

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE  
BIOMASA RESIDUAL HORTÍCOLA PRETRATADA EN UN  
SISTEMA DE MACERACIÓN ENZIMÁTICO**

**RUFFO ALEJANDRO RAMÍREZ REYES**

**TRABAJO DE GRADO**

**MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE PROCESOS Y SISTEMAS  
INDUSTRIALES**

**PhD. YINETH PIÑEROS CASTRO**

**DIRECTORA**

**PhD. IVÁN CABEZA ROJAS**

**CODIRECTOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA  
UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO**

**BOGOTÁ D.C.**

**2021**

# EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE BIOMASA RESIDUAL HORTÍCOLA PRETRATADA EN UN SISTEMA DE MACERACIÓN ENZIMÁTICO

Ruffo Alejandro Ramírez Reyes<sup>1\*</sup>, Iván Orlando Cabeza Rojas<sup>2</sup>, Yineth Piñeros Castro<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup> Departamento de Ingeniería, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Cra. 4 No. 22-61, Bogotá D. C., Colombia. CP 011110

<sup>2</sup> División de Ingenierías, Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Santo Tomás, Cra. 9 N.º 51-11, Bogotá D. C., Colombia. CP 083060

\*Correo electrónico: ruffoa.ramirezr@utadeo.edu.co

## RESUMEN

Los residuos agrícolas son biomasa lignocelulósica con gran potencial en la obtención de biogás, la cual se ve limitada por su estructura compleja de celulosa, hemicelulosa y lignina. Debido a esto, es necesario hacer una serie de pretratamientos que faciliten su obtención. Particularmente los residuos hortícolas se generan en grandes cantidades, debido a que aproximadamente el 30% de la cosecha se pierde en los procesos de adecuación para la comercialización de los productos. En este trabajo, se estudió el efecto del pretratamiento de maceración enzimática continua a residuos de biomasa hortícola provenientes de la Sabana de Bogotá-Colombia, con el fin de mejorar la obtención de biogás mediante digestión anaerobia. Se utilizaron residuos de hortalizas de hoja (lechuga y espinaca) y como inóculo contenido ruminal bovino, con 84,38%SV y 78,56 %SV respectivamente. Para realizar el tratamiento enzimático, se diseñó y construyó un sistema de maceración enzimático (SME), al cual ingresa el slurry de residuos vegetales junto con las enzimas celulasas, para generar un slurry vegetal tratado que fue utilizado como sustrato en la evaluación de la producción de biogás. En esta primera etapa se evaluó el efecto de la carga enzimática ( $C_E$ ) en el SME sobre la producción de azúcares reductores. En la segunda etapa se evaluó el efecto de la  $C_E$  y la carga orgánica ( $C_O$ ) sobre la producción de biogás en biodigestores batch. El SME tuvo un efecto significativo en la obtención de azúcares reductores, alcanzando un aumento cercano al 50% con un valor de  $8,5 \text{ g}_{Glucosa} \cdot 100 \text{ gSV}^{-1}$ , utilizando una  $C_E$  de 40 und de celulasa. Por otro lado, en la segunda etapa, se encontraron bajos niveles en la producción de metano debido a la rápida acidificación del material vegetal en el proceso de digestión. Debido a la disminución del pH en el proceso de digestibilidad, se obtuvo un bajo potencial bioquímico, siendo su máxima producción de  $0,534 \text{ mL}_{CH_4} \cdot \text{gSV}^{-1}$  a una  $C_O$  de 4gSV/L y una  $C_E$  de 30und de celulasa.

**Palabras clave:** Digestión anaerobia, inóculo, contenido ruminal, carga enzimática, carga orgánica, slurry.

## INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por la generación de desechos residuales agroindustriales provenientes de sus procesos productivos es una problemática mundial que se le atribuye al mal procesamiento y disposición final de los mismos. Según las evaluaciones agropecuarias realizadas por el Ministerio de Agricultura en la sabana de Bogotá-Cundinamarca, se estima que, en los municipios aledaños se producen 727 Ton/día de residuos orgánicos sin una adecuada disposición, debido a que el 65% de los residuos van a depósitos sanitarios y que el otro 35% se utiliza para diversos fines (AGRONET, 2014). Los altos costos de disposición de los residuos agroindustriales debe ser asumido por las diferentes industrias que lo generan, convirtiéndolo en un problema tanto ambiental como económico. Adicionalmente, no se cuenta con información del aprovechamiento de biomasa residual para la producción de biogás en la región.

El Departamento Nacional de Planeación de Colombia tenía el propósito para el 2018, que el 20% de los residuos fueran aprovechados incentivando el reciclaje y a su vez como alternativa de remediación

ambiental, pero sólo se ha alcanzado un 17% (Peñaranda et al., 2017). Por lo que se hace necesario estudiar e implementar alternativas que permitan mitigar la problemática ambiental mencionada. Por otro lado, la demanda energética ha incrementado con el paso del tiempo y seguirá aumentando considerablemente debido a la urgencia de las naciones por garantizar el desarrollo socioeconómico. Esto ha agotado en abundancia las fuentes energéticas tradicionales y ha ocasionado un incremento alarmante de las emisiones de CO<sub>2</sub> (AGRONET, 2014; Hernández y Rodríguez, 2013).

Una solución al problema de disposición de residuos orgánicos generados por industrias agropecuarias es su uso en la producción de biogás, debido a que puede ser utilizado en la obtención de energía eléctrica y calor, siendo una energía alternativa, que puede generar un impacto positivo en el ambiente representado en la disminución de gases efecto invernadero y contribuyendo en el aumento de la matriz energética del país. No obstante, el país no ha incursionado a fondo en su producción y hay escasez de tecnologías para este fin (Tobares y Petrotecnia, 2013; Hernández et al., 2014).

Particularmente, la implementación de tecnologías que permitan darle un alto valor agregado a la biomasa residual está subvalorada y permitiría entre muchos beneficios, que las fincas de la región de la Sabana de Bogotá puedan generar energía que puede ser utilizada en sus propias actividades (Lansing et al., 2008; Muñoz et al., 2018), tales como cocina y calefacción de cultivos y granjas pecuarias en las temporadas más frías del año. De acuerdo con Varnero (2011), el biogás en su composición se conforma entre un 50-70% de metano (CH<sub>4</sub>) y aporta un poder calorífico de entre 6000 y 6500 Wh m<sup>-3</sup>, el biogás es especialmente prometedor como alternativa energética para países en desarrollo (Martí-Herrero et al., 2014; Pérez et al., 2014).

