



## Study of Enzymes Pre-Treatments in Biomasses Dedicated to Biogas Production

### *Estudio de pre-tratamientos con enzimas en biomásas destinadas a la producción de biogás*

Dr.C. Carlos M. Martínez-Hernández<sup>1</sup>, Dr. Hans Oechsner<sup>II</sup>, Ing. Yaser García-López<sup>1</sup>, Ing. Lisbet López-González<sup>III</sup>

<sup>1</sup> Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

<sup>II</sup> Universidad de Hohenheim, Landensanstalt für Agrartechnik und Bioenergie (740), Garbenstrasse 9, Stuttgart. Alemania.

<sup>III</sup> Universidad de Sancti Spiritus, “José Martí Pérez”, Sancti Spiritus, Cuba.

**ABSTRACT.** This work presents a study of the influence of an enzyme pre-treatment application to different substrates utilized for biogas production. The substrates studied were biomass of agricultural origin (sorghum-R-132, sunflower JE-94, corn and dasheen) and a tavern residual (white bread). The pre-treatment consisted on the addition of one enzyme (ZY maXX XL 200) in dose of 100  $\mu$ L/syringes per 350 mg substrates diluted in 30 mL of inoculum. Substrates underwent a biodigestion process and the results were compared with those obtained in absence of the enzyme pre-treatment. Increments were achieved in the maximum specific biogas yield in the substrates. The best results took place with *Colocacia esculenta* (1918,07  $L_{CH_4}$ /kgSV); bread (1792,81  $L_{CH_4}$ /kgSV); sunflower JE-94 (1676,06  $L_{CH_4}$ /kgSV); sorghum R-132 (1145,78  $L_{CH_4}$ /kgSV) and corn (1139,03  $L_{CH_4}$ /kgSV) being obtained more than 100% increment in the maximum specific biogas yield when the treatment is used with enzymes and pig inoculum. On the other hand, it was observed that pH evolves in a similar way in substrates evaluated with enzyme treatment and without pre-treatment.

**Keywords:** Substrate, Wastes, Agricultural origin, Bovine and swine inoculum.

**RESUMEN.** En este trabajo se realiza un estudio de la influencia de la aplicación de un pre tratamiento con enzimas a diferentes sustratos con potencialidades de utilizarse para la producción de metano. Los sustratos estudiados fueron de origen agrícola (sorgo-R-132, girasol JE-94, maíz y malanga) y un residuo de cantina (pan blanco). El pre-tratamiento consistió en la adición de la enzima (ZY maXX XL 200) en dosis de 100  $\mu$ L/jeringas por 350 mg de sustratos mezclados en 30 mL de inóculo. Se investigó su efecto ante dos inóculos diferentes (inóculo vacuno e inóculo porcino). En cada una de las variantes de experimentación, los sustratos se sometieron a un proceso de digestión anaerobia y los resultados se compararon con los obtenidos en ausencia del pre-tratamiento. Se lograron incrementos favorables en el rendimiento específico máximo de biogás de los sustratos. Los mejores resultados se presentaron con la malanga (*Colocacia esculenta*), (1918,07  $L_{CH_4}$ /kgSV); Pan (1792,81  $L_{CH_4}$ /kgSV); Girasol JE-94 (1676,06  $L_{CH_4}$ /kgSV); Sorgo R-132 (1145,78  $L_{CH_4}$ /kgSV) y Maíz (1139,03  $L_{CH_4}$ /kgSV) donde fueron obtenidos incrementos mayores de 100% en el rendimiento máximo específico de biogás cuando se aplicó este pre-tratamiento con inóculo porcino. Por otra parte, se pudo apreciar que la evolución del pH en los sustratos evaluados, se comportó de forma semejante tanto cuando se utilizó el pre-tratamiento con enzimas que cuando este no fue utilizado.

**Palabras clave:** sustrato; residuos; origen agrícola, inóculo vacuno y porcino.

## INTRODUCTION

The composition of the substrates is one of the main factors in anaerobic digestion to determine methane yield and potential. Most of the bibliographical sources report that the differences in methane kinetics, potential and yield depend on the type of substrates utilized. The methods of

## INTRODUCCIÓN

La composición de los sustratos es uno de los factores principales en la digestión anaerobia para determinar el rendimiento y potencial de metano. Es conocido el empleo de la digestión anaerobia como un método para el tratamiento de residuos agrícolas y de cantina con el objeto de degradar los mismos, reducir su agresividad, poder

substrate pre-treatments have as object the improvement of their anaerobic digestion qualities, when altering their physical, chemical and biological properties. However, these pre-treatments show certain particularities such as: increase of manipulation costs, increment of legislative requirements for the stabilization and removal of possible pathogens, tendency to handle smaller nitrogen limits, which allows handling these substrates' age and the decrease of the degradability of activated substrates (Zhong *et al.*, 2011). However, pre-treatments analysis is necessary depending on type, performance and costs (Martínez & García, 2016).

**Biological pre-treatments:** the objective of biological pre-treatments is to prepare the substrates for the enzymatic degradation and the best method and condition of pre-treatment greatly depends on the substrates type. Among the utilized microorganisms to degrade organic substrates there are several types of mushrooms, such as: brown, white and soft rotten, besides some types of bacteria (Taherzadeh & Karimi, 2008). Kurakake *et al.* (2007) studied biological treatments in office paper with two chains of bacteria (*Sphingomonas paucimobiles* and *Bacillus circulans*), obtaining improvements in the enzymatic hydrolysis, as well as 94% of sugar recovery. Depending on the substrates type (residuals of houses, waters of industries, residuals of still etc), the enzymatic attack can be carried out by different types of mushrooms or combinations of them (*Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, etc). Taniguchi *et al.* (2005) evaluated biological pre-treatments in rice straw using 4 white-rotten mushrooms (*Phanerochaete chrysosporium*, *Tramete versicolor*, *Ceriporiopsis subvermisporea* and *Pleurotus ostreatus*) and the pre-treatment with *Pleurotus ostreatus* resulted in a selective degradation of lignin and an increment of rice straw susceptibility to enzymatic hydrolysis. Also, solid fermentation of orange peel with chains of mushrooms types *Sporotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, improved the feeding capacity of the constituents and reduced the level of antimicrobial substances. In a similar work, white-soft mushroom cultivations were used to decontaminate residual waters of milled olives, improving their anaerobic digestion. Vintiloui *et al.* (2009) investigated the influence of temperature and pH of several commercial enzymes on the degradation of corn ears and straw. In accordance with Vintiloui *et al.* (2009) the best results were obtained at 50° C, they also outline that enzymes produced by mushrooms present their best potentialities to pH values between 4 and 6. However, the methane genesis takes place to values between 6 and 8, therefore, it would be necessary to look for an enzyme that maintains a good activity in these pH ranges.

