



Study of Methane Potential in Three Bovine Pastures Pre-Treated with Enzymes

Estudio del potencial de obtención de metano en tres pastos vacunos pre-tratados con enzimas

Dr.C. Carlos M. Martínez Hernández¹, Dr. Hans Oechsner^{II}, Dra. Annett Reinhard^{II}, Dr. Yaser García López¹,
MSc. Arnaldo Martínez Hernández¹

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

^{II} Universidad de Hohenheim, Landensanstalt für Agrartechnik und Bioenergie, Stuttgart, Germany.

ABSTRACT. In this work, it was studied the influence of ZY maXX XL 200 enzyme pre-treatment of three agricultural substrata (mulatto pasture, natural pasture and variety CT-115), on their potentiality for methane production. The pre-treatment consisted on the addition of an enzyme (ZY maXX XL 200) in dose of 100 µl/syringes for 350 mg of substrate in 30⁻¹ mL of bovine inoculum. The results of the substrates bio digested were compared with the ones obtained without the addition of the investigated enzyme. In the three cases, significant increments of specific methane yield were achieved. The best result was obtained with mulatto pasture (0.268 m³ CH₄/kg VS), followed by the variety CT-115 (0.258 m³ CH₄/kg VS) and culminating with natural pasture (0.254 m³ CH₄/kg VS). Nevertheless, increments were observed when the pre-treatment was used with enzymes and bovine inoculum vs. when it was not used. On the other hand, the pH had a similar behavior in all substrates where the pre-treatment was applied, as well as where it was not used.

Keywords: Biomass; agricultural wastes; enzyme pre-treatment.

RESUMEN. En este trabajo se realizó un estudio del efecto de pre-tratamiento con la enzima (ZY maXX XL 200) a tres diferentes substratos agrícolas (pasto mulato, pasto natural y variedad CT-115) y su influencia sobre el potencial de producción de metano. Se aplicaron dosis de 100 µl/jeringas por 350 mg de substratos en 30⁻¹ mL de inóculo vacuno. Los resultados de los substratos biodigestados fueron comparados con los obtenidos sin la adición de la enzima. En todos los casos, se lograron incrementos significativos en el rendimiento específico de metano. Los mejores resultados se obtuvieron 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); no obstante, se observaron incrementos significativos cuando se utilizó el pre-tratamiento con enzimas y un inóculo, comparados con las combinaciones que no fueron aplicados el pre-tratamiento. Por otra parte, se demostró que el pH evolucionó de una manera similar en las biomásas que utilizaron el pre-tratamiento con enzima y sin este.

Palabras clave: biomasa, residuos agrícolas, pre-tratamiento con enzimas.

INTRODUCTION

The composition of the substrates is the main factor to determine the yield and methane potential. Most of the bibliographical sources report that the differences in the

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las fuentes bibliográficas reportan que las diferencias en la cinética, potencial y rendimiento del metano están en dependencia del tipo de sustrato utilizado (Forster et al., 2012). Los

*Author for correspondence: Carlos M. Martínez Hernández, e-mail: carlosmh@uclv.edu.cu

Received: 15/02/2018.

Approved:

kinetics, potential and methane yield depend on the type of substrates utilized (Forster et al., 2012). The methods of substrates pretreatment have as object, to improve their anaerobic digestion qualities by altering their physical, chemical and biological properties. In spite of that, they show certain particularities such as increasing of the manipulation costs, increment of legislative requirements for stabilization and removal of possible pathogens, tendency to handle smaller nitrogen limits, which allows handling the age of these substrates and increasing the biodegradability of activated substrates (Zhong et al., 2011). Consequently, it is necessary to analyze the pre - treatments to use depending on the type, performance and costs.

Pre-biological treatments: the objective of the pre-biological treatments are to prepare the substrates for the enzymatic degradation and the best method and pre-treatment condition depends significantly on the substrates type. Among the utilized microorganisms to degrade organic substrates there are several types of mushrooms, such as: Carmelite, white and soft rotten, besides some types of bacteria's (Kurakake et al., 2007). Taherzadeh and Karimi (2008) 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 recovery of sugar. Depending on the substrate 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 these (*Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, etc).

