



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE INGENIERÍA

TESIS

“VALORIZACIÓN DEL BAGAZO DE MALTA PARA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS  
MEDIANTE DIGESTIÓN ANAEROBIA Y COMPARACIÓN CON SU DIGESTATO  
PARA CULTIVO DE *PLEUROTUS OSTREATUS*”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA EN SISTEMAS ENERGÉTICOS SUSTENTABLES

PRESENTA

MARLEM MORQUECHO PEDRAZA

ASESOR

DR. BERND WEBER

COASESOR

MTRO. ISRAEL GUSTAVO REYES REYES

Toluca, Estado de México.

## RESUMEN

El bagazo de malta es un subproducto orgánico de la industria cervecera que se origina constantemente y puede ser destinado a la producción de biogás por medio de la digestión anaerobia. El residuo en estado semilíquido es llamado digestato, si el bagazo o digestato de malta no tienen un trato adecuado provocan contaminación al medio ambiente.

Emplear la parte sólida del digestato al igual que el bagazo en actividades acordes con el desarrollo sustentable mediante la valorización de dichos residuos es un tema de interés actual por lo cual surge la necesidad de investigar sus propiedades y con ello determinar el proceso productivo al que se pueden incluir.

En el presente trabajo se evaluó la estabilidad de la digestión anaerobia para la producción de biogás con bagazo de malta por medio de parámetros como características del sustrato, la carga orgánica, así como el análisis del pH, AGV's y nitrógeno amoniacal presentes en el digestato; concentración de sólidos volátiles removidos, producción de biogás y concentración de metano en el biogás.

Se caracterizó el bagazo y digestato de malta mediante un análisis de nitrógeno total, carbono orgánico, relación Carbono/Nitrógeno (C/N), pH, humedad, contenido de elementos traza y tamaño de partícula, además, se sometieron a un cultivo experimental de *P. ostreatus* con la finalidad de determinar su valorización en dicha actividad.

Por su parte la digestión anaerobia empleando como sustrato bagazo de malta presentó una tendencia creciente en la concentración de parámetros inhibitorios del proceso tales como AGV'S, nitrógeno amoniacal y pH, estos comportamientos contraproducentes se pueden corregir al someter al bagazo de malta a un pretratamiento que facilite su degradación y combinarlo con materia prima que mejore su relación C/N y pH.

Durante la operación del digester se observaron dos inhibiciones causadas por sobrecargas en el suministro de materia orgánica, una producción promedio de

biogás (en condiciones estandar) entre 300-354 ml-biogás/g-ST alimentado y un 41-49% de metano.

El análisis de las propiedades químicas del bagazo y digestato de malta revelaron su rico contenido de nitrógeno, apto para fungir como mejorador de sustratos deficientes en dicho nutriente.

Aunque ninguno de los sustratos de interés para la investigación presentó fructificaciones de hongos setas a causa de una baja relación Carbono/Nitrógeno y a un tamaño de partícula pequeño, se observó una mejora en el valor del pH del digestato en comparación al bagazo, así como la ausencia de plagas y contaminantes en su fase de incubación y producción por lo que la digestión anaerobia es un proceso que mejora las propiedades del bagazo para su uso como sustrato en el cultivo de *P. ostreatus*.

# CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS .....	iv
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Planteamiento del problema.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Objetivos.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Objetivo general.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
<b>1.3 Hipótesis.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Justificación.....</b>	<b>5</b>
<b>2 MARCO REFERENCIAL.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Valorización de los residuos.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2 Bagazo de malta.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Digestato de malta.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Digestión anaerobia.....</b>	<b>9</b>
2.4.1 Hidrólisis.....	10
2.4.2 Acidogénesis.....	11
2.4.3 Acetogénesis.....	11
2.4.4 Metanogénesis.....	12
2.4.5 Biodigestores.....	12
<b>2.5 Parámetros de operación.....</b>	<b>13</b>
2.5.1 Carga orgánica.....	13
2.5.2 Composición química de los sustratos.....	14
2.5.3 Temperatura.....	15
2.5.4 pH.....	16
2.5.5 Ácidos grasos volátiles (AGV's).....	16
2.5.6 Nitrógeno amoniacal.....	17
2.5.7 Concentración de sólidos totales y volátiles.....	17
2.5.8 Producción de Biogás.....	18
<b>2.6 Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>2.7 Evaluación del Cultivo de <i>P. ostreatus</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>2.8 Sustrato.....</b>	<b>25</b>
2.8.1 Propiedades físicas.....	25

2.8.2	Propiedades químicas .....	26
2.8.3	Propiedades biológicas .....	26
2.8.4	Tipos de sustratos .....	26
2.9	Sustrato para <i>Pleurotus</i> .....	27
2.9.1	Nitrógeno .....	27
2.9.2	Relación Carbono/Nitrógeno (C/N) .....	28
2.9.3	pH .....	29
2.9.4	Humedad.....	29
2.9.5	Elementos traza .....	29
2.9.6	Tamaño de partícula .....	30
2.10	Sustratos empleados para el cultivo de <i>P. ostreatus</i> .....	31
2.10.1	Bagazo de malta .....	32
2.10.2	Digestato de malta .....	33
3	MÉTODOS.....	34
3.1	Digestión anaerobia del bagazo de malta .....	34
3.1.1	Carga orgánica.....	34
3.1.2	pH .....	35
3.1.3	Ácidos grasos volátiles (AGV's) .....	35
3.1.4	Nitrógeno amoniacal .....	35
3.1.5	Producción de biogás .....	35
3.1.6	Concentración de sólidos volátiles .....	36
3.1.7	Concentración de metano en el biogás.....	36
3.2	Caracterización de los sustratos.....	37
3.3	Cultivo experimental .....	39
3.3.1	Preparación del sustrato.....	39
3.3.2	Siembra .....	39
3.3.3	Incubación y fructificación .....	40
3.3.4	Cosecha .....	41
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
4.1	Digestión anaerobia del bagazo de malta .....	42
4.1.1	Carga orgánica.....	42
4.1.2	pH en la digestión anaerobia .....	48
4.1.3	Ácidos Grasos Volátiles .....	49

4.1.4	Nitrógeno amoniacal .....	51
4.1.5	Concentración de sólidos volátiles .....	52
4.1.6	Producción de biogás .....	53
4.1.7	Concentración de metano en el biogás.....	57
4.2	Caracterización de los sustratos.....	60
4.2.1	Nitrógeno .....	60
4.2.2	Carbono orgánico y relación Carbono/Nitrógeno (C/N).....	61
4.2.3	pH .....	62
4.2.4	Tamaño de partícula .....	63
4.2.5	Características del bagazo de malta en la digestión anaerobia .....	63
4.2.6	Características del bagazo y digestato de malta en el cultivo de <i>P. ostreatus</i> .....	64
4.2.7	Elementos traza .....	67
4.2.8	Elementos traza en el bagazo y digestato de malta para el cultivo de <i>P. ostreatus</i> .....	67
4.2.9	Elementos traza en el bagazo de malta para digestión anaerobia.....	67
4.3	Cultivo experimental .....	68
4.3.1	Humedad.....	68
4.3.2	Incubación, fructificación y cosecha .....	69
5	CONCLUSIONES.....	74
6	RECOMENDACIONES .....	76
7	REFERENCIAS DE CONSULTA .....	77
9	ANEXOS.....	82
	Anexo 1: Determinación de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's) por destilación .....	82
	Anexo 2: Determinación del Nitrógeno amoniacal.....	83
	Anexo 3: Determinación de nitrógeno total por el método Kjeldahl. ....	84
	Anexo 4: Estandarización del Hidróxido de Sodio (NaOH).....	87

## ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS

Tabla 2.1 Características del bagazo de malta medida sobre ST .....	15
Tabla 2.2 Características del bagazo de malta.....	18
Tabla 2.3 Potencial del biogas y materia orgánica removida durante la digestión anaerobia del bagazo de malta.....	19
Tabla 2.4 Taxonomía del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	23
Tabla 2.5 Sustratos y sus características.....	29
Tabla 2.6 Propiedades de la fibra de kenaf y su combinación con otros sustratos en la producción de <i>P. ostreatus</i> .....	32
Tabla 2.7 Características y parámetros de producción de <i>P. ostreatus</i> con diferentes sustratos.....	32
Tabla 2.8 Propiedades del digestato de malta .....	33
Tabla 4.1 Parámetros de producción de biogás medidos durante la digestión anaerobia del bagazo de malta.....	56
Tabla 4.2 Parámetros de producción de metano durante el periodo estable de la digestión anaerobia.....	60
Tabla 4.3 Tamaño de malla a la que fueron cribados los sustratos.....	63
Tabla 4.4 Características analizadas y recomendadas en el bagazo de malta.....	63
Tabla 4.5 Contenido de minerales (g/kg) sobre ST en los sustratos.....	67
Tabla 4.6 Concentración de nutrientes en el reactor.....	68
Figura 2.1 Esquema del proceso para obtener el bagazo de malta.....	7
Figura 2.2 Esquema general del proceso para obtener digestato de malta.....	9
Figura 2.3 Diagrama de la digestión anaerobia.....	10
Figura 2.4 Esquema general de las partes de un hongo .....	20
Figura 2.5 Ciclo de reproducción sexual de <i>P. ostreatus</i> .....	21
Figura 2.6 Hongo seta con sus partes principales .....	22
Figura 2.7 Efecto del contenido de nitrógeno sobre la eficiencia biológica .....	28
Figura 4.1 Carga orgánica en la digestión anaerobia entre los días 23 y 102 (DA1).....	44
Figura 4.2 Tasa de carga orgánica entre los días 23 y 102 (DA1).....	44
Figura 4.3 Tiempo de retención hidráulico entre los días 23 y 102 (DA1).....	45
Figura 4.4 Carga orgánica en la digestión anaerobia entre los días 139 y 269 (DA2). .....	45
Figura 4.5 Tasa de carga orgánica entre los días 139 y 269 (DA2).....	46
Figura 4.6 Tiempo de retención hidráulica entre los días 139 y 269 (DA2).....	46
Figura 4.7 Carga orgánica en la digestión anaerobia entre los días 324 y 351 (DA3). .....	47
Figura 4.8 Tasa de carga orgánica ente los días 324 y 351 (DA3).....	47
Figura 4.9 Tiempo de retención hidráulico ente los días 324 y 351 (DA3). .....	48
Figura 4.10 pH durante la digestión anaerobia del día 45 al día 118. ....	49
Figura 4.11 pH durante la digestión anaerobia entre los días 120 y 311.....	49
Figura 4.12 AGV's durante la digestión anaerobia entre los días 1 y 105 (DA1). .....	50
Figura 4.13 AGV's durante la digestión anaerobia entre los días 148 y 310 (DA2). .....	51
Figura 4.14 Nitrógeno amoniacal durante la digestión anaerobia entre los días 50 y102 (DA1). .....	52

Figura 4.15 Nitrógeno amoniacal durante la digestión anaerobia entre los días 154 y 290 (DA2).	52
Figura 4.16 Porcentaje de Sólidos volátiles removidos.	53
Figura 4.17 Producción diaria de biogás durante la digestión anaerobia.	54
Figura 4.18 Producción diaria de biogás durante la digestión anaerobia por volumen del biodigestor.	55
Figura 4.19 Producción de biogás por gramo de ST alimentado	55
Figura 4.20 Producción de biogás por gramo de SV alimentado.	56
Figura 4.21 Concentración de metano en el biogás.	57
Figura 4.22 Producción diaria de metano durante la digestión anaerobia	58
Figura 4.23 Producción diaria de biogás durante la digestión anaerobia por volumen del biodigestor	58
Figura 4.24 Producción de metano por gramo de ST alimentado.	59
Figura 4.25 Producción de metano por gramo de SV alimentado.	59
Figura 4.26 Porcentaje de Nitrógeno total en los sustratos.	61
Figura 4.27 Porcentaje de Carbono orgánico en los sustratos	61
Figura 4.28 Relación C/N en los sustratos	62
Figura 4.29 pH en los sustratos	62
Figura 4.30 Características de los sustratos analizados.	64
Figura 4.31 Características de los sustratos analizados (continuación)	65
Figura 4.32 Porcentaje de humedad en los sustratos	69
Figura 4.33 Parámetros de evaluación del cultivo experimental	70
Foto 2.1 Bagazo de malta.	6
Foto 2.2 Parte sólida del digestato de malta.	8
Foto 2.3 Fructificación de <i>P. ostreatus</i> .	22
Foto 3.1 Bolsas de almacenamiento de biogás y columna de agua usada para medir la producción de biogás.	36
Foto 3.2 FTIR empleado para determinar la concentración de metano en el biogás.	37
Foto 3.3 Sustratos empleados durante el método de investigación. De izquierda a derecha, bagazo de malta, digestato de malta y rastrojo de maíz	38
Foto 3.4 Área en que se realizó la siembra, esterilizada por medio de dos mecheros bunsen.	40
Foto 3.5 Inóculo utilizado para el cultivo.	40
Foto 3.6 Módulo de incubación y fructificación.	41
Foto 3.7 Muestras en fase de incubación.	41
Foto 3.8 Fructificación del hongo seta lista para ser cosechada.	41
Foto 4.1 Grumos formados por las partículas de los sustratos, a la izquierda bagazo de malta y a la derecha digestato de malta	66
Foto 4.2 Sustratos colonizados por <i>P. ostreatus</i> .	71
Foto 4.3 Malla mosquitera rodeando el cultivo de <i>P. ostreatus</i>	71
Foto 4.4 Primordios en el rastrojo de maíz y bagazo de malta	72
Foto 4.5 Sustratos durante la fase de incubación y fructificación.	73



## 1 INTRODUCCIÓN

El fundamento principal de esta investigación es la valorización del bagazo y digestato de malta como sustratos para la producción de biogás mediante la digestión anaerobia y la producción del hongo comestible *P. ostreatus* con la finalidad de reducir el impacto ambiental que la incorrecta disposición de dichos residuos pueda ocasionar.

Un correcto proceso de digestión anaerobia trae beneficios como la producción de biogás que puede usarse como fuente de energía y la conversión de la materia orgánica en un mejorador de suelos (bioabono). El presente trabajo muestra las características del bagazo de malta y cómo se comportan los parámetros de operación al emplearlo como sustrato, pues de estas características y parámetros depende la calidad de los productos de la digestión anaerobia (biogás y bioabono).

Referente a la utilización del bagazo y digestato de malta para la producción de hongo seta se analizaron las características de los materiales debido a que el sustrato elegido para el cultivo de *P. ostreatus* es un factor importante en el correcto desarrollo del hongo, en este sentido también se realizó un cultivo experimental para determinar si es posible utilizar dichos materiales en la producción del hongo comestible.

En el capítulo 2 se abordan las cuestiones teóricas que sustentan el análisis del presente trabajo de investigación como lo son los fundamentos de la digestión anaerobia y sus parámetros de operación. A su vez se analizan las propiedades del sustrato que influyen en la calidad de la producción del hongo seta y cómo se evalúa dicha calidad de producción.

El capítulo 3 contiene los métodos empleados para realizar el monitoreo de los parámetros de operación de la digestión anaerobia del bagazo de malta, la determinación de las características del bagazo y digestato de malta y el cultivo de *P. ostreatus*.

En el capítulo 4 se presentan los valores medidos para cada uno de los parámetros de operación monitoreados durante la digestión anaerobia del bagazo

de malta, las características físicas y químicas que presentaron el bagazo y digestato de malta, así como el resultado obtenido en el cultivo experimental de *P. ostreatus*.

El capítulo 5 hace referencia a la relación que tuvieron los parámetros de operación con el desarrollo de la digestión anaerobia y en consecuencia con la degradación de la materia y producción de biogás. También presenta las características del bagazo de malta y digestato de malta y como dichas características influyen en el cultivo del hongo seta y en la digestión anaerobia (en el caso del bagazo de malta).

En el capítulo 6 con el análisis de los parámetros de operación en la digestión anaerobia y comparado con la literatura se describe si es o no es viable la producción de biogás a partir del bagazo de malta y si existen diferencias entre el bagazo y digestato de malta al emplearlos como sustratos para el cultivo de *P. ostreatus*.

El capítulo 7 contiene algunas recomendaciones para el desarrollo la digestión anaerobia del bagazo de malta y cultivo de *P. ostreatus* empleando bagazo o digestato de malta que pueden mejorar los resultados obtenidos.

Para finalizar, en el capítulo 9 se incluyen los anexos con el procedimiento que se empleó para determinar ácidos grasos volátiles (incluida la estandarización del hidróxido de sodio), nitrógeno amoniacal y nitrógeno total.

## **1.1 Planteamiento del problema**

Cuando los desechos orgánicos generados durante procesos agroindustriales son producidos en grandes volúmenes, a una velocidad que rebasa la capacidad de degradación natural y tienen una incorrecta disposición; se acumulan, se descomponen lentamente y producen efectos negativos al medio ambiente, por ello surge la inquietud de implementar actividades que permitan aprovechar al máximo los recursos y reintérgalos al sistema natural mediante un proceso cíclico.

En este trabajo se analizan dos subproductos agroindustriales, uno de los subproductos es el bagazo de malta, generado por la industria cervecera a gran y pequeña escala que lo desecha en grandes cantidades durante su proceso de

producción; según Reinold (1997) representa el 85% del volumen de los subproductos generados por esta industria, es decir, es su residuo sólido más abundante (como se cita en Mussatto, Dragone & Roberto, 2006; Pardo, Perona & Pardo, 2008).

El otro material analizado es el digestato de malta, un subproducto semilíquido procedente de la digestión anaerobia controlada que emplea el bagazo de malta para la generación de biogás. Si ambos residuos no tienen un trato adecuado causan un deterioro ambiental, para atacar este inconveniente es necesario realizar investigaciones que permitan conocer las propiedades de los subproductos agroindustriales y propicien su incorporación a un proceso productivo.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

Analizar los parámetros operativos de la digestión anaerobia del bagazo de malta para determinar su estabilidad en la producción de biogás y comparar las propiedades del bagazo y el digestato de malta como sustratos para el cultivo de *P. ostreatus*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Analizar la digestión anaerobia del bagazo de malta a través del monitoreo de sus parámetros operativos (carga orgánica, pH, ácidos grasos volátiles (AGV's), nitrógeno amoniacal, concentración de sólidos volátiles, producción de biogás y su concentración de metano).
- Caracterizar el bagazo y digestato de acuerdo con su contenido de nitrógeno total, carbono orgánico, relación Carbono/Nitrógeno (C/N), pH, humedad, contenido de elementos traza y tamaño de partícula.
- Diseñar y realizar un cultivo experimental de *P. ostreatus* sobre cada material para determinar la eficiencia biológica y periodo de cultivo.

## 1.3 Hipótesis

La producción de biogás a partir de la digestión anaerobia del bagazo de malta es estable (parámetros de operación dentro de los valores recomendados) y no existe diferencia entre las propiedades del bagazo y digestato de malta al emplearlos como sustratos para el cultivo de *P. ostreatus*.

#### **1.4 Justificación**

La utilización de la biomasa residual en procesos que permitan beneficios económicos y ambientales es un tema de relevancia actual desde el punto de vista del desarrollo sustentable porque se disminuye la disposición de residuos y se aprovechan al máximo los recursos, la digestión anaerobia permite disminuir la cantidad de materia orgánica contaminante, estabilizándola, al mismo tiempo que produce energía en forma de biogás (MINENERGA, PNUD, FAO & GEF, 2011) por otra parte la siembra de hongos comestibles es una técnica que le permite a los desechos orgánicos su integración a un proceso productivo por medio del cual los residuos orgánicos no comestibles se convierten en alimento de alto valor nutricional y el sustrato degradado se puede utilizar como mejorador de suelos (Piña, Nieto & Robles, 2016).

Dentro de la literatura consultada se encontraron reportes del cultivo de *Pleurotus* a partir del bagazo de malta con resultados favorables, pero no se ubicaron publicaciones con experiencias de su producción a partir del digestato de malta, por lo que este trabajo pretende evaluar y comparar aquellas propiedades del bagazo y digestato de malta que determinan la productividad del cultivo, y cómo ellas influyen en el desarrollo del hongo.

Es importante evaluar si se puede emplear el bagazo de malta en la producción de biogás a partir de la digestión anaerobia y compararlo con el digestato de malta como sustratos para el cultivo del hongo comestible seta para determinar si estos procesos de reciclaje permiten el manejo y tratamiento adecuado de dichos subproductos agroindustriales y propicia beneficios económicos, sociales y ambientales.

## 2 MARCO REFERENCIAL

Dentro de este apartado se encontrará la información de los términos que se estarán empleando, así como referencias a trabajos previos que se consultaron para identificar el estado de arte de la investigación.

### 2.1 Valorización de los residuos

La valorización de residuos se refiere al “principio o conjunto de acciones asociadas cuyo objetivo es recuperar el valor remanente o el poder calorífico de los materiales que componen los residuos, mediante su reincorporación en procesos productivos, bajo criterios de responsabilidad compartida, manejo integral y eficiencia ambiental, tecnológica y económica” (Ley general para la prevención y gestión integral de los residuos, 2018) , para ello se debe analizar la naturaleza del residuo y el tipo de función que se le dará.

### 2.2 Bagazo de malta



Foto 2.1 Bagazo de malta.

El bagazo de malta se obtiene durante la primera etapa de elaboración de cerveza, que consiste en la obtención de azúcar a partir de granos de cebada, proceso

fundamental ya que la fuente de azúcar se encuentra contenida en el almidón que no es fermentable, así que la cebada es sometida primero a un proceso de malteado y después a una maceración. El proceso de malteado está formado por tres etapas que son la germinación, secado y tostado. En la germinación se induce el brote del germen de los granos de cebada, posterior a este proceso la cebada es llamada malta, la finalidad del secado es detener la germinación y al producto se le denomina malta verde, el tostado puede omitirse, pero al realizarlo se crea una malta que al combinarse con la malta verde otorga a la cerveza un color y sabor especial. En el proceso de maceración la malta se mezcla con agua y se somete a una temperatura y tiempo determinados para transformar el almidón en azúcar fermentable. Al terminar la maceración se obtiene un producto sólido que es el bagazo de malta y una parte líquida azucarada llamada mosto que se lleva a la fermentación, el bagazo de malta ya no tiene utilidad en la fabricación de cerveza, pero es un residuo que se genera constantemente (Marcos & González, 2017). En la figura 2.1 se muestra el proceso para obtener el bagazo de malta.

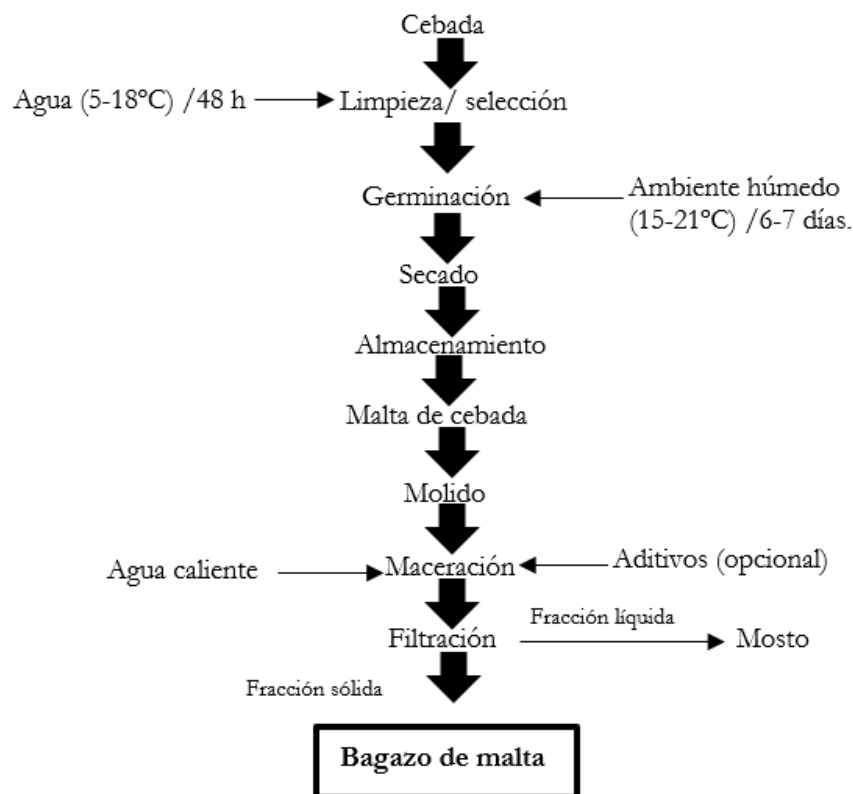


Figura 2.1 Esquema del proceso para obtener el bagazo de malta ( modificado de Mussatto et al., 2006).