Low energy requirement, no chemicals usage and gentle environmental condition are the main advantages of biological pre-treatments. However, the efficiency of these pre-treatments is sometimes low. For such a reason, biological pre-treatments need other previous pre-treatments that assure

contaminante y al mismo tiempo producir energía. Sin embargo desde hace algún tiempo, 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. Los métodos de pre-tratamientos de los sustratos tienen como objeto el mejoramiento de las cualidades de digestión anaerobia de estos, al alterar sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Sin embargo, estos pre-tratamientos 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 degradabilidad 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. A continuación se detalla algunos de estos. Un trabajo que aborda una revisión y análisis de estos pre-tratamientos se describe en (Martínez y García, 2016). Este trabajo se centra en el estudio de un pre-tratamiento biológico.

*Los pre-tratamientos biológicos:* el objetivo del pre-tratamiento biológico es preparar los sustratos para la degradación enzimática, y el mejor método y condición de pre tratamiento depende en gran medida del tipo de sustrato. Dentro de los microorganismos utilizados para degradar sustratos orgánicos se encuentran varios tipos de hongos, tales como: carmelita, blanco y suaves putrefactos, además de algunos tipos de bacterias (Taherzadeh y Karimi, 2008). Kurakake *et al.* (2007), han estudiado tratamientos biológicos en papel de oficina con dos cadenas de bacterias (*Sphingomonas paucimobiles* y *Bacillus circulans*), obteniendo mejoras en la hidrólisis enzimática, así como un 94% de recuperación de azúcar. Dependiendo del tipo de sustrato (residuos sólidos domésticos, aguas residuales industriales, residuos de destilería, etc), el ataque enzimático puede ser realizado por diferentes tipos de hongos o combinaciones de estos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, etc). Taniguchi *et al.* (2005), evaluaron pre-tratamientos biológicos en paja de arroz usando 4 hongos blanco-putrefactos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Tramete versicolor*, *Ceriporiopsis subvermisporea* y *Pleurotus ostreatus*) y 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 *Penicillium* mejoró la capacidad de alimentación de constituyentes y redujo el nivel de sustancias antimicrobiales. En un trabajo similar, cultivos de hongo blanco-suaves fueron usados para descontaminar aguas residuales del molinado de olivas, mejorando su digestión anaerobia. Vintiloui *et al.* (2009), han investigado la influencia de la temperatura y el pH de varias enzimas comerciales sobre la degradación de mazorcas y paja de maíz. Según Vintiloui *et al.* (2009), los mejores efectos fueron obtenidos a valores de temperatura de 50° C, también plantean que las enzimas originadas por hongos presentan sus mejores potencialidades a valores de pH entre 4 y 6. Sin embargo, la metanogénesis tiene lugar a valores entre 6 y 8, por lo que habría que buscar una enzima que mantenga una buena actividad en estos rangos de pH.

El bajo requerimiento energético, el no empleo de 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

the later enzymatic attack; this alternative can be carried out later to other pre-treatments previous such as physical or chemical pre-treatments.

Recently, Martínez *et al.* (2015) published a work using a chemical-thermal pre-treatment in the same biomasses that are valued in this investigation. Hence, the present work constitutes a continuation of the use of special pre-treatments to be used in the anaerobic biodigestion of agricultural and tavern residuals.

Of the analysis of these bibliographical sources it can be appreciated that the application of a pre-treatment with enzymes to organic residuals (lignin type), is very appropriate to favor biodegradability and methane production. This investigation intends to apply a pre-treatment with enzymes to different types of biomasses, studying their effect on the biogas production.

## METHODS

This work was carried out in Central University “Marta Abreu” of Las Villas, but the investigation material (Liquid cellulase enzymatic preparation, ZY maXX XL 200) was donated by the Company BIOPRACT GmbH, through investigators of University of Hohenheim, Germany. The experimental results, fruit of an investigation project in execution, were obtained from February 2015 until January 2016. Different effective norms for this type of investigation were taken into consideration, as it is indicated below.

The substrates were characterized according to the norm (VDI 4630, 2006) and following the characterization and general classification of substrates, the possibilities of fermentation of organic materials can be considered. The agricultural residuals studied in a Cuban investigation project (Martínez *et al.*, 2014), have been: sorghum (*Sorghum R-132*), sorghum (*Sorghum halepense*), sunflower (*Helianthus annuus L JE-94*), corn (*Zea mays*), dasheen (*Colocasia esculenta L Schott*), sweet potato (*Ipomoea batata*) and potato (*Solanum tuberosum Sw*). Also, a tavern residual has been studied (white bread). In the case of the agricultural residuals, they were collected by taking their roots, stems, leaves and fruits. Later on they were dried off and fractioned in particles of 1 mm of size. Laboratory analyses of samples were carried out in Germany and field investigations were performed in Cuba.

The investigations in Germany were executed in an investigation stay developed in the University of Hohenheim between September and November, 2013. There enzymes treatment was not applied, neither it was investigated with swine inoculum; it was only investigated with bovine inoculum. In Cuba, a pre-treatment was used with enzymes, which consisted on adding the enzyme ZY maXX XL 200 in dose of 100 µL/syringes for 350 mg of bovine and swine substrates.

Substrates inoculated with the enzyme were allowed reposing during 4 hours, later on the inoculum (30 mL) was added. The next step was to introduce the substrates

biológicos en algunos casos necesitan de otros pre-tratamientos anteriores que aseguren el ataque enzimático posterior; esta alternativa puede ser realizada posterior a otros pre tratamientos tales como son los casos de pre-tratamientos físicos o químicos.

Recientemente Martínez *et al.* (2015), ha publicado un trabajo utilizando un pre tratamiento químico- térmico en las mismas biomasa que se valoran en este investigación. Por lo que el presente trabajo constituye una continuación de la utilización de pre-tratamientos especiales a utilizar en la digestión anaerobia de residuos agrícolas y de cantina.

Del análisis de estas fuentes bibliográficas se puede apreciar que la aplicación de un pre-tratamiento biológico con enzimas a residuos orgánicos de tipo lignocelulósicos, pudiera resultar muy adecuado para favorecer la biodegradabilidad y la producción de metano. Es por ello, que en este trabajo se propone como objetivo general aplicar un pre- tratamiento con enzimas a diferentes sustratos agrícolas, para estudiar su efecto sobre la producción de biogás.