Taniguchi et al. (2005), evaluated pre-biological treatments in rice straw using 4 white-rotten mushrooms (*Phanerochaete chrysosporium*, *Tramete versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora* and *Pleurotus ostreatus*) and the pre-treatment with *Pleurotus ostreatus* generated a selective degradation of lignin and an increment of the susceptibility of rice straw to the enzymatic hydrolysis. In addition, in the phase of solid fermentation of orange shell with chains of mushrooms, type *Sporotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, the constituent feeding capacity was improved and the level of antimicrobial substances was reduced. In a similar work Taherzadeh and Karimi (2008), used white-soft mushroom cultivations to decontaminate waste waters of olives milling, improving their digestion. Vintiloiu et al. (2009), investigated the influence of temperature and pH of several commercial enzymes on the degradation of corn ears and straw. According to these authors, the best effects were obtained at 50 °C and the enzymes originated 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 use of chemical and gentle environmental condition are the main advantages of the biological pre-treatments. However, the efficiency of these pre-treatments is sometimes low. For such a reason,

métodos de pre tratamientos de los sustratos tienen como objeto el mejoramiento de las cualidades del proceso de digestión anaeróbica de estos, al alterar sus propiedades físicas, químicas y biológicas, mejorando 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 (trituration, 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, aumento de los requisitos legislativos para la estabilización y la remoción de posibles patógenos dañinos, tendencia al manejo de menores límites de nitrógeno, lo cual permite el manejo de la edad de estos sustratos, y el crecimiento de la biodegradabilidad de sustratos activados (Zhong et al., 2011). No obstante, se hace necesario un análisis de los pre- tratamientos a utilizar en dependencia del tipo, actuación y costos.

Pre- tratamientos biológicos: el objetivo de éstos es preparar a 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 *Bacillus circulans*), obteniendo mejoras en la hidrólisis enzimática, así como un 94% de recuperación del azúcar. Dependiendo del tipo de sustrato a pre- tratar (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 blancos putrefactos (*Phanerochaete chrysosporium*, *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 ser hidrolizada enzimáticamente. También, en la fase de fermentación sólida de la cáscara de naranja con cadenas de hongos del tipo *Sporotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, se mejoró la capacidad de alimentación de constituyentes y se redujo el nivel de sustancias antimicrobianas. En un trabajo similar; realizado por Taherzadeh y Karimi (2008), fueron usados cultivos de hongo blanco-suaves para descontaminar las aguas residuales del molinado de olivas, mejorando el proceso de digestión anaerobia. 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 °C y las mejores potencialidades de hidrólisis a valores de pH entre 4 y 6. Sin embargo, como la metanogénesis

the pre-biological treatments need of an extra state that assures the later enzymatic attack to these; this alternative can be carried out through previous pre-treatments such as physical or chemical.

Martínez et al. (2015) used a chemical-thermal pre treatment in some of the biomass that are valued in this investigation. Due to that, the present work constitutes a continuation of the use of special pre-treatments to use in the biodigestion of agricultural and of tavern residuals, which have been supported in investigations by Martínez et al. (2014), Martínez et al. (2015) and Martínez and García (2016).

The analysis of these bibliographical sources allows appreciating that the application of a pre-treatment with enzymes to organic residuals of type lignin-celluloses is very appropriate to favor the biodegradability and the methane production. This investigation is intended to apply a pre-treatment with enzymes to different types of biomass, studying their effect on biogas production.

METHODS

This work was carried out in the Central University "Marta Abreu" of Las Villas, but the Company BIOPRACT GmbH, through investigators of the University of Hohenheim, Germany, donated the investigation material (Liquid cellulase enzymatic preparation, ZY maXX XL 200). The experimental results, fruit of combined investigation projects, were obtained from September 2017 until November 2018. Different effective norms for this investigation type were consulted as it is indicated next.

The substrates were characterized according to the norm VDI (2006) and following the characterization and general classification of substrates, the possibilities of fermentability of the organic materials were determined. The agricultural residuals studied in the Cuban investigation project were sorghum (Sorghum R-132), sorghum (Sorghum halepense), sunflower (Helianthus annuus L JE-94), corn (Zea mays L), malanga (Colocasia esculenta L Schott), sweet potato (Ipomoea sweet potato) and potato (Solanum tuberosum Sw) (Martínez et al., 2014). In addition, a tavern residual was studied (white bread) (Martínez et al., 2016).