El bagazo de malta cuenta con un porcentaje de humedad entre el 74-76% (Bougrier, Dognin, Laroche, & Cacho Rivero, 2018; Kafle & Kim, 2013) y se puede utilizar como alimento para animales o personas, producción de energía (a partir de la combustión o producción de biogás), producción de carbón, como un componente para la producción de ladrillos, materia prima para la elaboración de papel, sustrato para el cultivo de microorganismos (como *Pleurotus*, *Agrocybe* y *Lentinus*), sustrato para la producción de enzimas o aditivo en la elaboración de cerveza (Mussatto et al., 2006).

### 2.3 Digestato de malta



Foto 2.2 Parte sólida del digestato de malta.

El bagazo de malta se puede destinar para la producción de biogás por medio de una digestión anaerobia controlada (Mussatto et al., 2006), de aquí, se obtiene un subproducto semilíquido llamado digestato con propiedades de bioabono que suele ser un producto orgánico con una drástica disminución de coliformes totales, un alto contenido de nitrógeno, fósforo y potasio (FAO et al., 2011; Kafle & Kim, 2013) , a la parte sólida de dicho digestato se le llamara en este trabajo digestato de malta.



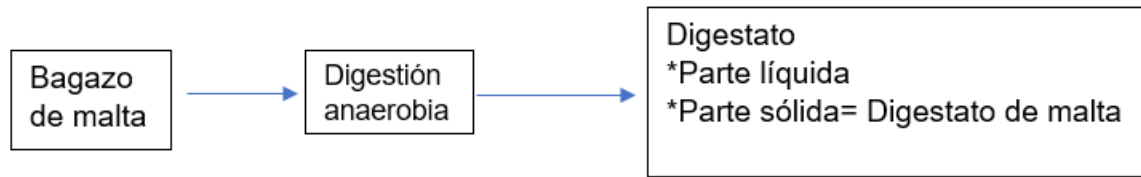


Figura 2.2 Esquema general del proceso para obtener digestato de malta.

## 2.4 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso de descomposición controlada de materiales biodegradables en condiciones controladas donde no hay oxígeno libre, a temperaturas adecuadas para bacterias anaerobias y especies facultativas que convierten los insumos en biogás y digestato (Zupancic & Grilc, 2012).

Dependiendo del tipo de aceptores de electrones en el proceso de digestión anaerobia se clasifica como fermentación o respiración anaeróbica. A la producción de metano por medio de la fermentación anaeróbica en la cual el acetato actúa como dador y aceptor de electrones se le conoce como metanogénesis acetotrófica, dos tercios del metano se produce por esta vía; la producción de metano por medio de la respiración anaeróbica en la que el  $\text{CO}_2$  acepta los electrones liberados por la materia orgánica se conoce como metanogénesis hidrogenotrófica y un tercio de metano se produce por este medio (FAO et al., 2011).

La digestión anaerobia ocurre en cuatro etapas (figura 2.3), en las cuales un consorcio de microorganismos produce biogás a partir de materia orgánica.

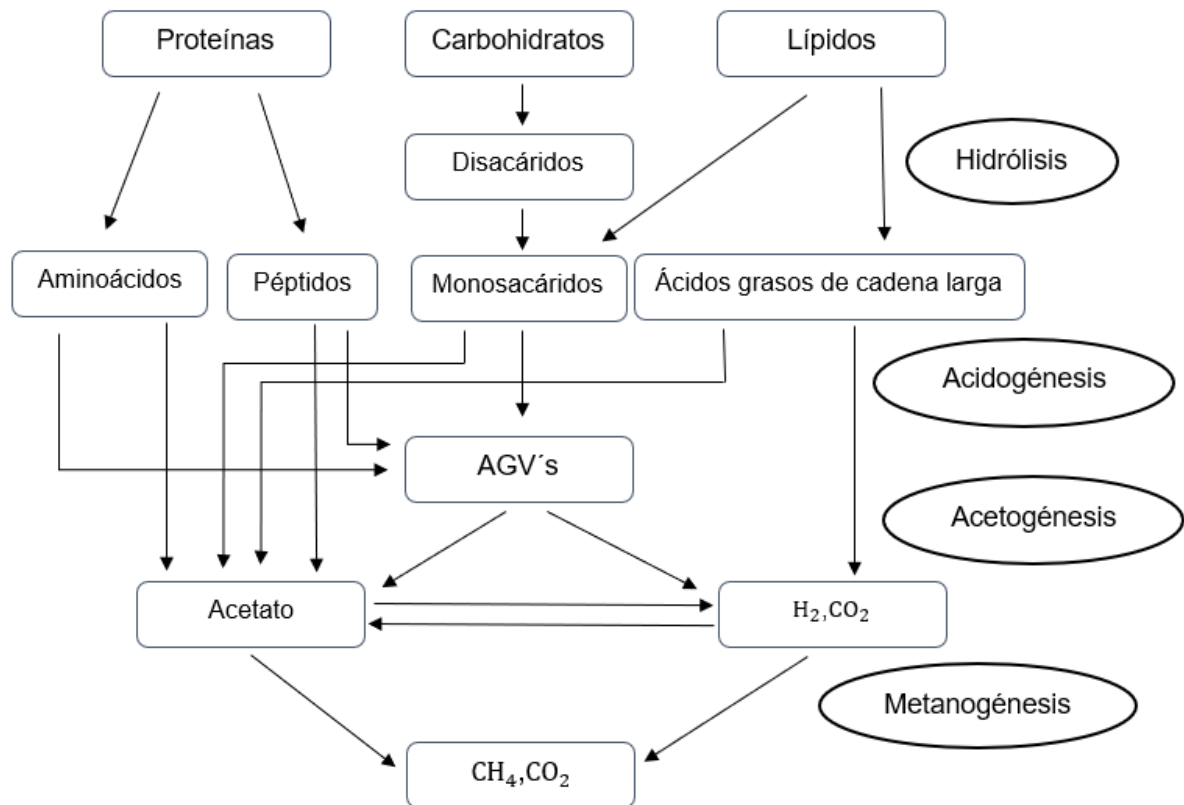
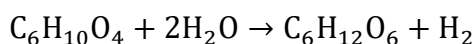


Figura 2.3 Diagrama de la digestión anaerobia (Modificado de Li, Chen & Wu 2019)

### 2.4.1 Hidrólisis

La materia orgánica está compuesta por polímeros como carbohidratos (celulosa, hemicelulosa, etc.), grasas y proteínas que debido a su gran tamaño molecular no pueden entrar a través de la pared celular de los microorganismos, por ello las enzimas extracelulares producidas por microorganismos acidogénicos (xilanas, amilasa, lipasa, enzimas proteolíticas, etc.) actúan sobre las moléculas complejas (proteínas, carbohidratos y lípidos) y producen compuestos solubles más sencillos (aminoácidos, azúcares monoméricos y ácidos grasos de cadena larga), la reacción química de la hidrólisis se muestra a continuación, en donde  $C_6H_{10}O_4$  representa una composición típica para la mezcla de desechos orgánicos (FAO et al., 2011; Kothari, Pandey, Kumar, Tyagi, & Tyagi, 2014).

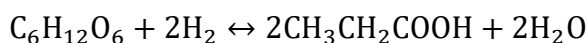
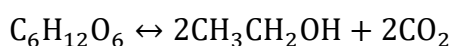


La hidrólisis depende de la temperatura del proceso, el tiempo de retención hidráulico, el tamaño de las partículas y la composición bioquímica del sustrato. Las proteínas son hidrolizadas a péptidos y aminoácidos por parte de las enzimas

llamadas proteasas, los lípidos son degradados por las lipasas produciendo ácidos grasos de cadena larga y glicerol. La degradación de materiales lignocelulósicos es la etapa limitante del proceso de hidrólisis ya que la lignina es muy resistente a la degradación por parte de los microorganismos anaeróbicos (FAO et al., 2011).

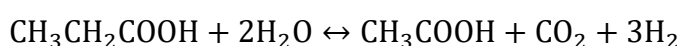
#### **2.4.2 Acidogénesis**

También conocida como etapa fermentativa ocurre cuando un grupo de bacterias acidogénicas (facultativas y anaerobias obligadas), transforman los monómeros solubles, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga en ácidos grasos de cadena corta como el ácido acético, propiónico, butírico y valérico, estas bacterias crecen rápidamente con un tiempo de duplicación aproximado de 30 minutos. Algunas bacterias como las homoacetogénicas utilizan el dióxido de carbono e hidrógeno como sustrato y los convierten en ácido acético, La acumulación de los ácidos grasos volátiles se muestra se escribe a continuación (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014; Li et al., 2019).



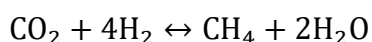
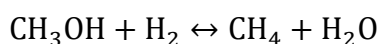
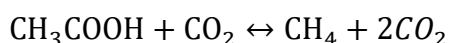
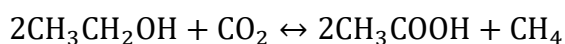
#### **2.4.3 Acetogénesis**

El etanol, ácidos grasos volátiles son empleados por las bacterias acetogénicas para su crecimiento transformándolos en compuestos más sencillos como acetato ( $CH_3COO^-$ ) e hidrógeno ( $H_2$ ), Las bacterias homoacetogénicas consumen el hidrógeno como sustrato y no lo producen como resultado de su metabolismo lo que permite mantener bajas presiones parciales de hidrógeno y con ello la actividad de las bacterias acidogénicas y acetogénicas. Estas bacterias tienen un crecimiento lento, con una tasa de duplicación de 1.5 a 4 días, la reacción de acetogénesis se muestra en seguida (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014).



#### 2.4.4 Metanogénesis

Los microorganismos metanogénicos que pertenecen al dominio Archaea forman metano a partir de sustratos monocarbonados o con dos átomos de carbono unidos por un enlace covalente (acetato, ácido acético,  $H_2/CO_2$ , formato, etanol, metanol y algunas metilaminas), existe el grupo hidrogenotrófica que consume  $H_2/CO_2$  y el acetoclástico que consume ácido acético, metanol y algunas aminas. La metanogénesis es un paso limitante en el proceso de la digestión anaerobia pues los microorganismos que participan en esta etapa tienen un tiempo de crecimiento lento, con una duplicación de 2 a 4 días, son muy sensibles a los cambios en las condiciones ambientales y falta de nutrientes. La reacción de metanogénesis se escribe en seguida (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014).



#### 2.4.5 Biodigestores

Un biodigestor es un depósito cerrado donde se introducen los residuos orgánicos que son digeridos por microorganismos. Tomando como referencia su régimen de alimentación se clasifican en: Continuos cuando la alimentación es constante y el efluente (material de descarga) es igual al afluente (materia alimentada) con producciones de biogás uniformes en el tiempo, semi continuos en los que la primera carga tiene gran cantidad de materia prima y después se agregan volúmenes de afluente en función del tiempo de retención hidráulico (TRH) y el volumen total del digestor; por último están los biodigestores discontinuos, de régimen estacionario o Batch que se alimentan con una sola carga o lote y cuando el contenido de materias primas y el rendimiento de biogás disminuyen se vacían y se alimentan de nuevo (FAO et al., 2011).

A su vez de acuerdo con su proceso, un biodigestor puede ser de una etapa en el que las cuatro etapas de la digestión anaerobia ocurren en un solo reactor o de etapas múltiples en el que se usan diferentes reactores para las diferentes

etapas de la digestión anaerobia con la finalidad de que cada reactor tenga diferentes factores de operación (tasa de carga orgánica, presencia o ausencia de oxígeno, pH, etc.) (Kothari et al., 2014).

En base a su contenido sólido el sistema de digestión anaerobia se denomina baja en sólidos donde la materia orgánica suministrada contiene entre el 10-15% de sólidos totales (ST) y alta en sólidos en el que la materia orgánica suministrada contiene entre el 20-40% de sólidos totales (Kothari et al., 2014).

## **2.5 Parámetros de operación**

El correcto funcionamiento de la digestión anaerobia está determinado por los parámetros de operación que a su vez dictan la calidad de los productos como el biogás y el digestato, en este sentido es importante la evaluación y conocimiento de dichos factores pues la estabilidad de la digestión anaerobia, la mejor producción de metano y calidad del digestato se obtienen al manejar los valores recomendados como óptimos en la literatura.

### **2.5.1 Carga orgánica**

La carga orgánica se refiere a la cantidad de sustrato empleado para alimentar diariamente al digestor y determina la cantidad de biogás producido, este valor está ligado a parámetros como:

La tasa de carga orgánica (TCO) se refiere a la cantidad de materia orgánica (que puede expresarse como Demanda química de oxígeno (DQO) o como sólidos volátiles (VS)) introducida diariamente en el reactor por unidad de volumen ( $m^3$  del volumen del digestor), al incrementarse la tasa de carga orgánica se incrementa la producción volumétrica de biogás pero una vez que pasa su valor óptimo la producción de biogás disminuye y de igual forma aumenta la probabilidad de una acidificación del reactor a causa de sobrecargas puntuales (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014).

$$TCO = \frac{\text{Carga orgánica} \times \text{Concentración de SV}}{\text{Volúmen de operación del digestor}}$$

El tiempo de retención hidráulico (TRH): Es definido como el tiempo requerido para que la materia orgánica se degrade por completo o como el tiempo promedio que la materia orgánica permanece dentro del biodigestor. En los biodigestores de régimen semicontinuo se determina como la relación del volumen del digestor entre el volumen de carga diaria (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014)

$$TRH = \frac{\text{Volumen de digestor}}{\text{Volúmen de carga orgánica diaria}}$$

Entre menor sea el tiempo de retención, menor es el tamaño del digestor, por otro lado, a menor tasa de degradación corresponde un mayor tiempo de retención. Al aumentar el TRH, aumenta el grado de materia orgánica degradada y con ello se incrementa la producción de metano, valor que disminuye después de alcanzar el óptimo (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014).

### **2.5.2 Composición química de los sustratos**

La calidad, cantidad de biogas producido y la tasa de degradación depende de la composición química y de la naturaleza del material utilizado (FAO et al., 2011; Kafle & Kim, 2013).

La biomasa lignocelulósica requiere un pretratamiento previo para la utilización de los carbohidratos protegidos por la celulosa, hemicelulosa y lignina. Entre los diferentes métodos empleados se encuentra el ácido diluido, explosión de vapor, cal o amoníaco (Kothari et al., 2014).

Los microorganismos metanógenos se alimentan principalmente de carbono y nitrógeno, en este sentido consumen 30 veces más carbono que nitrógeno, así que la relación Carbono/Nitrógeno (C/N) óptima y que genera el mejor rendimiento de biogás se encuentra en un rango de 20 a 30 (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014).

La descomposición de materiales con una relación C/N superior a 35, ocurre lentamente, por una baja multiplicación y desarrollo de bacterias debido a un insuficiente contenido de nitrógeno que es consumido rápidamente y generando bajos rendimientos de biogás, mientras que una relación C/N menor a 8 inhibe la

actividad bacteriana a causa de una excesiva formación de amonio propiciando un pH con valores superiores a 8.5 que es tóxico para los metanógenos (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014).

La tabla 2.1 presenta un resumen de las características del bagazo de malta presentada por diferentes autores.

Tabla 2.1 Características del bagazo de malta medida sobre ST

Parámetro	%	Referencia
Carbono	47.6-54	(Rodríguez, 2012; Ulloa, Merino, Bruijn, & Gontupil, 2011)
Nitrógeno	1.1-4.2	(Bougrier et al., 2018; Kafle & Kim, 2013; Rodríguez, 2012; Ulloa et al., 2011)
Proteína cruda	6.8-26.1	(Bougrier et al., 2018; Kafle & Kim, 2013; Rodríguez, 2012; Ulloa et al., 2011)
C/N	15.4-26.8	(Rodríguez, 2012; Ulloa et al., 2011)
pH	5.2	(Rodríguez, 2012)
Fosforo	0.3-0.6	(Bougrier et al., 2018; Ulloa et al., 2011)
Calcio	0.3	(Bougrier et al., 2018)
Potasio	0.1	(Bougrier et al., 2018)
Magnesio	0.2	(Bougrier et al., 2018)
Azufre	0.3	(Bougrier et al., 2018)

### 2.5.3 Temperatura

La digestión anaerobia es dependiente de la temperatura pues la velocidad de crecimiento de los microorganismos aumenta a medida que se incrementa la temperatura, acelerando el proceso de digestión y las producciones de biogás.

Se han definido tres diferentes rangos de temperatura para la formación de metano en base a la actividad microbiana: psicrófila o criófila (de 10 a 20°C), mesófila (entre 20 y 45°C) y termófila (entre 45 y 65°C) y para que el tratamiento anaeróbico funcione adecuadamente se recomienda que las variaciones de temperatura no excedan los 0.6-1.2°C/día (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014).

#### **2.5.4 pH**

El pH determina la producción y efectividad de las enzimas, en el caso de los microorganismos acidogénicos el pH óptimo está entre 5.5 y 6.5 en cambio los microorganismos metanogénicos requieren un pH entre 7.8 y 8.2. Dado que los microorganismos metanogénicos son más susceptibles a las variaciones de pH el valor óptimo para los cultivos mixtos está entre 6.8 y 7.4, siendo el pH neutro el ideal y para que el proceso se desarrolle el pH no debe bajar de 6.0 ni subir de 8.0 (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014).

Los valores bajos de pH disminuyen la actividad de los organismos metanogénicos, provocan la acumulación de ácido acético o la formación de su forma no ionizada que inhibe la degradación del propionato de igual forma se acumula el  $H_2$ , en consecuencia, aumenta la presión parcial del  $H_2$  que inhibe a las bacterias encargadas de degradar el ácido propiónico causando una acumulación de ácidos grasos volátiles de alto peso molecular (como el ácido propiónico y butírico). Cuando el pH aumenta se favorece la formación de amoníaco que al acumularse inhibe el crecimiento microbiano (FAO et al., 2011).

El pH en la digestión anaerobia se puede mantener dentro de los rangos aceptables gracias al efecto buffer, el cual se ajusta de acuerdo con la presencia de amoníaco ( $CH_4^+$ ) y bicarbonato ( $HCO_3^-$ ).

#### **2.5.5 Ácidos grasos volátiles (AGV's)**

Es uno de los parámetros más utilizados para determinar la evolución del proceso, debido a su rápida respuesta ante variaciones del sistema. El término "volátil" indica que puede ser recuperado por destilación a presión atmosférica, los AGV's son ácidos grasos de cadena corta (C2-C6) que incluye principalmente al ácido acético, propiónico y butírico y en menor cantidad al ácido isobutírico, valérico, isovalérico y caproico.

El rango óptimo de concentración de AGV's en el efluente se encuentra entre 50-250 mg/L como ácido acético, un aumento en su concentración implica una desestabilización del proceso y una disminución en la producción de biogás (FAO et al., 2011), considerando que su concentración inhibitoria ocurre cuando su valor es superior a los 2000 mg/L como ácido acético a un pH de 7.0 y el efecto inhibitorio



se hace mayor a medida que cae el valor del pH (FNR, 2010), aunque Kothari et al. (2014) mencionan que la inhibición se presenta con concentraciones de ácido acético mayores a 5000 mg/L y ácido butírico superiores a 3000 mg/L.

### **2.5.6 Nitrógeno amoniacal**

El amoníaco puede estar presente en el sustrato o ser producido durante la degradación de compuestos nitrogenados como proteínas o aminoácidos. El nitrógeno amoniacal es importante para el crecimiento bacteriano, pero en altas concentraciones limita su crecimiento. El nitrógeno amoniacal es la suma del ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), de las cuales el amoníaco es el que inhibe el proceso llevando el pH a alcalino.

Los sustratos con mayores proporciones de proteínas o compuestos nitrogenados son los que presentan mayores problemas de inhibición por amonio. Mientras el amoníaco dentro del digestor se encuentre en el rango de 5-100 mg/L tiene efectos benéficos, de 200-1000 mg/L no tiene efectos adversos, si la concentración se encuentra entre 1500-3000 mg/L y el pH es alto presenta efectos inhibitorios y por arriba de los 3000 mg/L se vuelve tóxico (FAO et al., 2011).

### **2.5.7 Concentración de sólidos totales y volátiles**

La materia seca o también llamada Sólidos Totales (ST) representan la fracción sólida de la materia orgánica seca (omitiendo el agua), su concentración es muy importante. A medida que aumenta el contenido de sólidos el área de contacto se ve reducida, la movilidad de los metanógenos dentro del sustrato se ve limitada y para concentraciones superiores al 40% de ST puede resultar un proceso inhibitorio (FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014).

Para los Biodigestores de tipo semicontinuo se recomienda entre un 8% a 12% de Sólidos Totales para asegurar un buen funcionamiento, los digestores discontinuos pueden tener entre un 40 a 60% de Sólidos totales (FAO et al., 2011).

La materia orgánica o Sólidos Volátiles (SV) se refieren a la porción de ST que se libera al volatilizarse cuando se incineran a temperaturas superiores a los 500°C y contiene los componentes orgánicos que teóricamente se convierten en

metano (FAO et al., 2011), el material remanente son las cenizas y constituye la materia inorgánica.

Con los SV se puede determinar el Tiempo de Retención de Sólidos Biológicos (TRSB) como la relación entre la cantidad de SV que entra al digestor y la cantidad de SV que sale del sistema cada día y sirve para representar la media del tiempo de retención de los microorganismos en el digestor (FAO et al., 2011).

Tabla 2.2 Características del bagazo de malta

Parámetro	%	Referencia
Agua	74-76	(Bougrier et al., 2018; Kafle & Kim, 2013; Rodríguez, 2012; Ulloa et al., 2011)
Agua acondicionada <sup>1</sup>	4-97	(Bougrier et al., 2018; Bougrier et al., 2017; Ezeonu & Okaka, 1996; Rodríguez, 2012; Ulloa et al., 2011)
Sólidos totales (ST)	24 - 26.47	(Bougrier et al., 2018; Kafle & Kim, 2013; Rodríguez, 2012; Ulloa et al., 2011)
Sólidos volátiles (SV)	72-97	(Bougrier et al., 2018; Ezeonu & Okaka, 1996; Rodríguez, 2012; Ulloa et al., 2011)

1: agua presente en el sustrato acondicionado para la alimentación del biodigestor.

\* El % de SV es referente a los ST.

### 2.5.8 Producción de Biogás

La eficiencia de la producción de biogás se determina expresando el volumen del biogás producido por unidad de peso de ST o SV (FAO et al., 2011).

La tabla 2.3 presenta un resumen de las producciones de biogás obtenidas a partir de una digestión anaerobia a temperatura mesofílica empleando biodigestores de tipo Batch y semicontinuos.

Tabla 2.3 Potencial del biogas y materia orgánica removida durante la digestión anaerobia del bagazo de malta.

Parámetro	Valor	Referencia
ml-biogás/g SV	173-508	(Kafle & Kim, 2013; Rodríguez, 2012)
ml-biogás/g ST	530	(KTBL, 2020)
ml-CH <sub>4</sub> /g SV	240-500	(Bougrier et al., 2018; Bougrier et al., 2017; Gonçalves et al., 2015; Kafle & Kim, 2013)
m <sup>3</sup> -biogás/m <sup>3</sup> - día	0.1-1.1	(Rodríguez, 2012; Sezun, Grilc, Zupancic, & Marinsek, 2011)
%CH <sub>4</sub>	59-62	(Ezeonu & Okaka, 1996; Kafle & Kim, 2013; KTBL, 2020; Sezun et al., 2011)
%SV removidos	34-79	(Bougrier et al., 2017; Kafle & Kim, 2013)

## 2.6 Hongo *Pleurotus ostreatus*.

Los hongos pertenecen al Reino Fungí, poseen características propias y a la vez una mezcla de características de los vegetales y animales, no contienen clorofila, tejidos especializados ni flores, son heterótrofos con una alimentación por absorción, su estado es vegetativo sobre el sustrato en forma de micelio inmóvil, tienen una pared celular compuesta por glucanos y quitina, rara vez por glucanos y celulosa, con reproducción sexual o asexual, su hábitat es terrestre o en agua dulce pero no en un ambiente marino (Guzmán, Mata, Soto & Guzmán, 2013).