## MÉTODOS

Este trabajo ha sido 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. Los resultados experimentales, fruto de un proyecto de investigación en ejecución, han sido obtenidos durante el período comprendido desde febrero 2015 hasta enero 2016. Para su desarrollo se han tenido en cuenta diferentes normas vigentes para este tipo de investigación, según se indica a continuación.

Los sustratos se caracterizaron de acuerdo con la norma (VDI 4630, 2006), siguiendo la caracterización y clasificación general de sustratos, se pueden estimar las posibilidades de fermentabilidad de los materiales orgánicos. Los residuos agrícolas estudiados en el marco de un proyecto de investigación cubano (Martínez *et al.*, 2014), han sido: sorgo (*Sorghum R-132*), sorgo (*Sorghum halepense*), girasol (*Helianthus annuus L JE-94*), maíz (*Zea mays*), malanga (*Colocasia esculenta L Schott*), boniato (*Ipomoea batata*) y papa (*Solanum tuberosum Sw*). Asimismo también se ha estudiado un residuo de cantina (pan blanco). En el caso de estos residuos agrícolas, los mismos fueron recolectados tomando sus raíces, tallos, hojas y frutos. Posteriormente se secaron y fraccionaron en partículas de 1 mm, empleando un molino VEB Nossener Maschinenbau, 8255 Nossen (de cribas), 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 en una estancia de investigación desarrollada en la Universidad de Hohenheim entre los meses de septiembre y noviembre del 2013. En el caso de Alemania no se aplicó tratamiento con enzimas, tampoco se investigó con inóculo porcino, (solo se investigó con inoculum vacuno). El inóculo fue tomado de una planta en producción, posteriormente fue aclimatado durante un tiempo a nivel de laboratorio. En Cuba se utilizó un pre-tratamiento con enzimas, el cual consistió en añadir la enzima ZY maXX XL 200 en dosis de 100 µL/syringes por 350 mg de sustrato diluido en 30 mL de los inóculos a valorar (vacuno y porcino). Los sustratos inoculados con la enzima se dejaron reposar durante 4 horas, posteriormente se le añade el inóculo (30 mL). El

pre-treated in experimental syringes of 100 mL of capacity. Bovine inoculum was added (caw manure) in some cases, in other cases swine inoculum (pig manure), coming from biodigesters in production. The conditions of the experiments are presented in Table 1.

próximo paso consistió en introducir los sustratos pre-tratados en jeringas experimentales de 100 mL de capacidad, se añadió inóculo vacuno en una serie de ensayos, en otros casos se utilizó inóculo porcino (ambos inóculos procedente de biodigestores en producción). En la Tabla 1 se presenta las condiciones de los ensayos a ejecutar.

**TABLE 1. Experimental conditions for biomasses valued**  
**TABLA 1. Condiciones de ensayo en las biomásas evaluadas**

Substrate	Enzyme treatments	Dosage	Hydraulic Retention Time (HRT= minutes)
Colocasia esculenta L Schott	ZY maXX XL 200	100 µL/syringes per 350 mg of substrate in 30 <sup>-1</sup> mL inoculum	120
Sorghum R-132	ZY maXX XL 200	100 µL/syringes per 350 mg of substrate in 30 <sup>-1</sup> mL inoculum	120
Sunflowers JE-94	ZY maXX XL 200.	100 µL/syringes per 350 mg of substrate in 30 <sup>-1</sup> mL inoculum	120
Bread	ZY maXX XL 200.	100 µL/syringes per 350 mg of substrate in 30 <sup>-1</sup> mL inoculum	120
Corn	ZY maXX XL 200.	100 µL/syringes per 350 mg of substrate in 30 <sup>-1</sup> mL inoculum	120
Inoculum (caw manure or pig manure)	Without enzyme pre-treatment		

Experimental syringes were placed in a Hohenheim Bench Test (HBT), two replicas per substrate in each syringe; as well as a replica in a plastic container, in order to investigating the evolution of the pH in the process of anaerobic digestion under field conditions. The following parameters were evaluated:

- Humidity and dry matter content according to norm NC-74-22: 1985;
- Ashy content according to norm NC-74-30: 1985;
- Determination of the relationship carbon/nitrogen (VDI-4630, 2006),
- pH evolution in the biodigestion
- Evaluation of specific biogas yield

Starting from the input data, by means of softwares elaborated for these ends (Gärttest nach VDI 4630) and following the norm (VDI-4630, 2006), the following parameters were calculated:

- Biodegradability rate
- Maximum potential of biogas ( $L_{CH_4}$ /kgSV)

The results of the investigations were processed with the professional statistical package STATISTICA 8.0.

## RESULTS AND DISCUSSION

In Figure 1 the behavior of the valued substrates without the use of enzymes pre-treatment and using bovine inoculum are observed. It can be observed that the biggest specific methane yield was obtained with bread (346,12  $L_{CH_4}$ /kgSV), while the rest of the biomasses did not reach superior values to 180  $L_{CH_4}$ /kgSV, being these values below the obtained by Martínez *et al.* (2014). That could be due to the mixed use of roots, leaves, and fruits of these agricultural biomasses, which possess bigger quantity of fiber (cellulose and hemicellulose) compared with the studies of these biomasses independent and previously made.

Las jeringas experimentales fueron montadas en un aditamento denominado Hohenheim Bench Test (HBT), a razón de dos réplicas por sustrato en cada jeringa; 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. El HBT es capaz de portar de forma simultánea 12 jeringas experimentales. Fueron objeto de valoración los siguientes parámetros:

- Contenido en humedad y materia seca de acuerdo con la norma NC-74-22: 1985;
- Contenido de cenizas de acuerdo con la norma NC-74-30: 1985;
- Determinación de la relación carbono/nitrógeno de acuerdo con la norma (VDI-4630, 2006),
- Evolución del pH en la biodigestión;
- Evaluación del rendimiento específico de biogás de acuerdo con la norma (VDI-4630, 2006),

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

- Tasa de biodegradabilidad;
- Potencial máximo de biogás ( $L_{CH_4}$ /kgSV).

