

Se puede observar que a los 9 días de fermentación el reactor R1 que contiene la MF presenta la mayor concentración de la DQO en los lixiviados (12 g/L), en

comparación con los reactores R2 y R3 que alcanzan una concentración de 11 g/L y 8 g/L al día 10 respectivamente. Además, se observa que en todos los reactores la DQO tiende a disminuir después de 10 días de cinética. Los valores de la concentración de compuestos solubles DQO son menores en los reactores control (R3). La disminución de la DQO se puede deber a que existen diferentes destinos de los sustratos orgánicos en la hidrólisis y acidogénesis, ya que los productos de la acidificación consisten en una variedad de compuestos orgánicos pequeños, principalmente AGV, pero también pueden producirse alcoholes y otros ácidos que no fueron analizados y en las fermentaciones se producen H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> que se pierden del sistema como gases. Algunos otros compuestos neutros como los azúcares y aminoácidos se convierten también en AGV y ácido carbónico, siendo los productos principales de la reacción.

La figura 31 muestra la evolución de los AGV totales producidos en los lixiviados de los RHALE durante toda la cinética, se observa que la mayor concentración de AGV se obtuvo en el R1 a los 10 días de cinética, la cual fue de 12.3 g/L, respecto al tratamiento R2 que fue de 9 g/L a los 7 días de cinética y el R3, que fue de 7 g/L a los 11 días.

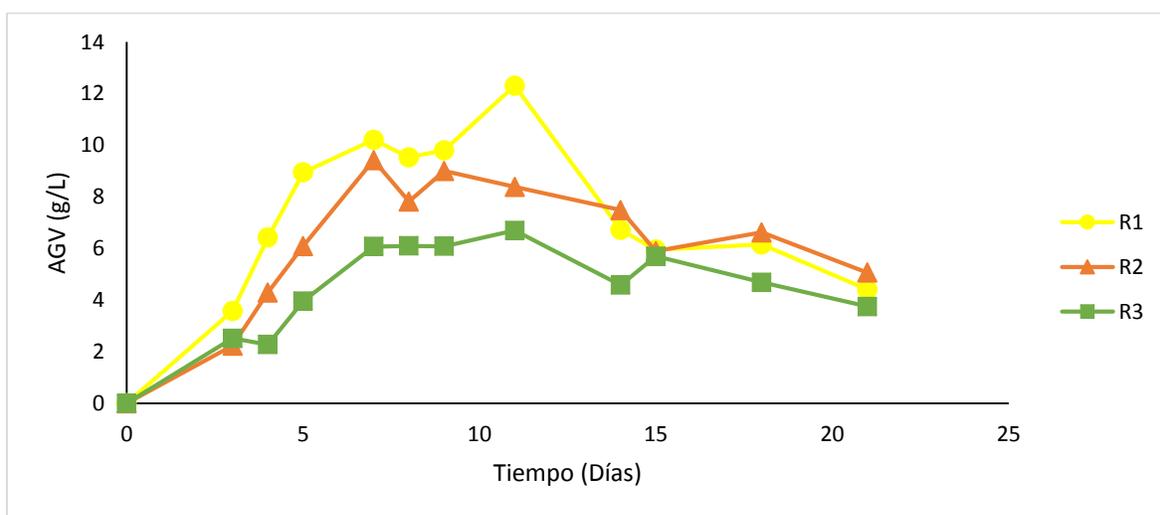


Figura 31. Concentración de los AGV totales en los RHALE. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control).

Realizando la cuantificación de los AGV por cromatografía de gases se observó que el ácido acético representa el 60% de los AGV totales, seguido del ácido propiónico 20% y butírico 16%. Altas concentraciones de AGV pueden inhibir la fase

acetogénica de la digestión anaerobia (Batstone *et al.*, 2003; Pind *et al.* 2003; Nielsen *et al.* 2007). Sin embargo, cuando la digestión anaerobia se separa en dos etapas y en distintos reactores, esas altas concentraciones de AGV que son hidrolizados y fermentados en el RHALE son escurridos del lecho de tal forma que ya no resultan inhibitorios para el proceso. Los lixiviados con altas concentraciones de AGV pueden diluirse a concentraciones no inhibitorias para tener altos rendimientos de metano en un reactor de alta tasa como el UASB, especialmente el acético, ya que es el principal precursor de la metanogénesis. La acumulación de ácido propiónico puede ser debido a una acumulación de hidrógeno en el sistema, ya que una presión parcial de hidrógeno alta inhibe severamente a las bacterias que degradan este ácido. La presión de hidrógeno desempeña un papel importante en el control de procesos de fermentación. El ácido propiónico es convertido a ácido acético solamente si la presión parcial de hidrogeno es menor de  $10^{-4}$  atm (Hassan y Nelson, 2012). Por lo tanto, el hidrógeno es también un intermediario importante del proceso anaeróbico que debe ser cuantificado ya que su acumulación en el medio provoca la inhibición de la acetogénesis y, consecuentemente, la acumulación de ácidos grasos volátiles con más de dos átomos de carbono, sin embargo, para este estudio la presencia de hidrógeno en el sistema no fue significativa ya que los AGV con más de dos cadenas que se cuantificaron solo correspondían al 4% de los AGV totales.

Estos valores representan el 90 % de la concentración de la DQO soluble recuperada en el lixiviado, resultando ser muy importante para que la metanogénesis de los lixiviados se lleve a cabo de manera más rápida y con altos rendimientos de metano en el biogás. Algunos autores han reportado conversiones de AGV menores al 50%, usando FORSU como sustrato (Ramírez *et al.*, 2014, Rodríguez *et al.*, 2015).

En el caso de los azúcares totales, fueron cuantificados y se obtuvo que representa el 2% de la DQO soluble recuperada, porcentaje que se encuentra dentro de lo reportado por Ramírez, (2017) que va entre 1 – 3 % respecto a la DQO soluble.

En la figura 32 se presenta el volumen recuperado y acumulado de los lixiviados producidos en cada uno de los reactores. La tendencia es similar en todos los tratamientos, debido a que el bagazo de lirio tiene características texturizante debido a su porosidad, lo que hace que el agua que se usa para el escurrimiento sea fácilmente filtrable, recuperándose el  $85 \% \pm 2$  del volumen total agregado. El volumen recuperado es mayor que los reportados por otros autores, usando otro tipo de residuos sólidos como la FORSU, (Ramírez *et al*, 2014; Rodríguez *et al*. 2015).