Los hongos macroscópicos a diferencia de los microscópicos poseen cuerpos fructíferos que se perciben a simple vista, dichas fructificaciones son denominadas “hongos”, sin embargo, el verdadero hongo es una masa algodonosa, generalmente blanca, técnicamente llamada micelio que crece sobre el sustrato. En la figura 2.4 se presenta un esquema general las partes del hongo, dichos organismos se alimentan de la materia orgánica, son especies parásitas, simbióticas o saprófitas, las especies parásitas se desarrollan sobre la materia viva, dentro de las células de vegetales o animales provocan su muerte e incluso la de todo el organismo, las simbióticas viven en un equilibrio biológico con el organismo al que aparentemente están parasitando y las especies saprófitas degradan para su crecimiento la materia orgánica como troncos o desechos agrícola-industriales. Dependiendo de cómo los hongos ataquen la lignina se clasifican en hongos de

podrición blanca que tienen la capacidad de metabolizar totalmente la lignina y hongos de podrición oscura que solo modifican la estructura de la lignina sin degradarla totalmente (Guzmán et al., 2013).

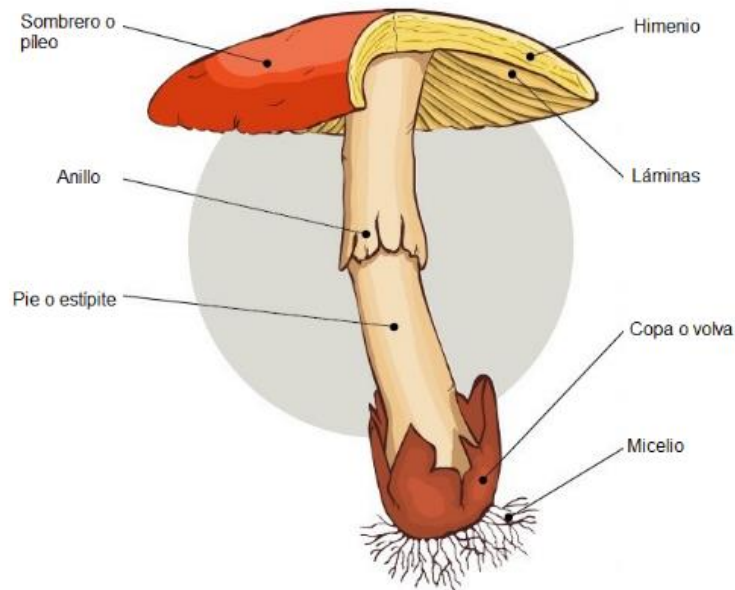


Figura 2.4 Esquema general de las partes de un hongo (Fungiturismo, 2019).

Las fructificaciones son los cuerpos reproductores de los hongos, en donde se forman sus esporas, resultan del proceso de reproducción sexual, mismo que se ilustra en la figura 2.5, cuando estas esporas caen en un sustrato adecuado germinan, produciendo hifas y éstas un micelio primario (con células de un solo núcleo), posterior a ello ocurre la plasmogamia que consiste en la fusión de un micelio primario con otro de otro individuo para producir un micelio secundario (con dos núcleos en cada célula sin fusión nuclear) que se desarrolla abundantemente y constituye el verdadero hongo capaz de producir cuerpos fructíferos, en cuyo himenio ocurre la fusión nuclear de los individuos, procesos conocido como cariogamia, seguido de la meiosis que da como resultado la formación de esporas (Guzmán et al., 2013; Pérez, Acevedo, Bibbins, Galván & Rosales, 2015). El hongo también se puede reproducir asexualmente por medio de esporas que se forman en el micelio primario como en el secundario ante determinadas circunstancias ambientales, a estas esporas se les llama conidiósporas, artrosporas o clamidosporas según su forma y el grosor de la pared. (Guzmán et al., 2013).

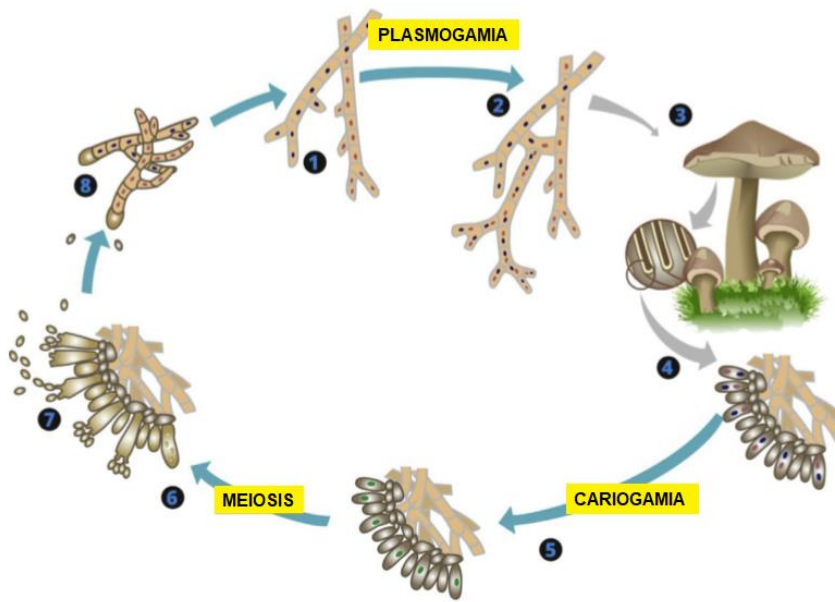


Figura 2.5 Ciclo de reproducción sexual de *P. ostreatus*.  
(modificado de Pérez et al., 2015)

El nombre *Pleurotus* deriva del griego pleurá o pleurón, costado o lado y del latín otus que significa oreja, de hecho el hongo *Pleurotus ostreatus* tiene la forma de oreja u ostra debido a que posee un pie más lateral que céntrico, en algunos casos está ausente así que el sombrero está adherido al sustrato o el pie es muy corto, lateral o excéntrico (Gaitán, Salmones, Pérez & Mata, Gaitán, Salmones, Pérez, & Mata, 2006; 2013) como se observa en la foto 2.3 y figura 2.6, tienen una esporada blanquecina con tonos púrpuras (Guzmán et al., 2013). Su clasificación taxonómica se describe en la tabla 2.4.



Foto 2.3 Fructificación de *P. ostreatus*.

Los hongos del género *Pleurotus* son el segundo hongo más comercializado a nivel mundial (Bellettini et al., 2016). En México a los hongos *P. ostreatus* se les conocen como orejas blancas, orejas de palo, orejas de patacan, orejas de cazahuate y orejas de izote pero tiene el nombre comercial de hongo “seta”. este hongo es saprófito, de pudrición blanca por el hecho de ser una especie lignocelulolítica, es decir, no necesita una descomposición previa del sustrato y puede degradar muchos materiales como los esquimos y desechos agroindustriales (Guzmán et al., 2013).

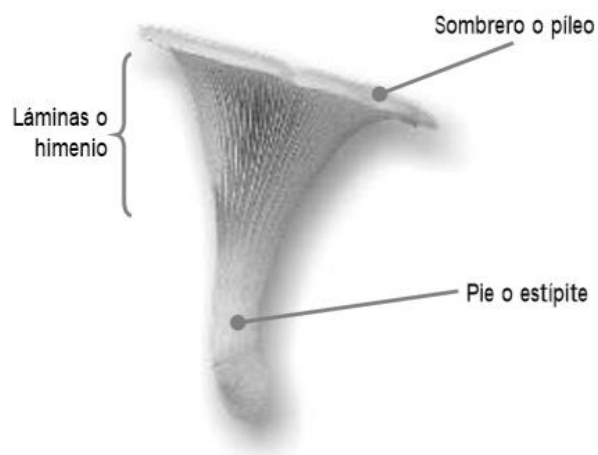


Figura 2.6 Hongo seta con sus partes principales (Gaitán et al., 2006).

Tabla 2.4 Taxonomía del hongo *Pleurotus ostreatus*

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Basidiomycota
Clase	Holobasidiomycetes
Subclase	Hymenomycetidae
Orden	Agaricales
Familia	Tricholomataceae
Género	Pleurotus
Especie	ostreatus

(Recuperado de Guzmán et al., 2013; Herrera & Ulloa, 1998)

## 2.7 Evaluación del Cultivo de *P. ostreatus*

Según Guzmán et al. (2013) para llevar a cabo un cultivo de *Pleurotus* es necesario aislar la cepa, elaborar el inóculo, seleccionar y preparar el sustrato, realizar la siembra, incubación, producción y cosecha.

Obtener la cepa consiste en desarrollar el micelio de un hongo por medio de su tejido o de sus esporas sobre un medio de cultivo sólido como puede ser agar con extracto de malta y el agar con papa y dextrosa (Guzmán et al., 2013).

La elaboración del inóculo se refiere a la propagación y desarrollo del micelio sobre granos como el sorgo o trigo (comúnmente conocido como semilla). Cuando la propagación se realiza a partir de una cepa crecida en un medio de cultivo se llama inóculo primario y cuando es a partir de semillas del inóculo primario se llama inóculo secundario y es el que se utiliza en el cultivo comercial de las setas pues permite disponer de una mayor cantidad de inóculo (Guzmán et al., 2013).

La selección y preparación del sustrato tiene la finalidad de proporcionarle al micelio los nutrimentos adecuados para su desarrollo, el medio de crecimiento requiere un tratamiento previo para disminuir la flora microbiana nociva y evitar que dichos microorganismos compitan por espacio y nutrientes con el micelio de *P. ostreatus*, algunos de los tratamientos son esterilización térmica, fermentación y el método de pasteurización que es el procedimiento más usado a escala industrial (Guzmán et al., 2013).

La siembra se desarrolla en área cerrada, limpia y sobre una mesa desinfectada, existen muchos métodos para realizarla, pero la más sencilla consiste en mezclar uniformemente el sustrato preparado con el inóculo (de 3 a 5% del peso en húmedo del sustrato) dentro de una bolsa de plástico, se cierra la bolsa, se etiqueta, dicha mezcla de sustrato y micelio que se incuba (Guzmán et al., 2013).

En la incubación se acomoda en un estante en condiciones de obscuridad y a una temperatura entre 26 y 28°C (Guzmán et al., 2013; Romero et al., 2010), un día después se le hacen unas perforaciones a las bolsas para permitir la oxigenación, tres días después se debe observar el crecimiento del micelio como una masa blanquecina alrededor del sustrato, la fase de incubación termina hasta que el micelio cubre todo el sustrato, algunos consideran que termina hasta que aparecen los primeros primordios (Guzmán et al., 2013; Romero et al., 2010). Durante la incubación se pueden presentar contaminantes (hongos, mohos, bacterias y levaduras) debido a una mala preparación del sustrato o falta de higiene, los contaminantes más comunes son Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Neurospora, Mycogone y Coprinus que aparecen como manchas verdes, amarillentas, negras y/o anaranjadas y se favorecen por una alta humedad, alta temperatura y luz directa. De igual forma durante la incubación y/o producción se pueden presentar plagas, las cuales son insectos (como mosquitos o catarinas) que se alimentan del micelio y de las fructificaciones, lo ideal es que las bolsas con muestras contaminadas se desechen (Guzmán et al., 2013).

Después de una correcta incubación las bolsas se deben trasladar al área de cultivo o fructificación en donde las bolsas se ponen bajo la luz indirecta, una humedad ambiental entre el 70 y 80% y una temperatura de 26 a 28°C con buena ventilación (Guzmán et al., 2013; Romero et al., 2010). Aproximadamente una semana después de que se empiezan a formar los primordios de las fructificaciones las setas alcanzan su estado adulto y se pueden cosechar. Las fructificaciones pueden presentar enfermedades causadas por bacterias y virus que se favorecen con la humedad excesiva, el calor y una escasa ventilación, las bacterias Pseudomonas provocan zonas de color amarillo, anaranjado o café en los píleos de los hongos que se pudren con rapidez, despiden mal olor y afectan el rendimiento de la producción (Guzmán et al., 2013).



La cosecha se debe realizar cuando el sombrero de las fructificaciones se encuentra totalmente extendido, pero sin que el margen esté enrollado hacia arriba, se aconseja usar una navaja limpia y cortar el pie del hongo lo más cerca posible de la superficie del sustrato para no dañar el hongo ni el sustrato, generalmente cada bolsa soporta entre dos y tres cosechas en intervalos de diez días (Guzmán et al., 2013).

De acuerdo con Flores (2012) existen varios parámetros que miden la productividad del cultivo de hongos, se utilizan para determinar qué tan buena es la cepa del hongo que se cultiva, así como para determinar el sustrato más adecuado, los criterios más empleados son el periodo de cultivo que se refiere a el tiempo transcurrido en días desde el inicio de la incubación hasta la última cosecha, el rendimiento que se refiere al peso en fresco de los hongos cosechados, la precocidad que es el tiempo transcurrido en días desde la siembra del sustrato hasta la cosecha de la primera florada, la Eficiencia Biológica (EB) que resulta de dividir el peso en fresco de los hongos cosechados entre el peso seco del sustrato empleado multiplicado por cien (Guzmán et al., 2013; Luz et al., 2012; Pardo et al., 2008; Piña et al., 2016). Según Guzmán et al. (2013) una buena EB para Pleurotos debe estar alrededor del 100%.

## **2.8 Sustrato**

El sustrato es el material sobre el que crecen los hongos y de él depende su desarrollo, su elección está relacionado con sus propiedades físicas, químicas y biológicas y con el complejo enzimático que sea capaz de producir el hongo (Luz et al., 2012).

### **2.8.1 Propiedades físicas**

Son aquellas que se pueden medir y observar sin que se modifique la composición o identidad de la sustancia (Chang & Goldsby 2013), una propiedad física que se debe considerar en la selección del sustrato es la dureza, es decir no debe ser muy duro porque impedirá la circulación del aire ni muy blando porque se empastará con el agua (Guzmán et al., 2013), otro factor importante es el tamaño de partícula porque se relaciona con la accesibilidad que tienen las hifas de los hongos a los nutrientes, al agua y al aire, un tamaño pequeño disminuye la aireación necesaria

para la respiración y tamaños muy grandes dificultan la compactación del sustrato y el acceso del hongo a los nutrientes (Sánchez & Royse, 2001).

### **2.8.2 Propiedades químicas**

Las propiedades químicas y físico-químicas están relacionadas con la composición elemental de los materiales e influyen en el suministro de nutrientes (Infoagro, 2017). Dentro de estas propiedades se tiene el pH, que el material cubra los requerimientos nutritivos de la especie como el contenido de carbono que utiliza como fuente de energía y para la elaboración de sustancias estructurales de la célula, de igual forma es importante el contenido de nitrógeno para que el hongo sintetice proteínas, ácidos nucleicos y quitina (Adebayo, Omolara & Toyin, 2009; Guzmán et al., 2013).

### **2.8.3 Propiedades biológicas**

Dentro de estas propiedades se debe considerar la ausencia organismos que inhiban el desarrollo del hongo (Guzmán et al., 2013). En el caso de *Pleurotus* se necesita una selectividad biológica pues la flora acompañante debe ser protectora y no competidora (Muez, 1994 como se cita en Pardo et al., 2008).

### **2.8.4 Tipos de sustratos**

Los sustratos para el cultivo de los hongos se clasifican en seis categorías e incluso se pueden mezclar entre sí para crear co-sustratos y así suplementar alguna deficiencia de nutrimentos y de esta forma mejorar los rendimientos del cultivo (Guzmán et al., 2013; Piña et al., 2016).

- 1) Pajas: de ajonjolí, arroz, cártamo, cebada, sorgo, trigo, avena y zacates en general.
- 2) Rastrojos: de maíz, mijo, garbanzo, frijol, etc.
- 3) Pulpas: de café, cardamomo, etc.
- 4) Bagazos: de caña de azúcar, de citronela, maguey tequilero, henequén, uva etc.
- 5) Forestales: aserrín, viruta, troncos y ramas.

6) Otros: papel, olote, tamo de maíz, hojas (brácteas) de piña, fibra de coco, lirio acuático, hojas y tallos (cañones) de plátano, de caña de azúcar, desechos de la industria textil (como algodón), etc.

## **2.9 Sustrato para *Pleurotus***

El género *Pleurotus* corresponde a hongos de pudrición blanca que segrega enzimas oxidativas lacasa y manganeso peroxidasa que participan en la degradación de la lignina, así como las enzimas hidrolíticas xilanas y celulasa involucradas en la degradación de hemicelulosa y celulosa, por lo que puede degradar una gran cantidad de residuos agroindustriales, dichas enzimas lignocelulolíticas permiten la utilización de lignina, celulosa y hemicelulosa como fuente de carbono, la actividad de las enzimas hidrolíticas se incrementa durante la incubación pero es mucho mayor durante la formación de cuerpos fructíferos debido a que el hongo necesita movilizar una mayor cantidad de carbono para la formación del basidiocarpo (Luz et al., 2012), sin embargo el rendimiento y composición del hongo está determinada por las propiedades químicas, físicas y biológicas del sustrato como es la concentración de carbono y nitrógeno, el pH que determinan la producción de enzimas, también influye la presencia de minerales, la humedad, tamaño de partícula, cantidad de inóculo, interacción con microorganismos y factores ambientales como la temperatura, humedad, luminosidad y composición del aire alrededor del sustrato (Bellettini et al., 2016; Luz et al., 2012).

### **2.9.1 Nitrógeno**

Para el crecimiento de *Pleurotus* se requieren niveles bajos de nitrógeno que van en un rango de 0.03 a 1.0% (Gaia, Simas, de Souza, Loureiro & de Aguilar, 2016). La suplementación con nitrógeno a bajos niveles incrementa la productividad y en el caso de *P. ostreatus* el crecimiento se inhibe a niveles iguales o mayores al 1.5% de nitrógeno sobre materia seca (Silva, Dias, Siqueira & Schwan, 2007 como se cita en Bellettini et al., 2016), dicho incremento en la productividad se debe a que el nitrógeno estimula el crecimiento de enzimas importantes en la degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina conocidas como enzimas lignocelulolíticas (Rajarithman, Bano & Patwardhan, 1986 como se cita en Bellettini et al., 2016),

mientras que altos porcentajes reprimen dicha producción (Patel, Gupte & Gupte, 2009).

El efecto que produce el contenido de nitrógeno sobre la eficiencia del cultivo de *P. ostreatus* se puede apreciar en el trabajo de Pardo et al. (2008) que al utilizar la fibra de Kenaf sola y en una mezcla 1:1 en peso (p/p) con otros sustratos empleando la pasteurización como pretratamiento obtuvo una mayor eficiencia biológica con pequeños incrementos de nitrógeno y un decaimiento rápido de la misma al continuar incrementando el porcentaje de nitrógeno (dicho efecto se muestra en la figura 2.7).

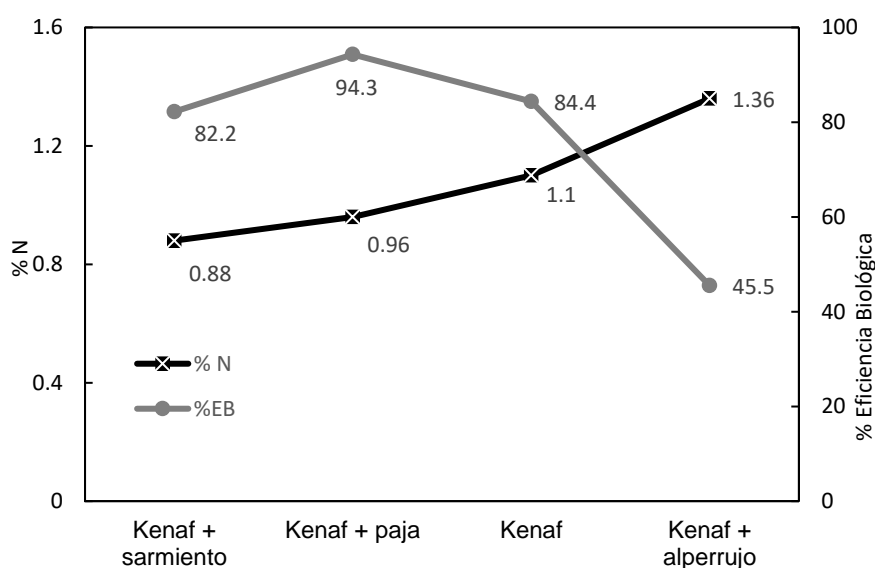


Figura 2.7 Efecto del contenido de nitrógeno sobre la eficiencia biológica (basado en Pardo et al., 2008)

### 2.9.2 Relación Carbono/Nitrógeno (C/N)

Los hongos del género *Pleurotus* crecen en medios con una relación Carbono/Nitrógeno comprendida en un amplio rango de valores, al menos entre 30 y 300 (Pardo et al., 2008). Yang, Guo y Wan (2013) realizaron un cultivo de *P. ostreatus* con una mezcla de diferentes sustratos variando sus concentraciones obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 2.5 en dónde se observa que al incrementar la relación C/N disminuye el tiempo de colonización, esto se debe a que altas relaciones de C/N favorecen el crecimiento micelial, en contraste

encontramos un mayor rendimiento y eficiencia biológica a bajas relaciones de C/N pues estos valores favorecen el crecimiento de cuerpos fructíferos.

Tabla 2.5 Sustratos y sus características

Sustrato	C/N	Tiempo de colonización (días)	Rendimiento (g)	% Eficiencia biológica
cascarilla de algodón 80% + salvado de trigo 20%	34.87	31	438.1	125.6
cascarilla de algodón 45% +paja de arroz 45%+ salvado de trigo 10%	44.76	22	339.4	96.7
cascarilla de algodón 30% +paja de arroz 60%+ salvado de trigo 10%	47.45	18	324.2	89.6
paja de arroz 80% + salvado de trigo 20%	49.19	16	223.7	53.9
cascarilla de algodón 40% +paja de trigo 40%+ salvado de trigo 20%	49.75	21	348.7	94.6
cascarilla de algodón 15% +paja de arroz 75%+ salvado de trigo 10%	50.13	17	261.5	74.7
cascarilla de algodón 30% +paja de trigo 50%+ salvado de trigo 20%	53.47	17	318.3	90.9
cascarilla de algodón 20% +paja de trigo 60%+ salvado de trigo 20%	57.19	16	268.1	76.6
paja de trigo 80%+ salvado de trigo 20%	64.63	15	214.6	51.3

Recuperado de Yang et al. (2013)

### 2.9.3 pH

El pH óptimo para el cultivo de *P. ostreatus* se encuentre en un intervalo de 6 a 7 (Guzmán et al., 2013).

### 2.9.4 Humedad

Para el cultivo de *P. ostreatus*, el sustrato debe tener una capacidad de retención de humedad comprendida entre el 70 al 80% (Guzmán et al., 2013). Patel et al. (2009) observaron la mejor producción de lacasa con un contenido de humedad del 60% pero superior a ello se reducía la porosidad del sustrato, limitando la transferencia de oxígeno y disminuyendo el crecimiento del hongo, a su vez el contenido de humedad depende del sustrato y de su capacidad de retención de agua (Sánchez & Royse, 2001).

### 2.9.5 Elementos traza

Durante el crecimiento del hongo el porcentaje de nitrógeno (N), potasio (K), fosforo (P), calcio (Ca) y magnesio (Mg) en el sustrato aumentan, pero en la constitución

final del sustrato existe un ligero decremento que corresponde al contenido de estos bioelementos en los cuerpos fructíferos del hongo pues son los minerales que se encuentran en mayor concentración en el basidioma (Chang & Hayes, 1978; Patel et al., 2009).

Los elementos requeridos por la mayoría de los hongos son el azufre, fosforo, potasio y magnesio. El azufre es necesario para formar los aminoácidos que lo contienen y se encuentran presentes en el hongo como la cisteína, metionina y vitaminas como la tiamina y biotina, otro mineral importante es el fosforo y su importancia radica en su presencia como adenosín trifosfato (ATP), ácidos nucleicos y en los fosfolípidos de las membranas, el potasio es otro elemento metálico importante pues participa en el metabolismo de los carbohidratos y en el mantenimiento de equilibrio iónico, el magnesio es un elemento que activa varias enzimas y es importante en el metabolismo del ATP. Existen otros elementos esenciales en el desarrollo de los hongos pero que se requieren en concentraciones mucho menores como el hierro componente de la catalasa y los citocromos, el zinc que es un constituyente o activador de enzimas como la alcohol deshidrogenasa, el manganeso y cobre que son activadores de enzimas (Chang & Miles, 2004). Patel et al. (2009) encontraron que el contenido de cobre en el sustrato sobre el que se cultiva *P. ostreatus* tiene un efecto sobre la producción de lacasa, pues al incrementar la concentración de sulfato de cobre de 0.06 a 0.28 mM incrementaron la producción de lacasa, pero no se observó un aumento en la biomasa fúngica y con concentraciones superiores a 0.28 mM disminuyó el crecimiento fúngico y la producción de lacasa.