Específicamente, los desechos agrícolas procedentes de cultivos hortícolas son biomasa disponible que puede ser utilizada como sustrato en la digestión anaeróbica. Sin embargo, su aprovechamiento se ve limitado por la fuerte asociación de sus componentes de celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales, se encuentran asociados dentro de una matriz compleja unida por fuerzas covalentes y no covalentes. Por esta razón, es necesario realizar pretratamientos a la biomasa con el fin de mejorar la disponibilidad a azúcares simples y obtener altos rendimientos de biogás a un bajo costo energético (Pérez et al., 2002; Tobares y Petrotecnia, 2013; Zhu y Pan, 2010). La sabana de Bogotá tiene una producción total de hortalizas de 22265 Ton/año, siendo los principales productores Zipaquirá y Sibate que debido a su altitud y bajas temperaturas ocasiona pérdidas de producto de entre un 30 y 50% (AGRONET, 2014; DANE, 2002), equivalentes a pérdidas en un rango de 6680 y 11133 Ton/año.

En los sistemas de producción de biogás, la digestión anaerobia de un sustrato orgánico se asemeja al tracto digestivo de los rumiantes, la cual se lleva a cabo mediante microorganismos anaeróbicos como bacterias celulolíticas presentes en su contenido ruminal que descomponen la celulosa y demás polisacáridos en acetatos, además contiene bacterias metanogénicas las cuales convierten parte de los acetatos en metano y dióxido de carbono (Budiyono et al., 2009). Los inóculos como el estiércol y contenido ruminal hacen parte importante en la cinética del proceso de producción de biogás (Luengo y Alvarez, 1988), por ende el contenido ruminal es un inóculo apropiado para la digestibilidad, ya que el uso de este aumenta la tasa de producción de biogás en una segunda o tercera parte respecto al blanco (Budiyono et al., 2014). El rumen de las vacas específicamente es mejor que otros contenidos ruminales debido a que presenta más complejos extracelulares multienzimáticos para hidrolizar la biomasa lignocelulósica para la producción de biogás (Xing et al., 2020).

En este proyecto se evaluó la producción de biogás a partir de residuos hortícolas pretratados en un sistema de maceración enzimático continuo, diseñado y construido para tal fin.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Este trabajo de investigación se realizó en 5 etapas; 1) Diseño y construcción del SME, 2) Diagnóstico de la generación de residuos hortícolas en la Sabana de Bogotá, 3) Acondicionamiento y caracterización de la biomasa y del inóculo, 4) Evaluación del SME, Estudio del efecto de la C<sub>E</sub> sobre la producción de azúcares reductores, 5) Evaluación de la producción de biogás a partir de residuos hortícola pretratados enzimáticamente.

### **Diseño y construcción del sistema de maceración enzimático (SME)**

Se realizó el diseño y construcción de un equipo para la realización de un tratamiento de maceración enzimática que involucra tratamiento mecánico mediante el paso de la biomasa por un tornillo sin fin (husillo) asistido por un motorreductor. Para el tratamiento enzimático se utilizó la enzima comercial Celluclast 1,5L-15 FPU/g Slurry. Para el diseño del husillo se modificó la metodología usada por Ramos de Valle (2000), donde con base en el diseño de un extrusor, se adoptaron los parámetros ángulo del filete, paso de rosca y se fijaron las variables de longitud del husillo, longitud de la aleta, diámetro de raíz y el perfil de la rosca. Se diseñaron dos juegos de piñones en el SME con diferentes relaciones, lo que permitió tener dos velocidades en el equipo. Posterior al diseño del equipo se procedió a la construcción de este utilizando materiales de bajo costo.

### **Diagnóstico de la generación de residuos hortícolas en la Sabana de Bogotá**

Se realizó análisis de la producción anual de productos hortícolas en la Sabana de Bogotá, según la información suministrada por CORABASTOS (2015) y DANE (2002), se analizaron los datos mensuales y se estimó la generación de residuos.

### **Acondicionamiento y caracterización de la biomasa y del inóculo**

La biomasa residual hortícola (lechuga y espinaca en relación 3:1) se recolectó en el Centro de Bio-Sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano sede Chía, la cual fue lavada y troceada en un homogeneizador para la obtención de un slurry vegetal, el cual se conservó en refrigeración previo a su caracterización y uso en las pruebas de producción de biogás. Se utilizó como inóculo el contenido ruminal bovino procedente del Frigorífico Los Cristales de Mosquera-Cundinamarca. Tanto en el slurry como el inóculo se determinó el porcentaje de humedad (%H), sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) mediante método modificado "Total, Fixed, and Volatile Solids in Solid and Semisolid Samples" de APHA (2005), se secaron los crisoles en una mufla a 550°C durante 20 minutos, se conservaron en desecador hasta temperatura ambiente y se determinó su masa, posteriormente se tomaron aproximadamente 7 g de muestra iniciales y se pusieron a secar a 103-105°C hasta que la diferencia del valor de su masa fue menor a 50 mg, estos datos permitieron el cálculo de la humedad. Posteriormente se llevaron a una mufla a 550°C durante dos horas, luego se llevaron los crisoles al desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesaron. El %H, %ST y %SV de la muestra se determinaron como lo indica las ecuaciones 1-3 respectivamente, siendo; A, el peso de la muestra seca a 103-105°C más el crisol; B, el peso del crisol; C, peso de la muestra inicial y D, el peso final del crisol después de ignición a 550°C. Se realizó el experimento por triplicado y se determinó su promedio, desviación estándar y su coeficiente de variación.

$$\%H = \left( \frac{(C - B) - (A - B)}{C - B} \right) * 100 \quad (1)$$

$$\%ST = \left( \frac{A - B}{C - B} \right) * 100 \quad (2)$$

$$\%SV = \left( \frac{A - D}{A - B} \right) * 100 \quad (3)$$

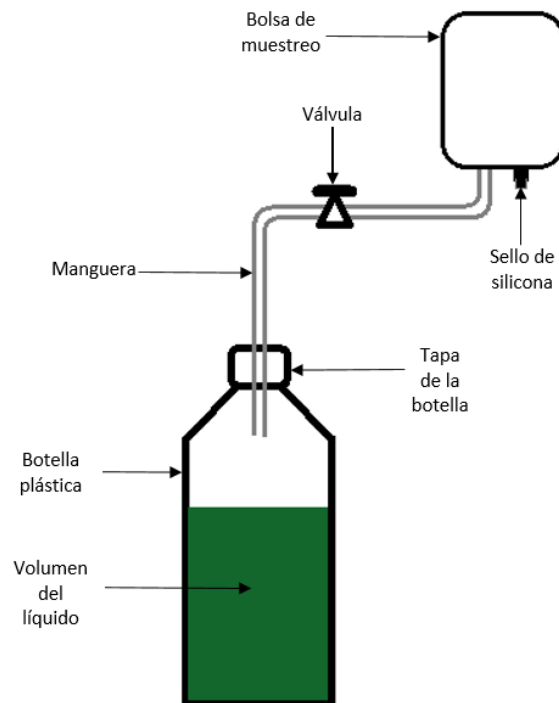
### **Evaluación del sistema de maceración enzimática (SME), Estudio del efecto de la C<sub>E</sub> sobre la producción de azúcares reductores**

La evaluación del proceso de maceración enzimática del sustrato en el SME sobre la producción de azúcares reductores se determinó variando las condiciones de proceso de C<sub>E</sub> de las enzimas comerciales Celluclast 1,5L-15 Und/g Sustrato, en el rango de (0, 20, 40 y 60 Und/g). La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 50°C. El análisis de los azúcares se realizó antes y después del tratamiento, para lo cual se generó un extracto centrifugando las muestras a 2000 rpm durante 30 minutos para recuperar el sobrenadante de cada una. La determinación de azúcares reductores se realizó utilizando el método DNS propuesto por Miller

(1959), determinando la absorbancia a 575 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific, Evolution 300). Se realizaron las pruebas por triplicado y se determinó su promedio, desviación estándar y su coeficiente de variación.