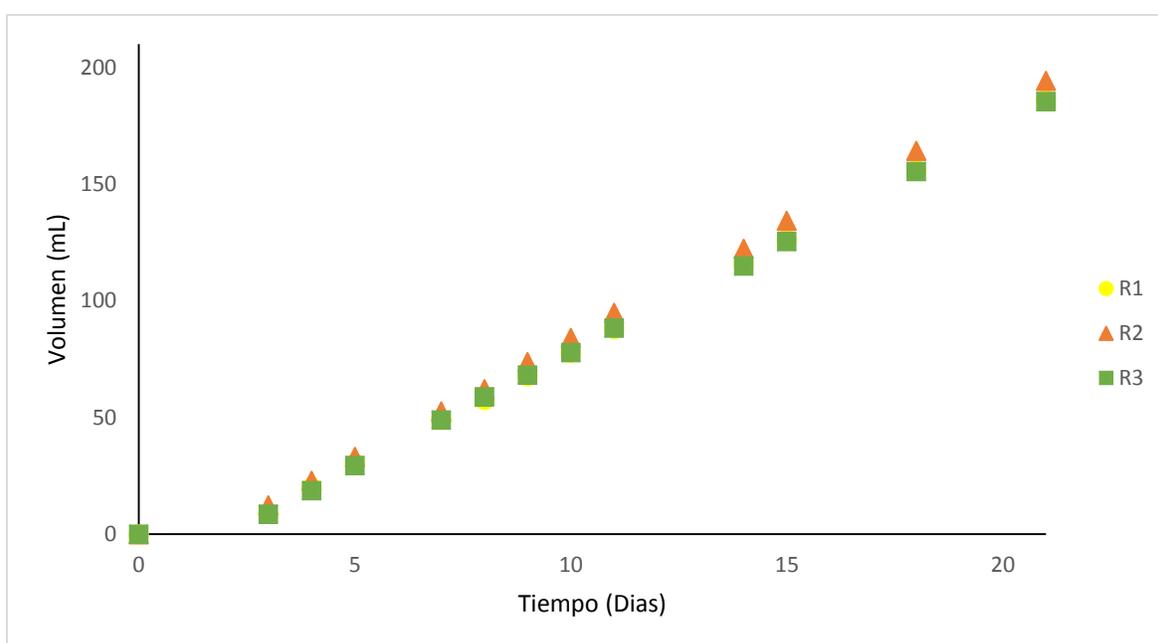


Figura 32. Volumen acumulado de lixiviados producidos en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio bajo los distintos tratamientos. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control).

Con el volumen de lixiviado producido y la concentración de la DQO se calculó la masa de DQO acumulada, para calcular la velocidad de hidrólisis, obteniendo la figura 33. Se observa que con los reactores R1 y R2 se presenta la mayor cantidad de DQO acumulada, con una velocidad de producción de compuestos solubles de  $0.1 \text{ gDQO}\cdot\text{d}^{-1}$  y  $0.9 \text{ gDQO}\cdot\text{d}^{-1}$ , seguido del control que fue de  $0.05 \text{ gDQO}\cdot\text{d}^{-1}$ .

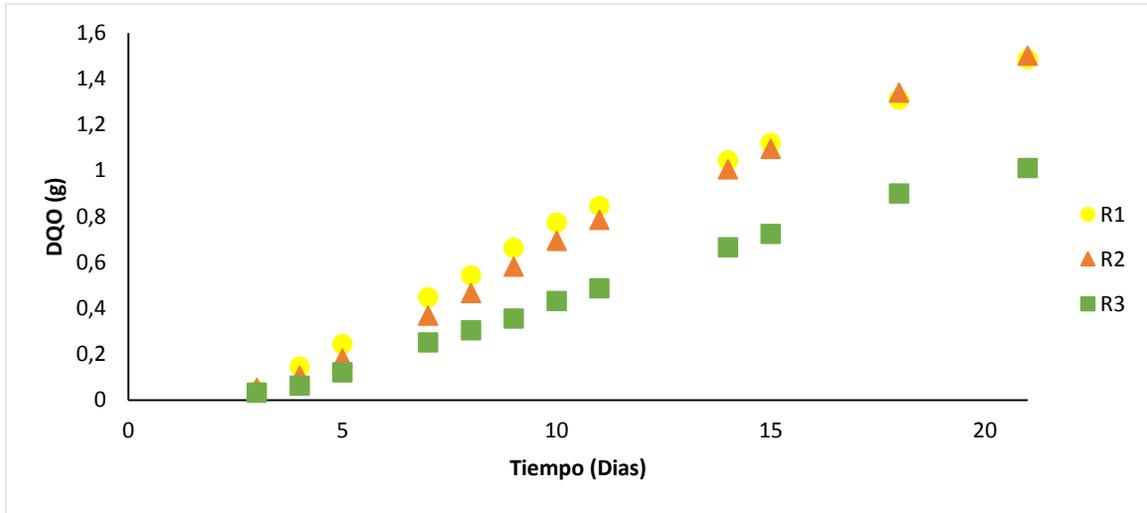


Figura 33. Producción acumulada de DQO en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático con los distintos tratamientos. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control).

Graficando los AGV acumulados con base al volumen de lixiviado producido y convertidos a DQO, se obtiene la figura 34. Se observa que con los reactores R1 y R2 presentan la mayor cantidad de AGV acumulados, con una velocidad de producción de  $0.07 \text{ gDQO}\cdot\text{d}^{-1}$ , seguido del R2 que fue de  $0.06 \text{ gDQO}\cdot\text{d}^{-1}$  y el R3 de  $0.04 \text{ gDQO}\cdot\text{d}^{-1}$ .

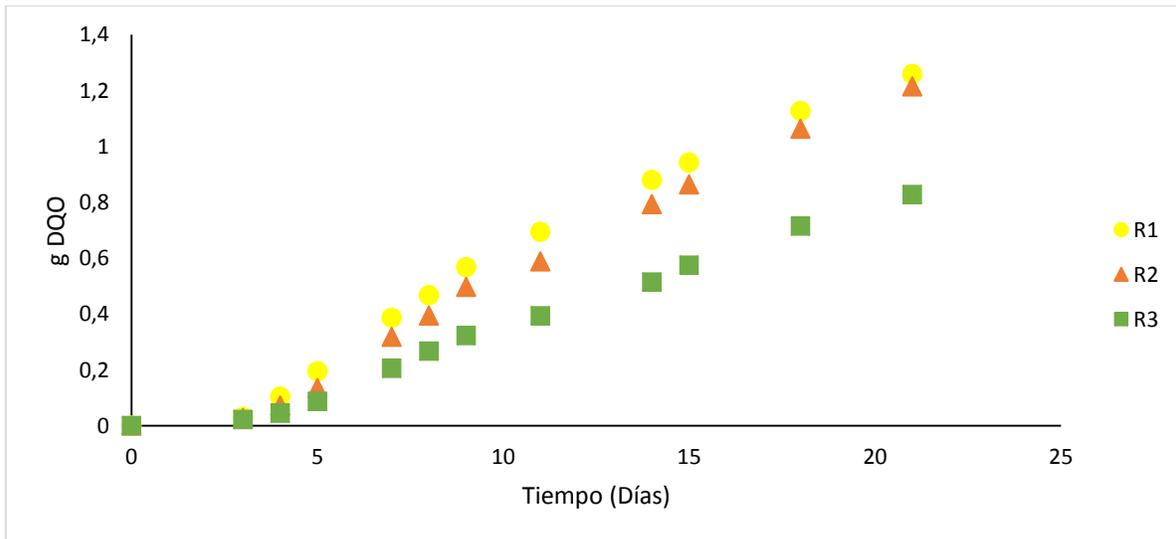


Figura 34. Producción acumulada de AGV convertida a DQO en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático. R1 = Masa fermentada + lirio + lodos, R2 = Extracto enzimático + lirio + lodos, R3 = Lirio + lodos (control).

La tabla 14 presenta el resumen de las variables analizadas más importantes en las 3 cinéticas. Se puede observar que en el primer estudio la mayor reducción de sólidos volátiles se obtuvo con el tratamiento que tenía extracto enzimático comercial y lodos anaerobios (37%). El aumento en la destrucción de sólidos y la formación de compuestos solubles (20% y 0.14 gDQO.d<sup>-1</sup>) pudo ser debido a que este complejo enzimático comercial está formado por varias enzimas (xilanasas, celulasas, hemicelulasas y β – glucosidasas) que pudieron hidrolizar distintos polímeros de la fracción sólida del lirio.

Tabla 14. Resumen de las variables más importantes obtenidas en los tres estudios.