Later on, other agricultural residuals were study object such as natural pasture, mulatto pasture and CT-115. In the case of these agricultural residuals, samples were collected taking roots, shafts, leaves and fruits. These residuals were dried off and fractioned in particles of 1 mm of size, taking samples to carry out the investigations on laboratory scale in Germany and on field scale in Cuba. The investigations in Germany were executed in investigation stay developed in the University of Hohenheim between the months of September and November 2017.

In the Germany case, treatment was applied with enzymes and it was investigated with bovine inoculum. In Cuba, these investigations were replied on field scale. A pre-treatment was

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 comúnmente requieren de un pre-tratamiento previo mediante la aplicación de métodos físicos, químicos o termo-químicos.

Martínez et al. (2015), publicaron un trabajo utilizando un pre tratamiento termo-químico en algunas de las biomazas que se valoran 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 Martínez et al. (2015); Martínez y García (2016); así como en otros trabajos anteriores (Martínez 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, resultaría 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 biomazas agrícolas, estudiando su efecto sobre la producción de metano.

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 adicionando un inóculo vacuno. En Cuba fueron replicadas estas investigaciones experimentales a escala de campo. A las muestras experimentales se les aplicó un pre-tratamiento con enzimas, donde fue añadida la enzima ZY maXX XL 200 en dosis de 100 µl/jeringas por 350 mg de sustrato a valorar. Los sustratos inoculados con la enzima se dejaron reposar durante 4 horas; posteriormente, se le añadió el inóculo (30 mL del efluente porcino de un biodigestor anaerobio). A continuación, los sustratos pre-tratados, más el inóculo

used with enzymes, the enzyme ZY ma XX XL 200 was added in dose of 100 µl/syringe for 350 mg substrate to value. The substrates inoculated with the enzyme were allowed resting during 4 hours, later on the inoculum was added (30 mL of porcine effluent of an anaerobium biodigester). Next, the substrates pre-treated and the inoculum were introduced in experimental syringes of 100 mL of capacity.

In Germany, bovine inoculum was used (cow manure), in Cuba pig inoculum was used (pig manure) coming from biodigesters in production. In both cases, the experimental syringes, were placed in a denominated addition Hohenheim Bench Test (HBT), to reason of three samples per substrate valued; as well as a sample in plastic container (plastic bottle), in order to investigating the evolution of the pH in the process of anaerobic digestion under field conditions. The object of valuation were the following parameters:

- Dry matter and humidity content according to the norm NC 74-22:85 (1985);
- Ashy content according to the norm NC 74-30: 85 (1985);
- Determination of carbon/nitrogen ratio;
- Evolution of the pH in the biodigestion;
- Evaluation of the specific biogas yield.

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

- Biodegradability rate;
- Maximum biogas potential (L/kg SV).

Table 1 shows the test conditions in each biomass under research.

adicionado, 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 un inóculo vacuno; mientras, en Cuba se utilizó un inóculo porcino procedente de biodigestores en producción. En ambos casos, en las jeringas experimentales se colocó un aditamento denominado Hohenheim Bench Test (HBT), el cual consiste en un dispositivo capaz de soportar simultáneamente 149 jeringas experimentales, colocadas horizontalmente y rotando durante toda la fase de investigación. Este dispositivo fue ubicado dentro de una incubadora a una temperatura constante de 35 °C. Cada variante experimental fue evaluada a razón de tres réplicas por cada sustrato, así como una réplica en contenedores plásticos (pomo plástico), con el objeto de investigar la evolución del pH y la producción de metano 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 (C/N);
- Evolución del pH en la biodigestión;
- Evaluación del rendimiento específico de producción de metano y biogás.

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

- Tasa de biodegradabilidad;
- Potencial máximo de obtención de metano y biogás (L/kg SV).