Algunos resultados de las investigaciones han sido procesados con el paquete estadístico profesional Statistica 8,0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se observa que el comportamiento de los sustratos evaluados sin la utilización del pre-tratamiento con enzimas y utilizando inóculo vacuno. Se pudo apreciar que el mayor rendimiento específico de metano fue obtenido con el pan (346,12  $L_{CH_4}$ /kgSV), mientras que el resto de las biomásas no alcanzaron valores superiores a (180  $L_{CH_4}$ /kgSV), encontrándose estos valores por debajo de los obtenidos por Martínez *et al.* (2014), lo cual pudiera estar dado por la utilización de raíces, hojas, tallos y frutos mezclados de estas biomásas agrícolas, las cuales poseen mayor cantidad de fibra (celulosa y hemicelulosa) comparado con los estudios efectuados anteriormente de estas biomásas en solitario.

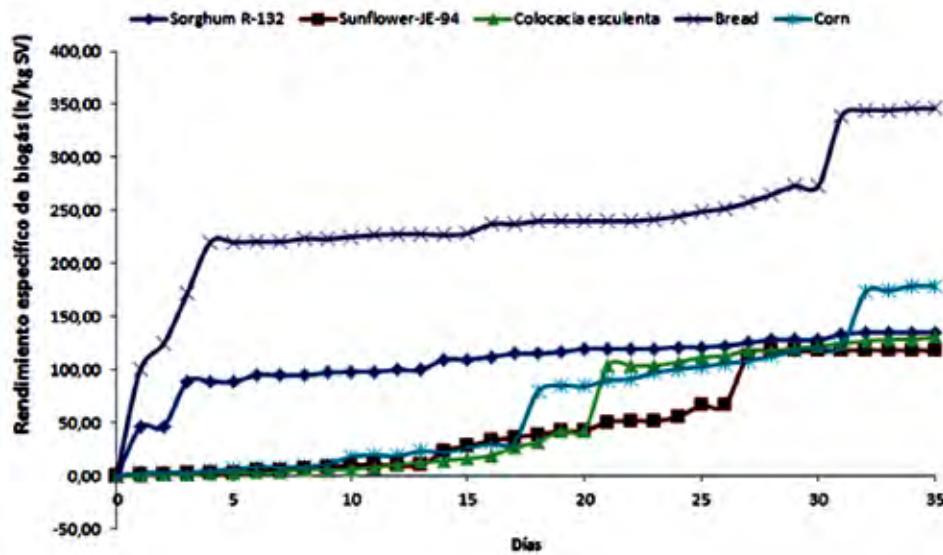


FIGURE 1. Average specific biogas yield of the biomasses using bovine inoculum without pre-treatment in field  
 FIGURA 1. Valores del rendimiento específico de biogás promedio de las biomásas objeto de estudio utilizando inóculo vacuno sin pre-tratamiento a escala de campo en Cuba.

Figure 2 shows the results obtained using enzymes pre-treatment with bovine inoculum. It can be appreciated that the biggest specific methane yield was obtained with bread (507,77 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV), followed by dasheen (*Colocacia esculenta*) (336,80 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV), while in sunflower (*Helianthus annuus L JE-94*) (161,54 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV) the lowest values were presented. These results are within the range of other investigations developed by Brulé *et al.* (2011), where they did not find significant differences in the biogas yield (m<sup>3</sup>/kg oTS) in effluents of the first and second bioreactors of German plants in production that used enzymes with these purposes, compared with the control without their use.

En la Figura 2 se observan los resultados obtenidos utilizando pre-tratamiento con enzimas e inóculo vacuno. Se pudo apreciar que el mayor rendimiento específico de metano fue obtenido con el pan (bread) (507,77 L/kgSV), siguiendo la malanga (*Colocacia esculenta*) (336,80 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV), mientras que en el girasol (*Helianthus annuus L JE-94*) (161,54 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV) se presentaron los valores más bajos. Estos resultados se encuentran dentro del rango de otras investigaciones conducidas por Brulé *et al.* (2011), en las cuales estos investigadores no encontraron diferencias significativas en el rendimiento de biogás (m<sup>3</sup>/kgSV) en efluentes del primer y segundo bioreactor de plantas alemanas en producción que usaron enzimas con estos fines, comparadas con la no utilización de éstas.

In the Figure 3, the results of the behavior of the different valued substrates are presented with the enzyme ZY maXX XL 200 and pig inoculum.

En la Figura 3, se presentan los resultados del comportamiento de los diferentes sustratos evaluados con la enzima ZY maXX XL 200 e inóculo porcino.

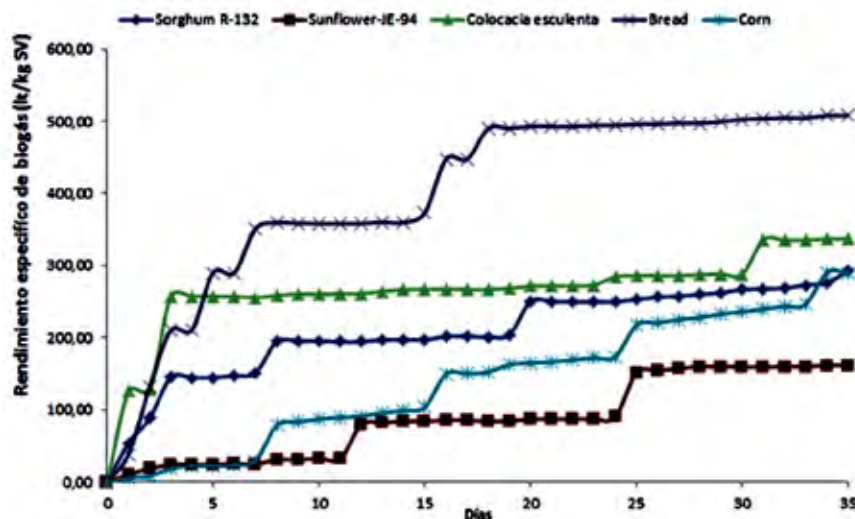


FIGURE 2. Average specific biogas yield of the biomasses using bovine inoculum with enzymes pre-treatment in field experiments in Cuba  
 FIGURA 2. Valores del rendimiento específico de biogás promedio de las biomásas objeto de estudio utilizando inóculo vacuno con pre-tratamiento de enzimas a escala de campo en Cuba.