Estudio	η SV (%)	DQO solubilizada (%)	Velocidad de producción de DQO (gDQO.d <sup>-1</sup> )	Complejo enzimático
Extracto enzimático	37 ± 3	20	0.14	xilanasas, celulasas, hemicelulasas y β – glucosidasas
Hongos	28 ± 1	24	0.23	ND
<i>T. harzianum</i>	33 ± 0.5	30	0.1	Xilanasas y celulasas

En el segundo estudio se obtuvo una menor reducción de sólidos volátiles con los tratamientos fúngicos, esta reducción se pudo deber a que la fracción sólida de lirio no fue esterilizada cuando se realizó la fermentación en medio sólido, por lo que probablemente algunos microorganismos nativos presentes en el lirio acuático compitieron por el sustrato, impidiendo una mayor velocidad en la hidrólisis de los polímeros del lirio por las cepas fúngicas. Sin embargo, la formación y velocidad de compuestos solubles fue mayor (24% y 0.23 gDQO.d<sup>-1</sup>) en los tratamientos con *A. niger* y *T. harzianum*.

En el tercer estudio se obtuvo la mayor reducción de SV (33%), con la masa de *T. harzianum*, siendo este valor 2 veces más alto respecto al control, también se obtuvo el mayor porcentaje de DQO solubilizada (30%), además los AGV correspondieron al 90% de la DQO soluble, siendo mas alta esta proporción a los demás estudios que fueron entre el 80 y 84%. Sin embargo, la velocidad de

producción de la DQO fue menor ( $0.1 \text{ gDQO}\cdot\text{d}^{-1}$ ), esto se puede deber, ya que el lirio recolectado para este estudio presentó valores de los sólidos volátiles, DQO y azúcares totales menores que la fracción sólida que se usó en el estudio anterior.

La implementación de hongos como pretratamiento tiene ciertas desventajas, se requiere un soporte como nutriente para el crecimiento, un pH específico para una mayor degradación, tiempos de cinética altos (1-3 días) (Mir *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2018). Por otra parte, reportan que la implementación de enzimas comerciales requiere de un pH específico y cuando no se tienen las mejores condiciones se tiende a la formación de productos diferentes a los deseados y altos costos de producción (Gasser *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2010).

Para el primer estudio el soporte fue la fracción sólida del lirio acuático estéril en el cual los hongos crecieron sin ningún problema obteniendo  $6.4 \times 10^8$  esporas/mL para *T. harzianum* y  $3.4 \times 10^8$  esporas/mL para *A. niger* y tiempos de cinética de 5 días.

## CAPÍTULO 4

### 4. Conclusiones

La fracción sólida del lirio acuático fresca y estéril puede ser usada como soporte para la producción de xilanasas y celulasas a partir de los hongos filamentosos *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus niger*, sin la adición de nutrientes al medio.

Con el análisis respirométrico se demuestra que el hongo que obtuvo la mayor producción de CO<sub>2</sub> fue *Trichoderma harzianum* (181 mg CO<sub>2</sub>/g<sub>MSI</sub>) lo que representa un mejor crecimiento sobre la fracción sólida de lirio acuático en comparación con *Aspergillus niger* (163 mg CO<sub>2</sub>/g<sub>MSI</sub>).

Las mayores actividades enzimáticas tanto de xilanasas como de celulasas, usando la fracción sólida de lirio acuático como sustrato, se dieron con el hongo *Trichoderma harzianum* con valores de 177 U<sub>xilanasas</sub>/g<sub>MS</sub> y 45 U<sub>celulasas</sub>/g<sub>MS</sub> a los 5 días de fermentación.

A 20 días de fermentación en los RHALE, los tratamientos con masa fermentada y extracto enzimático de *Trichoderma harzianum* mostraron diferencias significativas en la reducción de sólidos volátiles (33%) y en la producción de compuestos solubles con respecto a sus controles, obteniendo mayor producción de compuestos solubles y altas conversiones a AGV en los lixiviados (90%), predominando el ácido acético precursor de la metanogénesis, lo que representa una buena alternativa para la producción de biogás en reactores de alta tasa.

Implementar enzimas comerciales en la hidrólisis y acidogénesis anaerobia de la fracción sólida del lirio acuático, aumenta la reducción de sólidos volátiles (37 %) y la velocidad de producción de DQO (0.14 gDQO.d<sup>-1</sup>), sin embargo, el uso de enzimas comerciales puede aumentar los costos de producción, debido a que se deben controlar las condiciones de pH y T que favorezcan la acción enzimática.

## Recomendaciones

Sería importante medir la producción de H<sub>2</sub> y otros gases en los RHALE para saber su concentración, lo que ayudaría a entender mejor el comportamiento en la composición de los compuestos presentes en los lixiviados como los ácidos grasos volátiles.

La masa fermentada de *T. harzianum* se puede incubar por 24 horas a 50 °C, antes de adicionarla a la fracción sólida de lirio, para corroborar si esta incubación previa aumenta la velocidad de hidrólisis de los biopolímeros y la producción de los compuestos solubles en el RHALE.

## CAPITULO 5

### 5. Bibliografía

- Adav SS, Chao LT, Sze SK. (2012). Quantitative Secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for Lignocellulosic biomass degradation. *Mol Cell Proteomics*. 11(7).
- Ahring, B.K. 1995. Methanogenesis in thermophilic biogas reactors. *Antonie Van Leeuwenhoek*. (67), 91-102.
- Alani, F., Anderson, W. & Moo-Young, M. (2008). New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnol Lett*. 30, 123-126.
- Ali A. Juwaied, Ahmed Abdulamier Hussain Al-amier, Zahraa Abdumuniem and Umar Anaam. (2011). Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* and *Tricoderma viride* using sugar cane waste *Journal of Yeast and Fungal Research* Vol. 2(2), pp. 19.
- Ali, U.F., El-Dein, H.S.S., (2008). Production and partial purification of cellulase complex by *Aspergillus niger* and *A. nidulans* grown on water hyacinth blend. *J. Appl. Sci. Res*. 4, 875–891.
- Amriani F., Salim A., Isandinata L. Khumsupan D. y Bartad Z. (2016). Physical and Biophysical Pretreatment of Water Hyacinth Biomass for Cellulase Enzyme Production. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 30 (2) 237-244.
- APHA (2005) Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, Washington, DC.
- Ariunbaatar J., Panico A., Esposito G., Pirozzi F., Lens P. (2014). Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. *Applied Energy* (123) 143–156
- Aust, S. D. (1995). Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environ Health Perspect*. 103, 59-61.
- Awasthi, M., Kaur, J., and Rana, S. (2013). "Bioethanol production through water hyacinth, *Eichhornia crassipes* via optimization of the pretreatment

conditions,” *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* 3(3), 42- 46.

- Baldrian, P. & Valaskova, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* Epub ahead of print, doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00106.
- Banerjee, G., Scott-Craig, J. S., and Walton, J. D. (2010). “Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective,” *BioEnergy Research.* 3(1), 82- 92.
- Batstone D. J., Pind, P. F. and Angelidaki, I. 2003. Kinetics of thermophilic, anaerobic oxidation of straight and branched chain butyrate and valerate. *Biotechnology and Bioengineering*, 84, (2), 195-204.
- Bauer, W.D. (1973). The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 51: 174-187.
- Béguin, P. & Aubert, J.-P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev.* 13, 25-58.
- Benoliel B, Torres FAG, de LMP M. (2013). A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. *SpringerPlus.* 2:656.
- Bergier, I., Salis, S. M., Miranda, C. H. B., Ortega, E., and Luengo, C. A. (2012). “Biofuel production from water hyacinth in the Pantanal wetland,” *Ecohydrology and Hydrobiology* 12(1), 77-84. DOI: 10.2478/v10104-011-0041-4.
- Bhattacharya, A. and Kumar, P. 2010. Water Hyacinth as a potential biofuel crop. *EJEAFChe.* 9: 112-22.
- Bidlack, J., Malone, M. & Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *ProcOklaAcad Sci.* 71, 51-56.
- Bolenz, S., Omran, H. and Gierschner, K. 1990. Treatment of water hyacinth tissue to obtain useful products. *Biowastes.* 33: 263-274.