### **Evaluación de la producción de biogás a partir de residuos hortícolas pretratados enzimáticamente**

En la etapa de producción de biogás a partir de residuos hortícolas, se desarrolló un diseño experimental factorial  $2^2$ , utilizando la metodología de superficie de respuesta con cuatro repeticiones en el punto central, estudiando el efecto de la  $C_E$  en una dosis de (20-60 Und/g) y la  $C_O$  de slurry vegetal a una concentración de (2-10gSV/L). La biodigestión se realizó en botellas plásticas de 600 mL de capacidad con un volumen de líquido del 80% de su capacidad (Figura 1). Los biodigestores se burbujearon con nitrógeno previo al ensayo, para garantizar la digestión anaeróbica. Las variables de respuesta fueron: composición de metano (% $CH_4$ ), dióxido de carbono (% $CO_2$ ), volumen de biogás y metano, el potencial bioquímico de metano (PBM) expresado como mL $CH_4$ /gSVañadidos y el pH final. El volumen y composición del biogás se determinó mediante un sensor Biogás5000 (LANDTEC). Se realizó un análisis estadístico mediante el software DESIG-EXPERT V11. El diseño experimental arrojó 12 experimentos (Tabla 3) con 3 controles sin tratamiento enzimático para un total de 15 experimentos que se realizaron por duplicado. El proceso de digestión anaerobia se llevó a cabo mediante pruebas batch bajo condiciones mesofílicas (35-38°C), a una relación sustrato/inóculo (S/X) en SV de 3 y en un tiempo de retención de 33 días.



*Fig. 1 Esquema configuración pruebas batch.*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Sistema de maceración enzimático (SME)

Para la construcción del SME se procedió al diseño del husillo como se ilustra en la Figura 2, y su posterior construcción en acero inoxidable. El husillo es el encargado del transporte y mezclado del slurry vegetal, por lo cual se decidió elaborar canales a lo largo de la aleta del mismo con el fin de maximizar la eficiencia de mezclado y aumentar el tiempo de retención dentro del equipo. El husillo tiene una longitud de 500mm de los cuales en los primeros 265mm la aleta tiene 8 canales, en la parte central de 95mm se adaptaron 4 canales, la parte final con 140mm tiene 2 canales y se incorporó una salida cónica de 22mm de longitud. La aleta de geometría cuadrada consta de un perfil de rosca con una altura de 3mm y un ancho de 3mm. El ángulo de filete del husillo es de  $26,6^\circ$  con un paso de rosca de 25mm.

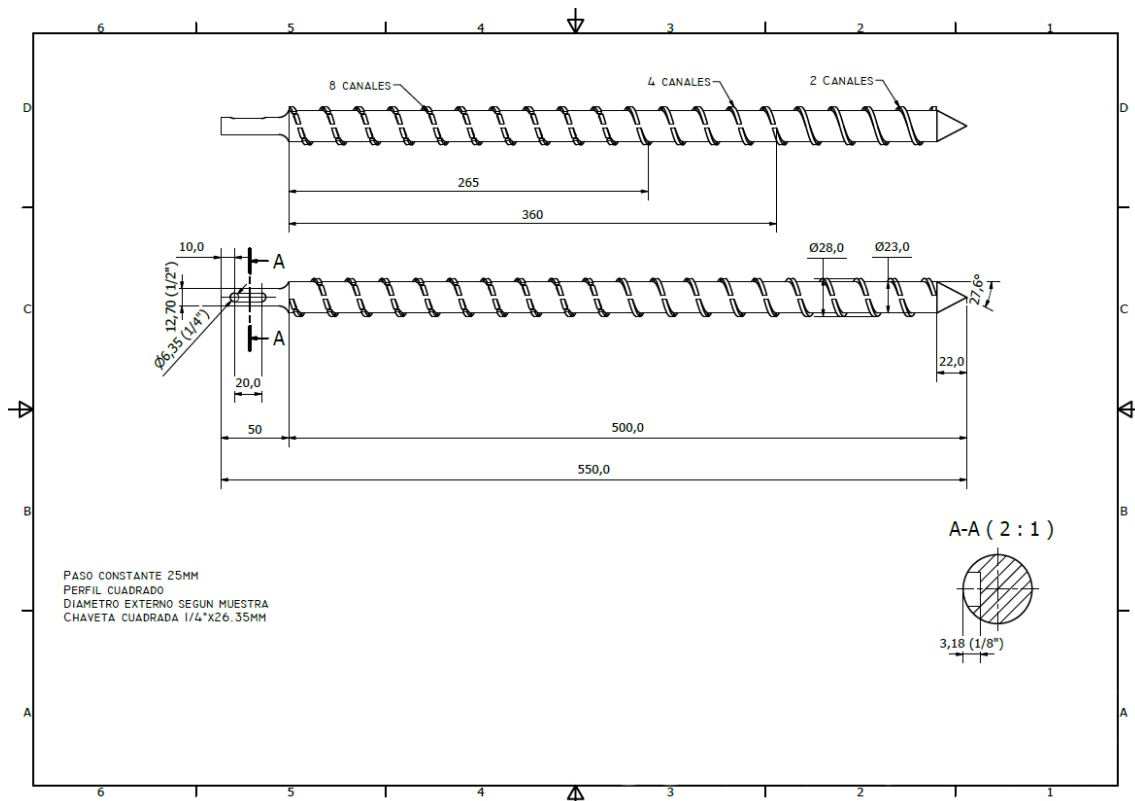
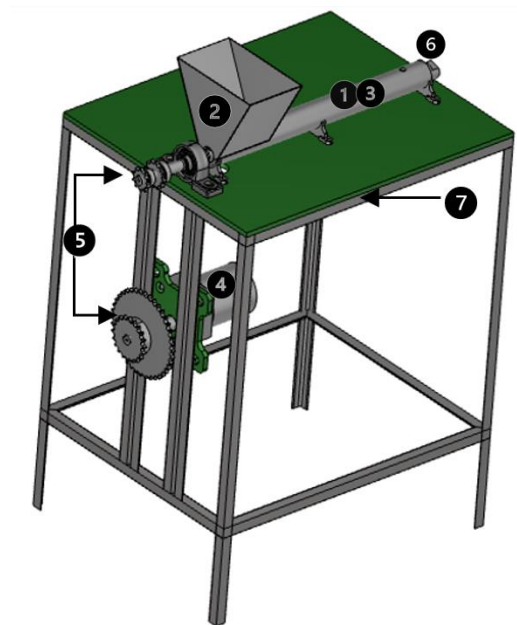


Fig. 2 Plano diseño del husillo.