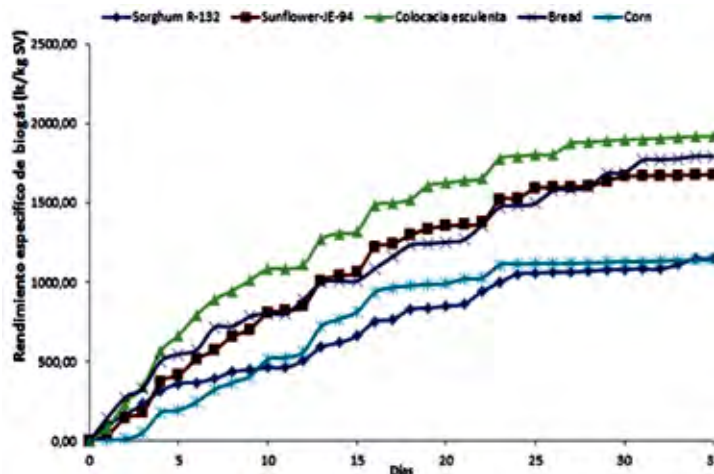


FIGURE 3. Average specific biogas yield of the biomasses using swine inoculum with enzymes pre-treatment in field experiments in Cuba  
 FIGURA 3. Valores del rendimiento específico de biogás promedio de las biomosas objeto de estudio utilizando inóculo porcino con pre-tratamiento de enzimas a escala de campo en Cuba.

In this case a different behavior is observed in all substrates. It can be noticed that the biggest specific methane yield was obtained with dasheen (*Colocacia esculenta*) (1918,07 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV), meaning an increment of 782,7% regarding the behavior of this substrate without pre-treatment, while the minimum value was obtained with corn (*Zea mays*) (1139,03 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV), being an increment of 326,5% (Martínez *et al.*, 2014). According to Brulé (2014), the experiments in the stage of enzymatic hydrolysis show a poor efficiency of the enzymes addition to agricultural substrates Brulé (2014) concluded that the efficiency of the enzymes can be favored by low content of recalcitrant fibers and lignin, low pH and low temperature. Brulé (2014) referred that to achieve a positive effect of enzyme addition in the productive practice, the bioreactor should have a high organic load rate (OLR), a low hydraulic residence time (HRT) and substrates characterized by possessing a mixture of energy cultivations. Therefore, our results are in contradiction with this author's and until the present there have not been similar references to those in here stated. These results indicate a very positive effect of the enzyme ZY maXX XL 200 in the substrates evaluated, when this type of inoculum is used. It should be emphasized that these results are surprising and they show the potentiality that the enzyme ZY maXX XL 200 possesses to favor biodegradation ability and biogas production.

It is also remarkable that using swine inoculum, the yields achieved in the diverse biomasses are much higher than the ones reached with bovine inoculum.

The cost of the enzyme ZY maXX XL 200 is \$64,00 €/kg. Considering the small quantities used for this pre-treatment (100 µL/syringe/ 0,350 mg of substrate evaluated), it can be inferred that the expense is not significant. however, the specific biogas yields per substrates obtained, reach values from a maximum of 782,7% (*Colocacia esculenta*) until a minimum of 326,5% (*Zea mays*) of increments, compared these same substrates with those without pre-treatments (Martínez *et al.*, 2014). Therefore, this demonstrates the

En este caso un comportamiento diferente se observa en todos los sustratos. Se pudo apreciar que el mayor rendimiento específico de metano fue obtenido con la malanga (*Colocacia esculenta*) (1918,07 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV), significando un incremento de 782,7% respecto al comportamiento de este sustrato sin pre-tratamiento, mientras que en el (Maíz), se obtiene el mínimo valor (1139,03 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV), resultando en un incremento de 326,5% (Martínez *et al.*, 2014). Según Brulé (2014), los experimentos en la etapa de hidrólisis enzimática mostraron una pobre eficiencia de la adición de enzimas en sustratos agrícolas. Brulé (2014), concluyó que la eficiencia de las enzimas puede ser favorecida por bajo contenido de fibras recalcitrantes y lignina, bajo pH y baja temperatura. Brulé (2014), ha referido que para lograr un efecto positivo de la adición de enzimas en la práctica productiva, los bioreactores deben tener una alta carga orgánica (COV), un bajo tiempo de residencia hidráulica (TRH) y sustratos caracterizados por poseer una mezcla de cultivos energéticos. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo están en contradicción con este autor y hasta el presente no se tienen referencias de resultados semejantes. Estos resultados indican un efecto muy positivo de la enzima ZY maXX XL 200 en los sustratos evaluados, cuando se utiliza este tipo de inóculo. Se debe destacar que estos resultados son sorprendentes y muestran la potencialidad que posee la enzima ZY maXX XL 200 para favorecer la digestión anaerobia y la producción de biogás.

También merece destacarse que utilizando el inóculo porcino, los rendimientos logrados en las diversas biomosas están muy por encima de los resultados alcanzados con inóculo vacuno.

El costo de la enzima ZY maXX XL 200 es 64,00 €/kg. Teniendo en cuenta las pequeñas cantidades utilizadas en este pre-tratamiento (100 µL/jeringas por cada 0,350 mg de sustrato evaluado), se puede inferir que el gasto es no significativo, sin embargo los rendimientos específicos de biogás por sustratos obtenidos, alcanzan valores desde un máximo 782,7% (*Colocacia esculenta*) hasta mínimo 326,5% (Maíz) de incrementos, comparando estos mismos sustratos sin pre-tratamientos (Martínez *et al.*, 2014). Por lo tanto, esto pudiera tenerse en cuenta a

economic feasibility of its use.

In Figure 4, it is shown the yield of obtained biogas ( $L_{CH_4}/kgSV$ ) in the biomass evaluated in Cuba without the application of the enzyme pre-treatment and using swine inoculum. In this case, it is observed that the best behavior was obtained with corn (*Zea mays*) (280,13  $L_{CH_4}/kgSV$ ) and dasheen (*Colocacia esculenta*) (264,89  $L_{CH_4}/kgSV$ ), while the rest of the biomasses reached inferior yields to 200  $L_{CH_4}/kgSV$ , behaving worse than in the case that bovine inoculum is used.

la hora de analizar la factibilidad económica de su utilización.

En la Figura 4 se muestra el rendimiento de biogás obtenido ( $L_{CH_4}/kgSV$ ) en las biomásas evaluadas en Cuba sin la aplicación del pre-tratamiento con enzimas, utilizando inóculo porcino. En este caso se pudo apreciar que el mejor comportamiento fue obtenido con el maíz (280,13  $L_{CH_4}/kgSV$ ) y la malanga (*Colocacia esculenta*) (264,89  $L_{CH_4}/kgSV$ ), mientras que el resto de las biomásas alcanzan rendimientos inferiores a (200  $L_{CH_4}/kgSV$ ), comportándose peor que en el caso que se utiliza inóculo vacuno.