- Bouallagui, H., Touhami, Y., Ben Cheikh, R. y Hamdia, M. (2005). Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes: review. *Process Biochemistry* 40, 989–995.
- Carrión, Cristóbal; Ponce-De León, Claudia; Cram, Silke; Sommer, Irene; Hernández, Manuel; Vanegas, Cecilia. (2012). Aprovechamiento del lirio acuático (*Eichhornia Crassipes*) en Xochimilco para Fitorremediación de metales. *Agrociencia*, 46, (6), 612-619.
- Cazemier, A. E., Verdoes, J. C., Reubsaet, F. A., Hackstein, J. H., van der Drift, C. & Op den Camp, H. J. (2003). *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi)cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 83, 135-48.
- Chandel AK, Chandrasekhar G, Silva MB, Silvério da Silva S. (2012). The realm of cellulases in biorefinery development. *Crit Rev Biotechnol*. 32(3):187–202.
- Chandler, J.A., Jewell, W.J., Gossett, J.M., Soest, P.J., Robertson, J.B., 1980. Predicting methane fermentation biodegradability. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 10, 93-107.
- Chu, J. J., Ding, Y., and Zhuang, Q. J. (2006). “Invasion and control of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in China,” *Journal of Zhejiang University Science B* 7(8), 623-626.
- Cirne, D., Lehtomäki, A., Björnsson, L., Blackall, L., 2007. Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal Applied Microbiology* 103, 516–527.
- Costa M., Torres M., Reyes A., (2012). Caracterización de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* producidas en fermentación sólida sobre torta de canola. *Revista Colombiana de biotecnología*. Vol. XIV, núm. 1, pp. 208-215.
- Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. (1993),  $\beta$ -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotech. Appl. Biochem.*, 17, 259-289.

- Critter, S., Freitas, S. y Airoidi, C. (2004). Comparison of microbial activity in some Brazilian soils by microcalorimetric and respirometric methods. *Thermochimica Acta* (410): 35-46.
- Da Silva Delabona P, Lima DJ, Robl D, Rabelo SC, Farinas CS, da Cruz Pradella JG. (2016). Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 43(5):617–26.
- De Castro AM, Pedro KCNR, da Cruz JC, Ferreira MC, Leite SGF, Pereira N. (2010). *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a Cellulolytic complex with significant  $\beta$ -Glucosidase activity from sugarcane Bagasse Cellulignin. *Appl Biochem Biotechnol.* 162(7):2111–22.
- Deshpande, P., Nair, S., Khedkar, S., 2009. Water hyacinth as carbon source for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158, 552–560.
- Deshpande, S.K., Bhotmange, M.G., Chakrabarti, T., Shastri, P.N., 2008. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Ind. J. Chem. Technol.* 15, 449–456.
- Devia J. (2014). Estudio del efecto de xilanasas fúngicas en la degradación de sustratos lignocelulósicos. Tesis de licenciatura para ingeniero civil en biotecnología e ingeniero civil químico. Universidad de Chile.
- Doi, R. H. (2007). Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome & noncellulosome producers. *Nature Reviews Microbiology* 2, 541-551.
- Domingues F. C., Queiroz J. A., Cabral J.M.S., y Fonseca L.P. (2000). “The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30”. *Enzyme and Microbial Technology.* 26:394-4021.
- Druzhinina, I. S., Schmoll, M., Seiboth, B. & Kubicek, C. P. 2006. Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. *Appl Environ Microbiol.* 72, 2126-2133.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Elberson, M., Malekzadeh, F., Yazdi, M., Kameranpour, N., Noori-Dalooi, M., Matte, M., Shahamat, M., Colwell, R. & Sowers, K. 2000. *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soils. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50, 993-996.
- Enoch Y. Park, Kazuya Naruse , Tatsuya Kato. (2011). Improvement of cellulase production in cultures of *Acremonium cellulolyticus* using pretreated waste milk pack with cellulase targeting for biorefinery *Bioresource Technology* 102 6120–6127.
- Eriksson, K.-E. L. (1989). Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Sci Technol.* 24, 79-101.
- Esposito, E. & da Silva, M. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit Rev Microbiol.* 24, 89-98.
- Feng, W., Xiao, K., Zhou, W., Zhu, D., Zhou, Y., Yuan, Y., Xiao, N., Wan, X., Hua, Y., and Zhao, J. (2017). “Analysis of utilization technologies for *Eichhornia crassipes* biomass harvested after restoration of wastewater,” *Bioresource Technology* 223, 287-295. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.047.
- Fileto-Pérez, H. A., Rutiaga-Quiñones, J. G., Aguilar-González, C. N., Paéz, J. B., López, J., and Rutiaga-Quiñones, O. M. (2013). “Evaluation of *Eichhornia crassipes* as an alternative raw material for reducing sugars production,” *BioResources* 8(4), 5340- 5348. DOI: 10.15376/biores.8.4.5340-5348.
- Fileto-Pérez, H. A., Rutiaga-Quiñones, O. M., Sytsma, M. D., Lorne, I. M, Luo, W, Pankow, J. F., and Rutiaga-Quiñones, J. G. (2015). “GC/MS analysis of some extractives from *Eichhornia crassipes*,” *BioResources* 10(4), 7353-7360. DOI: 10.15376/biores.10.4.7353-7360.
- Gasser, C. A., Yu, L., Svojitka, J., Wintgens, T., Ammann, E. M., Shahgaldian, P. and Hommes, G. (2014). Advanced enzymatic elimination of phenolic

contaminants in wastewater: a nano approach at field scale. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 3305-3316.

- Gerber, P. J.; Heitmann, J. A. and Joyce, T. W. (1997). Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma*. *Bioresource Technology*, 61,127-140.
- Gressel, J. 2008. Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Sci.* 174: 246-63.
- Gujer, W.; Zehnder. 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. *Source, Water Science and Technology* 15. ISSN 0273-1223 - p. 127 - 167. Department(s), Microbiological Laboratory. Publication type, Refereed Article in a scientific journal.
- Hag, I. et al. (2003). Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, v.38, n.6, p.921- 924.
- Haltrich, D.; Nidetzky, B.; Kulbe, K. D.; Steiner, W. and Zupancic, S. (1996), Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, 58, 137-161.
- Hanaki K., Hirunmasuwan S. y Matsuo T. (1994). Selective use of microorganisms in anaerobic treatment processes by application of immobilization. *Water Research* 28(4):993-996.
- Hassan, A & Nelson, K. (2012). Anaerobic fermentation of dairy food wastewater. *Journal Dairy Science*, 95, 6188-6203.
- Henrissay, B. y cols. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.*1;280 (Pt 2):309-16.
- Hernández J. (2016). Producción de biogás a partir de la fracción acuosa de lirio acuático. Tesis de Especialización en Biotecnología. UAMI.
- Hernández J. (2019). Producción de biogás a partir de la fracción sólida y líquida de lirio acuático en dos reactores en continuo. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAMI.
- Hills, D.J., Nakano, K. (1984). Effects of particle size on anaerobic digestion of tomato solid wastes. *Agricultural Wastes*. Vol. 10, pag. 285-295.