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

TABLE 1. Test conditions for biomass evaluated prior to the biodigestion process in experimental syringes
TABLA 1. Condiciones de ensayo por biomazas evaluadas anterior al proceso de biodigestión en jeringas experimentales

Substrates	Enzyme used	Dose	Hydraulic retention time (HRT= minutes)
Mulatto pasture	ZY maXX XL 200	100 µl/syringes per each 350 mg of substrates in 30 ⁻¹ mL Inoculum	120
Natural pasture	ZY maXX XL 200	100 µl/syringes per each 350 mg of substrates in 30 ⁻¹ mL Inoculum	120
CT-115	ZY maXX XL 200	100 µl/syringes per each 350 mg of substrates in 30 ⁻¹ mL Inoculum	120
Inoculum (cow and pig manure)	Without enzyme pre-treatment		

Statistical Analysis:

Statistical analysis was performed using the statistical package STATISTICA, STASOFT, 8.0. An ANOVA, One-way analysis and a Tukey HSD test were performed on the specific methane performance variable.

RESULTS AND DISCUSSION

In Figure 1, the evolution of all substrates valued with the addition of enzymes and without them are observed. The best behavior took place with the grass mulatto substrate (0.268 m³ CH₄/kg oDM), followed by the CT-115 (0.258

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico STATISTICA, STASOFT, 8.0. Se realizó un análisis ANOVA, One way y una prueba de Tukey HSD en la variable rendimiento específico de metano.

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±0,011 m³ CH₄/kg VS), seguidos del

m³ CH₄/kg oDM) and culminating with the natural grass (0.254 m³ CH₄/kg oDM). Superior increments were observed in all substrates that received the pre-treatment with enzymes with respect to those without the application of the referred pre-treatment. On the other hand, the obtained values are below the ones gotten by Martinez et al. (2014). It could be due to the potential of methane of these biomass and to the use of mixtures of roots, leaves, shafts and fruits of these agricultural biomass, which possess bigger quantity of fiber (cellulose and hemi cellulose), compared to the previous studies with these biomass in solitary.

pasto variedad CT-115 (0,258±0,018 m³ CH₄/kg VS) y culminando con el pasto natural (0,254±0,023 m³ CH₄/kg VS). Se observaron los incrementos superiores en todos los sustratos donde se aplicó el pre-tratamiento con enzimas con respecto a las combinaciones donde no fue aplicado el referido pre-tratamiento; no obstante, los valores obtenidos están por debajo a los obtenidos por Martinez et al. (2014). Este resultado pudiera estar dado por el menor potencial de metano de estas biomásas; además, de 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 otras biomásas en solitario.

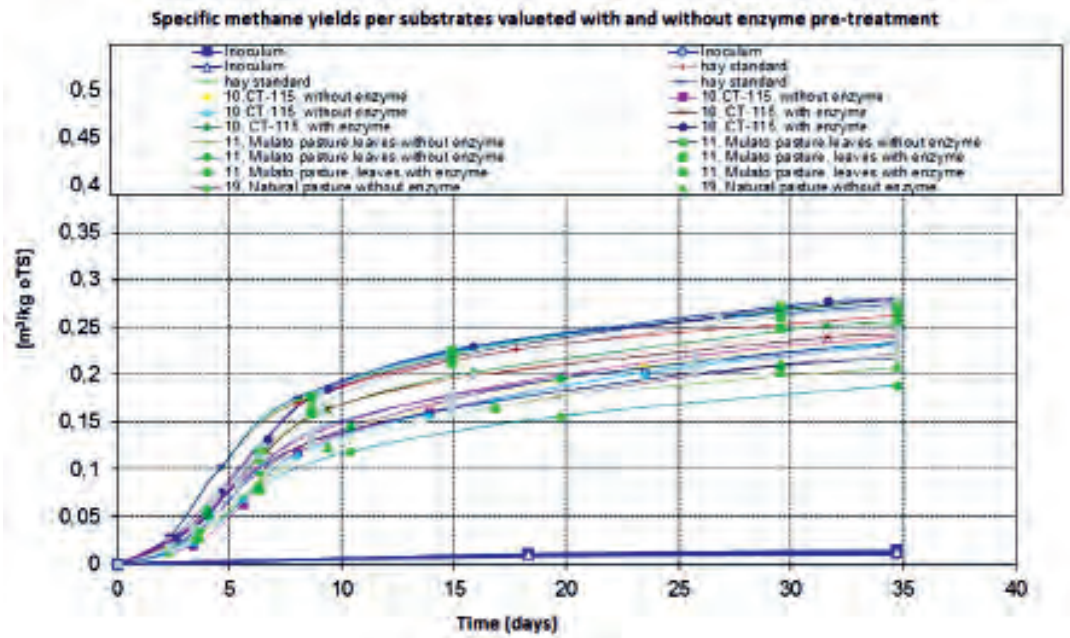


FIGURE 1. Specific methane yield of the biomass studied using cow inoculum and enzyme pre-treatment on laboratory scale in Germany.
 FIGURA 1. Valores del rendimiento específico de metano promedio de las biomásas objeto de estudio utilizando inóculo vacuno con pre-tratamiento con enzimas a escala de laboratorio en Alemania.