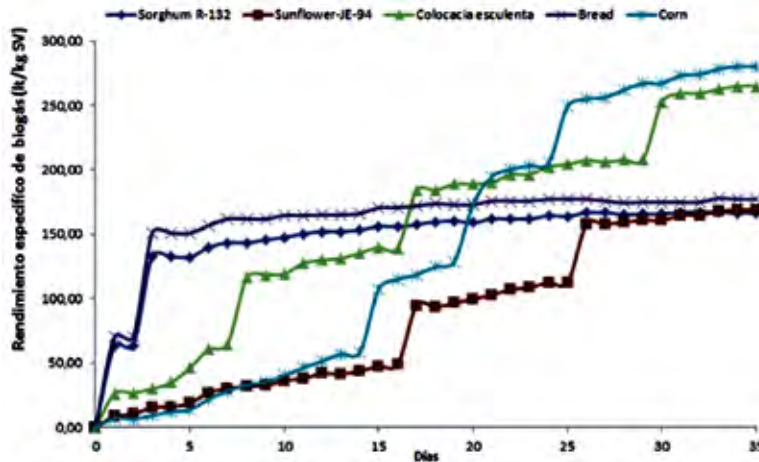


FIGURE 4. Average specific biogas yield of the biomasses using swine inoculum without pre-treatment in field experiments in Cuba  
 FIGURA 4. Valores del rendimiento específico de biogás promedio de las biomásas objeto de estudio utilizando inóculo porcino sin pre-tratamiento a escala de campo en Cuba.

Another important aspect object of valuation was the one related to pH evolution in the samples pre-treated with enzymes. In figure 5 their behavior is presented. There it is possible to observe that, in the first five days of biodigestion process an abrupt fall of the pH is presented, however, as the process went on, these values increased, product of the buffer or tampon effect of the inoculum, and it finished with appropriate values for this type of processes (pH values between 6 and 8), except in the corn basis.

Otro aspecto importante objeto de valoración fue el relacionado con la evolución del pH en los sustratos pre-tratadas con enzimas. En la Figura 5 se presenta su comportamiento, del análisis de esta figura; se puede observar que en los primeros cinco días del proceso de biodigestión se presenta una caída del pH, sin embargo a medida que transcurre el proceso, estos valores se incrementan, producto del efecto buffer o tampón del inóculo, culminando con valores entre 8 y 8,7 un poco por encima de los valores recomendados (pH entre 6 y 8).

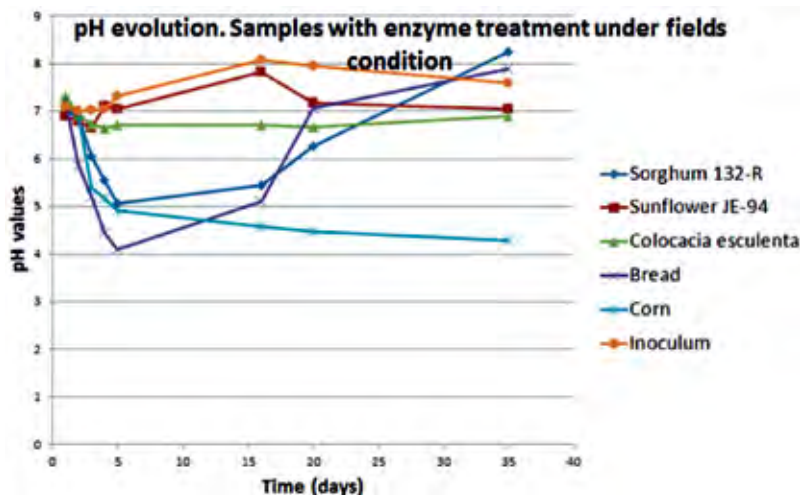


FIGURE 5. pH evolution. Variants analyzed under field conditions with enzymes pre-treatments and bovine inoculum.  
 FIGURA 5. Evolución del pH. Variantes analizadas en condiciones de campo con pre-tratamientos con enzimas e inóculo vacuno.

Something similar is presented in Figure 6. In this case, the same variables are analyzed, but using swine inoculum. In

Algo semejante se presenta en la Figura 6. Se analizan las mismas variables, pero utilizando inóculo porcino. En este caso,

this case, all substrates finished with pH values above 8. In this case, the enzyme ZY maXX XL 200 fulfilled the requirement of maintaining a good degrading activity of the substrates in these pH ranges between 6 and 8, which agrees with that outlined by Vintiloui *et al.* (2009).

In Figure 7, the obtained results of the statistical comparison of the different substrates evaluated with enzymes using bovine and swine inoculum, respectively, are presented

todos los sustratos terminan con valores de pH entre 7 y 8. La enzima ZY maXX XL 200 cumple con el requisito de mantener una buena actividad degradadora de los sustratos en estos rangos de pH entre 6 y 8, lo cual concuerda con lo planteado por Vintiloui *et al.* (2009).

En la Figura 7 se presenta los resultados obtenidos de la comparación estadística de los diferentes sustratos evaluados con enzimas utilizando inóculo vacuno y porcino respectivamente.

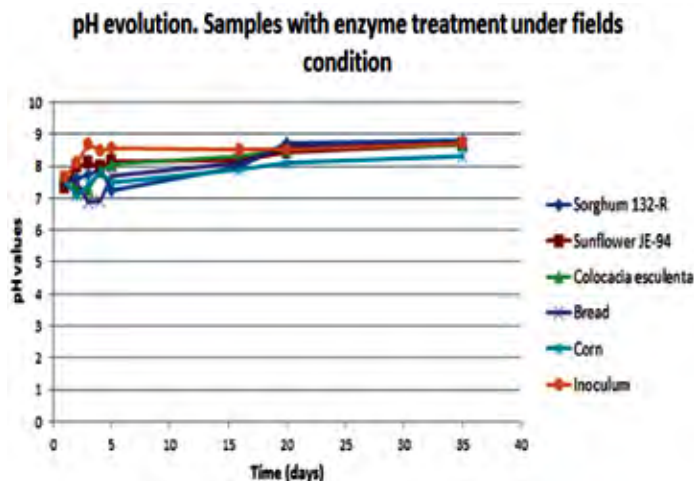


FIGURE 6. pH evolution. Variants analyzed under field conditions with enzymes pre-treatments and swine inoculum.  
 FIGURA 6. Evolución del pH. Variantes analizadas en condiciones de campo con pre-tratamientos con enzimas e inóculo porcino.