El diseño del SME se realizó en el software AUTODESK Inventor como se ilustra en la Figura 3, el cual consta de; (1) husillo de transporte y mezclado; (2) una tolva de alimentación, por la que ingresa el material vegetal y enzimas; (3) una chaqueta de calentamiento que trabaja por flujo de agua caliente en paralelo, el cual proporciona la temperatura óptima requerida por las enzimas ( $50^\circ\text{C}$ ); (4) un motorreductor que suministra potencia al equipo; (5) dos juegos de piñones con diferentes relaciones, los cuales proveen al equipo velocidades distintas; (6) una boquilla de salida del slurry vegetal tratado; (7) la estructura de soporte. La construcción del SME se realizó en acero inoxidable y el resultado final se ilustra en la Figura 4. El motorreductor tiene una potencia de  $\frac{1}{4}$  HP y una velocidad de salida de 100 rpm. Los dos juegos de piñones tienen relaciones de 3:5 y 2:5 para unas velocidades finales de 60 y 40 rpm respectivamente, siendo esta última la trabajada a lo largo del presente trabajo.



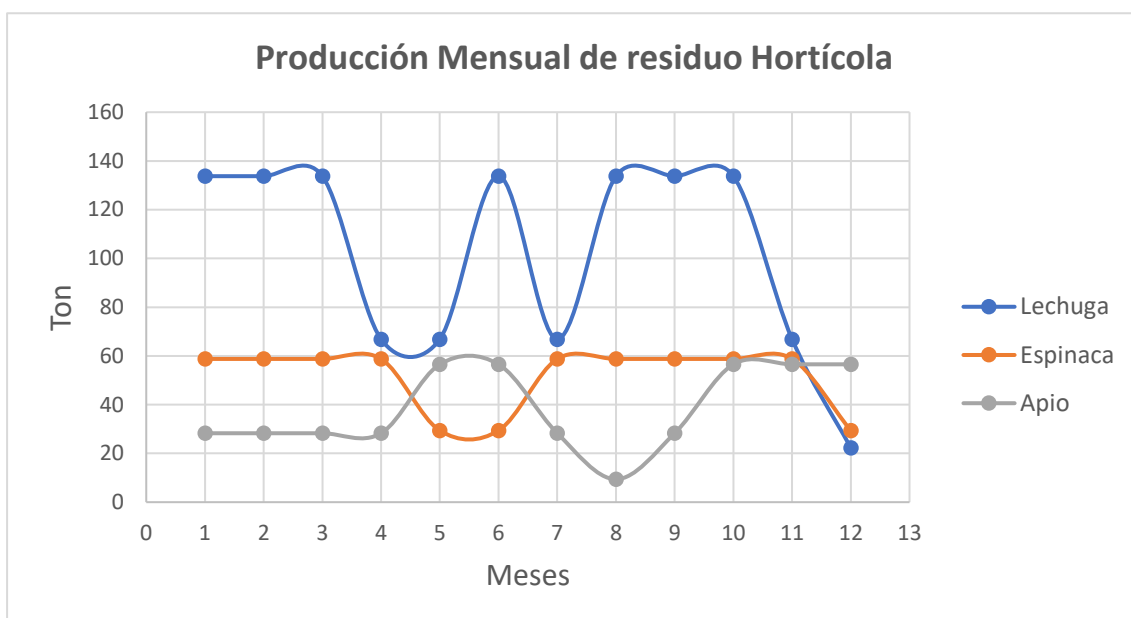
*Fig. 3 Plano 3D diseño del SME.*



*Fig. 4 Reporte fotográfico del SME.*

### **Selección de los residuos hortícolas**

La lechuga, la espinaca y el apio son tres de las hortalizas con mayor producción en la sabana de Bogotá, con una producción anual de 4086,7 - 2056,7 y 1539,6 toneladas respectivamente (DANE, 2002). La Figura 5 ilustra la producción mensual de residuos de hortícolas generados en el año 2015. La lechuga y la espinaca tienen la más alta producción en la mayor parte del año; los residuos generados por estas hortalizas son aproximadamente 1844 toneladas por año, las cuales constituyen el 30% de la producción y tienen un potencial importante en la producción de biogás.



*Fig. 5 Producción mensual de residuo de las hortalizas de lechuga, espinaca y apio.*

Considerando los niveles de producción de lechuga y espinaca, este trabajo se realizó utilizando una relación lechuga-espinaca de 3:1, guardando la relación del nivel de producción de estas hortalizas.

#### **Caracterización de slurry vegetal e inóculo**

En la Tabla 1 se encuentran los datos de la caracterización del slurry vegetal de lechuga-espinaca y el inóculo de contenido ruminal utilizado en esta investigación.

*Tabla 1. Resultados caracterización slurry vegetal e inóculo.*

MUESTRA	%Humedad (%H)	%Sólidos totales (%ST)	%Sólidos volátiles (%SV)
<b>Slurry Vegetal</b>	91,82 ± 0,15	8,18 ± 0,15	84,38 ± 0,84
<b>Inóculo</b>	94,49 ± 0,22	5,51 ± 0,22	78,56 ± 0,43

Los valores de la caracterización de residuos de comida, entre los cuales se encuentran residuos de frutas y vegetales son similares a los reportados por Gonçalves Neto et al. (2021), Li et al. (2018), Kostenberg y Marchaim (1993) y Kafle et al. (2014). Relacionado con la caracterización del contenido ruminal utilizado como inóculo, presenta valores similares al estudio realizado por Sánchez et al. (2015), donde se obtuvo valores de 83,66%H - 16,34%ST y un 80,89%SV. Otros valores se reportan en los estudios de Budiyo et al. (2009) y Ozbayram et al. (2018).

## Evaluación del sistema de maceración enzimático

En la Tabla 2, se presentan los resultados obtenidos en las pruebas realizadas en el SME a diferentes dosis de enzimas; se encontró que la dosis de las enzimas tiene un efecto significativo sobre la generación de azúcares ( $p < 0.05$ ) y en general un efecto positivo del tratamiento enzimático realizado en el SME. Se obtuvo la mayor producción de  $7,22 \text{ g Glucosa} * 100 \text{ g MSS}^{-1}$  con una  $C_E$  de 40 Unidades de celulasas, lo cual representa un incremento del 48% respecto al blanco. No se encontraron diferencias significativas entre las dosis de 40 y 60 Unidades.

