**AGROCENTRO 2019**

**IX SIMPOSIO DE INGENIERÍA AGRÍCOLA**

**ESTUDIO DEL POTENCIA DE METANO EN TRES PASTOS VACUNOS PRE-TRATADOS CON ENZIMAS**

***STUDY OF THE METHANE POTENCIAL IN THREE BOVINE GRASSES PRE-TREATIES WITH ENZYMES***

**Carlos M. Martínez Hernández1, Hans Oechsner2, Annett Reinhard3, Yaser García López4, Arnaldo Martínez Hernández5.**

1Universidad Central “Marta Abreu”de las Villas. Carretera a Camajuaní Km.5.5. CP: 54830. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. E.mail:carlosmh@uclv.edu.cu.

2Universidad de Hohenheim. Landensanstalt fur Agrartechnik und Bioenergie (740). Garbenstrasse 9. Stuttgart. Alemania. E.mail:oechsner@uni-hohenheim.de.

3Universidad de Hohenheim. Landensanstalt fur Agrartechnik und Bioenergie (740). Garbenstrasse 9. Stuttgart. Alemania.

4Universidad Central “Marta Abreu”de las Villas. Carretera a Camajuaní Km.5.5. CP: 54830. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

5MSc. Dpto de Ciencias Naturales. Universidad Central “Marta Abreu”de las Villas. CP: 50300. Santa Clara. Villa Clara. Cuba

**Resumen:** En este trabajo se llevó a cabo un estudio de la influencia de la aplicación de un pre-tratamiento con enzimas (ZY maXX XL 200) a tres diferentes substratos agrícolas (pasto mulato, pasto natural y CT-115) para estudiar su potencialidad en la producción de metano. El pre-tratamiento consistió en la adición de una enzima (ZY maXX XL 200) en dosis de 100 µl/jeringas por 350 mg de substratos en 30-1 mL de Inoculum vacuno. Los resultados de los substratos biodigestados, fueron comparados con los obtenidos sin la adición de la enzima investigada. En todos los casos, se lograron incrementos significativos en el rendimiento específico de metano. Los mejores resultado tuvieron lugar con el *pasto mulato* (0,268 m3 CH4/kg VS); seguidos del CT-115 (0,258 m3 CH4/kg VS) y culminando con el pasto natural (0,254 m3 CH4/kg VS) obteniéndose incrementos cuando se utilizó el pre-tratamiento con enzimas e Inoculum vacuno Vs cuando este no fue utilizado. Por otra parte, se demostró que el pH evolucionó de una manera similar en las biomasas que utilizaron el pre-tratamiento con enzima y sin este.

***Abstract:*** *In this work it was carried out a study of the influence of the application of a pre-treatment with enzymes (ZY maXX XL 200) to three different agricultural substrates (mulatto pasture, natural grass and CT-115) to study their potentiality in the biogas and methane production. The pre-treatment consisted on the addition of an enzyme (ZY maXX XL 200) in dose of 100 µl/syringes per 350 mg of substrate in 30-1 mL of caw Inoculum. The results of the substrates bio digested were compared with the obtained without the addition of the investigated enzyme. In all the cases, significant increments were achieved in the specific biogas and methane yield. The best result took place with the mulatto pasture (0.268 m3 CH4/kg VS); followed by the CT-115 (0.258 m3 CH4/kg VS) and culminating with the natural pasture (0.254 m3 CH4/kg VS) being obtained increments when the enzymes pre-treatment was used with bovine Inoculum Vs when this it was not used. On the other hand, it was demonstrated that the pH evolved in a similar way in the substrates that used the enzyme pre-treatment and without this.*