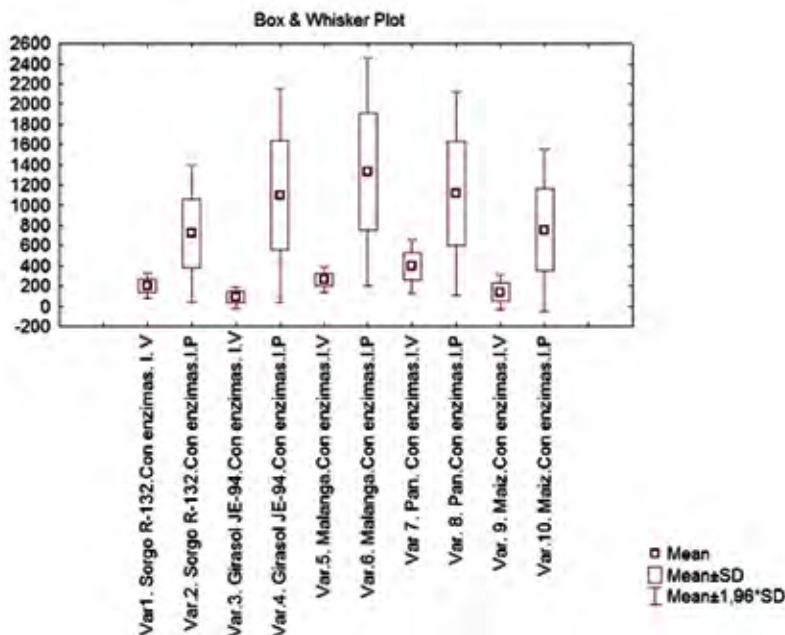


FIGURE 7. Whisker Box analysis of substrates evaluated with pre-treatment with enzymes and bovine and swine inoculum, respectively  
 FIGURA 7. Análisis Box and Whisker de sustratos evaluados con pre-tratamiento con enzimas e inóculo vacuno y porcino respectivamente.

Analyzing Figure 7, it is possible to appreciate that in all substrates evaluated, the behavior of specific biogas yield, when swine inoculum was used (P.I), presented significant differences with regard to when bovine inoculum (B.I) was used.

The results obtained at field level, in the process of biodegradation of the substrates pre-treated with enzymes and bovine inoculum, are shown in the Table 2. Analyzing the maximum

Del análisis de la Figura 7, se puede apreciar que en todos los sustratos evaluados, el comportamiento del rendimiento específico de biogás cuando se utilizó inóculo porcino (I.P), presentó diferencias significativas con respecto a cuándo se utilizó, inóculo vacuno (I.V).

Los resultados obtenidos a nivel de campo en el proceso de biodegradación de los sustratos pre-tratados con enzimas e inóculo vacuno se muestran en la Tabla 2. Analizando los valores máxi-



values obtained, it is evident that in bread substrate the biggest specific biogas yield occurred (574,84  $L_{CH_4}$ /kgSV), while in corn, it presented the lowest value (27,89  $L_{CH_4}$ /kgSV), differing with the results reached at laboratory level in Germany by Martínez *et al.* (2014); as well as with other results obtained by Martínez *et al.* (2015), using chemical-thermal pre-treatment in these same biomasses, which could be given by the utilized pre-treatment.

On the other hand, in the analysis of the maximum values obtained in the biogas yields with the same substrates with enzymes pre-treatment and swine inoculum (Table 3), a completely different behavior is observed.

Next the values obtained are presented. In dasheen (*Colocasia esculenta*), the biggest specific biogas yield is manifested (1903,31  $L_{CH_4}$ /kgSV), while Sorghum R-132 got the smallest specific biogas yield (717,33  $L_{CH_4}$ /kgSV). In this case these results were very good and they show the utility of this type of pre-treatment using swine inoculum.

mos obtenidos, se puede observar que en el pan (Bread) se produjo el mayor rendimiento específico de biogás (574,84  $L_{CH_4}$ /kgSV), mientras que el maíz (*Zea mays*) presentó el valor más bajo (27,89  $L_{CH_4}$ /kgSV), difiriendo con los resultados alcanzados a nivel de laboratorio en Alemania por Martínez *et al.* (2014), así como con otros resultados obtenidos por Martínez *et al.* (2015), utilizando pre-tratamiento químico-térmico en estas mismas biomásas, lo cual pudiera estar dado por el pre-tratamiento utilizado.

Por otra parte, en el análisis de los valores máximos obtenidos en los rendimientos de biogás con los mismos sustratos con pre-tratamiento con enzimas e inóculo porcino (Tabla 3), se observa un comportamiento totalmente diferente. A continuación se presentan los valores obtenidos en la malanga (*Colocasia esculenta*), en este caso se manifiesta el mayor rendimiento específico de biogás (1903,31  $L_{CH_4}$ /kgSV), mientras que el *Sorghum R-132* manifestó el menor rendimiento específico de biogás (717,33  $L_{CH_4}$ /kgSV). En este caso estos resultados son muy buenos y muestran la utilidad de este tipo de pre-tratamiento utilizando inóculo porcino.

**TABLE 2. Specific biogas yields. Biomass valuated with enzyme pre-treatment and caw manure inoculum**  
**TABLA 2. Rendimiento específico de biogás. Biomásas valoradas con pre tratamiento con enzimas e inóculo vacuno**

Substrate	$L_{CH_4}$ /kgFM ( $m^3$ /kg FM)	$L_{CH_4}$ /kgSV ( $m^3$ /kg oTS)
Sorghum R-132 a)	329,95 (0,32 $m^3$ /kg FM)	384,17 (0,38 $m^3$ /kg oTS)
Sorghum R-132 b)	174,09 (0,17 $m^3$ /kg FM)	202,69 (0,20 $m^3$ /kg oTS)
Sunflower JE-94 a)	145,19 (0,14 $m^3$ /kg FM)	169,62 (0,16 $m^3$ /kg oTS)
Sunflower JE-94 b)	131,16 (0,13 $m^3$ /kg FM)	153,46 (0,15 $m^3$ /kg oTS)
<i>Colocasia esculenta</i> L Schott a)	274,39 (0, 27 $m^3$ /kg FM)	354,38 (0,35 $m^3$ /kg oTS)
<i>Colocasia esculenta</i> L Schott b)	247,32 (0,24 $m^3$ /kg FM)	319,33 (0,31 $m^3$ /kg oTS)
Bread a)	574, 84 (0,57 $m^3$ /kg FM)	691,02 (0,69 $m^3$ /kg oTS)
Bread b)	269,97 (0, 26 $m^3$ /kg FM)	324,53 (0,32 $m^3$ /kg oTS)
Corn a)	27,89 (0,02 $m^3$ /kg FM)	32,69 (0,03 $m^3$ /kg oTS)
Corn b)	467,34 (0,46 $m^3$ /kg FM)	547,77 (0,54 $m^3$ /kg oTS)