Table 2 shows the results obtained with the substrates evaluated with and without the enzyme treatment.

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

TABLE 2. Specific yield of biogas and methane. Biomass evaluated with and without enzyme pre-treatment. The results are shown as average ± standard deviation
 TABLA 2. Rendimiento específico de biogás y metano. Biomásas evaluadas con y sin pre-tratamiento con enzimas. Los resultados se muestran como promedio ± desviación estándar

Substrate	Biogas content [mL]	Methane content [mL]	Methane content (% of volume)	Specific Biogas yield (m ³ /kg VS)	Methane yield specific (m ³ CH ₄ /kg VS)
Bovine inoculum	29±4,3	20±2,8	70±1,0	0,018±0,003	0,013±0,002
Standard hay (Reference substrate)	86±3,0	49±1,5	56±0,5	0,482±0,016	0,273±0,009
CT-115 pasture, without enzymes	114±3,6	64±1,0	56±1,5	0,416±0,014	0,234±0,004
CT-115 pasture, with enzymes	126±7,0	71±4,7	56±1,0	0,461±0,026	0,258±0,018
Mulatto pasture, without enzymes	103±12,5	58±6,5	56±1,0	0,375±0,046	0,211±0,023
Mulatto pasture, with enzymes	134±5,8	74±2,5	55±1,1	0,485±0,020	0,268±0,011
Natural pasture, without enzymes	105±5,2	60±2,0	57±0,5	0,379±0,018	0,217±0,008
Natural pasture, with enzymes	125±11,6	71±6,6	56±0,0	0,452±0,041	0,254±0,023

In Table 2, it is observed that, in CT-115 pasture (the whole plant), mulatto pasture (only leaves) and natural pasture (the whole plant), the action of the enzyme complex enhances methane production. However, when replicating these experiments at the field level in Cuba, the results were not satisfactory. In the case of the experiments carried out in Cuba, a swine inoculum was used, but perhaps the limiting factor of the low yields obtained by the biomass investigated was the size of the particles. They were not sufficiently crushed due to the damage in the mill used and that could affect the interaction enzyme biomass. According to Brulé (2014), experiments in the enzymatic hydrolysis stage show low efficiency when enzymes are added to agricultural substrates. The author concluded that the efficiency of enzymes could be favored by the low content of recalcitrant fibers and lignin, low pH and temperature. In addition, he refers that, to achieve a positive effect of the addition of enzymes in productive practice, anaerobic bioreactors must have high organic load (OLR), low hydraulic residence time (HRT) and the substrates must have a mixture of energy crops. Therefore, these results are in contradiction with what was reported by Brulé et al. (2011). The results of this investigation indicate a positive effect with the addition of the enzyme ZY maXX XL 200 to the substrates evaluated, and when an appropriate inoculum density is used. The potential of the ZY maXX XL 200 enzyme, to favor the hydrolysis process, which is the limiting stage in anaerobic digestion of these types of waste, should be highlighted. When the hydrolysis is improved, the anaerobic treatment of these wastes is indirectly improved and, therefore, the production of biogas.

The cost of the ZY maXX XL 200 enzyme is \$ 64.00 € / kg, and taking into account the small amounts of enzymes used in this experiment (100 µl / syringes per 0.350 mg of substrate evaluated or 0.01 L / 3.5 kg), an approximate cost of € 192 per ton of treated substrate can be inferred, demonstrating the economic feasibility of its use. In addition, the specific values of methane obtaining would reach values from a maximum of 0.047 CH₄ / kg VS (mulatto pasture) to a minimum of 0.024 CH₄ / kg VS (CT-115) increments, compared with the same substrates without pre-treatments.

The results obtained regarding the evolution of the pH are shown in Figure 2.