- Hu, J. y cols. (2011). The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?. *Biotechnology for Biofuels* 4:36.
- Jagadish H. Patil, Prajwal H. Sanil. 2012. Study on biomethanation of water hyacinth using primary sludge as inoculum. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*,4(4):2255-2260.
- Ji N, Zhang T., Zheng M., Wang A., Wang H., Wang X., Chen J., 2008. Direct Catalytic Conversion of Cellulose into Ethylene Glycol Using Nickel-Promoted Tungsten Carbide Catalysts, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 8510-8513.
- Juanga J. P. 2005. "Optimizing dry anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste", M. E. Thesis, Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand.
- Kadla, J. F. & Gilbert, R. D. (2000). Cellulose structure: A review. *Cellul Chem Technol.* 34, 197-216.
- Karmakar, M., Ray, R.R., 2011. A statistical approach for optimization of simultaneous production of b-glucosidase and endoglucanase by *Rhizopus oryzae* from solid-state fermentation of water hyacinth using central composite design. *Biotechnol. Res. Int.*, 1–7 574983.
- Kim, H. (2014) Efficient function and characterization of GH10 xylanase (Xyl10g) from *Gloeophyllum trabeum* in lignocellulose degradation. *Journal of Biotechnology* 172 38– 45.
- Klemm Djeter, Brigitte Heublein, Hans-Peter Fink. Habil. Andreas Bohn Dr. (2005) Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition* Volume 44, Issue 22, pages 3358–3393.
- Koppar, A., Pullammanappallil, P., 2008. Single-stage, batch, leach bed thermophilic anaerobic digestion of spent sugar beet pulp. *Bioresource Technology* 99, 2831– 2839
- Kozakiewicz Z. (1989). *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.

- Küçük Ç, Kivanç M, Kinaci E, Kinaci G. (2007). Biological efficacy of *Trichoderma harzianum* isolate to control some fungal pathogens of wheat (*Triticum aestivum*) in Turkey. *Biologia*. 62(3):283–6.
- Kumar P., Barrett D., Delwiche M., Stroeve P. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48 3713-3729.
- Kunatsa, T. and Mufundirwa, A. 2013. Biogas Production from Water Hyacinth Case of Lake Chivero - Zimbabwe A review. *International Journal of Recent Technology and Engineering*. 2: 2277-3878.
- Lara-Serrano, J. S., Rutiaga-Quiñones, O. M., López-Miranda, J., Fileto-Pérez, H. A., Pedraza-Bucio, F. E., Rico-Cerda, J. L., and Rutiaga-Quiñones, J. G. (2016). “Physicochemical characterization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms),” *BioResources* 11(3), 7214-7223. DOI: 10.15376/biores/11.3.7214-7223.
- López N. (2014). Producción de xilanasas y celulasas por *Trichoderma harzianum* en fermentación en estado sólido. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAMI.
- López Vázquez C., Buitrón Méndez G., A. García H., Cervantes Carrillo F. (2017). Tratamiento biológico de aguas residuales: principios, modelación y diseño. IWA Publishing. Cap 16. Pag. 465- 474.
- Lu, J., Wu, J., Fu, Z., and Zhu, L. (2007). “Water hyacinth in China: A sustainability science-based management framework,” *Environmental Management* 40, 823-830. DOI: 10.1007/s00267-007-9003-4.
- Lynd, L. R., Wyman, C. E. & Gerngross, T. U. (1999). Biocommodity engineering. *Biotechnol Prog.* 15, 777-793.
- Mako, A. A., Babayemi, O. J., and Akinsoyinu, A. O. (2011). “An evaluation of nutritive value of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart. Solms-Laubach) harvested from different water sources as animal feed,” *Livestock Research for Rural Development* 23, 106.
- Manivannan, A., and Narendhirakannan, R. T. (2014). “Biodegradation of lignocellulosic residues of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and

response surface methodological approach to optimize bioethanol production using fermenting yeast *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460,” *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering* 8(2), 157-162.

- Manivannan, A., Jayarani, P. H., and Narendhirakannan, R. T. (2012). “Enhanced acid hydrolysis for bioethanol production from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) using fermenting yeast *Candida intermedia* NRRL Y-981,” *Journal of Scientific and Industrial Research* 71(January), 51-56.
- Manivannan, A., Narendhirakannan, R.T., 2014. Response surface optimization for co-production of cellulase and xylanase enzymes by *Trichoderma reesei* NRRL– 3652. *Int. J. Chem. Tech. Res.* 6, 3883–3888.
- Mao, L., Lu, J., Habteselassie, M., Luo, Q., Gao, S., Cabrera, M. and Huang, Q. (2010). Ligninase-mediated removal of natural and synthetic estrogens from water: II. Reactions of 17  $\beta$ - estradiol. *Environmental Science & Technology* 44, 2599-2604.
- Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. & del Río, J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol.* 8, 195-204.
- Martínez, M., Gómez, MM. (2007). Integrated control of *Eichhornia crassipes* by using insects and plant pathogens in México. *Crop Protection*, 26, 1234-1238.
- Martínez-Sánchez, J., Membrillo-Venegas, I., Martínez-Trujillo, A. and García-Rivero, A. M. (2018). Decolorization of reactive black 5 by immobilized *Trametes versicolor*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 17, 107-121.
- Marzano M, Gallo A, Altomare C. (2013). Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. Sp. lycopersici through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biol Control.* 67(3):397–408.
- Masai, E., Katayama, Y. & Fukuda, M. 2007. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin- derived aromatic compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71, 1-15.

- Mata-Álvarez, J., 2003. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. IWA publishing. Londres, Inglaterra. p. 1-180.
- Menon V., Rao M., (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, Prog. Energy Combust. Sci., 38 522-550.
- Miller, G. L. (1960), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars Anal Chem., 31, 426-428.
- Miranda M. y Lot A. 1999. El lirio acuático, ¿Una planta nativa de México? Revista Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mir-Tutusaus, J. A., Baccar, R., Caminal, G. and Sarrà, M. (2018). Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. Water Research 138, 137-151.
- Montalvo, S., Guerrero, L. (2003). Tratamiento anaerobio de residuos. Producción de Biogás. Ed. Universidad Técnica Federico Santa María Chile.
- Montenecourt B. S. (1983). "*Trichoderma reesei* cellulases". Trends in Biotechnology. 1:156-161.
- Montiel C. y Bustos I. 2014. Procesos enzimáticos amigables con el ambiente. Revista digital universitaria. Vol.15, Núm. 12, ISSN 1607- 6079.
- Morales-de la Rosa S., Campos-Martin J., G. Fierro J., 2014. Optimization of the process of chemical hydrolysis of cellulose to glucose, Cellulose, DOI: 10.1007/s10570-10014-10280-10579.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y., Holtzapple M., Ladisch M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, Bioresour. Technol., 96 673-686.
- Mukhopadhyay, S., Nandi, B., 1999. Optimization of cellulase production by *Trichoderma reesei* ATCC 26921 using a simplified medium on water hyacinth biomass. J. Sci. Ind. Res. 58, 107–111.
- Murithi, G., Onindo, C. O., Wambu, E. W., and Muthakia, G. K. (2014). "Removal of cadmium (II) ions from water by adsorption using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) biomass," *BioResources* 9(2), 3613-3631. DOI: 10.15376/biores.9.2.3613- 3631.