**TABLE 3. Specific biogas yields. Biomass valuated with enzyme pre-treatment and pig manure inoculum**  
**TABLA 3. Rendimiento específico de biogás. Biomásas valoradas con pre tratamiento con enzimas e inóculo porcino**

Substrate	$L_{CH_4}$ /kgFM ( $m^3$ /kg FM)	$L_{CH_4}$ /kgSV ( $m^3$ /kg oTS)
Sorghum R-132 a)	1250,84 (1,25 $m^3$ /kg FM)	1456, 38 (1,45 $m^3$ /kg oTS)
Sorghum R-132 b)	717,33 (0,71 $m^3$ /kg FM)	835,20 (0,83 $m^3$ /kg oTS)
Sunflower JE-94 a)	1286,26 (1,28 $m^3$ /kg FM)	1502,68 (1,50 $m^3$ /kg oTS)
Sunflower JE-94 b)	1583,08 (1,58 $m^3$ /kg FM)	1849,44 (1,84 $m^3$ /kg oTS)
<i>Colocasia esculenta</i> L Schott a)	1067,79 (1,06 $m^3$ /kg FM)	1378,69 (1,37 $m^3$ /kg oTS)
<i>Colocasia esculenta</i> L Schott b)	1903,31 (1,90 $m^3$ /kg FM)	2457,46 (2,45 $m^3$ /kg oTS)
Bread a)	1352,81 (1,35 $m^3$ /kg FM)	1626,21 (1,62 $m^3$ /kg oTS)
Bread b)	1630,00 (1, 63 $m^3$ /kg FM)	1959,42 (1,95 $m^3$ /kg oTS)
Corn a)	872,60 (0,87 $m^3$ /kg FM)	1022,77 (1,02 $m^3$ /kg oTS)
Corn b)	1070,99 (1,07 $m^3$ /kg FM)	1255,31 (1,25 $m^3$ /kg oTS)

## CONCLUSIONS

- In all substrates evaluated increments above 100% were obtained in their maximum value of specific biogas yield when this

## CONCLUSIONES

- En todos los sustratos evaluados fueron obtenidos incrementos por encima de 100% en su valor máximo de rendimiento

- pre-treatment is applied with swine inoculum, compared with the case of the same pre-treatment with bovine inoculum application.
- Favorable increases of the specific biogas yield were achieved in the cases of dasheen (1918,07 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV); bread (1792,81 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV); sunflower JE-94 (1676,06 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV); Sorghum R-132 (1145,78 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV) and corn (1139,03 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV), when the treatment is used with enzymes and swine inoculum.
  - pH evolution in the biomasses treated with this special pre-treatment behaved in similar way to when the biomasses are not treated.
  - It is necessary to continue this type of investigation to clarify in which other biomasses that use this special pre-treatment, could report bigger specific biogas yields.

## GRATEFULNESS

To CUBAENERGIA national project. Code. 9917. Studies of basic and special treatments to improve the production and quality of the biogas; To Hohenheim University. Germany.

## REFERENCES / REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRULE M.: *The effect of enzyme additives on the anaerobic digestion of energy crops*, University of Hohenheim, Ph.D. Thesis, Germany, 180 p., 2014.
- BRULE, M.; VOGTHEER, 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.
- 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, 1432-0991, DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-006-0568-6>.
- MARTÍNEZ, C.; OECHSNER, H.; BRULÉ, M.; MARAÑÓN, 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, 2071-0054.
- 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, ISSN: 2395-3438, 2395-3446.
- MARTÍNEZ, C.; GARCÍA, 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: 2071-0054, DOI: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.34865.99688>.
- OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN: *Determinación de la humedad inicial y de la materia seca*, no. NC 74-22, 1985.
- OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN: *Determinación del contenido de cenizas*, no. NC 74-30, 1985.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K.: "Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production. A review", *International Journal of Molecular Science*, 9(9): 1621-1651, 2008, ISSN: 1422-0067, DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms9091621>.
- TANIGUCHI, M.; SUSUKI, 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: <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.637>.
- VINTILOUI, A.; BRULÉ, M.; LEMMER, A.; OECHSNER, H.; JUNGBLUTH, T.: "Influence of temperature and pH on enzyme activity in the biogas process", *Landtechnik*, 64(1): 22-24, 2009, ISSN: 0023-8082.
- VDI-RICHTLINIEN-4630: *Fermentation of organic material characterization of substrate, sampling collection of material data, fermentation tests*. Dusseldorf, 92 p., 2006.
- 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: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2010.12.020>.

Received: 12/09/2016.

Approved: 13/03/2017.

Carlos M. Martínez-Hernández, Prof. Titular. Universidad 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](mailto:carlosmh@uclv.edu.cu)

Hans Oechsner, E-mail: [carlosmh@uclv.edu.cu](mailto:carlosmh@uclv.edu.cu)

Yaser García-López, E-mail: [carlosmh@uclv.edu.cu](mailto:carlosmh@uclv.edu.cu)

Lisbet López-González, E-mail: [carlosmh@uclv.edu.cu](mailto:carlosmh@uclv.edu.cu)

Note: the mention of commercial equipment marks, instruments or specific materials obeys identification purposes, there is not any promotional commitment related to them, neither for the authors nor for the editor.

específico de biogás cuando se aplicó este pre-tratamiento con inóculo porcino comparado con el caso de la aplicación del mismo pre-tratamiento con inóculo vacuno.

- Se lograron aumentos favorables del rendimiento específico de biogás en los casos de la malanga (1918,07 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV); pan (1792,81 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV); girasol JE-94 (1676,06 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV); sorgo R-132 (1145,78 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV) y el maíz (1139,03 L<sub>CH<sub>4</sub></sub>/kgSV) cuando se utiliza el tratamiento con enzimas e inóculo porcino.
- La evolución del pH en las biomásas evaluadas con este pre-tratamiento especial se comportó de forma semejante a cuando las biomásas no son pre-tratadas.

## AGRADECIMIENTOS

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