#### **2.9.6 Tamaño de partícula**

De acuerdo con (Membrillo, Sánchez, Meneses, Favela & Loera, 2008) el enriquecimiento de proteínas después del crecimiento de *P. ostreatus* en el bagazo de caña de azúcar a diferentes tamaños de partículas dependía del tipo de cepa empleada en el análisis, al emplear la cepa CP-50 el contenido de proteínas era mayor al incrementar el diámetro de la partícula de 0.92 a 2.9 mm, contrario a lo que ocurría al usar la cepa IE-8, por otra parte la cepa IE-8 tuvo una mayor actividad

enzimática (xilanasas y lacasas) que la cepa CP-50 y presentó el valor más alto con el mayor diámetro de partícula.

## **2.10 Sustratos empleados para el cultivo de *P. ostreatus***

*P. ostreatus* se pueden cultivar sobre una gran variedad de sustratos, siendo las más utilizadas pajas de cebada, trigo, centeno, avena, arroz y sorgo, y en menor cantidad la pulpa de café y algunos bagazos como los de caña de azúcar y de maguey tequilero, también se realizan combinaciones de sustratos para incrementar la producción (Gaitán et al., 2006), su habilidad para degradar la lignina permite el reciclaje de residuos agrícolas, agroindustriales y forestales a la vez que se genera un producto alimenticio.

Se han realizado varias investigaciones para aprovechar los materiales lignocelulósicos en la producción de hongos setas y encontrar aquellos que cumplan con características como disponibilidad en cantidad y continuidad, características fisicoquímicas conocidas, bajo costo, así como facilidad de manejo y transporte (Guzmán et al., 2013), que ofrezcan una alta disponibilidad de nutrientes para el cultivo de *Pleurotus* y aseguren altos rendimientos (Piña et al., 2016).

En los trabajos descritos en el párrafo anterior se emplean varios subproductos no convencionales en el cultivo de *Pleurotus* para contribuir a la biorremediación de ecosistemas a la vez que se genera un alimento rico en proteínas, por ejemplo Pardo et al. (2008) realizaron un cultivo de *P. ostreatus* sobre fibra de kenaf sola y mezclada (1:1, p/p) con paja (una mezcla de paja de trigo y cebada 2:1; p/p), sarmiento de vid y alperujo, los resultados de la caracterización de los sustratos pasteurizados y sus parámetros de producción después de 23 días de incubación a una temperatura entre 25 y 30 °C, una inducción de fructificación mediante ventilación, reducción de temperatura, humedad relativa, ventilación y un periodo de cultivo de 69 días se muestran en la tabla 2.6

Tabla 2.6 Propiedades de la fibra de kenaf y su combinación con otros sustratos en la producción de *P. ostreatus*

Sustrato	%N	%C orgánico	C/N	pH	%Hum	Precocidad (días)	%EB
Kenaf	1.1	50.6	46	8.89	77	41.3	84.4
Kenaf + paja	0.96	50.9	53.1	8.5	76.6	46.8	94.3
Kenaf+ sarmiento	0.88	50.2	57	7.93	74.3	38.4	82.2
Kenaf + alperujo	1.36	48.7	35.8	6.88	67.3	40.1	45.5

Respecto a los sustratos más utilizados Romero et al. (2010) realizaron un cultivo de *P. ostreatus* sobre paja de trigo, paja de cebada y rastrojo de maíz, así como hoja de plátano y pajilla de frijol obteniendo los resultados mostrados en la tabla 2.7, los sustratos poseían un tamaño de partícula comprendido entre 1 a 3 cm, la incubación se realizó hasta la aparición de los primeros primordios con obscuridad total a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C al igual que la etapa de fructificación agregando a esta última un porcentaje de humedad comprendido entre el 70 y 80 %, luz diurna indirecta y aereación con un total de 3 cosechas por sustrato.

Tabla 2.7 Características y parámetros de producción de *P. ostreatus* con diferentes sustratos

Sustrato	% Proteína bruta	Periodo de cultivo (días)	Incubación (días)	Precocidad (días)	%EB
Hoja de plátano	17.89	63	22	27	123.3
Paja de trigo	15.1	68	22	27	129.34
Paja de cebada	19.44	95	22	27	120.41
Pajilla de frijol	9.43	84	28	31	82.91
Rastrojo de maíz	4.92	61	28	31	66.77

### 2.10.1 Bagazo de malta

Andrino, Morte y Honrubia (2011) realizaron el cultivo de 3 cepas de *Pleurotus eryngii* empleando como sustrato bagazo de malta, cascarilla de arroz, paja de trigo y estas dos últimas combinadas con aserrín, observando únicamente colonización de *P. eryngii* sobre el bagazo de cervecería con un 71.9% de humedad, los resultados del proceso de producción para la cepa comercial fueron una eficiencia biológica de 77.5%, con una incubación con obscuridad total de 50 días a 21°C y 70% de humedad, para la inducción de primordios y la fructificación se ajustó la



temperatura a 16°C con iluminación de 350 lux (16 h luz/ 8 h oscuridad) y se aseguró la aereación, en total el periodo de cultivo tuvo una duración de 61 días con una sola cosecha.

Las propiedades químicas del bagazo de malta se muestran en la tabla 2.1

### 2.10.2 Digestato de malta

Rodríguez (2012) realizó una caracterización del digestato de malta en su fase semilíquida, reportó los resultados mostrados en la tabla 2.8 además de una toxicidad severa para su uso en la agricultura (contrario a la estabilización esperada a causa de la digestión anaerobia) atribuyéndolo a una fermentación metanogénica incompleta y a una posible liberación de sustancias inhibidoras, la acidificación del medio y altas concentraciones de nitrógeno amoniacal.

Tabla 2.8 Propiedades del digestato de malta

% Humedad	% C orgánico	% N	C/N	pH
89.67	42.67	0.4	106.33	5.19

### 3 MÉTODOS

Este capítulo se encuentra dividido en dos secciones, la primera describe el procedimiento y las condiciones que se emplearon para monitorear los parámetros de la digestión anaerobia. En la segunda sección se describen los recursos y acciones empleadas para caracterizar el bagazo y digestato de malta, así como la ejecución del cultivo experimental de *P. ostreatus* sobre bagazo de malta y digestato de malta.

#### 3.1 Digestión anaerobia del bagazo de malta

El monitoreo de la digestión anaerobia se llevó a cabo del 23 de agosto de 2017 al 08 de agosto de 2018 con un total de 352 días de operación, se empleó un digestor de tipo horizontal semicontinuo ubicado en el laboratorio de Sistemas Energéticos Sustentables de la Facultad de Ingeniería en la UAEMex con un volumen de operación de 60 litros, a una temperatura de operación de 35°C e inoculado con digestato procedente de un biodigestor tipo bolsa ubicado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEMex que emplea como sustrato estiércol de animales de granja.

Durante el monitoreo existieron dos inhibiciones, por lo que el sistema se tuvo que reiniciar el día 119 y el día 315, existiendo tres procesos de digestión analizados, el primero ocurrió entre los días de operación 1 y 118 (Digestión anaerobia 1 o DA1), el segundo entre los días 119 y 314 (Digestión anaerobia 2 o DA2) mientras que el tercero se monitoreo entre el día 315 y 352 (Digestión anaerobia 3 o DA3)

##### 3.1.1 Carga orgánica

El bagazo de malta fue proporcionado por micro cervecera “Gobernadora Brewing Company” ubicada en Toluca, Estado de México y consiste en el subproducto de la cocción de malta adicionado con pequeñas cantidades de lúpulo, para evitar su rápida descomposición causada por su alto contenido de humedad (73% de agua) se sometía a un tratamiento de deshidratación solar con lo cual se obtenía un 4% de humedad remanente, con ello se facilitaba su almacenaje previo a su uso.

La carga orgánica fue de tipo variable (mostrada en las figuras 4.1, 4.4 y 4.7), durante los primeros 56 días de operación se alimentó con el sustrato húmedo y posterior a ellos se empleó el bagazo de malta deshidratado, se comenzó con pequeñas cantidades y se fue elevando con la finalidad de alcanzar un punto de operación en el cuál existiera la mayor producción de biogás con la mejor concentración de metano sin que se produjera una sobrecarga que inhibiera el sistema.

### **3.1.2 pH**

El pH era medio en el laboratorio de Sistemas Energéticos Sustentables con un pH-metro marca HACH modelo HQ40D directamente sobre una muestra de 10 ml de digestato posterior a su extracción del digestor.

### **3.1.3 Ácidos grasos volátiles (AGV's)**

El método para determinar los AGV's se describe en el anexo 1 y está basado la publicación de Bair, Eaton, and Rice (2017).

### **3.1.4 Nitrógeno amoniacal**

El método para determinar el nitrógeno amoniacal se describe en el anexo 2 basado en Bair et al. (2017).

### **3.1.5 Producción de biogás**

Se emplearon dos métodos para medir el volumen diario de producción de biogás, el primero se efectuó desde el día 23 de agosto de 2017 al día 12 de marzo de 2018 (día de operación 1 al día 202) en el que se usaron dos bolsas selladas herméticamente para almacenar el biogás (foto 3.1), las cuales eran vaciadas una vez a la semana o cuando se llenaban, mientras se vaciaba, el contenido de biogás pasaba por una columna con un volumen de 10 litros para contabilizar el volumen total almacenado que se dividía entre el total de días que permaneció dentro de las bolsas para obtener el volumen de biogás producido al día. Del día 13 de marzo del 2018 al día 09 de agosto de 2018 (día de operación 203 al día 352) la producción

diaria de biogás se realizó mediante un gasómetro marca Ritter modelo TG 0.5. Todas las medidas se corrigieron a temperatura y presión estándar.



Foto 3.1 Bolsas de almacenamiento de biogás y columna de agua usada para medir la producción de biogás

### **3.1.6 Concentración de sólidos volátiles**

A partir de la concentración de sólidos volátiles en el bagazo y digestato de malta se pudo calcular el porcentaje de sólidos volátiles removidos durante la digestión anaerobia. Se determinó el contenido de sólidos volátiles por medio de deshidratación a 105°C y calcinación a 550°C (Bair et al., 2017; EPA, 2001).

### **3.1.7 Concentración de metano en el biogás**

Fue determinado con una celda de gas colocada en un FTIR IRPrestige-21 ubicado en el laboratorio de Sistemas Energéticos Sustentables de la facultad de ingeniería de la UAEMex, en donde se midió la absorción de metano en el número de onda de 3012.81  $\text{cm}^{-1}$ .



Foto 3.2 FTIR empleado para determinar la concentración de metano en el biogás

### **3.2 Caracterización de los sustratos**

El bagazo de malta analizado fue una muestra tomada del mes de junio de 2018 del sustrato empleado para la digestión anaerobia mencionada en el subtítulo 3.1, el digestato utilizado, fue el resultado del paso del bagazo de malta por la digestión anaerobia en el mismo biodigestor.

Se empleó como testigo rastrojo de maíz, el cual es un material que se ha utilizado exitosamente en la producción del hongo seta bajo las condiciones que se emplearon en el cultivo experimental de la presente investigación.

El rastrojo de maíz fue proporcionado por el área de producción de la Facultad de Ciencia Agrícolas de la UAEM. El bagazo y digestato de malta fueron deshidratados exponiéndolos a la radiación solar y almacenados hasta que se inició con el cultivo experimental.



Foto 3.3 Sustratos empleados durante el método de investigación. De izquierda a derecha, bagazo de malta, digestato de malta y rastrojo de maíz

A cada sustrato se les analizó:

- **Contenido de nitrógeno total:** por el método Kjeldahl (Anexo 3) basado en Bair et al. (2017). El análisis se realizó en el Laboratorio de Calidad de Suelos del Centro de Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la UAEMéx a cargo del Mtro. Isaías Valencia Becerril.
- **Contenido de carbono orgánico:** se realizó en el laboratorio de calidad del agua del Instituto Interamericano de Tecnología y Ciencias del Agua (IITCA) perteneciente a la UAEMéx con un analizador de carbono orgánico modelo 1020A de la marca IO Analytical.
- **pH:** que se determinó por el método de dilución 1:2 (v/v) (Torres, Camberato, Lopez & Mickelbart, 2019)
- **Cantidad de humedad:** que contenían después de adicionarle agua para lograr la hidratación necesaria para la siembra. La medición se realizó con una balanza analizadora de humedad marca OAUS modelo MB23 en el laboratorio de sistemas energéticos sustentables de la Facultad de Ingeniería de la UAEMéx.

- **Minerales:** Se analizaron en un laboratorio externo a la UAEMéx por el método de digestión ácida desarrollada por Rosopulo 1976 como se indica en Weber et al. (2014)
- **Tamaño de partícula:** Los sustratos fueron cribados en diferentes tamices pertenecientes al laboratorio de materiales de la Facultad de Ingeniería de la UAEMéx hasta encontrar el número de malla en el cual pasaran todas las partículas del sustrato.

### **3.3 Cultivo experimental**

El cultivo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMéx. A continuación, se describe el desarrollo de cada una de las fases del cultivo experimental que comprende la preparación del sustrato, la siembra, incubación, fructificación y la cosecha.

#### **3.3.1 Preparación del sustrato.**

Para el cultivo de *P. ostreatus*, el sustrato debe contener entre el 70 y 75% de humedad, con tal finalidad se les adicionó agua hasta que al tomar una porción del tamaño del puño de la mano y presionarla ligeramente, escurrían pequeñas gotas de agua entre los dedos como lo recomienda Guzmán et al. (2013). Aproximadamente 400 g de sustrato humectado se colocó en bolsas de polietileno grueso y transparente. Para eliminar los microorganismos inhibidores, se llevaron a la autoclave por 30 minutos a 120°C a una presión que varió de 15 a 21 psi, como las bolsas no resistieron las condiciones dentro de la autoclave, se rompieron y fueron trasladadas a bolsas nuevas dentro de un área esterilizada por medio de dos mecheros bunsen, posterior a ello se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

#### **3.3.2 Siembra**

El inóculo utilizado para la incubación fue adquirido comercialmente y se encontraba preparado sobre semillas de sorgo, el peso de las semillas agregadas fue del 10% del peso del sustrato húmedo, aunque se recomienda agregar entre el 3 al 5% del peso húmedo del sustrato para una producción comercial (Guzmán et al., 2013), al incrementar la cantidad de semillas agregadas se produce un

incremento en la eficiencia biológica (Dahmardeh, 2013), como en este caso la producción es experimental y no comercial no se quiso comprometer la producción a causa de una escasez de micelio. La siembra se realizó en un área esterilizada por medio de dos mecheros bunsen.



Foto 3.4 Área en que se realizó la siembra, esterilizada por medio de dos mecheros bunsen.



Foto 3.5 Inóculo utilizado para el cultivo.

### 3.3.3 Incubación y fructificación

Después de la inoculación o siembra, las bolsas fueron trasladadas a un módulo semioscuro de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMéx, donde experimentaron su fase de incubación y fructificación, sin control de temperatura ni humedad. Cuando se empezó a observar la aparición de los primeros primordios y para mantener un alto porcentaje de humedad, tres días de la semana se dejaba gotear diez litros de agua colocados arriba del cultivo para que el agua pudiera caer cerca de las bolsas.





Foto 3.6 Módulo de incubación y fructificación.



Foto 3.7 Muestras en fase de incubación.

### 3.3.4 Cosecha

Cuando las setas concluyeron su etapa de fructificación y maduraron, se procedió a la cosecha, realizando un corte del estípite con un cúter a ras de a bolsa.



Foto 3.8 Fructificación del hongo seta lista para ser cosechada.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este apartado se encuentra dividido en tres secciones. La primera sección está relacionada con los parámetros de operación monitoreados durante la digestión anaerobia del digestato de malta y como estos determinan la estabilidad del proceso para la producción de biogás. La segunda sección presenta los resultados y comentarios de cómo influyen las características del bagazo y digestato de malta como sustratos destinados a la producción de *P. ostreatus* y en el caso del bagazo de malta, además, como sustrato para la digestión anaerobia. En tercer lugar, se muestran los datos obtenidos durante el cultivo experimental de *P. ostreatus*.

### 4.1 Digestión anaerobia del bagazo de malta

Durante la digestión anaerobia de bagazo de malta se llevó el control de varios parámetros para analizar el proceso, cuando las mediciones de dichos parámetros se encontraban dentro del rango recomendado se concluía que el proceso era estable.

#### 4.1.1 Carga orgánica

Las figuras 4.1, 4.4 y 4.7 presentan la carga orgánica en gramos de ST por día, las figuras 4.2, 4.5 y 4.8 muestran la tasa de carga orgánica (TCO) en kilogramo de sólidos volátiles por metro cúbico al día con que fue alimentado el digestor y en las figuras 4.3, 4.6 y 4.9 se aprecia la variación del tiempo de retención hidráulico a lo largo del periodo de operación considerando que se quiere lograr una concentración de ST del 12% dentro del digestor y que posterior a ello el sustrato se seguirá agregando con el mismo contenido de ST.

La alimentación se efectuaba de lunes a sábados con excepción de los días no laborables. Los sábados o el día previo a algún día inhábil se alimentó entre un 25 a 50% extra de la carga suministrada en ese momento con la finalidad de evitar una disminución brusca en el volumen de biogás producido.

Al comparar la carga orgánica (figuras 4.1, 4.4 y 4.7.) con la concentración de AGV's (figuras 4.12 y 4.13), se puede observar que mientras los AGV's se encontraban en un valor menor a 2000 mg/L la carga orgánica se incrementaba con

la finalidad de obtener una mayor producción de biogás, pero una vez que estos AGV's se elevaban drásticamente o se encontraban cercanos o superaban los 2000 mg/L la carga orgánica se disminuía o suspendía.

Durante el proceso de DA1 (comprendida entre el día 1 y 118) la carga orgánica se incrementó hasta el día 94 pues el día 95 se presentó una concentración de AGV's de 1710 mg/L (como se observa en la figura 4.12) y un pH de 7.93 (figura 4.10) por lo que se comenzó a disminuir la carga hasta que se omitió por completo a partir del día 103, el día 104 se adicionó una solución ácida con la finalidad de reducir un poco el pH pero en su lugar ocurrió una excesiva disminución que alcanzó el valor mínimo medido de 5.7 el día 114 y un valor máximo de AGV's de 4730 mg/L medidos el día 105.

Después de las medidas que se aplicaron para llevar el pH y la concentración de AGV's al rango deseable en la digestión anaerobia (se describen en el apartado 4.1.2) y al observar la inhibición de la digestión anaerobia demostrada por los altos valores AGV's, nitrógeno amoniacal, así como la ausencia en la producción de biogás, se optó por reiniciar el sistema retomando la alimentación el día 139 correspondiente al proceso DA2 (comprendido entre el día 119 y 314).

Durante el proceso DA2 se mantuvo una alimentación del sistema, que poco a poco se fue incrementando hasta que el día 269 se presentó una sobrecarga al duplicar la carga orgánica en ST (de 192 a 384 g de ST) del día 268 al 269 (mostrados en la figura 4.4), lo que produjo un incremento de 1540 a 3210 mg/L de AGV's (figura 4.13), ante ello se suspendió la alimentación debido a una segunda inhibición causada por una sobrecarga puntual y se reinició el sistema con el proceso DA3 (comprendido entre el día 315 al 352) comenzando la alimentación el día 323 con una medida de 90 mg/L de AGV's para el día de operación 339.

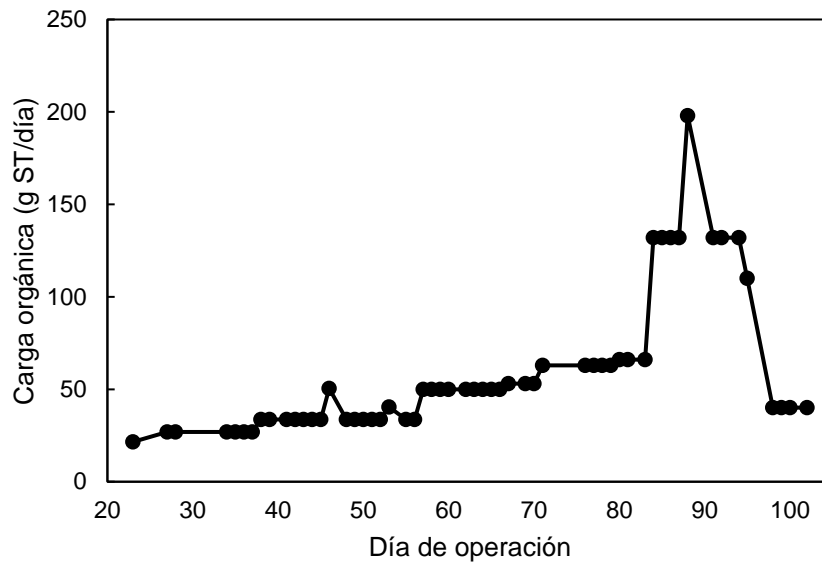


Figura 4.1 Carga orgánica en la digestión anaerobia entre los días 23 y 102 (DA1).

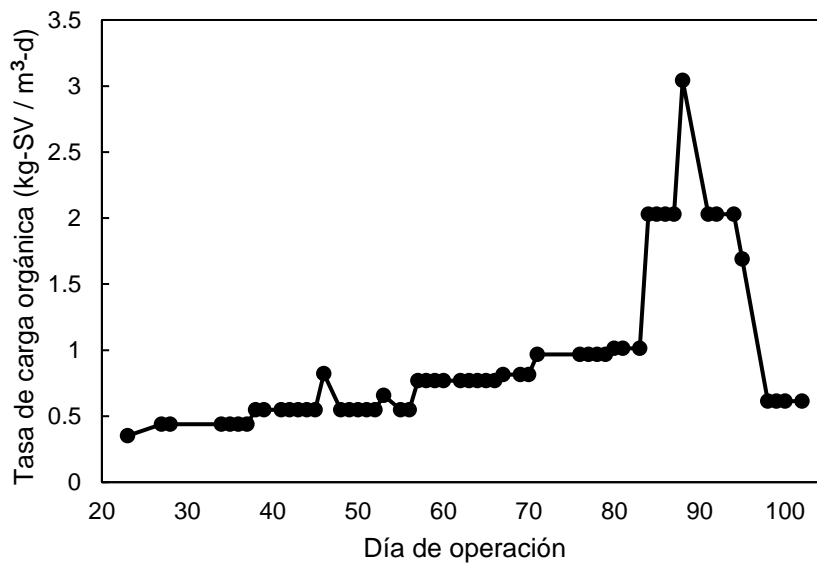


Figura 4.2 Tasa de carga orgánica entre los días 23 y 102 (DA1).

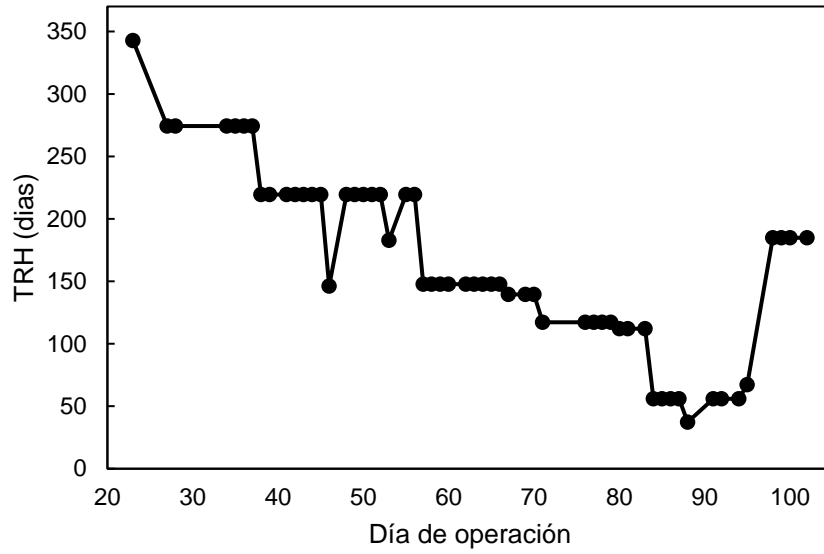


Figura 4.3 Tiempo de retención hidráulico entre los días 23 y 102 (DA1).