- Nevalainen, H., Suominen, P. & Taimisto, K. 1994. On the safety of *Trichoderma reesei*. J Biotechnol. 37, 193-200.
- Nielsen, H.B., Uellendahl, H., Ahring, B.K., 2007. Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. Biomass and Bioenergy. 31, 820-830.
- Njogu P. Kinyua R, Muthoni P, Nemoto Y. 2015. Biogas production using water hyacinth for electricity generation in Kenya. *Energy and Power Engineering*, 7, 209-216.
- O’Sullivan, C., Rounsefell, B., Grinham, A., Clarke, W. and Udy J. 2010. Anaerobic digestion of harvested aquatic weeds: water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), cabomba (*Cabomba caroliniana*) and salvinia (*Salvinia molesta*). Ecological Engineering. 36:1459–1468. doi: 10.1016/j.ecoleng.2010.06.027.
- Ochieng, E., and Kaesje, M. (2014). “An assessment of knowledge and use of water hyacinth for production of biogas among beach communities in Kenya,” *International Journal of Social Sciences and Entrepreneurship* 1(12), 132-139.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gómez, E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. Critical reviews in environmental control. Vol. 21 (5,6), pag. 411-490.
- Peciulyte A, Anasontzis GE, Karlström K, Larsson PT, Olsson L. (2014). Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates. Fungal Genet Biol. 72:64–72.
- Perazzolli M, Moretto M, Fontana P, Ferrarini A, Velasco R, Moser C, Delledonne M, Pertot I. (2012). Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. BMC Genomics. 13(1):660.
- Peters, D. 2006. Carbohydrates for fermentation. Biotechnol J. 1, 806-814.
- Pind P. F., Angelidaki I. and Ahring, B. K. 2003. Dynamics of the anaerobic process: Effects of volatile fatty acids. Biotechnology and Bioengineering 82 (7), 791-801.

- Pothiraj, C., Arumugam, R., Gobinath, R.M., 2016. Production of cellulase in submerged fermentation using water hyacinth as carbon source and reutilization of spent fungal biomass for dye degradation. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5, 99-108. Production: a review, *Bioresour. Technol.*, 83 1-11.
- Quiroz, R. y FOLCH, J., 2011. Plant cell Wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. Laboratorio de Biología Molecular de Hongos, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
- Ramírez, F. (2016) Digestión anaerobia del lirio acuático. Informe de servicio social. Laboratorio de microbiología y tratamiento de aguas residuales, UAMI.
- Ramírez, F. (2017) Tesis de especialización. Digestión anaerobia de la fracción sólida de lirio acuático: hidrólisis y acidogénesis en un reactor hidrolítico anaerobio de lecho escurrido (RHALE).
- Rezaia, S., Din, M. F. M., Kamaruddin, S. F., Taib, S. M., Singh, L., Yong, E. L., and Dahalan, F. A. (2016). "Evaluation of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as a potential raw material source for briquette production," *Energy* 111, 768-773. DOI: 10.1016/j.energy.2016.06.026.
- Rezaia, S., Ponraj, M., Din, M. F. M., Songip, A. R., Sairan, F. M., and Chelliapan, S.(2015a). "The diverse applications of water hyacinth with main focus on sustainable energy and production for new era: An overview," *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41, 943-954. DOI: 10.1016/j.rser.2014.09.006.
- Rezaia, S., Ponraj, M., Talaiekhosani, A., Mohamad, S. E., Din, M. F. M., Taib, S. M., Sabbagh, F., and Sairan, F. M. (2015b). "Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater," *Journal of Environmental Management* 163, 125-133. DOI: 10.1016/j.jenvman.2015.08.018.
- Rodríguez P.R.; Rodríguez, P.S.; Monroy, H.O.; Ramírez, V.F. (2015) Effect of organic loading rate on the performance of two stages anaerobic digestion

of organic fraction of the municipal solid waste (OFMSW). *Water Science & Technology*. In press.

- Romero A. O., Huerta L. M., Damián H. M. A., Dominguez H. F. y Arellano V. D. A. 2009. "Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles". *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11:143-151.
- Rozy S., Rouf A. y Gupta U. (2017) Optimization of biogas production from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Journal of Applied and Natural Science* 9 (4): 2062 -2067.
- Saha, P., Alam, M.F., Baishnab, A.C., Khan, M.R., Islam, M.A., 2014. Fermentable sugar production and separation from water hyacinth using enzymatic hydrolysis. *Sustainable Energy* 2, 20–24.
- Saha, S.P., Mukherjee, D., Ghosh, S., 2012. Submerged cultivation of *Aspergillus flavus* xym4 with water hyacinth as substrate for production of a highly active, thermostable xylanase. *Ann. Biol. Res.* 3, 4884–4892.
- Samuels GJ. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*. 96(2):195–206.
- Sarath, G., Akin, D., Mitchell, R. & Vogel, K. 2008. Cell-wall composition and accessibility to hydrolytic enzymes is differentially altered in divergently bred switchgrass (*Panicum virgatum* L.) genotypes. *Appl Biochem Biotechnol*. Epub ahead of print, doi:10.1007/s12010-008-8168-5.
- Schuster A. y Schmoll M. (2010). "Biology and biotechnology of *Trichoderma*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87:787-799.
- Selig M, Knoshaug E, Adney W et al (2008) Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pre-treated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresour Technol* 99:4997–5005
- Selig, M. J., Knoshaug, E. P., Adney, W. S., Himmel, M. E., and Decker, S. R. (2008). "Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities," *Bioresour Technol*. 99(11), 4997- 5005.

- Shin, H. 2001. Performance of UASB Reactor treating leachate from acidogenic fermenter in the two-phase anaerobic digestion of food waste. *Water Research*. 35 (14), 3441–3447
- Sleat, R., Mah, R. (1987). “Hydrolytic bacteria”, en *Anaerobic digestion of biomass*. Editado por Chynoweth, D. Y y Isaacson, R. Elsevier applied science LTD.
- Stricker, A. R., Mach, R. L., and de Graaff, L. H. (2008). “Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*),” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78(2), 211-220.
- Sun Y. & Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresurce Technology*. 83: 1-11.
- Tchobanoglous, G., Theisen, H., & Vigil S.A. *Integrated Solid Waste Management* (international edition). 1993. New York: McGraw-Hill Inc.
- Tengerdy, R.P.; Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p.169-17.
- Teunissen, M. J. & Op den Camp, H. J. 1993. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 63, 63-76.
- Thamaraiselvi, P. L., and Jayanthi, P. (2012). “Preliminary studies on phytochemicals and antimicrobial activity of solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms.,” *Asian Journal of Plant Science and Research* 2(2), 115-122.
- Tovar, Xochitl; Tellez, Alejandro; López, Emma; Favela, Ernesto; Hernández, Ithzmalzin. (2017) Obtención de extractos celulolíticos a partir de *Pleurotus ostreatus* empleando como sustrato lirio acuático. *Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología*. Vol.1 No.1 26-34.
- Van Lier J.B. (2007) Current and future trends in anaerobic digestion: diversifying from waste(water) treatment to resource oriented conversion techniques. In: Proc. of the 11th IWA-International Conference on Anaerobic Digestion, Brisbane, September 23-27.

- Vavilin V., Fernandez B., Palatsi J., and Flotats X. 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management* 28 (6), 939-951
- Vavilin V., Rytov S. Ya L., Rintala J., And Lyberatos G., 2001. Simplified hydrolysis models for the optimal design of two-stage anaerobic digestion. *Water Resource* 35 (17), 4247–4251
- Veeken, A., Hamelers, B. (1999) Effect of temperature on hydrolysis rates of selectes biowaste components. *Bioresource technology*. Vol. 29, pag. 249-254.
- Vibrans H. 2009. Malezas de México. Pontederiaceae *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. Lirio acuático. Disponible en <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/pontederiaceae/eichhornia-crassipes/fichas/ficha.htm> (consultado el 10 de septiembre de 2019).
- Vijetha, P., Kumaraswamy, K., Prasanna Kumar, Y., Satyasree, N., and Siva Prasad, K. (2014). “Biosorption of Cu, Zn and Pb by *Eichhornia crassipes*: Thermodynamic and isotherm studies,” *International Journal of Scientific & Technology Research* 3(3), 439-443.
- Villamagna, A., and Murphy, B. (2010). “Ecological and socio-economic impacts of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): A review,” *Freshwater Biology* 55,282-298.
- Vizoná Liberato M, Cardoso Generoso W, Malagó W, Henrique-Silva F, Polikarpov I. (2012). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of endoglucanase III from *Trichoderma harzianum*. *Acta Crystallographica section F: structural biology and crystallization. Communications*. 68(Pt 3):306–9.
- Warnecke, F., Luginbuhl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T. H., Stege, J. T., Cayouette, M., McHardy, A. C., Djordjevic, G., Aboushadi, N. et al. 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a woodfeeding higher termite. *Nature*. 450, 560-5.