**Tabla 2.** Efecto de la carga enzimática sobre la producción de azúcares reductores.

CARGA ENZIMÁTICA [Und]	AZÚCARES REDUCTORES		
	$\frac{[g \text{ Glucosa}]}{[L \text{ extracto}]}$	$\frac{[g \text{ Glucosa}]}{[100 \text{ g MSS}]}$	$\frac{[g \text{ Glucosa}]}{[100 \text{ g SV}]}$
0	11,466 ± 0,615	3,739 ± 0,201	4,431 ± 0,238
20	18,959 ± 0,499	6,183 ± 0,163	7,327 ± 0,193
40	22,055 ± 1,015	7,192 ± 0,331	8,523 ± 0,392
60	21,834 ± 0,965	7,121 ± 0,315	8,438 ± 0,373

MSS: Masa seca de slurry, SV: Sólidos volátiles.

La eficiencia de la hidrólisis es baja considerando la recalcitrancia de los materiales lignocelulósicos y alta resistencia a la degradación enzimática (Galbe & Zacchi, 2012). La evaluación realizada por Procentese et al. (2017) donde se realiza un pretratamiento alcalino e hidrólisis enzimática con celulasa Cellic CTec 2 a residuos de lechuga, determinó que el efecto de la enzima incrementa la producción de azúcares y posterior producción de bio-butanol. En estudios realizados por Martínez et al. (2017) sobre la influencia de pretratamientos biológicos por medio de la celulasa ZY-maXX-XL200 a residuos lignocelulósicos de sorgo, girasol, maíz, malanga y residuos de pan, se obtuvieron rendimientos más altos en la hidrólisis y producción de biogás en los ensayos con tratamiento enzimático. También se han realizado tratamientos enzimáticos a residuos de papel de oficina y desechos municipales, con lo cual se mejoró la producción de azúcares en la hidrólisis en un 94% y posterior obtención de biogás (Tahezadeh & Karimi, 2008). Adicionalmente, la evaluación de un pretratamiento enzimático realizada por Ziemiński et al. (2012) a pulpa y residuos de remolacha, evidenció que el pretratamiento mejoró la producción de azúcares en un 88,9% y 59,4% respectivamente, maximizando la producción de biogás. Un pretratamiento enzimático utilizado por Wang et al. (2018) de la celulasa proveniente de *Aspergillus Níger* para sustrato de rastrojo de maíz afectando significativamente la producción de biogás, aumentando su rendimiento en un 36,9%.

## Producción de biogás a partir de residuos hortícola pretratados enzimáticamente

Los datos del volumen y composición de biogás producido, así como el potencial bioquímico de metano y pH final de los biodigestores se reportan en la Tablas 3.

**Tabla 3.** Resultados ejecución experimental producción de biogás.

EXP	VALORES CODIFICADOS		VALORES EXPERIMENTALES		VARIABLES DE RESPUESTA				
	C <sub>E</sub>	C <sub>O</sub>	C <sub>E</sub> [Und]	C <sub>O</sub> [ $\frac{gSV}{L}$ ]	% CH <sub>4</sub>	Volumen [mL]		PBM [ $\frac{mLCH_4}{gSV}$ ]	pH <sub>f</sub>
						Biogás	CH <sub>4</sub>		
1	0	1,41	40	11,66	0,2	183,52	0,37	0,066	2,88
2	0	0	40	6	0,12	295,62	0,35	0,205	3,26
3	-1,42	0	11,6	6	0,2	190,94	0,38	0,133	3,49
4	0	0	40	6	0,2	183,42	0,37	0,127	3,21
5	-1	-1	20	2	0,2	256,21	0,51	0,534	5,55
6	0	0	40	6	0,2	174,17	0,35	0,121	3,25
7	-1	1	20	10	0	238,33	0	0	2,72
8	0	-1,41	40	0,34	0	196,53	0	0	5,31
9	1	-1	60	2	0,1	196,07	0,20	0,204	3,14
10	1	1	60	10	0	218,99	0	0	2,81
11	1,41	0	68,2	6	0	222,75	0	0	2,94
12	0	0	40	6	0,2	171,42	0,34	0,119	3,29

C<sub>E</sub>: Carga Enzimática, C<sub>O</sub>: Carga Orgánica, CH<sub>4</sub>: Metano, PBM: Potencial Bioquímico de Metano, pH<sub>f</sub>: pH final.

Se realizó un análisis para el volumen de metano ( $V_{CH_4}$ ) y pH<sub>f</sub>. Las respuestas se ajustaron bien a modelos polinomiales de tercer orden representados en las ecuaciones 4 y 5. El modelo de  $V_{CH_4}$  ajustó bien debido a que la variable de regresión que mide la cantidad de reducción en la variabilidad dada por el R<sup>2</sup> es de 0,9826 y un R<sup>2</sup> ajustado de 0,9594, lo que nos indica que el modelo explica un 98,26% de la variabilidad de las respuestas (X. Wang et al., 2018). De igual forma sucedió para el modelo de pH<sub>f</sub> con un valor de R<sup>2</sup> de 0,9695 y un R<sup>2</sup> ajustado de 0,9390. Las variables de regresión de los modelos estadísticos se recopilan en la Tabla 4.

$$\sqrt{V_{CH_4}} = \beta_1 + \beta_2 C_E + \beta_3 C_O + \beta_4 C_E C_O + \beta_5 C_E^2 + \beta_6 C_O^2 + \beta_7 C_E^2 C_O + \beta_8 C_E C_O^2 + \beta_9 C_O^3 \quad (4)$$

$$\text{siendo: } \beta_1 = -1,9317; \beta_2 = 0,0739; \beta_3 = 1,3743; \beta_4 = -0,0144; \beta_5 = -8,46 * 10^{-4}; \\ \beta_6 = -0,2189; \beta_7 = 8,87 * 10^{-5}; \beta_8 = 6,83 * 10^{-4}; \beta_9 = 0,0101$$

$$pH_f = \beta_1 + \beta_2 C_E + \beta_3 C_O + \beta_4 C_E C_O + \beta_5 C_O^2 + \beta_6 C_E^2 C_O + \beta_7 C_E^3 + \beta_8 C_O^3 \quad (5)$$

$$\text{siendo: } \beta_1 = 4,1229; \beta_2 = 0,0600; \beta_3 = 0,0181; \beta_4 = -0,0145; \beta_5 = -0,0460; \\ \beta_6 = 2,48 * 10^{-4}; \beta_7 = 1,9 * 10^{-5}; \beta_8 = 3,589 * 10^{-3}$$

En los análisis de varianzas ANOVA se muestra que el modelo tiene valores de probabilidad muy bajos ( $P \leq 0,0001$ ) para todos los valores F de las respuestas como lo reporta la Tabla 4, demostrando que los modelos de regresión en ambos casos son altamente significativos, en adición, los coeficientes de determinación ajustada (R<sup>2</sup> ajustado) defienden la alta significancia de los modelos (Muñoz et al., 2009). La capacidad predictiva de los modelos (R<sup>2</sup> predicho) son útiles, ya que explica gran porcentaje de los datos en comparación con los datos originales.