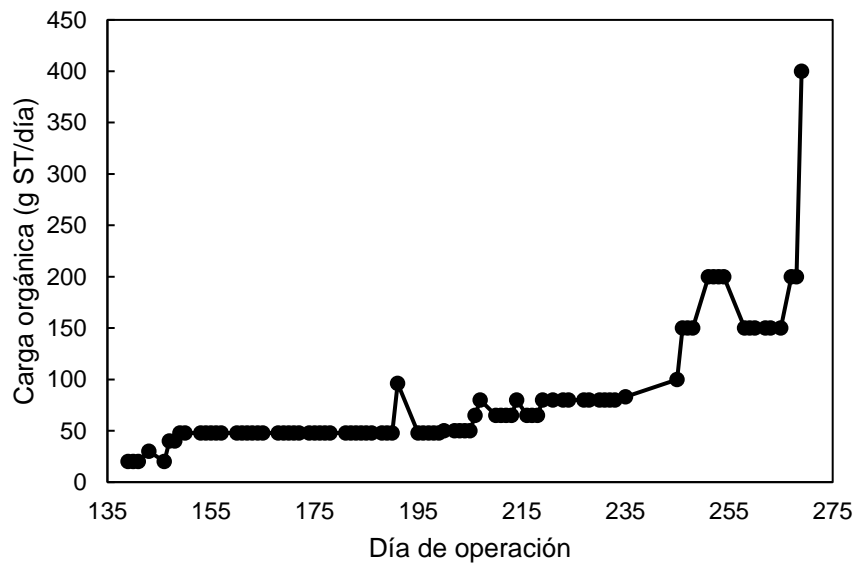


Figura 4.4 Carga orgánica en la digestión anaerobia entre los días 139 y 269 (DA2).

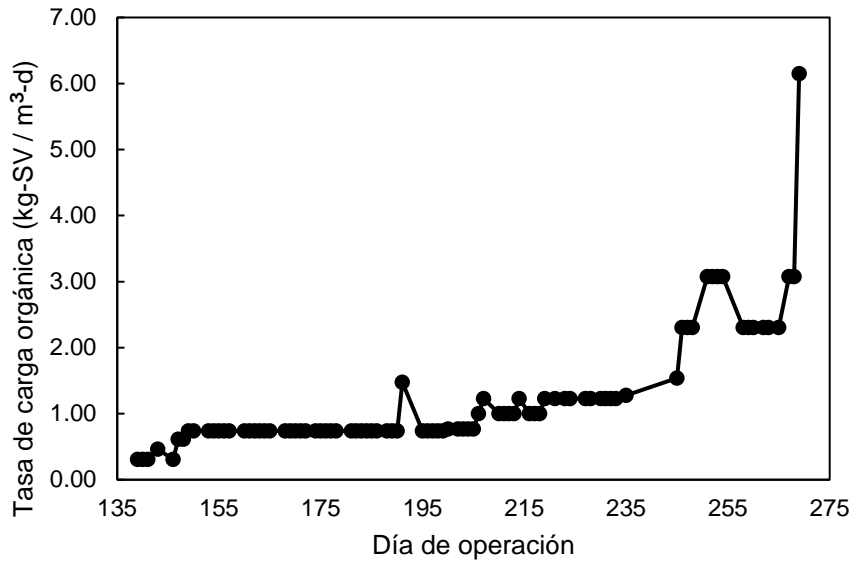


Figura 4.5 Tasa de carga orgánica entre los días 139 y 269 (DA2)

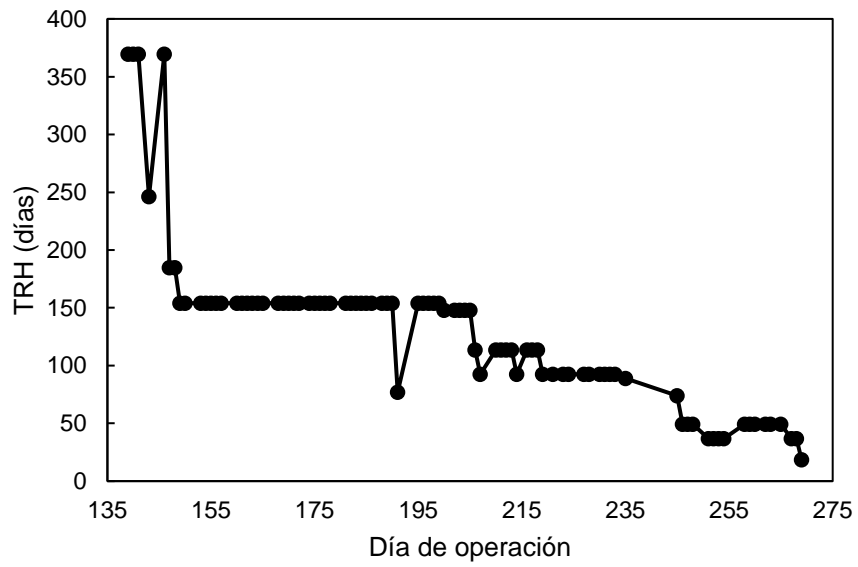


Figura 4.6 Tiempo de retención hidráulica entre los días 139 y 269 (DA2)

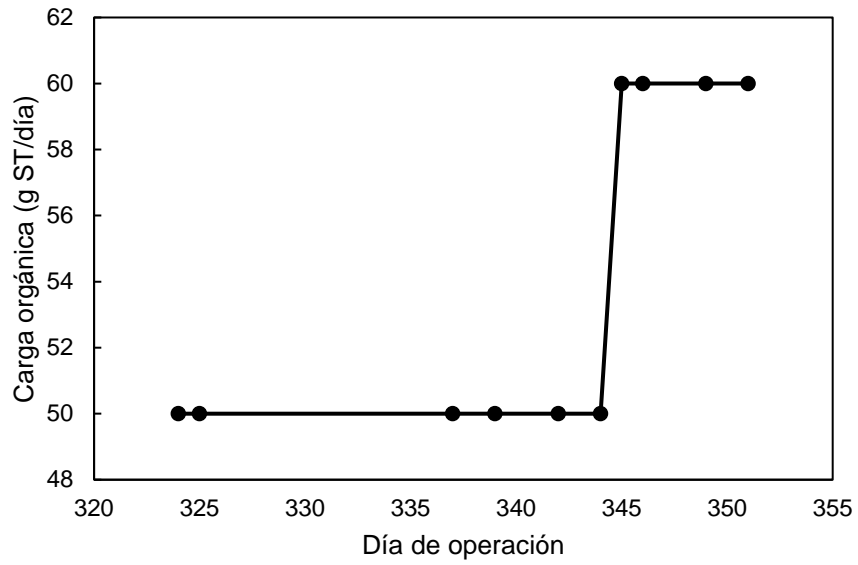


Figura 4.7 Carga orgánica en la digestión anaerobia entre los días 324 y 351 (DA3).

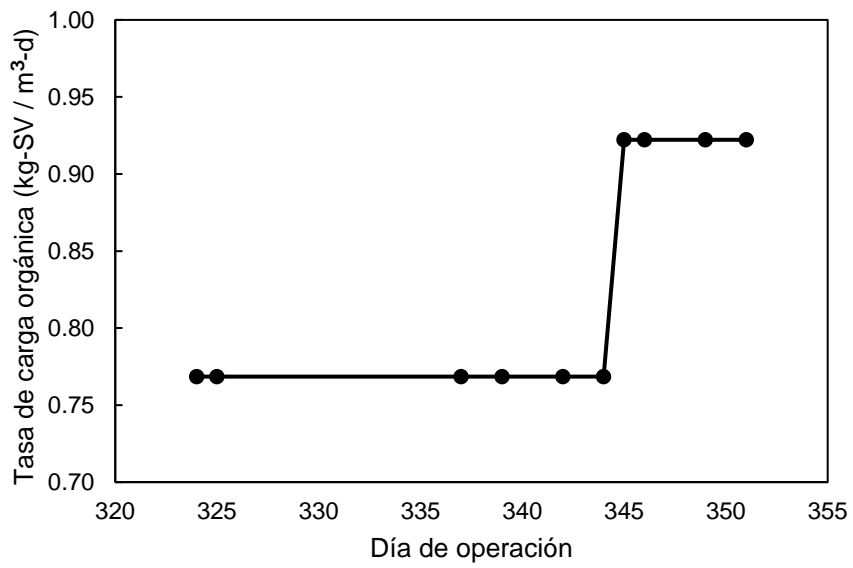


Figura 4.8 Tasa de carga orgánica ente los días 324 y 351 (DA3).

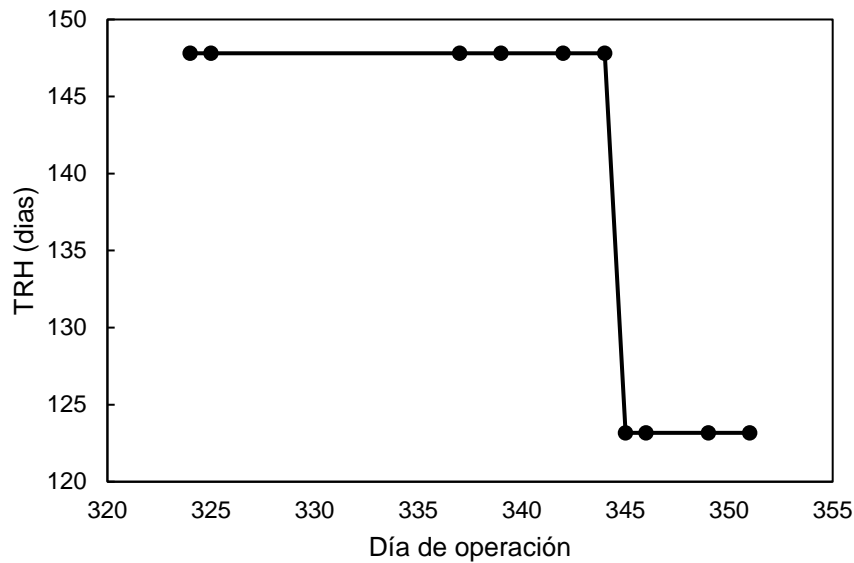


Figura 4.9 Tiempo de retención hidráulico ente los días 324 y 351 (DA3).

#### 4.1.2 pH en la digestión anaerobia

Durante el monitoreo de la DA1 se observó una disminución drástica del pH entre la medida del día 95 al día 113 debido a que el día 104 se adicionó 1500 ml de solución de HCl 1M que tenía la finalidad de reducir un poco el pH pues el medio estaba tendiendo a hacerse alcalino pero debido a que la solución estaba destinada para el volumen efectivo del biodigestor y dicho reactor estaba operando por debajo de ese valor ocurrió una excesiva disminución del pH.

Después de la disminución del pH durante la DA1, y para elevarlo a un valor apto, el día 113 se retiraron 30 L de digestato, se agregó el mismo volumen de agua y el día 115 se agregaron 4.1 L de una solución de bicarbonato de sodio 1M, con lo cual el día 116 el pH registró una medida de 7.5, como el digestato tenía un olor muy desagradable y la producción de biogás se detuvo, se optó por vaciar y llenar el biodigestor con agua e inóculo nuevo el día 119.

Durante el proceso de DA2 el pH se mantuvo dentro de un valor mínimo de 7.3 y un máximo de 7.9 mientras que no se monitoreo el pH durante el proceso de DA3.

Las figuras 4.10 y 4.11 muestran los valores monitoreados de pH durante la DA1 y DA2, así como los promedios durante el periodo de digestión anaerobia estable.



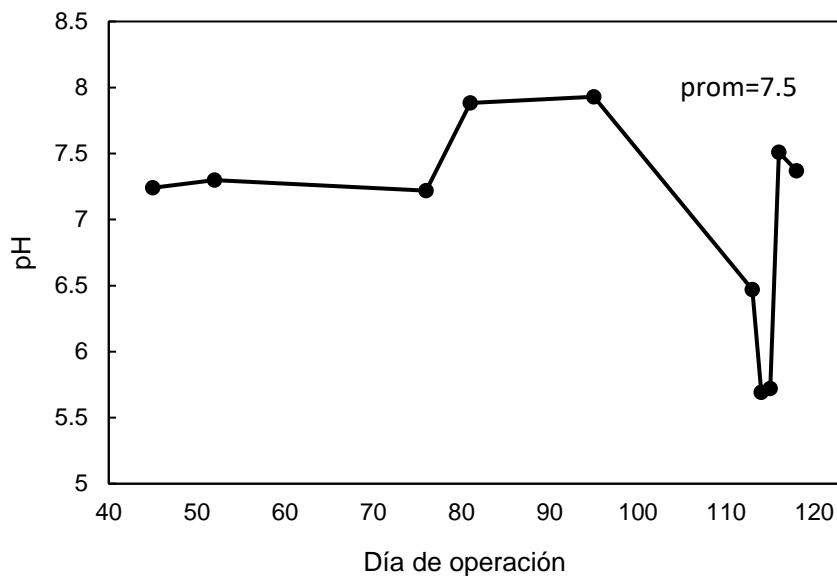


Figura 4.10 pH durante la digestión anaerobia del día 45 al día 118.

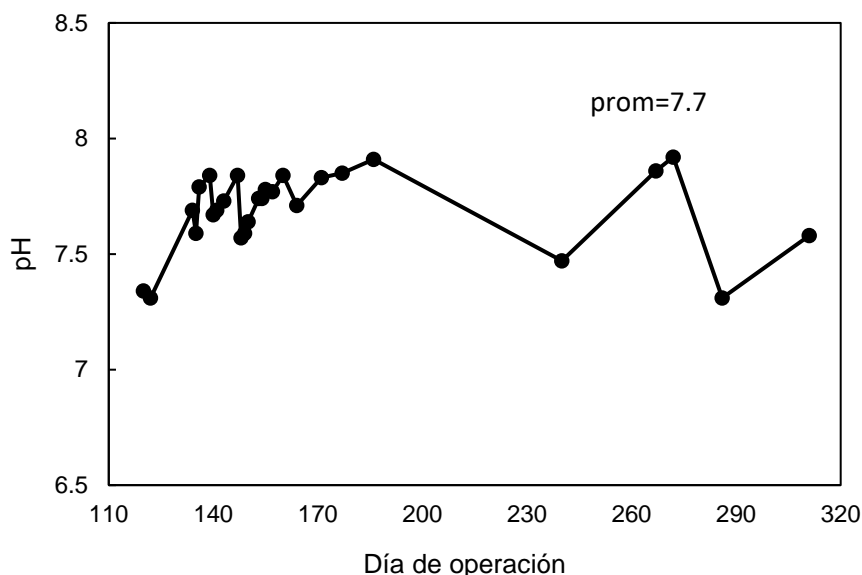


Figura 4.11 pH durante la digestión anaerobia entre los días 120 y 311.

### 4.1.3 Ácidos Grasos Volátiles

Otro factor que se utilizó para analizar la estabilidad del proceso de degradación fueron los AGV's que presentaban cambios más evidentes a los mostrados en el pH.

Para el día 101 correspondiente a la DA1 se obtuvo una medición de 2830 mg/L la cuál es superior al máximo valor recomendado de 2000 mg/L (FNR, 2010),

la cual se explica a que se duplicó la carga orgánica entre el día 83 y 84, pero un aumento mayor ocurrió el día 105 (un día después de que se agregó la solución de HCl) con 4730 mg/L, este fue uno de los parámetros que demuestran la inhibición de la DA1.

Después de reiniciar el sistema (vaciar el digestor y agregar inoculo nuevo) el primer valor correspondiente a la DA2 se midió el día 148. La mediada de AGV's de nuevo salió del rango aceptable el día 272 con una concentración de 3210 mg/L (mientras que el pH no presentó un cambio tan evidente) a causa de una sobrecarga de alimento suministrado el día 269, razón por la cual se suspende el suministro de sustrato, dicha concentración aumentó hasta alcanzar su valor máximo el día 291 con una concentración de 9420 mg/L.

Ante el elevado incremento de AGV's durante la DA2 el día 314 se vació el digestor y se llenó con inóculo nuevo así que la primer y única medición de AGV's para DA3 ocurrida el día 339 entregó como resultado 90 mg/L.

Las figuras 4.12 y 4.13 presenta el monitoreo de los AGV's de la DA1 y DA2 y su promedio durante el proceso de digestión anaerobia estable.

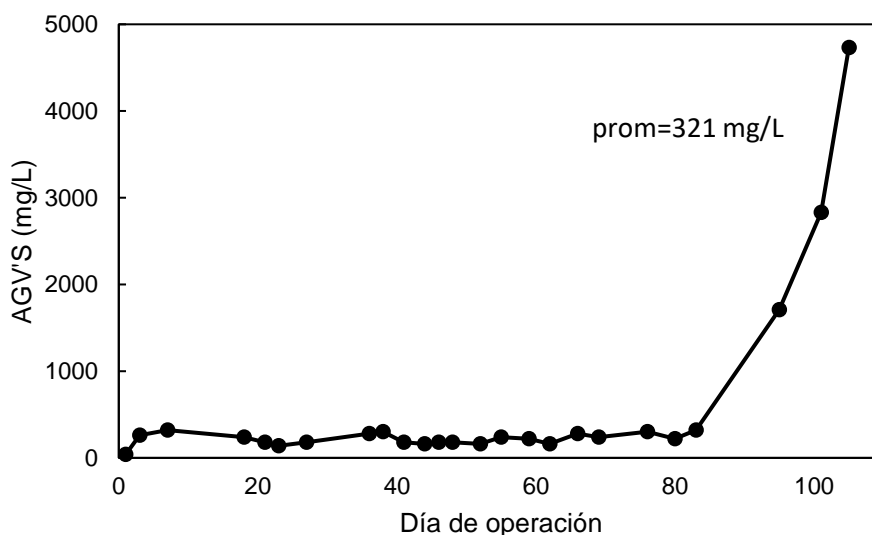


Figura 4.12 AGV's durante la digestión anaerobia entre los días 1 y 105 (DA1).

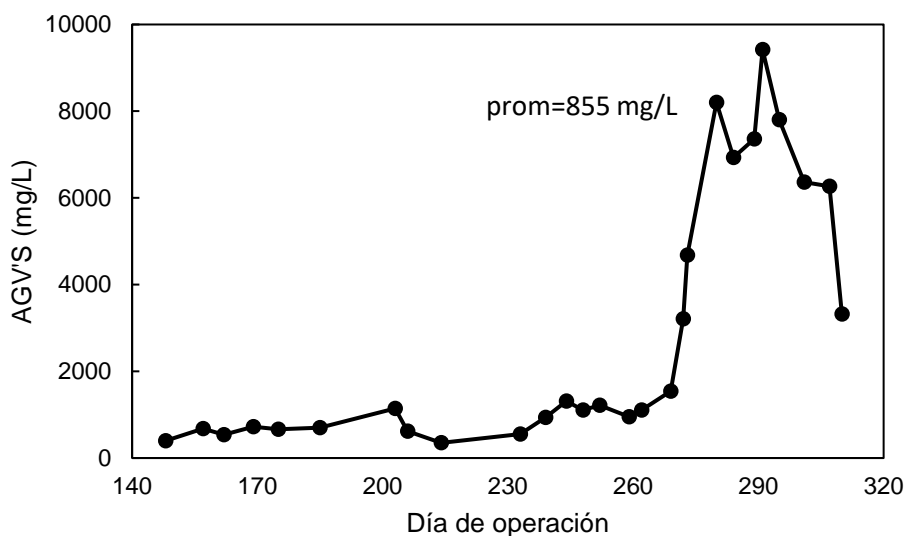


Figura 4.13 AGV's durante la digestión anaerobia entre los días 148 y 310 (DA2).

#### 4.1.4 Nitrógeno amoniacal

El monitoreo del nitrógeno amoniacal en los procesos y el promedio durante la digestión anaerobia estable se muestran en las figuras 4.14 y 4.15. Durante la digestión anaerobia se puede apreciar un claro aumento del Nitrógeno amoniacal a medida que transcurren el periodo de operación y a medida que se aumenta la carga orgánica.

El incremento en la concentración del nitrógeno amoniacal en el reactor se debe a que el sustrato es un material con un alto contenido de nitrógeno y proteínas (como se observa en la tabla 4.5 ya que produce una relación C/N inferior a la recomendada), que al degradarse dentro del reactor producen amoniaco, ante el incremento de la carga orgánica se elevan las concentraciones del nitrógeno amoniacal y el pH (que la mayor parte del tiempo se mantuvo cercano a 8).

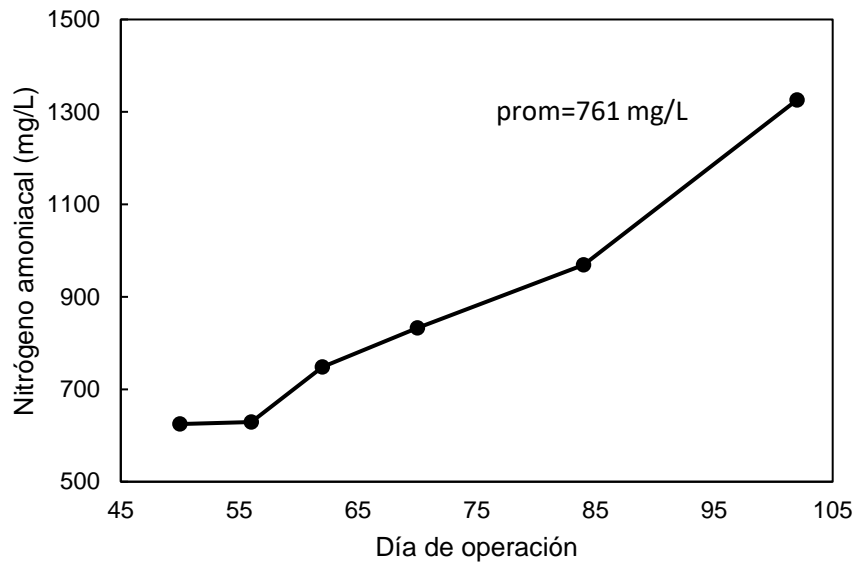


Figura 4.14 Nitrógeno amoniacoal durante la digestión anaerobia entre los días 50 y 102 (DA1).

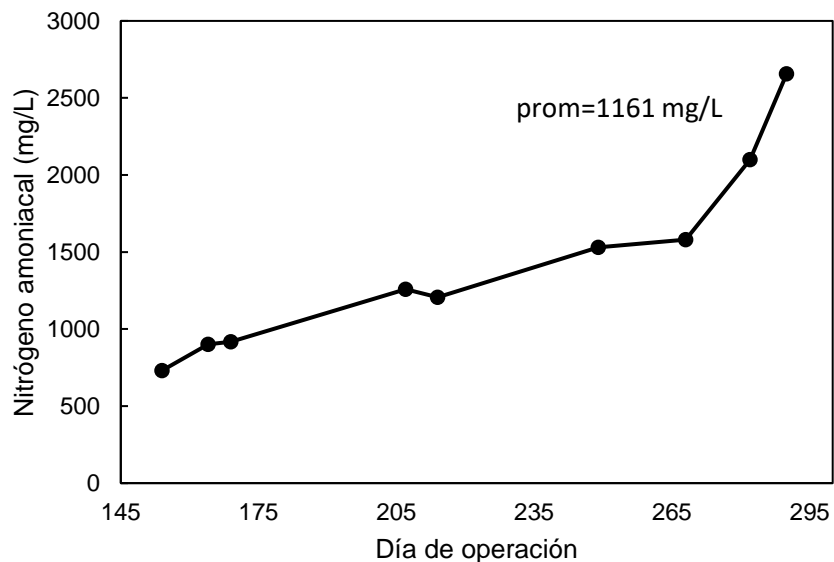


Figura 4.15 Nitrógeno amoniacoal durante la digestión anaerobia entre los días 154 y 290 (DA2).

#### 4.1.5 Concentración de sólidos volátiles

La concentración de sólidos volátiles eliminados durante el proceso de la digestión anaerobia se mantuvo entre 8.7 y 24.9% (como se aprecia en la figura 4.16) con un promedio durante el proceso estable de 17% para la DA1 y de 16% para la DA2, los cuales son valores bajos si se compara con el promedio de 79% reportado por Kafle y Kim (2013) o el 34% reportado por Bougrier et al. (2017) y hace referencia a una baja degradación de la materia orgánica.

Esta baja remoción de sólidos volátiles se debe a la composición del sustrato que contiene aproximadamente 16.8-25.4% de celulosa, 21.8-28.4 de hemicelulosa y 11.9-27.8% de lignina (Mussatto et al., 2006) y debido a la complejidad estructural de la lignina, su alto peso molecular, su estabilidad química e insolubilidad hacen que la biodegradación de este sustrato por medio de la digestión anaerobia sea lenta (Sezun et al., 2011).

Para facilitar la biodegradabilidad del bagazo de malta, se puede emplear un pretratamiento y como lo reporta Sezun et al. (2011) se sugiere que dicho pretratamiento sea biológico con hongos o bacterias lignocelulolíticas pues el pretratamiento químico (ácido y básico), termoquímico y mecánico tienen un efecto inhibitorio en el proceso anaerobio causada por los productos generados durante la degradación del material lignocelulósico (principalmente p-cresol) o como lo sugiere Bougrier et al. (2018) al adicionar elementos se puede mejorar la biodigestión anaerobia.