- Wilder, B. M. & Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls: IV. A structural comparison of the wall hemicellulose of cell suspension cultures of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiol.* 51, 889-893.
- Withers, S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym.* 44, 325-337.
- Yamamoto K., Akiba S., Kimura Y., Kumagai H. 1995. Purification and characterization of a protease - resistant cellulase from *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Bioeng.* 79 (2): 125-130.
- Yu H. y Fang H. 2002. Acidogenesis of dairy wastewater at various pH levels. *Water Science and Technology* (45) 201-206.
- Zhao, S., Liang, X., Hua, D., Ma, T., Zhang, H., 2011. High-yield cellulase production in solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* SEMCC-3.217 using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Afr. J. Biotechnol.* 10, 10178–10187.
- Zhaoxin L., Fengxia L., Mei L., Xiaomei B., Haizhen Z., Yi W. 2008. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF - 98. *Bioresource Technology.* 99: 5938 - 5941.

# CAPITULO 6

## 6. Anexos

### 6.1. Técnicas analíticas

#### 6.1.1. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) por el método de reflujo cerrado

Se determinó a partir del método colorimétrico (Standard Methods APHA., 2005). Para la realización de la técnica se ocuparon dos soluciones, la solución digestora y la solución de ácido sulfúrico con sulfato de plata.

#### I. Preparación de soluciones

##### 1. Solución digestora.

1. Se secaron en una caja de Petri 25 g de  $K_2CrO_7$  durante dos horas a  $105^\circ C$ , se enfrió en un desecador por 30 minutos y se pesaron 20 g.
2. Se pesaron 33.3 g de  $HgSO_4$ .
3. En una palangana con hielo se colocó un matraz aforado de 1 litro con una barra magnética y en agitación, se disolvió el dicromato de potasio en 500 mL de agua destilada,
4. Se Añadió bajo agitación el sulfato de mercurio (33.3 g), y se adiciono muy lentamente 167 mL de  $H_2SO_4$ .
5. Una vez enfriada la mezcla, se aforo el matraz a un litro con agua destilada.

##### 2. Solución de ácido sulfúrico con sulfato de plata.

1. Se Peso 5.5 g de sulfato de plata por cada Kg de  $H_2SO_4$ . Para calcular la cantidad exacta se consideró el peso específico y la pureza del ácido sulfúrico.
2. En un matraz aforado de 1 litro, se agregó una cuarta parte del total del ácido sulfúrico a utilizar (250 mL), así como el sulfato de plata, se dejó uno o dos días en agitación para que se disolviera el sulfato y después se completó el volumen al aforo con el ácido restante (750 mL).

## II. Preparación de la Curva patrón

Se prepararon 100 ml de una solución de glucosa anhidra con una concentración de  $1 \text{ gL}^{-1}$ .

Todas las muestras se prepararon por duplicado y se realizaron con base a la siguiente tabla.

**Tabla 15. Elaboración de la curva patrón de DQO**

Tubo	Solución de glucosa (mL)	Volumen de agua (mL)	Concentración de glucosa ( $\text{mgL}^{-1}$ )
0	0	2	0
1	0.2	1.8	100
2	0.4	1.6	200
3	0.6	1.4	300
4	0.8	1.2	400
5	1.0	1.0	500
6	1.2	0.8	600
7	1.4	0.6	700
8	1.6	0.4	800
9	1.8	0.2	900
10	2.0	0.0	1000

## III. Determinación de la curva patrón.

1. Se encendió el digestor portátil de DQO y se dejó calentar hasta alcanzar la temperatura adecuada ( $150 \text{ }^\circ\text{C}$ ).
2. Se marcaron correctamente los tubos para poder diferenciar cada una de las concentraciones y el blanco de la curva (tubo 0).
3. Con la micropipeta de  $1000 \text{ } \mu\text{L}$ , se tomaron las cantidades de agua y de la solución de glucosa que se señalan en la tabla y se depositaron en cada uno de los tubos HATCH. Se mezclaron en un vórtex.

4. Dentro de la campana de extracción se añadió 1.0 mL de la solución digestora y se mezcló en vórtex.
5. Se añadió lentamente en las paredes del tubo, 2.0 mL de la solución de ácido con plata.
6. Se taparon los tubos perfectamente y se homogeneizó la mezcla mediante agitación suave.
7. Se colocaron los tubos en el digestor portátil a 150 ° C durante 2 horas.
8. Transcurrido el tiempo, se sacaron del digestor, se pusieron en una gradilla y se dejaron enfriar.
9. Ya fríos los tubos se limpiaron perfectamente con un algodón humedecido en alcohol, se calibró el espectrofotómetro Génesis 10S marca Thermo Scientific con el blanco y las muestras se midieron a 620 nm.
10. Se desecharon las muestras después de ser leídas en el recipiente destinado para estos residuos.

#### **IV. Preparación de la muestra.**

Se tomó 1 g de la fracción sólida del lirio acuático y se macero agregando pequeñas cantidades de agua hasta obtener la muestra sólida, soluble, se filtró la muestra para eliminar los residuos sólidos y posteriormente la muestra fue aforada a 100 mL. Se realizaron las diluciones correspondientes para que los valores entraran en la curva. La cantidad de muestra para el análisis fue de 2 mL de muestra, 1 mL de solución digestora y 2 mL de ácido con sulfato de plata.

#### **6.1.2. Determinación de azúcares totales**

Para la determinación de la concentración de azúcares totales fue utilizado el método de fenol sulfúrico Dubois (1957), se realizó la curva estándar con una solución de glucosa a una concentración de 100 mg/L disolviendo 100 mg de glucosa en un matraz aforado de 1 L utilizando agua como disolvente. A partir de la solución patrón de glucosa se hicieron diferentes diluciones por duplicado como se indica en la tabla X. A cada tubo se le adicionó 1 mL de fenol al 5%, inmediatamente se agregó cuidadosamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado con sulfato de hidrazina (0.5%).

Se mezcló perfectamente y se dejó reposar 10 minutos. La absorbancia se midió a 490 nm en el espectrofotómetro Génesis 10S marca Thermo Scientific.

**Reactivos:**

**A.** Fenol 5%. Se pesaron 5 gramos de fenol (cristales), se diluyó y se aforó a 100 mL con agua destilada (coloración ligeramente amarillenta).

**B.** Ácido sulfúrico concentrado con 5 g de sulfato de hidrazina, se diluyó el sulfato de hidrazina en 1L de ácido sulfúrico concentrado.

**C.** Solución Estándar de azúcar 0.1 mg/ml (100 mg/L) se pesaron 0.1g de azúcar (sacarosa o glucosa) y se disolvió con agua destilada hasta un volumen de aforo de 1L.

**Curva Estándar para azúcares totales:**

A partir de la solución estándar (100 mg/L) de azúcar, se prepararon las muestras por duplicado y como indica la siguiente tabla.

**Tabla 16. Elaboración de la curva patrón de azúcares totales.**

Volumen del estándar (ml)	Volumen de agua (ml)	Concentración del Std. (mg/L)
0.00	1.0	0
0.20	0.8	20
0.40	0.6	40
0.60	0.4	60
0.80	0.2	80
1.00	0.0	100

A cada tubo se le adicionó 1.0 mL de fenol al 5%, se mezclaron inmediatamente y se le agregaron cuidadosamente 5mL de ácido sulfúrico concentrado. Se mezclaron

perfectamente y se dejaron reposar aproximadamente 30 minutos. La absorbancia se midió a 490 nm.