**Palabras clave:** Biomasa; Desechos agrícolas; Pre-tratamiento con enzimas**.**

**Keywords:** *Biomass; Agricultural wastes; Enzyme pretreatment*.

**1. Introducción**

La composición de los sustratos es el factor principal para determinar el rendimiento y potencial de metano. La mayoría de las fuentes bibliográficas reportan que las diferencias en la cinética, potencial y rendimiento de metano están en dependencia del tipo de sustrato utilizado (Forster-Carneiro *et al*, 2012). Los métodos de pre tratamientos de los sustratos tienen como objeto el mejoramiento de las cualidades de digestión anaeróbica de estos, al alterar sus propiedades físicas, químicas y biológicas, mejorarando la disponibilidad de los componentes de los sustratos para incrementar el proceso de hidrólisis en la digestión anaerobia, el cual es la etapa limitante de los sustratos lignocelulósicos. Existen diferentes tipos de pre-tratamientos utilizados en los sustratos, los cuales se pueden clasificar en básicos y especiales. Dentro de los básicos están aquellos que tienen la finalidad en disminuir el tamaño de las partículas (trituración, molinado, tamizado). Dentro de los especiales se pueden mencionar (tratamientos térmicos, químicos, utilización de ultrasonido, radiación por microondas y los biológicos (utilización de enzimas, hongos y bacterias).

Sin embargo, estos muestran ciertas particularidades tales como: incremento de los costos de manipulación, incremento de los requisitos legislativos para la estabilización y remoción de posibles patógenos, tendencia al manejo de menores límites de nitrógeno, lo cual permite el manejo de la edad de estos sustratos y el decrecimiento de la biodegradabilidad de sustratos activados (Zhong *et al.*, 2011). Sin embargo, se hace necesario un análisis de los pre- tratamientos a utilizar en dependencia del tipo, actuación y costos.

***Pre- tratamientos biológicos:*** el objetivo de éstoses preparar los sustratos para la degradación enzimática; no obstante, el mejor método y condición de pre- tratamiento depende en gran medida del tipo de sustrato a usar. Entre los microorganismos más utilizados para degradar sustratos orgánicos se encuentran varios tipos de hongos, tales como: carmelita, blanco y suaves putrefactos, además de algunos tipos de bacterias Kurakake *et al.* (2007).

Taherzadeh y Karimi (2008), estudiaron el efecto de pre-tratamientos biológicos en papel de oficina con dos cadenas de bacterias (*Sphingomonas paucimobiles y Baccilus circulans*), obteniendo mejoras en la hidrólisis enzimática, así como un 94% de recuperación de azúcar. Dependiendo del tipo de sustrato (residuos de casas, aguas residuales, residuos de destilería, etc.), la hidrólisis enzimática puede realizarse mediante diferentes tipos de hongos o combinaciones de estos *(Aspergillus niger, Aspergillus awamori, Aspergillus oryzae, Aspergillus terreus, etc*). Taniguchi *et al.* (2005), evaluaron el efecto de varios pre- tratamientos biológicos en la paja de arroz usando 4 hongos blanco-putrefactos (*Phanerochaete chrysospurium, Tramete versicolor, Ceriporiopsis subvermispora y Pleurotus ostreatus*). El pre- tratamiento con *Pleurotus ostreatus* resultó en una degradación selectiva de la lignina y un incremento de la susceptibilidad de la paja de arroz a la hidrólisis enzimática. También, en la fase de fermentación sólida de la cáscara de naranja con cadenas de hongos del tipo *Sporotrichum, Aspergillus, Fusarium y Penicillum,* mejoró la capacidad de alimentación de constituyentes y se redujo el nivel de sustancias antimicrobianas. En un trabajo similar, al efectuado por Taherzadeh y Karimi (2008), cultivos de hongo blanco-suaves fueron usados para descontaminar aguas residuales del molinado de olivas, mejorando su digestión. Vintiloiu *et al.* (2009), investigaron la influencia de la temperatura y el pH de varias enzimas comerciales sobre la degradación de mazorcas y paja de maíz. Según esos autores, los mejores efectos se obtuvieron a valores de temperatura de 50 ºC y mejores potencialidades de hidrólisis a valores de pH entre 4 y 6. Sin embargo, como la metanogénesis del proceso anaerobio tiene lugar a valores entre 6 y 8, los autores concluyeron que habría que buscar una enzima que mantenga una adecuada actividad en estos rangos de pH.

El bajo requerimiento energético, el no uso de compuestos químicos y la apacible condición ambiental son las principales ventajas de los pre-tratamientos biológicos. Sin embargo, a veces la eficiencia de estos pre-tratamientos es baja. Por tal motivo, los pre- tratamientos biológicos requieren de un pre- tratamientos previo mediante la aplicación de métodos físicos, químicos o termo-químicos.