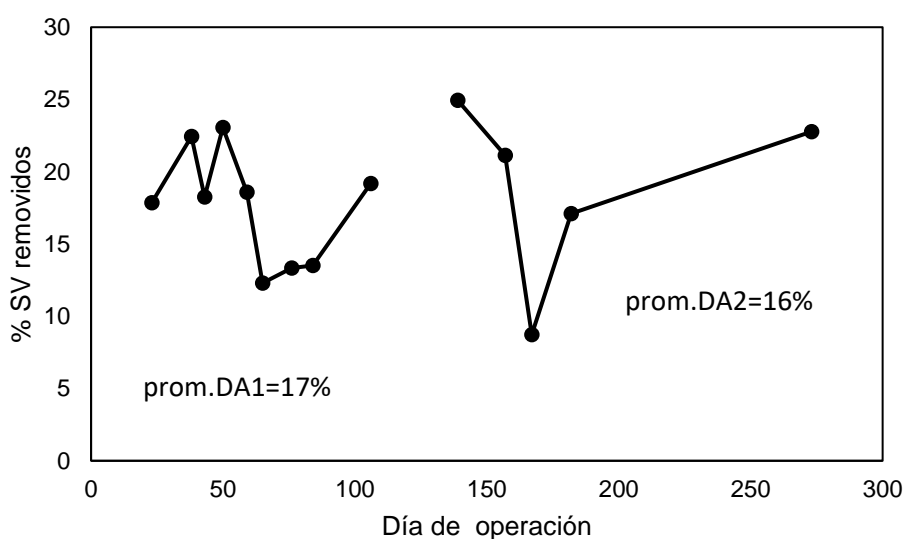


Figura 4.16 Porcentaje de Sólidos volátiles removidos.

#### 4.1.6 Producción de biogás

La producción de biogás diaria (L/día) está relacionada con la masa de sustrato alimentado, a mayor cantidad de sustrato alimentado se obtenía una mejor producción de biogás diaria (como se ve al comparar las figuras 4.1, 4.4 y 4.7 con la 4.17).

La máxima producción de biogás por día durante la DA2 ocurrió el día 270 y fue de 47 L/d debido a que un día antes se suministró la máxima carga empleada durante el proceso, misma que causó una sobrecarga que posteriormente llevó a una disminución de la producción de biogás e inhibición.

De igual forma la máxima producción durante la DA1 ocurrió el día 87 y fue causada por un aumento al doble en la carga orgánica entre el día 83 y 84 que de igual forma produjo la disminución posterior a la producción.

Por otra parte el rendimiento de biogás por gramo de ST o SV no incrementó directamente al elevar la cantidad de sustrato alimentado, al comparar las figuras 4.19 y 4.20 con la figura 4,1, 4.4 y 4.7 se puede observar cómo disminuye la producción de biogás por gramo de ST o SV al incrementar la carga orgánica, lo cual indica que existe un menor porcentaje de materia orgánica que se degrada y convierte en biogás, esto coincide con el incremento de AGV's e inhibición de los procesos por sobrecarga.

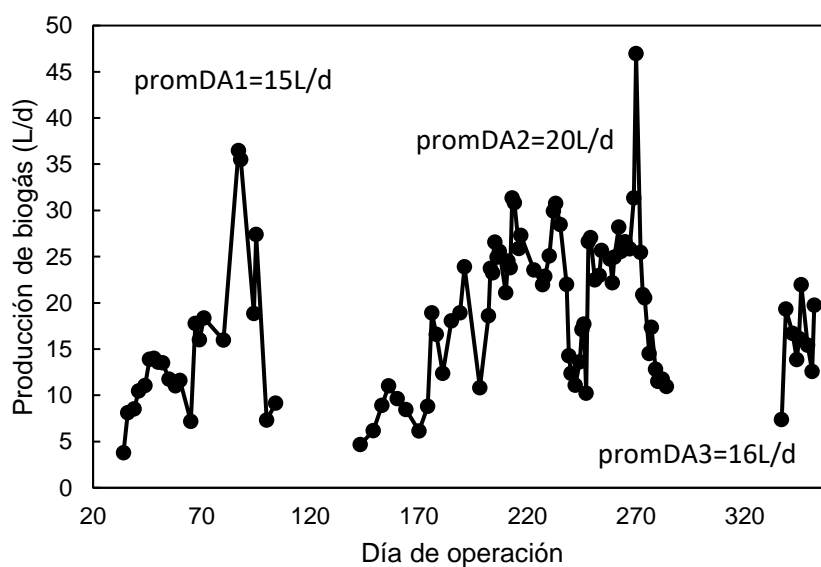


Figura 4.17 Producción diaria de biogás durante la digestión anaerobia.

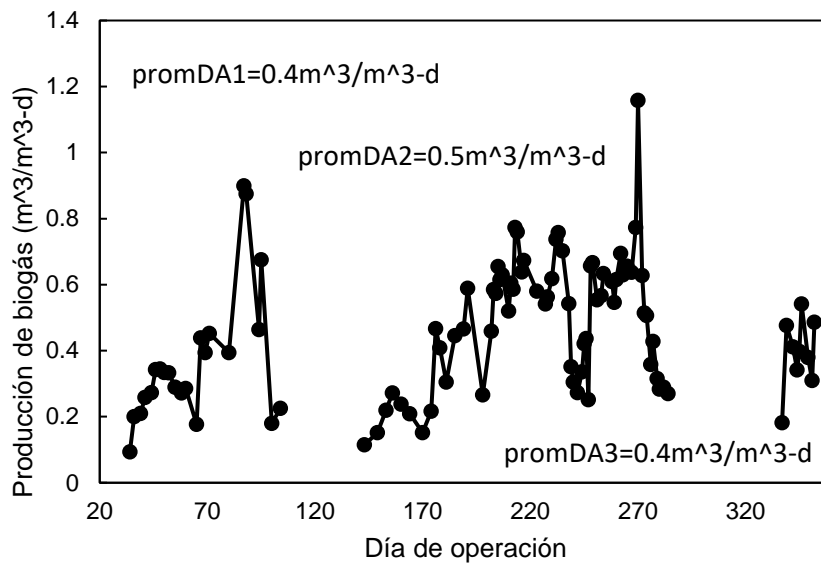


Figura 4.18 Producción diaria de biogás durante la digestión anaerobia por volumen del biodigestor.

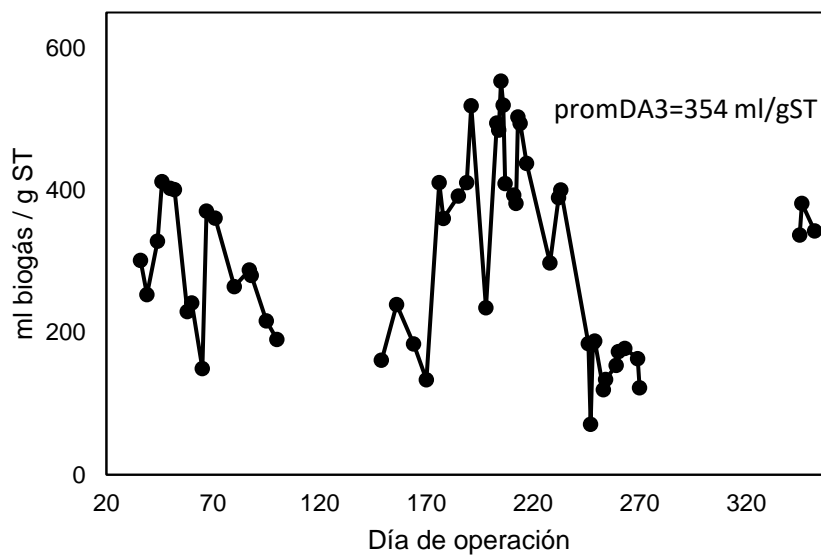


Figura 4.19 Producción de biogás por gramo de ST alimentado

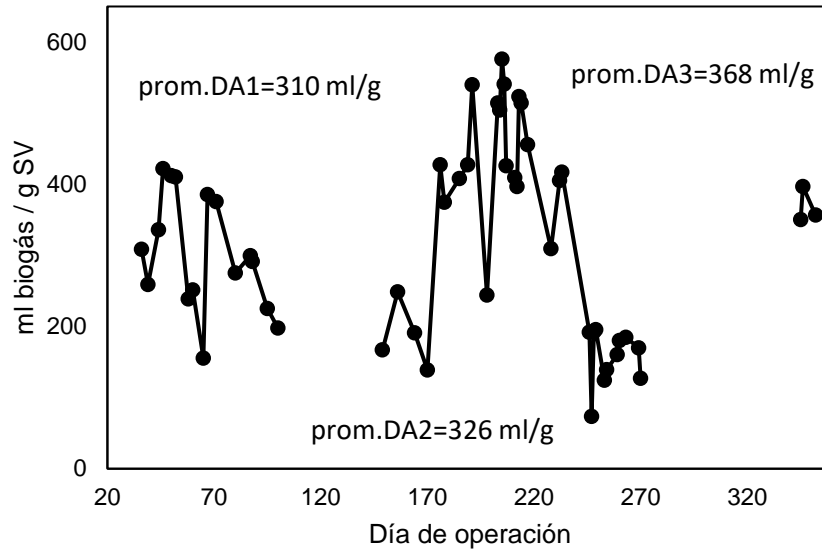


Figura 4.20 Producción de biogás por gramo de SV alimentado.

Los valores promedio durante el periodo de digestión anaerobia estable de los diferentes parámetros de producción de biogás medidos para los tres procesos analizados se muestran en la tabla 4.1. Al comparar los resultados con los reportados (mostrados en la tabla 2.3) podemos notar que la producción de biogás en ml/g ST se encuentra por debajo a los 530 ml biogás/g ST reportados por KTBL (2020), la producción en ml biogás/g SV y en m<sup>3</sup>biogás/m<sup>3</sup>día se encuentran dentro del rango reportado (173-508 ml biogás/g SV y 0.1-1.1 m<sup>3</sup>biogás/m<sup>3</sup>día) (Kafle & Kim, 2013; Rodríguez, 2012; Sezun et al., 2011).

Tabla 4.1 Parámetros de producción de biogás medidos durante la digestión anaerobia del bagazo de malta

Producción de biogás	DA1	DA2	DA3	Promedio
L biogás/día	15	20	16	17
m <sup>3</sup> biogás/m <sup>3</sup> día	0.3	0.3	0.3	0.3
ml biogás/g ST alimentado	300	314	354	323
ml biogás/g SV alimentado	310	326	368	335



#### 4.1.7 Concentración de metano en el biogás

El porcentaje de metano presente en el biogás varió entre el 27.6% a 57.7% (como lo muestra la gráfica 4.21) con un promedio de 41% para la DA1, 45% para la DA2 y 49% para la DA3, dichos promedios se encuentran por debajo del rango de 59-62% reportado por Ezeonu y Okaka (1996); Kafle y Kim (2013); Sezun et al. (2011) y KTBL (2020), lo cual se debe a una degradación incompleta del sustrato.

En las gráficas 4.22 a la 4.25 se pueden observar las producciones de metano en L/día, m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>-día, ml/ST alimentado y ml/SV alimentado.

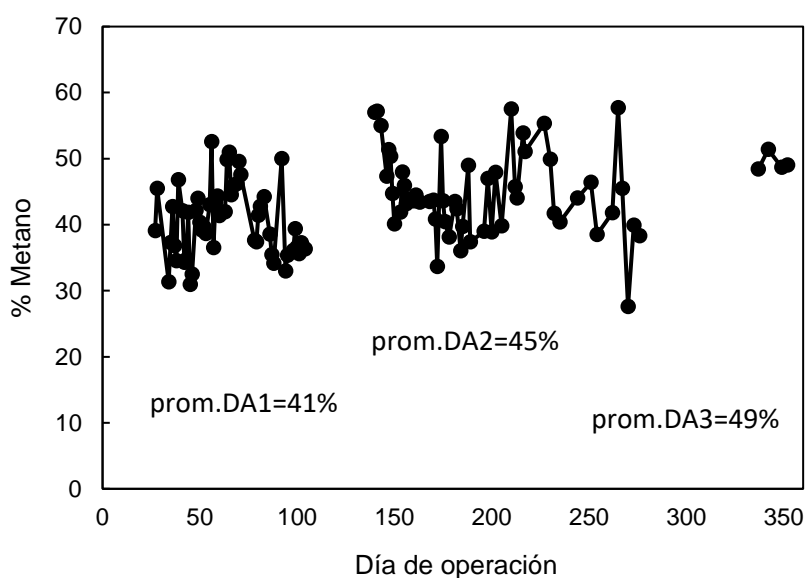


Figura 4.21 Concentración de metano en el biogás.

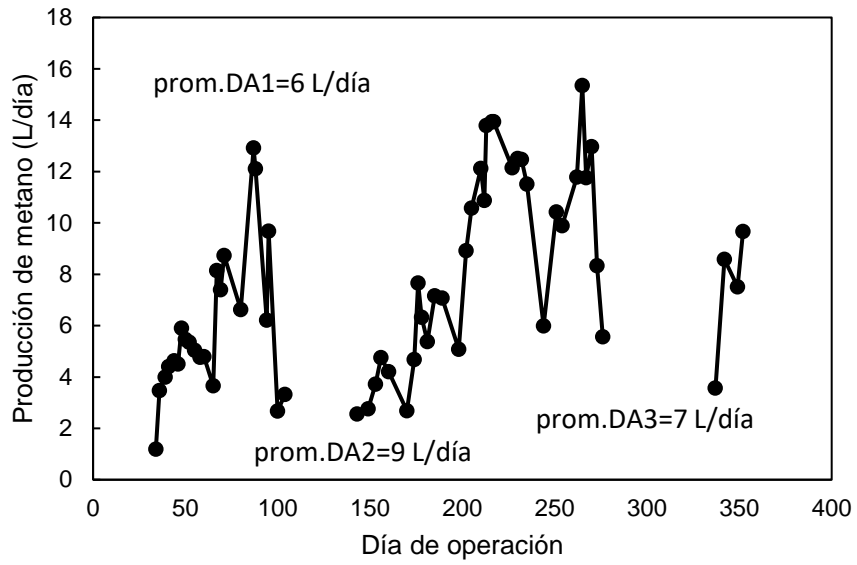


Figura 4.22 Producción diaria de metano durante la digestión anaerobia

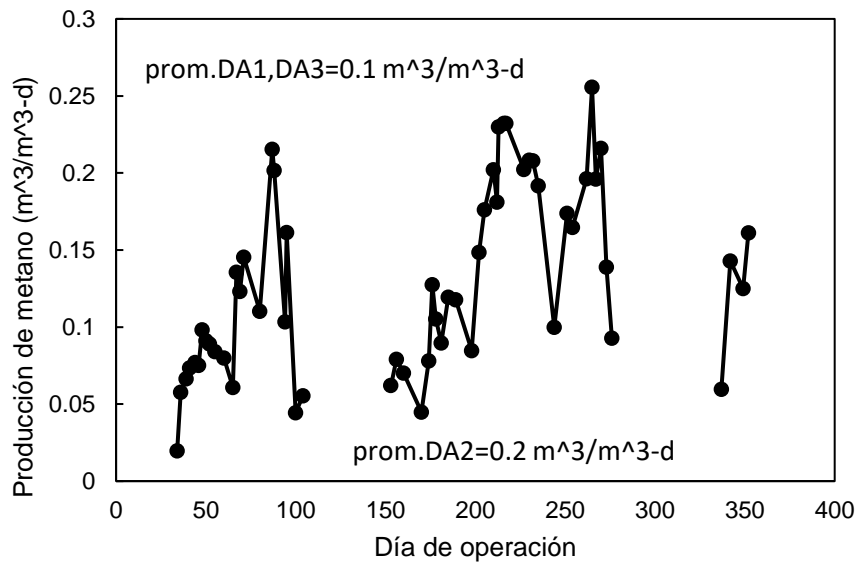


Figura 4.23 Producción diaria de biogás durante la digestión anaerobia por volumen del biodigestor

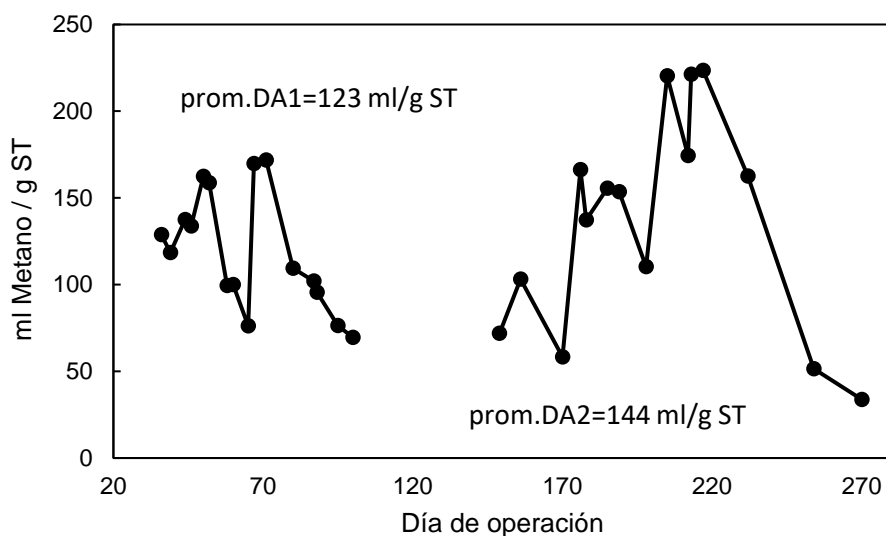


Figura 4.24 Producción de metano por gramo de ST alimentado.

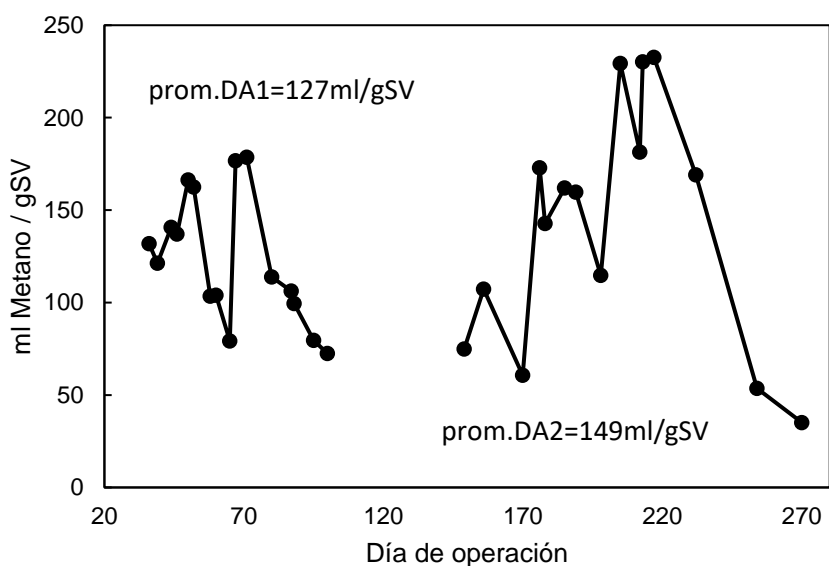


Figura 4.25 Producción de metano por gramo de SV alimentado.

Los valores promedio de la producción de metano durante el periodo de digestión anaerobia estable se muestran en la tabla 4.2. Se puede observar que debido al bajo porcentaje de metano presente en el biogás, el rendimiento de metano por sólido volátil alimentado es inferior al rango reportado de 240-500 ml metano/g SV (Bougrier et al., 2018; Bougrier et al., 2017; Gonçalves et al., 2015; Kafle & Kim, 2013).

Tabla 4.2 Parámetros de producción de metano durante el periodo estable de la digestión anaerobia

Producción de biogás	DA1	DA2	DA3	Promedio
L metano/día	6	9	7	7
m <sup>3</sup> metano/m <sup>3</sup> día	0.1	0.2	0.1	0.1
ml metano/g ST alimentado	123	144	n.d.	133
ml metano/g SV alimentado	127	149	n.d.	138

## 4.2 Caracterización de los sustratos

El porcentaje de nitrógeno total, carbono orgánico y contenido de minerales se realizaron sobre sólidos totales (ST). La prueba de nitrógeno total y carbono orgánico se realizó por duplicado, mientras que el método para determinar el pH tuvo tres replicas. Para el análisis estadístico se utilizó el software Minitab 17.1, se evaluó la desviación estándar en los resultados de cada tratamiento, posterior a ello se empleó la técnica de análisis de varianza y se aplicó la prueba de comparaciones múltiples Tukey para evaluar los datos y establecer las diferencias significativas de medias entre tratamientos ( $p=0.05$ ).

### 4.2.1 Nitrógeno

Se observó una diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre el valor del bagazo de malta y del digestato de malta, con una disminución en su porcentaje después de su paso por la digestión anaerobia, mientras que el contenido de nitrógeno en el bagazo fue 6 veces mayor al contenido de nitrógeno del rastrojo de maíz.

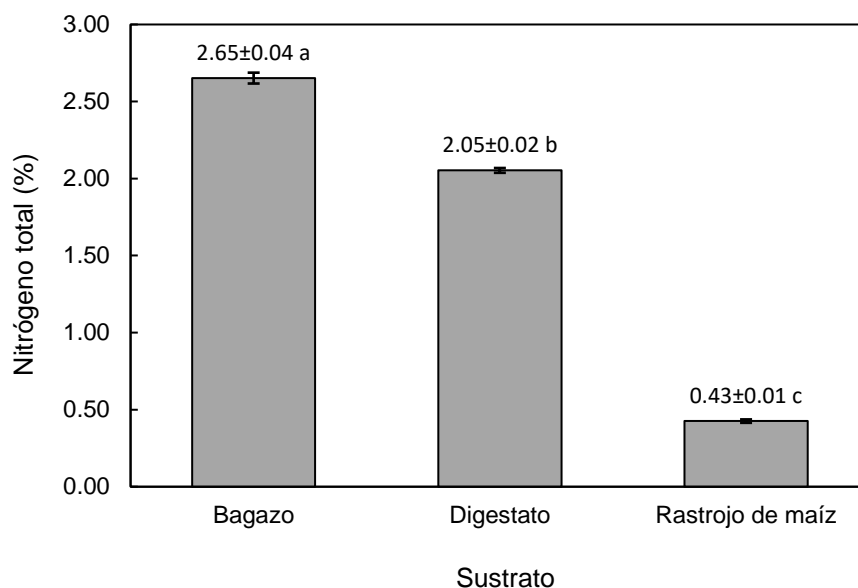


Figura 4.26 Porcentaje de Nitrógeno total en los sustratos

#### 4.2.2 Carbono orgánico y relación Carbono/Nitrógeno (C/N)

Los valores de carbono orgánico obtenidos entre el bagazo, digestato de malta y rastrojo de maíz no fueron estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ )

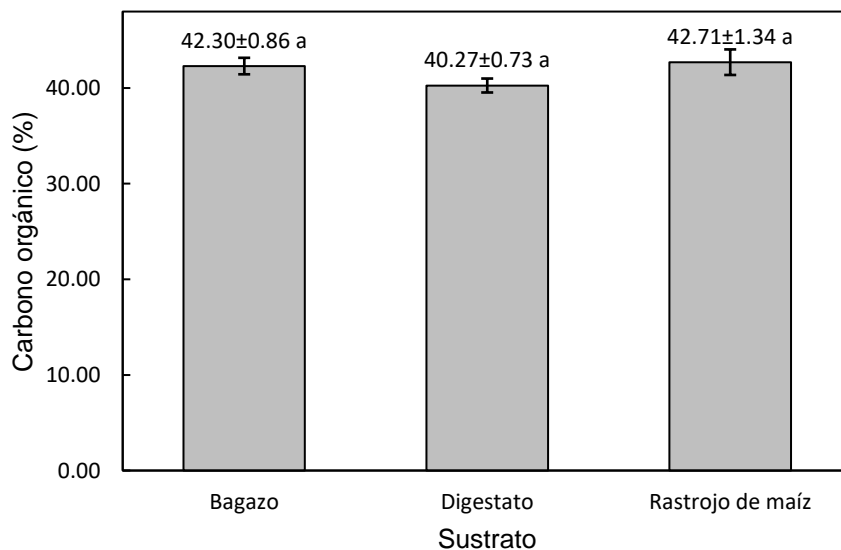


Figura 4.27 Porcentaje de Carbono orgánico en los sustratos

La relación C/N se obtuvo al dividir el porcentaje de Carbono orgánico entre el porcentaje de Nitrógeno total, los resultados obtenidos se observan en la figura 4.28 en donde sí existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

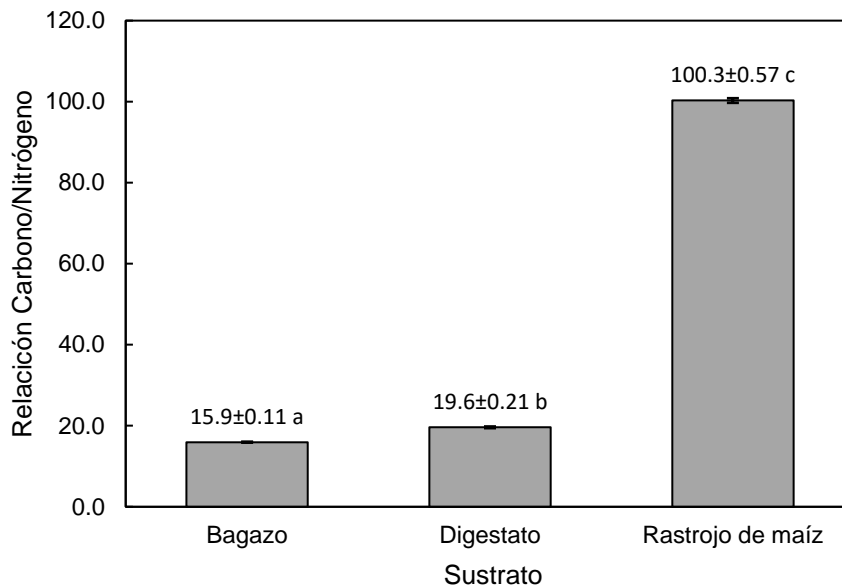


Figura 4.28 Relación C/N en los sustratos

#### 4.2.3 pH

Los valores obtenidos para el bagazo y el digestato de malta fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ), se observa que solo el rastrojo de maíz prestó un pH adecuado para el cultivo de *P. ostreatus* y el pH del bagazo de malta se encuentra por debajo del rango recomendado para una digestión anaerobia.