### **Preparación de la muestra.**

Se tomó 1 g de la fracción sólida del lirio acuático y se macero agregando pequeñas cantidades de agua hasta obtener la muestra sólida, soluble, se filtró la muestra para eliminar los residuos sólidos y posteriormente la muestra fue aforada a 100 mL. Se realizaron las diluciones correspondientes para que los valores entraran en la curva. La cantidad de muestra para el análisis fue de 1 mL, 1 mL de fenol y 5 mL de ácido con sulfato de plata.

### **6.1.3. Determinación de pH de la fracción sólida**

Se tomó 1 g de la fracción sólida del lirio acuático y se macero agregando pequeñas cantidades de agua hasta obtener la muestra sólida soluble, se filtró la muestra para eliminar los residuos sólidos y posteriormente la muestra fue aforada a 100 mL.

Se sumergió el electrodo en la muestra, registrar el valor mostrado en la pantalla del potenciómetro marca HANNA instruments HI 255; se enjuagó el electrodo con agua destilada y se secó cuidadosamente con un paño limpio. Posteriormente se colocó en una solución de pH 4.

### **6.1.4. Determinación de sólidos en la fracción sólida (bagazo).**

Se determinaron los sólidos totales, sólidos fijos, y sólidos volátiles, con el fin de conocer la cantidad de compuestos orgánicos (volátiles) e inorgánicos (fijos), en la fracción sólida de lirio acuático.

Los crisoles utilizados fueron puestos a peso constante en estufa a 105 °C, durante 2 horas y después colocados en un desecador durante 30 minutos, este procedimiento se repitió tres veces hasta llegar a un peso constante. Se pesaron 5 g de la muestra y fueron colocados de nuevo en la estufa a 105 °C por 2 horas, se dejaron enfriar en el desecador durante 30 minutos, se registró el peso (sólidos secos). Posteriormente se colocaron dentro de la mufla durante 30 minutos a 550 °C, después fueron colocados en estufa a 105°C durante 30 minutos pasado el

tiempo fueron colocados en el desecador por otros 30 minutos y se registró el peso de las cenizas (sólidos fijos). Los sólidos volátiles fueron calculados a partir de la diferencia de los sólidos totales menos los sólidos fijos.

#### **6.1.5. Determinación de las actividades enzimáticas.**

Las actividades enzimáticas se determinaron midiendo los azúcares reductores liberados de la hidrólisis, por el método de DNS (Miller 1960). Según el método, los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. Cuando el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él, se desarrolla un cambio de color parecido al café (con variaciones de amarillo hasta café). El cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica, leídas por espectrofotometría a una determinada longitud de onda. La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determina haciendo una interpolación con una curva patrón según el azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración.

#### **Cuantificación de las actividades enzimáticas.**

Preparación de la curva patrón

- En 1 tubo de ensayo se colocó 1 mL de solución de glucosa o dextrosa 5 mg/mL; posteriormente, se realizó una dilución en serie (de 5 mg/mL a 0.078 mg/mL) en el resto de los tubos y se agregaron 1.5 mL de reactivo de DNS.

Preparación del blanco:

- En 2 tubos de ensayo se agregó 1 mL de agua destilada y 1.5 mL de DNS a cada tubo.

Preparación de los sustratos:

- En 3 tubos de ensayo se añadieron 0.9 mL de sustrato de xilano de abedul (0.25% en buffer de acetatos), 1.5 mL de DNS y 0.1 mL de buffer de acetatos 0.1 M a pH =5.2.

- En 3 tubos de ensayo se pusieron 0.9 mL de sustrato de carboximetil celulosa (0.25% en buffer de acetatos), 1.5 mL de DNS y 0.1 mL de buffer de acetatos 0.1 M a pH =5.2.

Preparación de tubos control para los distintos tratamientos:

- Dependiendo del número de tratamientos se prepara un tubo de ensayo control que contiene 0.9 mL de buffer, 0.1 mL de extracto de la MF y 1.5 mL de DNS.

#### **Actividad de celulasas.**

1. Se colocaron tubos de ensayo en un baño con agua a 40 °C con 0.9 mL de sustrato de carboximetilcelulosa (0.25% p/v)
2. Cada 10 segundos se adicionaron 0.1 mL del extracto obtenido de la MF en el tubo correspondiente.
3. Se incubó por 30 min.

Posteriormente para detener la reacción se adicionó 1.5 mL de reactivo DNS cada 10 segundos a cada tubo, como en el punto 2. Esto para detener la reacción de los tubos en el mismo tiempo, es decir, después de los 30 min.

#### **Actividad de xilanasas**

1. Se colocaron tubos de ensayo en un baño con agua a 40 °C con 0.9 mL de sustrato de Xilano de abedul (0.25% p/v)
2. Cada 10 segundos se adicionaron 0.1 mL de extracto obtenido de la MF en el tubo correspondiente.
3. Se incubo por 15 min.
4. Para detener la reacción se adicionaron 1.5 mL de reactivo DNS cada 10 segundos a cada tubo, como en el punto 2. Esto para detener la reacción de los tubos en el mismo tiempo, es decir, después de los 30 min.

Posteriormente las muestras se incubaron en baño maría a ebullición durante 10 minutos, se dejaron enfriar con agua a contracorriente y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 640 nm.

La cuantificación se hizo considerando que una unidad de actividad enzimática (UI) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcares reductores por minuto bajo las condiciones de ensayo.

#### **6.1.6. Determinación de los ácidos grasos volátiles**

##### **Preparación de la muestra**

Primeramente las muestras (el lixiviado producido de la fermentación) se filtraron por medio de un matraz Kitasato con membranas de 55 mm en una bomba de vacío, posteriormente las muestras se pasaron por un segundo filtro, con una pirinola y membranas de 25 mm, esto para eliminar los sólidos provenientes de las muestras y tener muestras más puras, una vez obtenida las muestras filtradas, se realizaron diluciones correspondientes debido a que las muestras estaban muy concentradas; una vez realizada las diluciones, se agregaron 1 mL de las muestras en viales de 2 mL, posteriormente se le quitaron 50  $\mu$ L y se le agregaron 50  $\mu$ L de HCL al 50%, esto para protonar a los AGV presentes en la muestra, ya que estos se encuentran en forma de sales y tienen que ser convertidos a ácidos para una mayor volatilidad.

La determinación de los AGV se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases de la marca Agilent con las siguientes condiciones:

- Cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 7820A
- Temperatura del inyector: 200 °C
- Detector de ionización de flama (FID): 200 °C
- Fase móvil o gas acarreador: N<sub>2</sub>
- Columna capilar: HP-INNOWax
- Fase estacionaria: polietilenglicol
- Largo: 30 m
- Diámetro interno: 0.5 mm
- Espesor: 1.2  $\mu$ m
- Rampa de temperatura: 80°C por 1 min. 80 – 205°C a 25°C/min.
- Flujo de columna: 5 mL/min.in.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00272

Matrícula: 2173806063

Efecto de un pretratamiento enzimático en la hidrólisis y acidogénesis de la fracción sólida de lirio acuático.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 7 del mes de enero del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ERNESTO FAVELA TORRES  
DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ  
DR. QUENTIN PAUL CARBOUE  
DRA. REYNA ISABEL RODRIGUEZ PIMENTEL



FRANCISCO IGNACIO RAMIREZ ESTRADA  
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: FRANCISCO IGNACIO RAMIREZ ESTRADA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobador*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

VOCAL

DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ

VOCAL

DR. QUENTIN PAUL CARBOUE

SECRETARIA

DRA. REYNA ISABEL RODRIGUEZ PIMENTEL