Martínez *et al.* (2015) realizaron un pre tratamiento termo-químico en algunas de las biomasas que se estudian en esta investigación. Por lo que el presente trabajo constituye una continuación de la investigación en la que se aplican pre- tratamientos biológicos para aplicar la digestión anaerobia de residuos agrícolas y de cantina, los cuales se han soportado en investigaciones de Martinez *et al.* (2015); Martínez y García (2016); así como en otros trabajos anteriores (Martinez *et al.*, 2014).

Del análisis de estas fuentes bibliográficas se puede apreciar que la aplicación de un pre- tratamiento con enzimas a residuos orgánicos de tipo lignocelulósicos, resulta muy adecuado para favorecer la biodegradabilidad y la producción de metano. Por tanto, el objetivo de esta investigación consiste en aplicar un pre- tratamiento con enzimas a diferentes tipos de biomasas agrícolas, estudiando su efecto sobre la producción de biogás.

**Objetivos**: Comparar el comportamiento de diferentes biomasas de origen agrícola tratados y no tratados con enzimas para conocer su comportamiento en la producción de metano***.***

**2. Materiales y Métodos:**

Este trabajo fue realizado en la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, pero el material de investigación (Liquid cellulase enzymatic preparation, ZY maXX XL 200) fue donado por la Empresa BIOPRACT GmbH, a través de investigadores de la Universidad de Hohenheim, Alemania. El experimento fue ejecutado durante el período comprendido desde septiembre 2017 hasta noviembre 2018. Para su desarrollo se consultaron diferentes normas vigentes para este tipo de investigación, según se indica a continuación.

Los sustratos se caracterizaron de acuerdo con la norma VDI (2006) y siguiendo la caracterización y clasificación general de sustratos, se pudo estimar las posibilidades de fermentabilidad de los materiales orgánicos. En este trabajo fueron estudiados tres residuos agrícolas con alto contenido de compuestos lignocelulósicos: pasto natural, pasto variedad mulato y pasto variedad CT-115. Las muestras fueron recolectadas considerando sus raíces, tallos, hojas y frutos. Estos residuos fueron secados y fraccionados en partículas de 1 mm de tamaño, tomando muestras para realizar las investigaciones a escala de laboratorio en Alemania y a escala de campo en Cuba. Las investigaciones en Alemania fueron ejecutadas entre los meses de septiembre y noviembre 2017, se utilizó un tratamiento con enzimas y se investigó con inoculum vacuno. En Cuba fueron replicadas estas investigaciones experimentales a escala de campo. A las muestras experimentales se le aplicó un pre-tratamiento con enzimas, se añadió la enzima ZY maXX XL 200 en dosis de 100 µl/syringes por 350 mg de sustrato a valorar. Los sustratos inoculados con la enzima se dejaran reposar durante 4 horas, posteriormente se le añadió el inóculo (30 mL de efluente porcino de un biodigestor). A continuación, los sustratos pre-tratados más el inóculo fueron introducidos en jeringas experimentales de 100 mL de capacidad. El experimento tuvo una duración de 35 días, para observar el comportamiento de la digestión anaerobia durante este ciclo. En Alemania se utilizó inóculo vacuno (caw manure), en Cuba se utilizó inóculo porcino (pig manure) procedente de biodigestores en producción. En ambos casos, las jeringas experimentales, se colocaron en un aditamento denominado Hohenheim Bench Test (HBT), a razón de tres réplicas por sustrato evaluado; así como una réplica en contenedor plástico (pomo plástico), con el objeto de investigar la evolución del pH en el proceso de digestión anaerobia en condiciones de campo. Fueron objeto de estudio los siguientes parámetros:

* Contenido en humedad y materia seca según la norma NC 74-22:85 (1985);
* Contenido de cenizas de acuerdo con la norma NC 74-30: 85 (1985);
* Determinación de la relación carbono/nitrógeno
* Evolución del pH en la biodigestión;
* Evaluación del rendimiento específico de biogás.

A partir de los datos de entrada, mediante softwares elaborados para estos fines (Gärtest nachVDI 4630) y siguiendo la norma VDI (2006), se procedió a calcular los siguientes parámetros:

* Tasa de biodegradabilidad;
* Potencial máximo de biogás (l/kg SV).

En la tabla 1, se muestra las condiciones de ensayo en cada biomasa objeto de investigación.