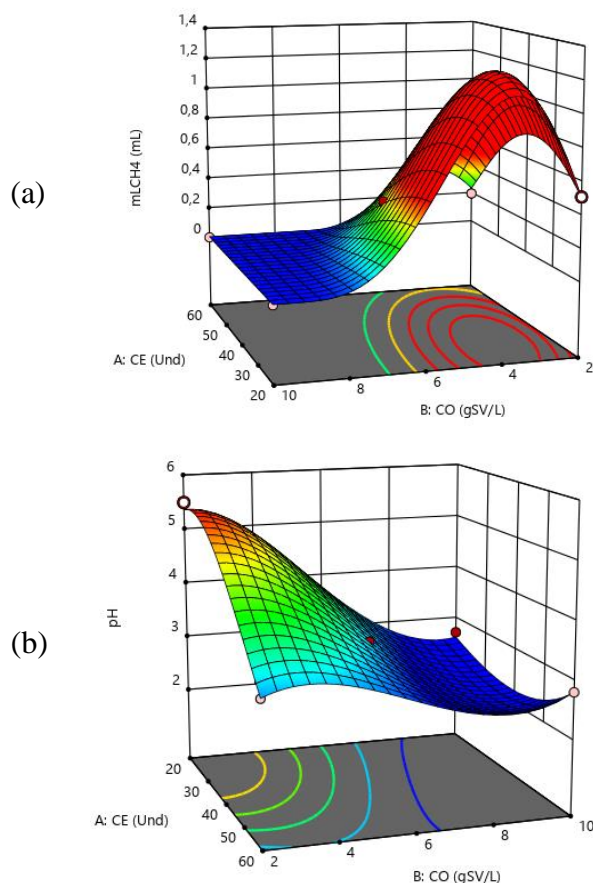
**Tabla 4.** ANOVA variables de regresión modelo cubico reducido

Variable de Regresión	Variable de respuesta	
	$pH_f$	$V_{CH_4}$
Valor F	31,80	42,37
Valor p - Modelo	< 0,0001	0,0001
Valor p - $C_O$	0,0006	< 0,0001
Valor p - $C_E$	0,0006	< 0,0001
Media	3,45	0,3643
$R^2$	0,9695	0,9826
$R^2$ ajustado	0,9390	0,9594
$R^2$ predicho	0,6064	0,7282
Precisión adecuada	18,7685	15,2375

$V_{CH_4}$ : Volumen de Metano,  
 $C_O$ : Carga orgánica,  $C_E$ : Carga enzimática.

Por otro lado, en la Figura 6a se evidencia el comportamiento de las variables  $C_O$  y  $C_E$  sobre el proceso de producción de metano en mL metano, determinando que la mayor producción se presenta a bajas concentraciones de materia orgánica y baja dosificación enzimática, siendo el punto máximo de 1,25 mL a una  $C_O$  de 4gSV/L y una  $C_E$  de 30 unidades de celulasas. A esta misma condición se obtiene PBM de 0,534  $mL_{CH_4} \cdot gSV^{-1}$  correspondiente a una producción de biogás de 267 mL.

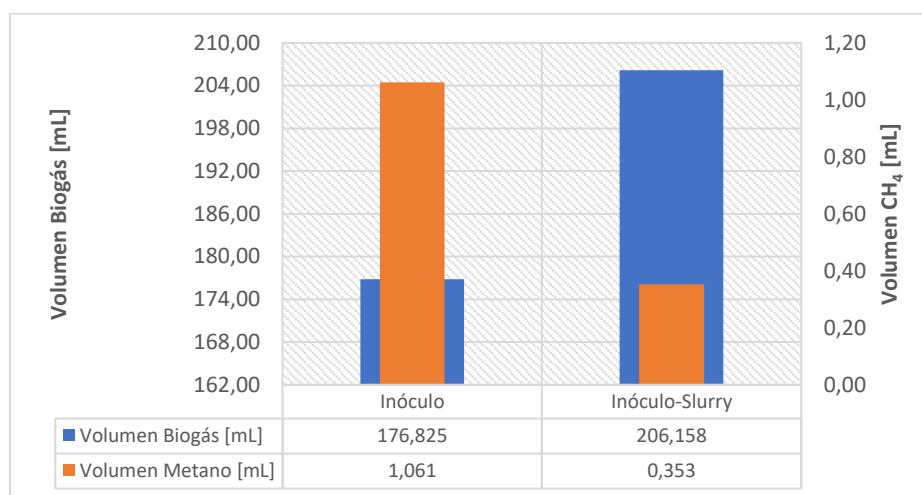
La superficie de respuesta representada en la Figura 6b muestra el efecto de la  $C_O$  y  $C_E$  sobre el pH final después de los 33 días de fermentación. Al aumentar los SV y la concentración de enzima en el sistema, el pH disminuye lo que lo convierte en un ambiente ácido que inhibe la actividad microbiana metanogénica del inóculo. Las bacterias metanogénicas son de crecimiento lento y sensibles a bajos valores de pH, causante de inhibición de la metanogénesis debido a la disminución en la producción de acetatos y toxicidad de los ácidos en la fermentación, conjuntamente la generación excesiva de ácidos grasos disminuye la metanogénesis ya que favorece la vía metabólica del hidrógeno (Carmona et al., 2005; Nguyen et al., 2019). El descenso del pH a valores inferiores de 6, es causa de que el biogás generado sea pobre en metano y así mismo, tenga menores cualidades caloríficas (Varnero, 2011). En el estudio realizado por Xing et al. (2020) se determinó que la baja concentración de pH y la alta producción de ácidos grasos volátiles (AGV) inhibieron los microbios ruminales tanto de vaca como de oveja, disminuyendo la biodegradación de residuos de comida y paja de maíz en la fermentación, generando una disminución en la producción de metano y un aumento en la producción de  $CO_2$ . Nguyen et al. (2019) refiere en su estudio la caída de pH a la inhibición hidrolítica y acidógena dada por bacterias de este género presentes en el líquido ruminal, ocasionando un incremento en la producción de AGVs y una disminución en la producción de biogás en comparación con inóculo de lodos anaerobios. El inóculo de lodos anaerobios en algunos casos contiene mayor cantidad de bacterias metanogénicas que en líquidos ruminales, debido a que en algunos rumiantes es mayor la presencia de bacterias hidrolíticas y acidogénicas que las metanogénicas consecuencia de la absorción del animal (Patra et al., 2017).