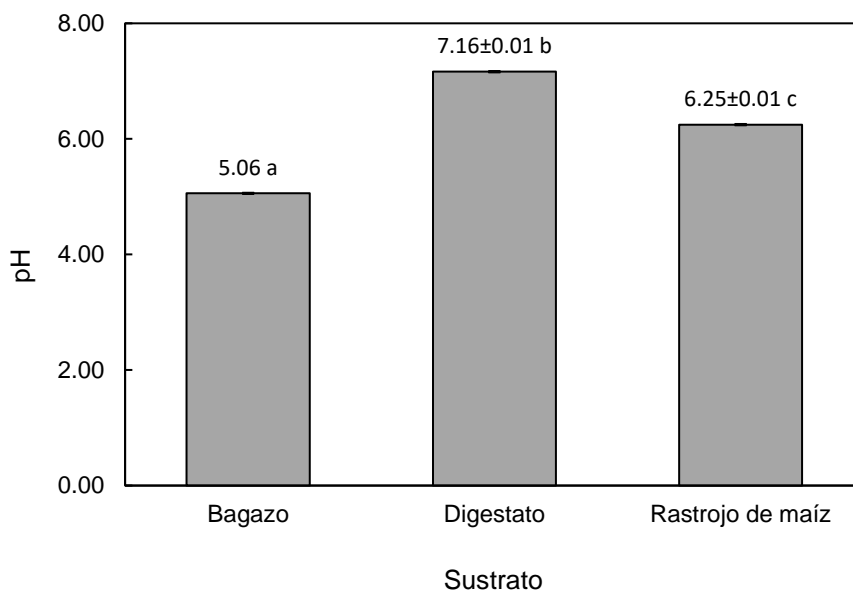


Figura 4.29 pH en los sustratos

#### 4.2.4 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula fue designado como la apertura del tamiz a través de la cual pasaban todas las partículas del sustrato analizado, los resultados se pueden apreciar en la tabla 4.3.

Tabla 4.3 Tamaño de malla a la que fueron cribados los sustratos

Sustrato	Tamaño de malla	Apertura del tamiz (mm)
Bagazo	1/2	12.7
Digestato	3/4	19
Rastrojo de maíz	3/4	19

#### 4.2.5 Características del bagazo de malta en la digestión anaerobia

La tabla 4.4 muestra el resumen de las características medidas del bagazo de malta empleado en el análisis de la digestión anaerobia y las recomendadas para los sustratos que se desean emplear en la digestión anaerobia. Como se puede apreciar, el alto contenido de nitrógeno presente en el sustrato genera una relación C/N inferior al valor mínimo recomendado, el pH es ácido comparado con el rango necesario mientras que el porcentaje de humedad es casi nulo y no recomendable para un biodigestor semicontinuo.

Tabla 4.4 Características analizadas y recomendadas en el bagazo de malta

Parámetro	Valor medido	Valor recomendado	Referencia
%Carbono /ST	42.3	-	-
%Nitrógeno/ST	2.65	-	-
C/N	15.9	20-30	(FAO et al., 2011; Zupancic & Grilc, 2012)
%Proteína cruda/ST	16.6	-	-
pH	5.06	6-8	(FAO et al., 2011; Kothari et al., 2014; Zupancic & Grilc, 2012)
%Humedad	4	88-92	(FAO et al., 2011)

#### 4.2.6 Características del bagazo y digestato de malta en el cultivo de *P. ostreatus*.

En las figuras 4.30 y 4.31 se resumen los resultados obtenidos en la caracterización de los sustratos y su comparación con los valores recomendados.

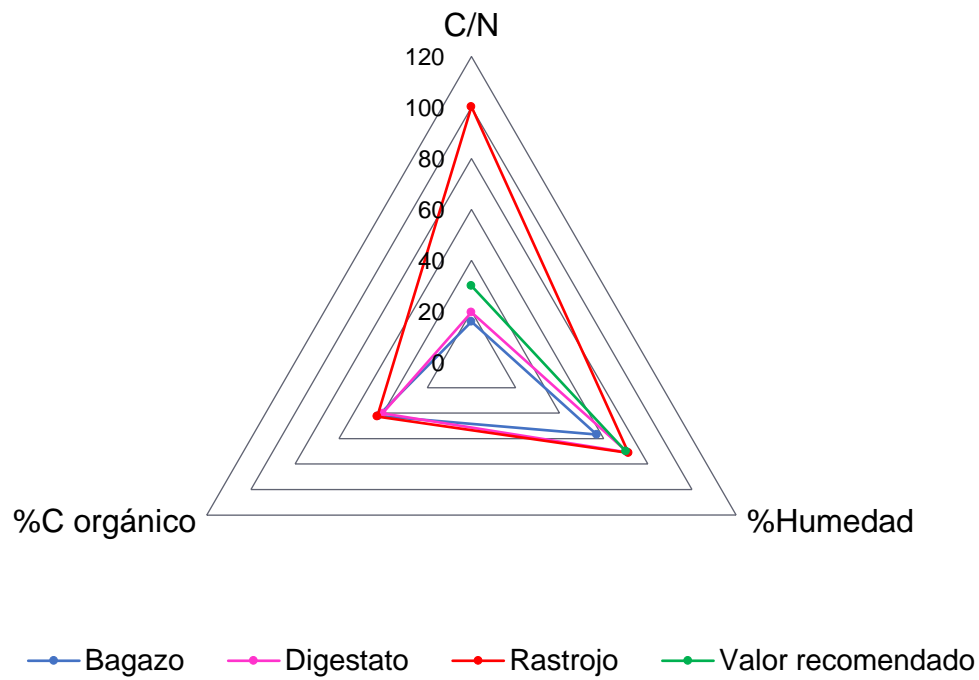


Figura 4.30 Características de los sustratos analizados.



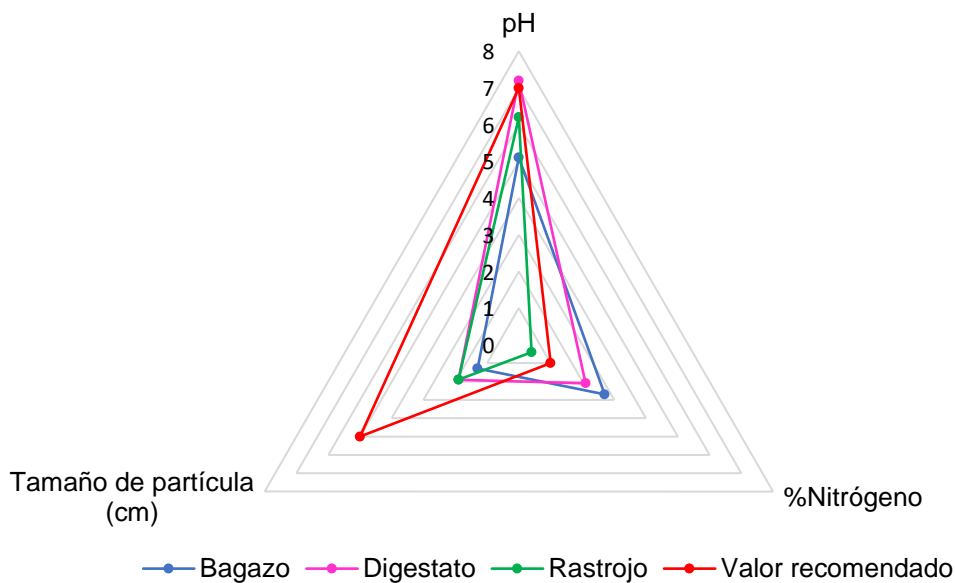


Figura 4.31 Características de los sustratos analizados (continuación).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que existió una diferencia en el contenido de nitrógeno entre el bagazo y digestato, pero ambos presentan un contenido superior al máximo recomendado que es de 1.5% (Silva, Dias, Siqueira & Schwan, 2007 como se cita en Bellettini et al., 2016), contrario a lo que se observó en el rastrojo de maíz, sustrato que fungió como control, pues sobre él ya se han tenido cultivos exitosos de *P. ostreatus* en las condiciones en que se realizó el experimento y posee un contenido de nitrógeno dentro del intervalo recomendado para el cultivo de *Pleurotus* que va de 0.03 al 1.0% (Gaia et al., 2016).

A causa del alto contenido de nitrógeno en el bagazo y digestato de malta y contenido de carbono similares tanto en el bagazo, digestato y rastrojo se obtuvo una relación C/N menor a 30 (en los sustratos de interés para la investigación) que es el valor mínimo recomendado para el cultivo de *P. ostreatus* (Pardo et al., 2008).

Si bien ninguno de los dos sustratos posee un pH dentro del intervalo recomendado para el cultivo de *P. ostreatus* el cual es de 6 a 7 (Guzmán et al., 2013), el más cercano a estos límites es el del digestato de malta con un valor de

7.16 que es mucho mejor a su valor de 5.06 que posee antes de pasar por la digestión anaerobia.

En el caso del digestato y el bagazo se necesitaron tamices d 1.27 cm y de 1.9 cm respectivamente solo que el ancho y largo de la mayoría de las partículas era inferior al tamaño de tamiz, por observación se deduce que el ancho y largo es inferior a 1 cm, pero varias partículas estaban pegadas y ese tamaño es el que se requirió para hacerlas pasar (véase la foto 4.1).

Si bien el tamaño de tamiz requerido para que todas las partículas rastrojo de maíz pasaran fue de 1.9 cm sin embargo el largo llegaba a medir hasta 5cm, así que su tamaño de partícula comprendido entre 2 y 5 cm que es el adecuado para emplearlo como sustrato para el cultivo de *P. ostreatus* (Guzmán et al., 2013).

Por otro lado, tanto el bagazo y digestato tienen un tamaño menor a un centímetro lo que producen una compactación del sustrato y disminuye la aereación necesaria para el desarrollo del hongo (Sánchez & Royse, 2001).



Foto 4.1 Grumos formados por las partículas de los sustratos, a la izquierda bagazo de malta y a la derecha digestato de malta

#### 4.2.7 Elementos traza

El experimento se realizó por duplicado para el análisis de contenido de elementos traza sobre el bagazo de malta y por cuadruplicado para el digestato. Tanto el bagazo y el digestato de malta presentaron mayor cantidad de fósforo con diferencias significativas en todos los minerales ( $p < 0.05$ ) con excepción del azufre.

Tabla 4.5 Contenido de minerales (g/kg) sobre ST en los sustratos. Media  $\pm$  desviación estándar. Las letras indican que las medias consecutivas sobre la misma columna con la misma letra son estadísticamente similares ( $p > 0.05$ ).

Sustrato	Ca	Mg	K	Na	P	S
Bagazo	2.3 $\pm$ 0.00 a	3.19 $\pm$ 0.07 a	2.78 $\pm$ 0.20 a	1.27 $\pm$ 0.07 a	6.32 $\pm$ 0.01 a	2.33 $\pm$ 0.01 a
Digestato	1.07 $\pm$ 0.05 b	2.21 $\pm$ 0.16 b	1.30 $\pm$ 0.04 b	0.15 $\pm$ 0.01 b	5.31 $\pm$ 0.24 b	2.30 $\pm$ 0.03 a

Tabla 4.5 continuación.

Sustrato	Zn	Fe	Mn	Cd	Cu
Bagazo	0.23 $\pm$ 0.00 a	0.43 $\pm$ 0.02 a	0.07 $\pm$ 0.00 a	0.00 $\pm$ 0.00 a	0.03 $\pm$ 0.00 a
Digestato	0.05 $\pm$ 0.00 b	0.17 $\pm$ 0.05 b	0.04 $\pm$ 0.00 b	0.00 $\pm$ 0.00 a	0.01 $\pm$ 0.00 b

#### 4.2.8 Elementos traza en el bagazo y digestato de malta para el cultivo de *P. ostreatus*.

El azufre, fosforo, potasio y magnesio que son los elementos prioritarios para el crecimiento del hongo, así como pequeñas cantidades de zinc, manganeso y cobre están presentes en la composición de los sustratos, se encuentran en concentraciones estadísticamente diferentes a excepción del azufre, siendo el bagazo el que tiene una mayor concentración de los minerales mencionados.

#### 4.2.9 Elementos traza en el bagazo de malta para digestión anaerobia

La tabla 4.6 presenta una relación de la concentración de elementos en mg/L y los valores requeridos en el reactor según lo reportado por (Bougrier et al., 2018) y a partir de ello se deduce si se requiere adición de nutrientes.

Como se puede observar, el contenido de nutrientes en el bagazo suministrado durante el experimento es superior al valor requerido, esto se debe a que el sustrato es suministrado en estado seco (solo 4% de humedad remanente), la dilución en agua a un nivel recomendado (12-8% de ST) reduciría el contenido de nutrientes, además no es posible llenar el reactor hasta un porcentaje de ST del 95%, por lo que se recomienda que una vez que el reactor alcance una

concentración del 10% de ST se proceda a utilizar el sustrato con el mismo porcentaje de humedad o emplearlo con dicho contenido de agua desde el inicio.

Tabla 4.6 Concentración de nutrientes en el reactor

Elemento	Valor medido (mg/L)	Valor requerido (mg/L)	Requiere adición de nutrientes
Calcio	600	75-200	No
Potasio	725	100-600	No
Magnesio	831	75-300	No
Sodio	331	50-200	No
Azufre	607	1-30	No
Cobre	9	0.05-0.3	No
Hierro	113	1-10	No
Zinc	61	0.05-2	No

### 4.3 Cultivo experimental

El cultivo tuvo tres replicas por sustrato, incluyendo el testigo, dando un total de nueve bolsas analizadas.

#### 4.3.1 Humedad

Los tres sustratos empleados en el cultivo experimental fueron sometidos a la prueba del puño para determinar la cantidad de agua necesaria que se les debía adicionar para obtener la humedad requerida para el cultivo de *P. ostreatus*, comprendida entre el 70 y 80 % (Guzmán et al., 2013).

Cuando las bolsas se encontraban listas para el cultivo de *P. ostreatus*, se les midió el contenido de humedad que resultó estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) entre los valores del bagazo y digestato.

Los resultados del análisis de humedad demostraron que solo el digestato y el rastrojo obtuvieron los valores deseados, mientras que el bagazo tuvo niveles inferiores, lo cual lo cual no favorece el crecimiento del micelio, debido a la falta de agua para la movilización de los nutrientes.

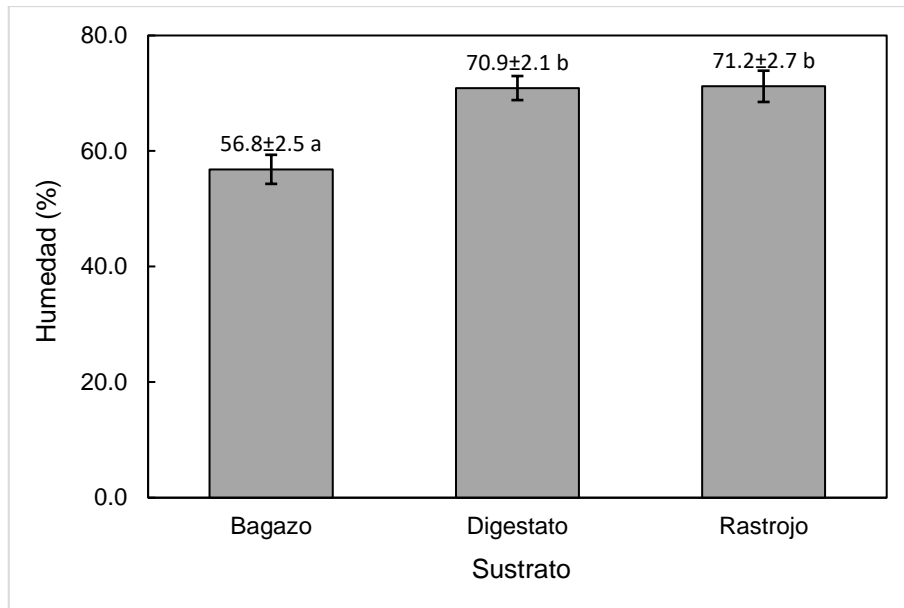


Figura 4.32 Porcentaje de humedad en los sustratos

#### 4.3.2 Incubación, fructificación y cosecha

El cultivo de *P. ostreatus* sobre una réplica de bagazo y tres de digestato de malta inició el 27 de agosto del 2018, en cuanto al cultivo de rastrojo de maíz y dos réplicas del bagazo de malta iniciaron el 30 de agosto de 2018 concluyendo el 17 de octubre del 2018 para todos los sustratos.

La figura 4.33 muestra los resultados del cultivo experimental para el bagazo, digestato y el rastrojo (que fungió como testigo).

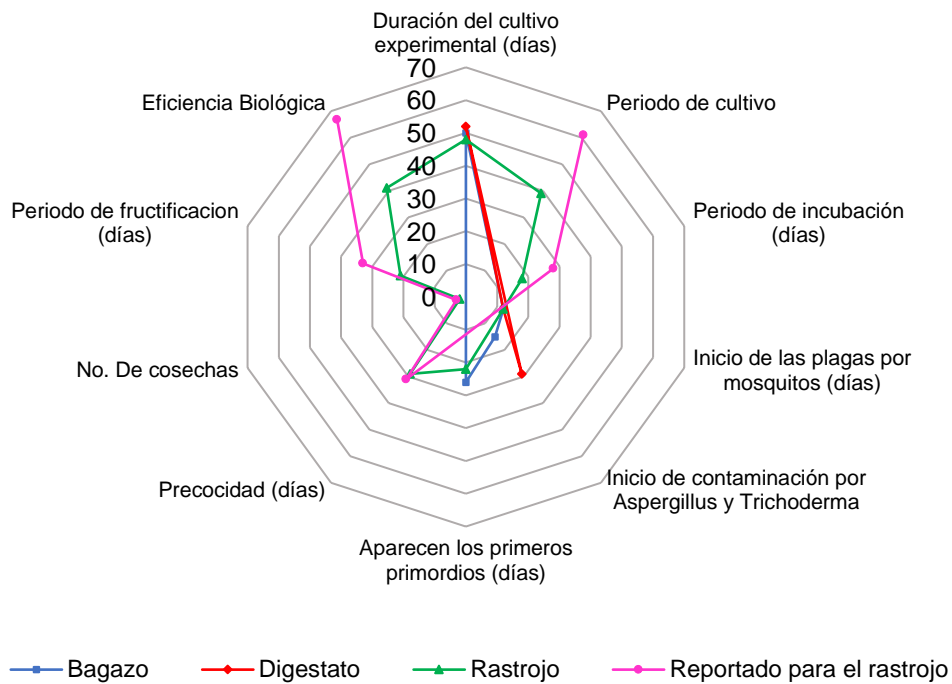


Figura 4.33 Parámetros de evaluación del cultivo experimental

El tiempo de incubación se estableció como el tiempo en que el micelio cubrió por completo el sustrato y solo se podía observar el color blanco característico del micelio. La invasión total ocurrió sólo en el rastrojo de maíz después de 18 días de la siembra, no se concluyó en el bagazo y digestato pues quedó entre el 30 al 50% de la superficie del bagazo y digestato sin invadir.

El alto contenido de Nitrógeno en el bagazo y digestato de malta es un factor que pudo reprimir la producción de enzimas lignocelulolíticas y con ello inhibir el crecimiento del hongo, lo que condujo a que el micelio no colonizara por completo los sustratos.



Foto 4.2 Sustratos colonizados por *P. ostreatus*

Como la zona de incubación-fructificación también se empleaba para el almacenaje de jitomates, es importante mencionar que dicha fruta comenzó a presentar un proceso de descomposición que atrajo a mosquitos. La plaga procedente de los jitomates invadió el cultivo de *P. ostreatus* sobre el bagazo de malta 12 días después de la siembra por lo que se decidió colocar una malla mosquitera que rodeara el cultivo, aun así, la plaga no se pudo detener, contaminó el bagazo, el digestato de malta y en menor cantidad el rastrojo de maíz.



Foto 4.3 Malla mosquitera rodeando el cultivo de *P. ostreatus*

El bagazo de malta tuvo una contaminación de hongo *Aspergillus* y *Trichoderma*  $15 \pm 2.3$  días después de la siembra esto se relaciona a que el bagazo tiene restos de azúcares simples provenientes del proceso de elaboración de cerveza que propician un medio favorable para el desarrollo de plagas, mientras que el digestato presentó la contaminación de *Aspergillus* 29 días después de la inoculación posiblemente trasladado desde el bagazo por la plaga de mosquitos que no se pudo detener.

Tanto el hongo *Aspergillus* como el *Trichoderma* fueron identificados mediante un microscopio óptico en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMex a cargo de la Dra. Martha Lydia Salgado Siclan con ayuda de su equipo de trabajo empleando como referencia el libro de Barnett y Hunter (1998).

El rastrojo de maíz presentó sus primeros primordios 22 días después de la siembra mientras que el bagazo lo hizo a los  $26 \pm 4.6$  días.

La aparición de primordios en el bagazo de malta pero no una colonización completa por parte del micelio, pudo ser causada por la baja relación C/N, pues, tal como lo mencionan Yang et al. (2013) bajas concentraciones no favorecieron el crecimiento micelial, en contraste beneficia el crecimiento de cuerpos fructíferos.

Los primordios que presentó el bagazo de malta no alcanzaron la madurez, esto posiblemente a causa de las características del sustrato como una baja concentración de humedad y tamaño de partícula pequeño.



Foto 4.4 Primordios en el rastrojo de maíz y bagazo de malta



Dado que no existió fructificación en el bagazo y digestato la Eficiencia Biológica fue del 0% y de 41.1% en el rastrojo de maíz con un periodo de cultivo de 48 días con un promedio de  $2 \pm 0.58$  cosechas.

En las fructificaciones que presentó el rastrojo de maíz presentaron etiolación que se atribuye a un basidiocarpo con un estípote alargada y un píleo reducido a causa de una deficiencia en la calidad y cantidad de luz (Flores, 2012), por el uso de la malla mosquitera empleada para controlar la llegada de mosquitos que de igual forma convergió en una baja eficiencia biológica del cultivo.



Foto 4.5 Sustratos durante la fase de incubación y fructificación.

Arriba a la izquierda bagazo de malta contaminado por *Trichoderma* (a causa de ello se observa de color verde), abajo a la izquierda digestato de malta invadido por el micelio contaminado por *Aspergillus* (manchas rojizas) y a la derecha el rastrojo de maíz con fructificaciones.

## 5 CONCLUSIONES

En el análisis de las propiedades del bagazo de malta empleado para la digestión anaerobia se pudo notar que:

- Presentó un alto contenido de nitrógeno y en consecuencia una relación C/N inferior al valor recomendado.
- El contenido de agua se encontraba por debajo del valor recomendado, esta alta concentración de ST limitaba la movilidad de los metanógenos dentro del sustrato que provocó una lenta degradación de la materia orgánica.
- El pH es inferior al rango sugerido, pero esto no produjo un pH ácido dentro del digestor.