* Tabla 1. Condiciones de ensayo por biomasas evaluadas anterior al proceso de biodigestión en jeringas experimentales.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| (Sustrato) | Enzima utilizada | Dosis aplicada | Tiempo de retención hidráulica (HRT= min) |
| Pasto mulato | ZY maXX XL 200 | 100 µl/jeringas por 350 mg de sustrato en 30-1 mL Inoculo | 120 |
| Pasto natural | ZY maXX XL 200 | 100 µl/jeringas por 350 mg de sustrato en 30-1 mL Inoculo | 120 |
| CT-115 | ZY maXX XL 200 | 100 µl/jeringas por 350 mg de sustrato en 30-1 mL Inoculo | 120 |
| Inóculo (procedente de biodigestores que utilizan excreta vacuna o porcina) | Sin tratamiento con Enzimas |  |  |

**3. Resultados y discusión**

En la Figura 1 se observa la evolución del rendimiento específico de producción de metano en todos los sustratos evaluados con la adición de enzimas y sin esta. El mayor valor se obtuvo con el sustrato *pasto mulato* (0,268 m3 CH4/kg VS), seguidos del CT-115 (0,258 m3 CH4/kg VS) y culminando con el pasto natural (0,254 m3 CH4/kg VS), se presentó incrementos superiores en todos los sustratos que aplicaron el pre-tratamiento con enzimas con respectos a estos, sin la aplicación del referido pre-tratamiento; por otra parte los valores obtenidos están por debajo de los obtenidos por Martinez *et al.* (2014), lo cual pudiera estar dado por el potencial de metano de estas biomasas; además de por la utilización de raíces, hojas, tallos y frutos mezclados de estas biomasas agrícolas, las cuales poseen mayor cantidad de fibra (celulosa y hemicelulosa) comparado con los estudios efectuados anteriormente de estas biomasas en solitario.

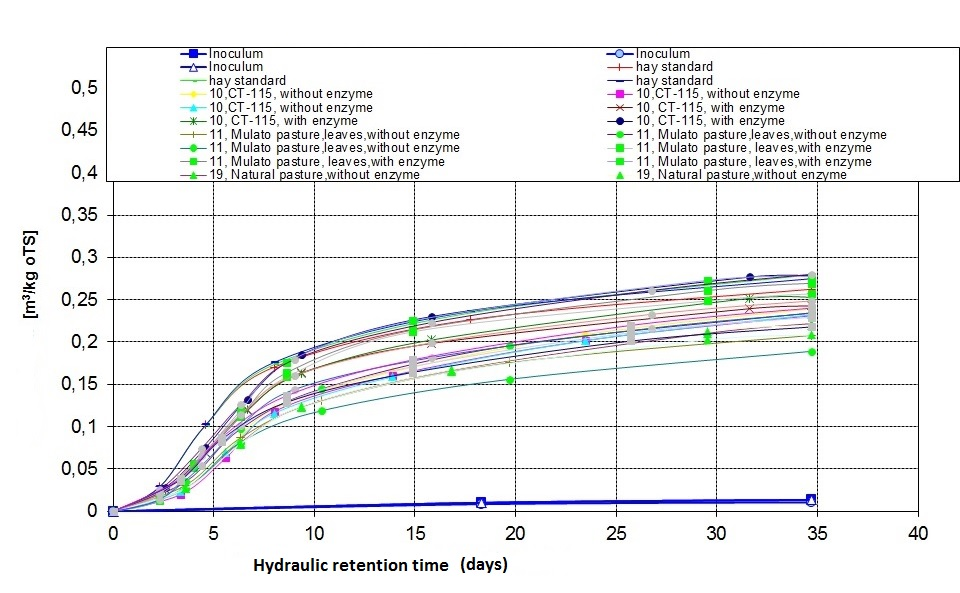


FIGURA 1. Valores del rendimiento específico de metano promedio de las biomasas objeto de estudio utilizando inóculo vacuno con pre-tratamiento con enzimas a escala de laboratorio en Alemania.

En la tabla 2, se presentan los resultados obtenidos con los sustratos valorados con y sin el tratamiento con enzimas.