**Fig.6** Superficies de respuesta: Carga Orgánica y Carga Enzimática sobre las variables de respuesta

La Figura 7 muestra el efecto del inóculo (líquido ruminal bovino) y su mixtura con el slurry hortícola sobre la producción de biogás y metano, se realizó una comparación del punto central de  $C_0$  del diseño experimental con y sin slurry de hortalizas. Se trabajó la prueba de solo inóculo a una  $C_0$  de 2gSV/L y la prueba slurry-inóculo a una  $C_0$  de 6gSV/L y 2gSV/L respectivamente. Se observa que la sola presencia de biomasa vegetal disminuye de forma drástica la producción de metano así presente mayor cantidad de SV totales. A pesar de que presentan valores similares en la producción de biogás, se determinó que la mezcla slurry-inóculo produce una menor cantidad de metano que la generada por el inóculo de manera independiente, concluyendo que la adición de slurry hortícola disminuye el pH creando un ambiente ácido que causa inhibición de las metanogénesis como también se evidenció en el análisis de superficie de respuesta en la Figura 6b. El estudio realizado por Aybek y Üçok (2017) sobre la producción de biogás y metano a partir de residuos de frutas y vegetales mediante método batch Hohenheim a una relación S/X de 1, determinó que los residuos de lechuga generaron los valores más bajos en la producción de metano y biogás respecto a otros residuos, obteniendo valores de  $290 \text{ mL}_{CH_4} \cdot \text{gSV}^{-1}$  y  $536 \text{ mL}_{\text{Biogás}} \cdot \text{gSV}^{-1}$  respectivamente. Unas de las razones por las que la producción de metano disminuye con la adición del slurry vegetal al inóculo es la rápida acidificación del material vegetal causando inhibición de la metanogénesis como lo reportó Kafle et al. (2014) en su estudio de digestión anaeróbica batch de residuos de col China con estiércol de cerdo, determinando que al añadir más cantidad de SV del material vegetal se disminuyó el pH final y posterior producción de metano. En adición, las bajas concentraciones de hemicelulosa en la biomasa y la baja relación SV/ST y C/N conlleva a una baja producción de metano, como en el estudio realizado por Yan et al. (2017), donde reportó bajas relaciones C/N para la espinaca y lechuga de 7,96 y 8,68 respectivamente, lo que afectó la producción de metano obteniendo valores de  $157,55 \text{ mL}_{CH_4} \cdot \text{gSV}^{-1}$  para la espinaca y  $198,89 \text{ mL}_{CH_4} \cdot \text{gSV}^{-1}$  para la lechuga. La alta tasa de producción de AGVs conduce a la acumulación inhibitoria de la metanogénesis, provocando una caída en el nivel de pH como se evidenció en el estudio de Chanakya et al. (2009), en el cual la digestión anaerobia de residuos

vegetales como repollo generó concentraciones más altas de  $\text{CO}_2$  que de  $\text{CH}_4$ , con concentraciones de metano menores al 1%, lo que indicó un estancamiento de metanogénesis debido a una sobrecarga de AGVs en el proceso ocasionando que el PBM no se pudiera cuantificar. La estabilidad del pH en rangos neutros de entre 6,5 y 7,5 es de suma importancia en la generación de metano del proceso de digestión anaerobia. En el presente trabajo se observó una disminución de los niveles de pH al incrementar los valores de  $C_O$  y  $C_E$  como se reflejó en el estudio de Uma et al. (2013), donde la caída de pH causa de un incremento en la tasa de  $C_O$  dio como resultado una alta concentración de AGVs durante la fase de acidogénesis.



**Fig.7** Efecto del slurry e inóculo sobre la producción de biogás y metano

## CONCLUSIONES

Se determinó que el sistema de maceración enzimático permitió la realización de un tratamiento mecánico-enzimático que causó un efecto positivo en la hidrólisis, aumentando la producción de azúcares reductores, ya que se obtuvieron incrementos 1,5 veces más altos comparado con el control. El análisis de varianza determinó que las variables  $C_O$  y  $C_E$  asociadas en los modelos de superficie de respuesta, tuvieron efectos significativos sobre las variables de respuesta: pH final y volumen de biogás y metano, en este caso incrementando la producción de biogás, pero a muy bajas concentraciones de metano debido a la disminución del pH, generando un ambiente ácido que inhibió las reacciones metanogénicas desfavoreciendo la producción de metano en el proceso. Se comprobó que la biomasa hortícola trabajada proveniente de lechuga-espina a una relación de 3, desfavoreció la producción de metano debido a la rápida acidificación del material vegetal en el proceso de digestión, favoreciendo la vía metabólica del hidrógeno y reacciones acidogénicas que sobrecargaron el proceso e inhibieron la metanogénesis. En las pruebas del efecto del slurry de hortalizas sobre el inóculo determinó que la sola presencia del slurry disminuyó de forma drástica la producción de metano en la digestión. El incremento en la  $C_O$  como en la  $C_E$  disminuye la producción de metano debido la disminución del pH en la digestión anaerobia. La mayor producción de metano se presenta a bajas concentraciones de materia orgánica y baja dosificación enzimática, siendo el punto máximo de 1,25 mL a una  $C_O$  de 4gSV/L y una  $C_E$  de 30 unidades de celulasas. A esta misma condición se obtiene PBM de  $0,534 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gSV}^{-1}$  correspondiente a una producción de biogás de 267 mL. Aunque la producción de metano fue baja, el sustrato fue fermentable generando buenas cantidades de  $\text{CO}_2$ . Se recomienda realizar estudios relacionados con la evaluación del proceso de AGVs, probar un proceso de codigestión con otro sustrato y evaluar la calidad del digestato para su posible uso como biofertilizante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRONET. (2014). Evaluaciones Agropecuarias Municipales. *Sistema de Estadísticas Agropecuarias, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*.
- APHA. (2005). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater* (23rd ed.). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Aybek, A., & Üçok, S. (2017). Determination and evaluation of biogas and methane productions of vegetable and fruit wastes with Hohenheim Batch Test method. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 10(4), 207–215. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20171004.2864>
- Budiyono, B., Widiyasa, I. N., Johari, S., & Sunarso, S. (2014). Increasing Biogas Production Rate from Cattle Manure Using Rumen Fluid as Inoculums. *International Journal of Science and Engineering*, 6(1), 31–38. <https://doi.org/10.12777/ijse.6.1.31-38>
- Budiyono, Widiyasa, I. N., Johari, S., & Sunarso. (2009). Influence of inoculum content on performance of: Anaerobic reactors for treating cattle manure: Using rumen fluid inoculum. *International Journal of Engineering and Technology*, 1(3), 109–116.
- Carmona, J., Bolívar, D., & Giraldo, L. (2005). El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1), 49–63.
- Chanakya, H. N., Sharma, I., & Ramachandra, T. V. (2009). Micro-scale anaerobic digestion of point source components of organic fraction of municipal solid waste. *Waste Management*, 29(4), 1306–1312. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.09.014>
- CORABASTOS. (2015). *Plan estratégico de manejo de residuos sólidos*. Bogotá.
- DANE. (2002). *Censo hortícola de la Sabana de Bogotá - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*.
- Galbe, M., & Zacchi, G. (2012). Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 46, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.026>
- Gonçalves Neto, J., Vidal Ozorio, L., Campos de Abreu, T. C., Ferreira dos Santos, B., & Pradelle, F. (2021). Modeling of biogas production from food, fruits and vegetables wastes using artificial neural network (ANN). *Fuel*, 285(August 2020), 119081. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119081>
- Hernández, M., & Rodríguez, M. (2013). Hydrogen production by anaerobic digestion of pig manure: Effect of operating conditions. *Renewable Energy*, 53, 187–192. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2012.11.024>
- Hernández, M., Rodríguez, M., & Yves, A. (2014). Use of coffee mucilage as a new substrate for hydrogen production in anaerobic co-digestion with swine manure. *Bioresource Technology*, 168, 112–118. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.02.101>
- ICBF. (2018). Tabla de composición de alimentos colombianos. *Tabla de Composición de Alimentos Colombianos*.
- Kafle, G. K., Bhattarai, S., Kim, S. H., & Chen, L. (2014). Anaerobic digestion of Chinese cabbage waste silage with swine manure for biogas production: Batch and continuous study. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 35(21), 2708–2717. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.919033>
- Kostenberg, D., & Marchaim, U. (1993). Anaerobic digestion and horticultural value of solid waste from manufacture of instant coffee. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 14(10), 973–980. <https://doi.org/10.1080/09593339309385372>