Durante el desarrollo de la digestión anaerobia se pudo observar:

- Una baja degradabilidad del sustrato reflejada en un 24.9% como máximo porcentaje de SV removidos durante el proceso.
- El pH creció hasta acercarse a un valor de 8.
- Durante el proceso se presentó un incremento de AGV's a causa de la baja biodegradabilidad del sustrato y por sobrecargas puntuales.
- Un incremento de Nitrógeno amoniacal.
- Una concentración de metano inferior a los valores reportados, esto por la acumulación de materia orgánica que difícilmente era degradada.
- Una producción de biogás en ml biogás/g SV y  $m^3$ biogás/ $m^3$ día dentro del rango reportado.

Ante estas observaciones se puede decir que el bagazo de malta es una opción viable como materia prima para la producción de biogás solo a bajas tasas de carga (bajo las condiciones analizadas a una tasa menor a 132 g-ST/día o 2 kg-SV /  $m^3$ -d), con un contenido de humedad mayor al 88%, en co-sustrato con otro material (no lignocelulósico) fácilmente degradable, que produzca una relación C/N y un pH que se encuentre dentro del rango recomendado, con un pretratamiento biológico (con hongos o bacterias lignocelulolíticas) que faciliten su biodegradabilidad y/o con la adición de nutrientes indispensables para la digestión anaerobia.

En cuanto al cultivo de hongo seta, el bagazo y digestato de malta no resultaron viables como sustratos para el cultivo de *P. ostreatus*, pero presentan diferencias significativas en sus propiedades analizadas, su alto contenido de nitrógeno los vuelve una buena opción para enriquecer sustratos con bajos valores del nutriente y su tamaño de partícula se puede emplear para compensar la alta porosidad que pueda poseer otro sustrato.

El pH de 7.2 del digestato comparado con el pH de 5.1 del bagazo de malta revelan la viabilidad de la digestión anaerobia como mejoradora del potencial de hidrógeno, así como un medio para eliminar las propiedades que fomentan la aparición de plagas y mosquitos en el sustrato durante la fase de incubación y fructificación; y lo convierte en una buena opción para crear co-sustratos que se puedan emplear en el cultivo del hongo seta.

## 6 RECOMENDACIONES

Para la digestión anaerobia del bagazo de malta:

- Para facilitar del proceso de digestión anaerobia del sustrato es importante adicionarle un porcentaje de humedad superior a 88%.
- Se recomienda realizar un pretratamiento biológico al bagazo de malta con el fin de incrementar su biodegradabilidad y con ello el porcentaje de SV convertidos a metano y reducir la acumulación de AGV's.
- Adicionalmente se sugiere realizar un co-sustrato con un material fácilmente degradable (no lignocelulósico) que a su vez permita disminuir el porcentaje de nitrógeno, mejorar la relación C/N y con ello la formación de nitrógeno amoniacal.
- Realizar una adición de nutrientes en caso de requerirlo.

Para el uso del bagazo y digestato como sustratos para el cultivo de *P. ostreatus*:

- Es indispensable emplear bolsas adecuadas para la esterilización en la autoclave, con ello se evita una rotura durante el proceso y se asegura la eliminación de microorganismos contaminantes.
- Para futuras investigaciones se sugiere emplear el bagazo y digestato de malta unidos a otro material para generar un co-sustrato con un contenido de nitrógeno, tamaño de partícula, pH y relación C/N que favorezcan el crecimiento del hongo seta. En este sentido, se sugiere realizar un co-sustrato entre el rastrojo de maíz y digestato para disminuir la relación C/N del rastrojo de maíz y con ello aumentar el rendimiento y la eficiencia biológica del cultivo.
- Durante la incubación y fructificación se recomienda asegurar las condiciones antisépticas del espacio aunado a un control de la temperatura, aereación y luminosidad que propicien un medio adecuado para el desarrollo de *P. ostreatus*.
- Se recomienda analizar los residuos de los sustratos ya cosechados especialmente el procedente del bagazo de malta para determinar si el cultivo de hongo seta se puede emplear como pretratamiento para su uso en la digestión anaerobia.

## 7 REFERENCIAS DE CONSULTA

- Adebayo, G. J., Omolara, B. N., & Toyin, A. E. (2009). Evaluation of yield of oyster mushroom (*Pleurotus pulmonarius*) grown on cotton waste and cassava peel. *African Journal of Biotechnology*, 8(2), 215-218.
- Andrino, A., Morte, A., & Honrubia, M. (2011). Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fies) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. *Anales de Biología* 33, 53-66.
- Bair, R. B., Eaton, A. D., & Rice, E. W. (Eds.). (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd ed.). EUA: American Public Health Association.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Bellettini, M. B., Fiorda, F. A., Maieves, H. A., Teixeira, G. L., Avila, S., Hornung, P. S., & Junior, A. M. (2016). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi J Biol Sci*, 26(4), 633-646. doi:10.1016/j.sjbs.2016.12.005
- Bougrier, C., Dognin, D., Laroche, C., & Cacho Rivero, J. A. (2018). Use of trace elements addition for anaerobic digestion of brewer's spent grains. *J Environ Manage*, 223, 101-107. doi:10.1016/j.jenvman.2018.06.014
- Bougrier, C., Dognin, D., Laroche, C., Gonzalez, V., Benali-Raclot, D., & Cacho Rivero, J. A. (2017). Anaerobic digestion of Brewery Spent Grains: Trace elements addition requirement. *Bioresour Technol*, 247, 1193-1196. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.211
- Chang, R., & Goldsby, K. A. (2013). *Química*. México: McGraw-Hill.
- Chang, S. T., & Hayes, W. A. (1978). *The biology and cultivation of edible mushrooms*: Academic Press.
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value Medicinal Effect and Environmental Impact*. USA: CRC Press, Boca Raton.
- Dahmardeh, M. (2013). Use of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) grown on different substrates (wheat and barley straw) and supplements at various levels of spawn to change the nutritional quality forage. *International Journal of Agriculture and Forestry* 3(4), 138-140. doi:10.5923/j.ijaf.20130304.02

- EPA. (2001). Method 1684: Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids, and Biosolids. United States Environmental Protection Agency. Recuperado de <https://www.epa.gov/>.
- Ezeonu, F. C., & Okaka, A. N. C. (1996). Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (BSG). *Process Biochemistry*, 31 (1), 7-12. doi:10.1016/0032-9592(94)00064-6
- FAO, MINENERGIA, PNUD, & GEF. (2011). *Manual del biogás*. Santiago de Chile: Proyecto CHI/00/G32.
- Flores, R. G. (2012). *Aprovechamiento del bagazo residual de Yucca spp. como sustrato para la producción de Pleurotus spp.* (Tesis de Maestría). Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.
- FNR (Ed.) (2010). *Guía sobre el Biogás. Desde la producción hasta el uso* (5ta ed.). Gülsow, Alemania: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, Abt. Öffentlichkeitsarbeit.
- Fungiturismo. (2019). Todas las partes de una seta. España: Fungiturismo. Recuperado de <http://www.fungiturismo.com>.
- Gaia, M. A. R., Simas, T. M. F., de Souza, K. L., Loureiro, C. M., & de Aguiar, O. I. M. (2016). Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi J Biol Sci*, 23(5), 621-627. doi:10.1016/j.sjbs.2015.07.002
- Gaitán, H. R., Salmones, D., Pérez, M. R., & Mata, G. (2006). *Manual práctico del cultivo de setas. Aislamiento, siembra y producción*. Veracruz, México: Instituto de Ecología, A.C.
- Gonçalves, I. C., Fonseca, A., Morão, A. M., Pinheiro, H. M., Duarte, A. P., & Ferra, M. I. A. (2015). Evaluation of anaerobic co-digestion of spent brewery grains and an azo dye. *Renewable Energy*, 74, 489-496. doi:10.1016/j.renene.2014.08.053
- Guzmán, G., Mata, G., Soto, V. C., & Guzmán, D. L. (2013). *El cultivo de los hongos comestibles: con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales*. Ciudad de México: Instituto Politécnico Nacional.
- Herrera, T., & Ulloa, M. (1998). *El reino de los hongos: Micología básica y aplicada*. Ciudad de México: Fondo de cultura económica

- Infoagro. (2017). Las propiedades de los sustratos de cultivo. Recuperado de [mexico.infoagro.com](http://mexico.infoagro.com).
- Kafle, G. K., & Kim, S. H. (2013). Effects of chemical compositions and ensiling on the biogas productivity and degradation rates of agricultural and food processing by-products. *Bioresour Technol*, *142*, 553-561. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.018
- Kothari, R., Pandey, A. K., Kumar, S., Tyagi, V. V., & Tyagi, S. K. (2014). Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *39*, 174-195. doi:10.1016/j.rser.2014.07.011
- KTBL. (2020). Wirtschaftlichkeitsrechner Biogas. Recuperado de <https://daten.ktbl.de/biogas/>.
- Ley general para la prevención y gestión integral de los residuos. (2018). Diario oficial de la Federación. México. Recuperado de [www.diputados.gob.mx](http://www.diputados.gob.mx).
- Li, Y., Chen, Y., & Wu, J. (2019). Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. *Applied Energy*, *240*, 120-137. doi:10.1016/j.apenergy.2019.01.243
- Luz, J. M., Nunes, M. D., Paes, S. A., Torres, D. P., Silva, C., .S. M., & Megumi, K. M. C. (2012). Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*, 1508-1515.
- Marcos, R., & González, G. (2017). *Principios de elaboración de las cervezas artesanales*. Morrisville, North Carolina, USA: Lulu Press Inc.
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., & Loera, O. (2008). Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, *99*(16), 7842-7847. doi:10.1016/j.biortech.2008.01.083
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, *43*(1), 1-14. doi:10.1016/j.jcs.2005.06.001
- Pardo, G. A., Perona, Z. M. A., & Pardo, N. J. (2008). Utilización de fibra de kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) en la elaboración de sustratos específicos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. *Revista*

*Iberoamericana de Micología* 25, 57-61. doi:10.1016/S1130-1406(08)70015-9

- Patel, H., Gupte, A., & Gupte, S. (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid-state fermentation. *BioResources*, 4, 268-284.
- Pérez, M. A. S., Acevedo, P. S. A., Bibbins, M. M., Galván, A. J., & Rosales, M. S. (2015). A perspective on the use of *Pleurotus* for the development of convenient fungi-made oral subunit vaccines. *Vaccine*, 33(1), 25-33. doi:10.1016/j.vaccine.2014.10.059
- Piña, G. A. B., Nieto, M. D. A., & Robles, M. F. (2016). Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales en el cultivo y producción del hongo comestible seta (*Pleurotus* spp.). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32(Residuos sólidos), 141-151. doi:10.20937/rica.2016.32.05.10
- Rodríguez, V. C. A. (2012). *Producción de biogás a partir de bagazo cervecero (Memoria de título)*. Facultad de ciencias agronómicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Romero, O., Huerta, M., Damian, M. A., Macías, A., Tapia, A. M., Parraguirre, J. F. C., & Juárez, J. (2010). Evaluación de la capacidad productiva de *Pleurotus ostreatus* con el uso de hoja de plátano (*Musa paradisiaca* L., cv. roatan) deshidratada, en relación con otros sustratos agrícolas. *Agronomía Costarricense*, 34, 53-63.
- Sánchez, J. E., & Royse, D. (2001). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* . México: Uteha-Ecosur
- Sezun, M., Grilc, V., Zupancic, G. D., & Marinsek, L. R. (2011). Anaerobic Digestion of Brewery Spent Grain in a Semi-Continuous Bioreactor: Inhibition by Phenolic Degradation Products. *Acta Chim.*, 58, 158-166.
- Torres, P. A., Camberato, D., Lopez, G. R., & Mickelbart, M. (2019). Producción comercial de cultivos bajo invernadero y vivero. Medición de pH y conductividad eléctrica en sustratos. Purdue University. Recuperado de <https://www.extension.purdue.edu>.
- Ulloa, C., Merino, G., Bruijn, J., & Gontupil, J. (2011). Kinetics of biogas generation from microbreweries organic wastes. *Agro-Ciencia, Chilean J. Agric. & Anim. Sci*, 28, 5-20.



- Weber, B., Stadlbauer, E. A., Schlich, E., Eichenauer, S., Kern, J., & Steffens, D. (2014). Phosphorus bioavailability of biochars produced by thermochemical conversion. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177(1), 84-90. doi:10.1002/jpln.201300281
- Yang, W., Guo, F., & Wan, Z. (2013). Yield and size of oyster mushroom grown on rice/wheat straw basal substrate supplemented with cotton seed hull. *Saudi J Biol Sci*, 20(4), 333-338. doi:10.1016/j.sjbs.2013.02.006
- Zupancic, G. D., & Grilc, V. (2012). Anaerobic Treatment and Biogas Production from Organica Waste. *Management of Organic Waste*. doi:10.5772/32756

## 9 ANEXOS

### Anexo 1: Determinación de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's) por destilación

#### Reactivos y soluciones

- Ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ )  $\geq$  85%.
- Solución indicadora de fenolftaleína.
- Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1 N (Es recomendable estandarizar la solución, checar el anexo 4)

#### Material y equipo

- Soporte universal
- Pinzas de sujeción para soporte universal
- Bureta
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Pipeta de vidrio de 5 ml.
- Pipeta de 30ml.
- Destilador por arrastre de vapor BÜCHI k-350
- Hielos, agua y un recipiente que pueda contener al matraz Erlenmeyer.

#### Procedimiento

##### PROCESO DE DESTILACIÓN

1. Con la pipeta extraer 5ml de ácido fosfórico de su contenedor y colocarlos dentro del tubo del destilador buchi.
2. Con la pipeta extraer 30 ml. del digestato (volumen de la muestra) contenido dentro del biodigestor y colocarlo dentro del tubo del destilador BÜCHI.
3. Inmediatamente comienza la reacción entre el ácido fosfórico y el digestato por lo que debe iniciarse la destilación lo antes posible, la cual debe durar 5 minutos.
4. Recoger la muestra destilada en el matraz Erlenmeyer que a su vez debe estar dentro del recipiente con agua y hielos para evitar la evaporación de la solución a causa de su temperatura.

##### PROCESO DE TITULACIÓN.

1. Agregar al matraz con el titulado dos gotas de fenolftaleína.
2. Titular con la solución de Hidróxido de sodio hasta que el color transparente cambié a rosa pálido.
3. Registrar los mL de NaOH gastados.

#### CÁLCULOS

- Para obtener el contenido de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)

$$AGV'_{S_{Ac. Acético}} = \frac{V * N * 60\ 000}{M}$$

Donde:

$AGV'_{S_{Ac. Acético}}$  = Concentración de ácidos grasos volátiles como ácido acético (mg/L)

V= Volumen del titulante (solución de NaOH) gastado (ml)

N= Normalidad de la solución de NaOH 0.1N (eq/L)

60 000= Peso equivalente del ácido acético (mg/eq)

M= volumen de la muestra (ml)

## Anexo 2: Determinación del Nitrógeno amoniacal.

### Reactivos y soluciones

- Solución de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ). Disolver 20 g de  $H_3BO_3$  en 400 ml de agua caliente y dejar enfriar. Mezclar 0.1504 g de verde Bromocresol y 0.826 de rojo de metilo con un poco de etanol y cuando la mezcla se encuentre homogénea aforar a 250 ml con más etanol. Una vez que la mezcla de  $H_3BO_3$  y agua se encuentra a temperatura ambiente, agregarle los 250 ml de etanol con los indicadores y aforar con alcohol etílico a 1 Litro.
- Óxido de magnesio
- Solución de Ácido Sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 0.1 N.

### Material y equipo

- Balanza analítica
- Soporte universal
- Pinzas de sujeción para soporte universal
- Bureta
- Pipeta de 30ml.
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Probeta
- Destilador por arrastre de vapor Büchi

### Procedimiento

#### PROCESO DE DESTILACIÓN

1. Pesar en balanza analítica de 0.2 g de Óxido de Magnesio, calcinar a 700°C por 2 horas y dejar enfriar en la mufla a 60°C, posterior a ello pasar a un desecador hasta que alcance temperatura ambiente.
2. Con la pipeta extraer 10 ml. del digestato (volumen de la muestra) contenido dentro del biodigestor y colocarlo dentro del tubo del destilador Büchi.

3. Agregar al tubo del destilador los 0.2 g de óxido de magnesio previamente calcinados.
4. Medir en una probeta 5 ml de la solución de Ácido Bórico y colocarlos en el matraz erlenmeyer que va a recoger la muestra destilada (el color de la solución debe conservar su tono morado, en caso de cambiar a verde indica que el matraz se encuentra sucio, para evitarlo se puede enjuagar el matraz con agua destilada).
5. Destilar el digestato con el Óxido de Magnesio durante 3 minutos.
6. Cuando la muestra destilada empieza a caer sobre el matraz erlenmeyer que a su vez contiene la solución de Ácido Bórico, la mezcla se torna de color verde oscuro.

## PROCESO DE TITULACIÓN

1. Remover el matraz con el destilado (color verde oscuro) y titular con ácido sulfúrico al 0.1 N ( $H_2SO_4$ ) a tono rosa oscuro. Ser preciso en la lectura.
2. Registrar los mL de HCl gastados.

## CÁLCULOS

- Para obtener el contenido de nitrógeno amoniacal

$$\text{Nitrógeno Amoniacal}_{NH_3} = \frac{V * N * 17\ 000}{M}$$

Donde:

$N_{amoniaco}$  = Concentración de Nitrógeno Amoniacal como amoniaco (mg/L)

V= Volumen del titulante (solución de  $H_2SO_4$ ) gastado (ml)

N= Normalidad de la solución de  $H_2SO_4$  0.1N (eq/L)

17 000= Peso equivalente del amoniaco (mg/eq)

M= volumen de la muestra (ml)

### **Anexo 3: Determinación de nitrógeno total por el método Kjeldahl.**

Basado en el manual de técnicas de análisis de laboratorio del Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEMéx.)

#### **Reactivos y soluciones**

- Ácido Sulfúrico concentrado 95-98% grado reactivo.
- Pastillas catalizadoras. Tabletas comercialmente disponibles cuyo contenido por tableta es de 3.5  $K_2SO_2$  y 0.4g  $CuSO_4$ . (Tabletas Kjeldahl Missouri)

- Hidróxido de sodio, NaOH (solución al 20% y 32% w/w).
- Solución indicadora rojo de metilo (disolver 100mg de rojo de metilo en 100ml de metanol).
- Verde de Bromocresol (disolver 100 mg de verde de bromocresol en 100 ml de metanol)
- Indicador de azul de bromotimol (100 mg de azul de bromotimol en 20 ml de agua destilada, agregar a 3 litros de solución de NaOH al 20%), ambas soluciones (indicador de azul y solución de NaOH) se colocan en el depósito del lavador de gases (Büchi, Scrubber K-415)
- Solución de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) 4% (w/v) ajustar el pH a 4.65, disolver 40g de  $H_3BO_3$  en 500-600 mL de agua destilada caliente mezclar y adicionar más agua a un volumen aproximado de 900 mL. Enfriar a temperatura ambiente, adicionar 10 mL de verde Bromocresol y 7 mL de rojo de metilo y diluir a una solución final de volumen de 1 L.
- Solución de ácido clorhídrico 0.10 M.
- Carbón activado granular (utilizado en el lavador de gases)
- Fibra de vidrio o algodón (utilizado en el lavador de gases)
- Agua destilada
- Sulfato de amonio (como estándar 0.2 g)

### Material y equipo

- Balanza analítica
- Destilador Kjeldahl (Büchi)
- Digestor Kjeldahl (Büchi)
- Scrubber Kjeldahl (lavador de gases Büchi)
- Matraz Erlenmeyer de 250-500 mL.
- Marcador/rotulador. Indeleble, resistente a solventes y ácidos para la identificación de la muestra.
- Tubos de vidrio para digerir la muestra.
- Pipeta, probeta, bureta.

### Procedimiento

#### A. PROCESO DE DIGESTIÓN

1. Conectar el Scrubber K-415 a 110V y encender por 15 min. Antes de todo el proceso.
2. Pesar en balanza analítica de 1.0g de la muestra previamente molida, y anotar el peso exacto.
3. Calentar previamente el digestor, mediante la técnica de rampa de temperatura:
  - 120°C: 10min
  - 250°C: 10min
  - 350°C: 10min

450-470°C Temperatura ideal para iniciar la digestión.
4. Colocar en el tubo para digerir bajo el siguiente orden:
  - a) Muestra
  - b) 1 pastilla catalizadora por cada 10ml.
  - c) Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), se agrega de 10.
5. Colocarle la unidad de succión para vapor de ácidos.

6. El proceso de digestión tarda en promedio 90 min, trascurrido ese tiempo la muestra tomó un color verde claro. Dejar enfriar por 20 min, posteriormente agregar 40 ml de agua destilada.

#### PROCESO DE DESTILACIÓN

1. Revisar que los tanques estén correctamente llenos uno de NaOH al 32% y el otro teniendo agua destilada.
2. Encender el destilador y el recirculador de agua, este último debe registrar una temperatura de 10 a 11°C para iniciar el proceso.
3. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL, agregar 60 mL de ácido bórico (4%) y colocarlo en el destilador BÜCHI. En este matraz se captará el destilado.
4. Colocar el tubo con la muestra digerida y el agua destilada en el destilador BÜCHI, sujetándolo con el adaptador y que embone el tubo. Cerrar la puerta de protección, presionar el botón "reagent" una sola vez y automáticamente se adicionará la cantidad adecuado (tomando la medida de 100ml) de NaOH a la muestra.
5. Presionar el botón de "start" del destilador BÜCHI, en automático inicia el proceso de destilación. La duración del proceso es de 2.5 min. La muestra tomará un color verde oscuro. Inicia el proceso de destilación con una duración de 2.5 minutos. La muestra toma un color verde oscuro.
6. Remover el tubo ya destilado tomándolo cuidadosamente con las pinzas ya que está caliente, depositar los residuos en el lugar adecuado. Retirar el matraz Erlenmeyer con la solución captada después del proceso de destilación y proceder al proceso de titulación.

#### PROCESO DE TITULACIÓN

Remover el matraz con el destilado (color verde oscuro) y titular con ácido clorhídrico al 0.1 N (HCl) a tono rosa oscuro. Ser preciso en la lectura. Registrar los mL de HCl gastados.

NOTA: Tratar una muestra en blanco para las correcciones necesarias. Y utilizar sulfato de amonio como estándar, bajo las mismas condiciones de la muestra.

#### CÁLCULOS

- Para obtener el contenido de nitrógeno

$$\% \text{ N Kjeldahl} = \frac{[(g \text{ HCl} - g \text{ HCl B}) \times \text{NHCl} \times 14.01]}{\text{PMF} \times 10}$$

Dónde:

gHCl= Gasto de HCl (0.1N) en mL de la muestra

gHCl B= Gasto de HCL (0.1N) en mL del BLANCO

NHCl= Molaridad del HCl: 0.1N

PMF= Peso muestra húmeda o fresca

Peso molecular (peso atómico) del N= 14.01 g/mol.

10= factor para convertir g/mg a porcentaje.

- Para calcular el contenido de proteína bruta:

$$\%PB = \%N \times F$$

Dónde:

F=Factores:

5.70 para trigo; 6.38 para productos lácteos; 6.25 para otros alimentos.

## **Anexo 4: Estandarización del Hidróxido de Sodio (NaOH)**

### **Reactivos y soluciones**

- Biftalato de potasio ( $C_8H_5O_4K$ )
- Solución preparada de Hidróxido de Sodio (NaOH) aprox. 0.1 N
- Solución indicadora de fenolftaleína.

### **Material y equipo**

- Soporte universal
- Pinzas de sujeción para soporte universal
- Bureta
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Horno
- Desecador
- Balanza analítica

### **Procedimiento**

1. Secar 15 g de biftalato de potasio a 120°C durante 2 horas y dejar enfriar en un desecador por 30 minutos.
2. Pesar  $10 \pm 0.5$ g colocarlo en un matraz para aforarlo a 1 litro.
3. Colocar una muestra de 40 ml de la solución preparada de biftalato de potasio en un matraz erlenmeyer y agregar 2 gotas de fenolftaleína.
4. Titular con la solución de hidróxido de sodio hasta alcanzar el primer punto final rosa pálido que persista por 20 segundos.

### **CÁLCULOS**

Para determinar la normalidad de la solución preparada de hidróxido de sodio:

$$\text{Normalidad} = \frac{A \times B}{204.2 \times C}$$

Normalidad= Normalidad de la solución de hidróxido de sodio preparada

A: Masa de biftalato de potasio que se aforo a 1 litro ( $\approx 10$  g)

B= Volumen de la solución de biftalato de potasio empleada para la titulación ( $\approx 40$  ml)

204.2= Peso equivalente del biftalato de potasio (g/eq)

C= Volumen del titulante (solución de hidróxido de sodio) gastado (ml)