TABLA 2. Rendimiento específico de biogás y metano. Biomasas evaluadas con y sin pre-tratamiento con enzimas.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Sustratos | Contenido de biogás rectificado de biogás [ml] | Contenido de metano rectificado  [ml] | Contenido de metano rectificado  (% de volumen) | Rendimiento  específico de biogás (m3/kg VS) | Rendimiento  específico de metano (m3 CH4/kg VS) | Media  (m3 CH4/kg VS) |
| Inóculo.a | 32 | 22 | 69 | 0,020 | 0,014 | 0,013 |
| Inóculo.b | 24 | 17 | 71 | 0,015 | 0,011 |
| Inóculo.c | 31 | 22 | 70 | 0,020 | 0,014 |
| hay estándar.a | 83 | 47 | 56 | 0,465 | 0,263 | 0,272 |
| hay estándar.b | 89 | 50 | 56 | 0,496 | 0,280 |
| hay estándar.c | 87 | 49 | 57 | 0,485 | 0,275 |
| CT-115.a, sin enzimas | 117 | 65 | 56 | 0,428 | 0,239 | 0,234 |
| CT-115.b, sin enzimas | 110 | 63 | 58 | 0,401 | 0,231 |
| CT-115.c, sin enzimas | 115 | 64 | 55 | 0,419 | 0,232 |
| CT-115.a, con enzimas | 119 | 67 | 56 | 0,436 | 0,243 | **0,258** |
| CT-115.b, con enzimas | 125 | 69 | 55 | 0,460 | 0,253 |
| CT-115.c, con enzimas | 133 | 76 | 57 | 0,488 | 0,278 |
| Pasto mulato. a, sin enzimas | 103 | 57 | 55 | 0,375 | 0,208 | 0,221 |
| Pasto mulato.b, sin enzimas | 116 | 65 | 56 | 0,421 | 0,235 |
| Pasto mulato.c, sin enzimas | 91 | 52 | 57 | 0,330 | 0,189 |
| Pasto mulato.a, con enzimas | 127 | 71 | 56 | 0,462 | 0,257 | **0,268** |
| Pasto mulato.b, con enzimas | 138 | 74 | 54 | 0,498 | 0,270 |
| Pasto mulato.c, con enzimas | 136 | 76 | 56 | 0,494 | 0,278 |
| Pasto natural. a, sin enzimas | 109 | 62 | 57 | 0,393 | 0,222 | 0,217 |
| Pasto natural. b, sin enzimas | 107 | 61 | 57 | 0,385 | 0,220 |
| Pasto natural. c, sin enzimas | 99 | 58 | 58 | 0,358 | 0,208 |
| Pasto natural. a, con enzimas | 138 | 78 | 56 | 0,497 | 0,280 | **0,254** |
| Pasto natural. b, con enzimas | 123 | 69 | 56 | 0,445 | 0,249 |
| Pasto natural. c, con enzimas | 115 | 65 | 56 | 0,415 | 0,234 |

En la tabla 2, se pudo apreciar que de los sustratos evaluados: CT-115 (toda la planta); Pasto mulato (solamente hojas) y Pasto natural (toda la planta), la acción del complejo de enzimas potencia la producción de metano. Sin embargo al replicar estos experimentos a nivel de campo en Cuba, los resultados no fueron satisfactorios. En el caso de los experimentos efectuados en Cuba, se utilizó inóculo porcino, pero quizás el factor limitante en el bajo rendimiento obtenido por biomasa investigada fue el tamaño de las partículas (biomasas) objeto de investigación, las cuales no quedaron suficientemente trituradas, producto de desperfecto en el molino utilizado, lo cual pudo afectar la interacción de la enzima respecto a las biomasas utilizadas.

Según Brulé (2014), los experimentos en la etapa de hidrólisis enzimática muestran una baja eficiencia cuando son adicionadas enzimas a los sustratos agrícolas. El autor concluyó que la eficiencia de las enzimas puede ser favorecida por bajo contenido de fibras recalcitrantes y lignina, bajo pH y baja temperatura. Además, refiere que para lograr un efecto positivo de la adición de enzimas en la práctica productiva, los bioreactores anaerobios deben tener una alta carga orgánica (OLR), un bajo tiempo de residencia hidráulica (HRT) y los sustratos deben poseer una mezcla de cultivos energéticos. Por lo tanto, estos resultados están en contradicción con Brulé *et al.* (2011). Ya que estos resultados indican un efecto positivo con la adición de la enzima ZY maXX XL 200 a los sustratos evaluados, y cuando se utiliza una densidad de inóculo apropiada. Se debe destacar que estos resultados muestran la potencialidad que posee la enzima ZY maXX XL 200 para favorecer el proceso de hidrólisis, la cual es la etapa limitante en la digestión anaerobia de estos tipos de residuos, al mejorarse le hidrólisis indirectamente se mejora el tratamiento anaerobio de estos residuos y, por ende, la producción de biogás.