- Lansing, S., Viquez, J., Martínez, H., Botero, R., & Martin, J. (2008). Quantifying electricity generation and waste transformations in a low-cost, plug-flow anaerobic digestion system. *Ecological Engineering*, 34(4), 332–348. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2008.09.002>
- Li, W., Loh, K. C., Zhang, J., Tong, Y. W., & Dai, Y. (2018). Two-stage anaerobic digestion of food waste and horticultural waste in high-solid system. *Applied Energy*, 209, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.05.042>
- Luengo, P. L., & Alvarez, J. M. (1988). Influence of temperature, buffer, composition and straw particle length on the anaerobic digestion of wheat straw-Pig manure mixtures. *Resources, Conservation and Recycling*, 1(1), 27–37. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(88\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0921-3449(88)90005-5)
- Martí-Herrero, J., Chipana, M., Cuevas, C., Paco, G., Serrano, V., Zymla, B., ... Gamarra, A. (2014). Low cost tubular digesters as appropriate technology for widespread application: Results and lessons learned from Bolivia. *Renewable Energy*, 71, 156–165. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2014.05.036>
- Martínez, C. M., Oechsner, H., García, Y., & López, L. (2017). Study of Enzymes Pre-Treatments in Biomasses Dedicated to Biogas Production. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 26(2), 55–64.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Muñoz, J., Camargo, D., & Gallego, D. (2009). Response surface methodology application in a CO2 absorption process from biogas into an alkaline solution. *DYNA (Colombia)*, 76(159), 135–144.
- Muñoz, S., Suárez, I., Rojas, I., & Hernandez, M. (2018). *Evaluación del potencial energético de pollinaza y residuos de poscosecha de rosas mediante co-digestión anaerobia*. Facultad de ingeniería ambiental, Universidad Santo tomas (USTA), Universidad EAN.
- Nguyen, L. N., Nguyen, A. Q., Johir, M. A. H., Guo, W., Ngo, H. H., Chaves, A. V., & Nghiem, L. D. (2019). Application of rumen and anaerobic sludge microbes for bio harvesting from lignocellulosic biomass. *Chemosphere*, 228, 702–708. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.159>
- Nguyen, L. N., Nguyen, A. Q., & Nghiem, L. D. (2019). Microbial Community in Anaerobic Digestion System: Progression in Microbial Ecology. En *Energy, Environment, and Sustainability* (pp. 331–355). Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3259-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3259-3_15)
- Ozbayram, E. G., Akyol, ç, Ince, B., Karakoç, C., & Ince, O. (2018). Rumen bacteria at work: bioaugmentation strategies to enhance biogas production from cow manure. *Applied Microbiology*, 124(2), 491–502. <https://doi.org/10.1111/jam.13668>
- Patra, A., Park, T., Kim, M., & Yu, Z. (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
- Peñaranda, L., Montenegro, S., & Giraldo, P. (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2), 141–150.
- Pérez, I., Garfí, M., Cadena, E., & Ferrer, I. (2014). Technical, economic and environmental assessment of household biogas digesters for rural communities. *Renewable Energy*, 62, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.07.017>
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>

- Procentese, A., Raganati, F., Olivieri, G., Elena Russo, M., & Marzocchella, A. (2017). Pre-treatment and enzymatic hydrolysis of lettuce residues as feedstock for bio-butanol production. *Biomass and Bioenergy*, 96, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.11.015>
- Ramos, L. (2012). *Extrusión de plásticos : principios básicos*. (LIMUSA S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores, Ed.). Limusa.
- Sánchez, L., Laines, J., & Sosa, J. (2015). Producción De Biogás Por Medio De La Co-Digestión Anaerobia Con Excretas De Ganado Vacuno, Lodo Y Contenido Ruminal. *ASOCIACIÓN MEXICANA DE INGENIERÍA CIENCIA Y GESTIÓN AMBIENTAL, A.C. AMICA*, (2010), 55–57.
- Taherzadeh, M., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), 1621. <https://doi.org/10.3390/IJMS9091621>
- Tobares, L., & Petrotecnia. (2013). La importancia y el futuro del biogás en la Argentina. *Petrotecnia*, 1–7.
- Uma, R., Adish, S., Kaliappan, S., Yeom, I. T., & Rajesh, J. (2013). Impacts of microwave pretreatments on the semi-continuous anaerobic digestion of dairy waste activated sludge. *Waste Management*, 33(5), 1119–1127. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.01.016>
- Varnero, M. (2011). *MANUAL DE BIOGÁS*. (M. de Energía, GEF, PNUD, & FAO, Eds.) (FAO). Recuperado de <http://www.fao.org/3/as400s/as400s.pdf>
- Wang, S., Li, F., Wu, D., Zhang, P., Wang, H., Tao, X., ... Nabi, M. (2018). Enzyme Pretreatment Enhancing Biogas Yield from Corn Stover: Feasibility, Optimization, and Mechanism Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(38), 10026–10032. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03086>
- Wang, X., Zhang, C., Lin, Q., Cheng, B., Kong, F., Li, H., & Ren, J. (2018). Solid acid-induced hydrothermal treatment of bagasse for production of furfural and levulinic acid by a two-step process. *Industrial Crops and Products*, 123(June), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.064>
- Xing, B. S., Cao, S., Han, Y., Wang, X. C., Wen, J., & Zhang, K. (2020). A comparative study of artificial cow and sheep rumen fermentation of corn straw and food waste: Batch and continuous operation. *Science of the Total Environment*, 745, 140731. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140731>
- Yan, H., Zhao, C., Zhang, J., Zhang, R., Xue, C., Liu, G., & Chen, C. (2017). Study on biomethane production and biodegradability of different leafy vegetables in anaerobic digestion. *AMB Express*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0325-1>
- Zhu, J. Y., & Pan, X. J. (2010). Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology*, 101(13), 4992–5002. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.11.007>
- Ziemiński, K., Romanowska, I., & Kowalska, M. (2012). Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production. *Waste Management*, 32(6), 1131–1137. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.01.016>