El costo de la enzima ZY maXX XL 200 es de 64,00 €/kg, y teniendo en cuenta las pequeñas cantidades de enzimas utilizadas en este experimento (100 µl/jeringas por cada 0,350 mg de sustrato evaluado o 0,01 L/0,0003 kg), se puede inferir un gasto aproximado de 192 € por tonelada de sustrato tratado, demostrando la factibilidad económica de su utilización; además, los valores específicos de obtención de metano alcanzarían valores desde un máximo de 0,047 CH4/kg VS (*pasto mulato*) hasta un mínimo de 0,024 CH4/kg VS (*CT-115*) de incrementos, comparando estos mismos sustratos sin pre-tratamientos.

Respecto a la evolución del pH, los resultados obtenidos en las biomasas evaluadas (CT-115, Pasto mulato y Pasto natural), mostraron que todos los sustratos al terminar la biodigestión, tanto utilizando inóculo vacuno o porcino, presentaron valores de pH por encima de 7. Por tanto, la enzima ZY maXX XL 200 permite mantener condiciones adecuadas para una buena actividad degradadora de los sustratos en los rangos de pH entre 6 y 8, lo cual concuerda con lo planteado por Vintiloiu *et al.* (2009).

En la Tabla 3 se muestran los valores promedios obtenidos en cada sustrato analizado para el rendimiento de biogás y metano, respectivamente.

TABLA 3. Valores promedios obtenidos del rendimiento específico de biogás y metano.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| (Sustrato) | l/kgFM (m3/kg VS) | l/kgSV (m3 CH4/kg VS) |
|  | Rendimiento específico de biogás | Rendimiento específico de metano |
| (Pasto Mulato) | (0,484 m3/kg VS) | (0,268 m3 CH4/kg VS) |
| (Pasto Natural) | (0,452 m3/kg VS) | ( 0,254 m3 CH4/kg VS) |
| CT-115 | (0,461 m3/kg VS) | (0,258 m3 CH4/kg VS) |

Los valores máximos del rendimiento específico de biogás se obtuvieron en el pasto mulato (0,484m3/kg VS); mientras, el mínimo valor se obtuvo con el pasto natural (0,452m3/kg VS). Similarmente, los valores máximos de rendimiento específico de metano se observaron con el pasto mulato (0,268m3 CH4/kg VS) y los valores mínimos obtenidos coincidieron con el pasto natural (0,254 m3 CH4/kg VS). Éstos resultados alcanzados a nivel de laboratorio difieren a los obtenidos por Martinez *et al.* (2014), los cuáles estudiaron otras biomasas valoradas; así como a los obtenidos por Martínez *et al.* (2015), donde utilizaron un pre-tratamiento químico-térmico para esos mismas sustratos.

**4. Conclusiones**

* En todos los casos, se lograron incrementos significativos en el rendimiento específico de metano. Los mejores resultados tuvieron lugar con el *pasto mulato* (0,268 m3 CH4/kg VS); seguidos del CT-115 (0,258 m3 CH4/kg VS) y culminando con el pasto natural (0,254 m3 CH4/kg VS) obteniéndose incrementos cuando se utilizó el pre-tratamiento con enzimas e Inóculo vacuno Vs cuando este no fue utilizado.
* Los resultados alcanzados a nivel de campo en Cuba con las mismas biomasas evaluadas en Alemania no fueron favorables, sin embargo estos resultados no deben tomarse como conclusivos.
* La evolución del pH en las biomasas pre-tratadas con enzimas se comportó de forma semejante a cuando las biomasas no son pre-tratadas.

**Recomendaciones**

. Repetir las Investigaciones a escala de campo en Cuba con las mismas biomasas para contrastar los resultados obtenidos.

. Llevar a cabo estos estudios con estos pre-tratamientos a mayor escala (biodigestores a escala productivas).

**Agradecimientos**

* Al Proyecto nacional de CUBAENERGIA. Estudio de pre-tratamientos básicos y especiales para mejorar la producción y calidad del biogás. Código: 9917;
* A la Universidad de Hohenheim. Alemania.

**5. Referencias**

1.BRULÉ, M.: *The effect of enzyme additives on the anaerobic digestion of energy crops*, *[en línea]*, Institut für Agrartechnik, Landesanstalt für Agrartechnik und Bioenergie, Fakultät Agrarwissenschaften, PhD. Thesis, Universität Hohenheim, Germany, 180 p., 2014, *Disponible en:http://opus.uni-hohenheim.de/volltexte/2014/1030/*, *[Consulta:15 de diciembre de 2014]*.

2.BRULÉ, M.; VOGTHERR, J.; LEMMER, A.; OECHSNER, H.; JUNGBLUTH, T.: “Effect of enzyme addition on the methane yields of effluents from a full-scale biogas plant.”, *Landtechnik*, 66(1): 50-52, 2011, ISSN: 0023-8082.

3.FORSTER-CARNEIRO T; ISAAC R; PÉREZ M;SCHVARTZ C. Anaerobic Digestion: Pretreatment of Substrates. En: Ackmez Mudhoo. Biogas production. Pretreatment methods in anaerobic digestion. Edit. Scrivener-Wiley, 2012. p.1-20.

4.KURAKAKE, M.; IDE, N.; KOMAKI, T.: “Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper”, *Current microbiology*, 54(6): 424-428, 2007, ISSN: 0343-8651.

5.MARTÍNEZ, C.; OECHSNER, H.; REINHARDT, A.; GARCÍA, Y.; LÓPEZ, L.: “Studies of chemical-thermal pre-treatment in biomass to use for biogas production in Cuba”, *Journal of Basic and Applied Research International*, 14(3): 215-224, 2015.

6.MARTÍNEZ, H.C.; GARCÍA, L.Y.: “Utilización de pre-tratamientos básicos y específicos para la producción de biogás. Revisión y análisis”, *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 25(3): 81-92, 2016, ISSN: 1010-2760, E-ISSN: 2071-0054.

7.MARTINEZ, H.C.; OECHSNER, H.; BRULÉ, M.; MARAÑON, M.E.: “Estudio de algunas propiedades físico-mecánicas y químicas de residuos orgánicos a utilizar en la producción de biogás en Cuba”, *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 23(2): 63-69, 2014, ISSN: 1010-2760, E-ISSN: 2071-0054.

8.NC 74-22: 85: *Determinación de la humedad inicial y de la materia seca*, Inst. Oficina Nacional de Normalización (NC), La Habana, Cuba, Vig de 1985.

9.NC 74-30: 85: *Determinación del contenido de cenizas*, Inst. Oficina Nacional de Normalización (NC), La Habana, Cuba, Vig de 1985.

10.TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K.: “Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review”, *International journal of molecular sciences*, 9(9): 1621-1651, 2008, ISSN: 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms9091621.

11.TANIGUCHI, M.; SUZUKI, H.; WATANABE, D.; SAKAI, K.; HOSHINO, K.; TANAKA, T.: “Evaluation of pretreatment with Pleurotus ostreatus for enzymatic hydrolysis of rice straw”, *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(6): 637-643, 2005, ISSN: 1389-1723, DOI: https://doi.org/10.1263/jbb.100.637.

12.VDI-4630.: *Fermentation of organic material characterization of substrate, sampling collection of material data, fermentation tests,[en línea], no. 4630,* no. 4630, Inst. Inst. VDI-Richtlinien, Berlin, Vig de 2006.

13.VINTILOIU, A.; BRULÉ, M.; LEMMER, A.; OECHSNER, H.; JUNGBLUTH, T.; JURCOANE, S.; ISRAEL, R.F.: “Influence of temperature and pH value on enzyme activity in the biogas process.”, *Landtechnik*, 64(1): 22-24, 2009, ISSN: 0023-8082.

14.ZHONG, W.; ZHANG, Z.; QIAO, W.; FU, P.; LIU, M.: “RETRACTED: Comparison of chemical and biological pretreatment of corn straw for biogas production by anaerobic digestion”, *Renewable Energy*, 36(6): 1875-1879, 2011, ISSN: 0960-1481, DOI: https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.12.020.