Regarding the evolution of the pH, in Figure 2, it was seen that the results obtained in the biomass evaluated, showed that all the substrates at the end of the anaerobic biodigestion cycle presented pH values above 7. Therefore, the enzyme ZY maXX XL 200 allows maintaining adequate conditions for a good degradation activity of the substrates in the pH ranges between 6 and 8, which agrees with the results raised by Vintiloiu et al. (2009).

Table 3 shows a summary of the average values obtained in each substrate analyzed for biogas and methane yield, respectively, on laboratory scale.

En la Tabla 2, se pudo apreciar que, de los sustratos evaluados: pasto variedad 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 un inóculo porcino, pero quizás el factor limitante de los bajos rendimientos obtenidos por las biomásas investigada fue el tamaño de las partículas, las cuales no quedaron suficientemente trituradas, debido al desperfecto en el molino utilizado, lo cual pudo afectar la interacción de la enzima respecto a las biomásas 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 el bajo contenido de fibras recalcitrantes y la lignina, bajo pH y la 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 lo reportado por Brulé et al. (2011). Los resultados de esta investigación 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 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 la 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/3,5 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), incrementos comparando con los mismos sustratos sin pre-tratamientos.

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos respecto a la evolución del pH.

Respecto a la evolución del pH, en la Figura 2 se pudo apreciar que los resultados obtenidos en las biomásas evaluadas, mostraron que todos los sustratos al terminar el ciclo de biodigestión anaerobia 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 un resumen de los valores promedios obtenidos en cada sustrato analizado para el rendimiento de biogás y metano, respectivamente a escala de laboratorio.

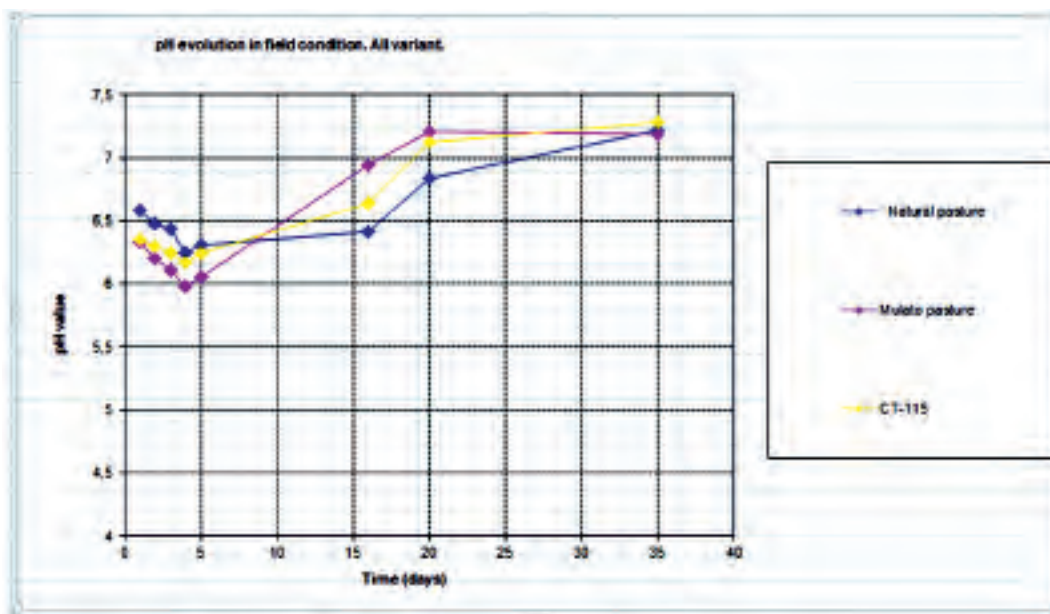


FIGURE 2. pH evolution (CT-115, mulatto pasture and natural pasture), analyzed under field conditions with enzymes pre-treatments and pig inoculum.
 FIGURA 2. Evolución del pH (pasto variedad CT-115, pasto variedad mulato y pasto natural), analizadas en condiciones de campo con pre-tratamientos con enzimas e inóculo porcino.

TABLE 3. Average values obtained from specific biogas and methane yield
 TABLA 3. Valores promedios obtenidos de rendimiento específico de biogás y metano

Substrate	l/kgFM (m ³ /kg VS)	l/kgSV (m ³ CH ₄ /kg VS)
	Specific biogas yield	Specific methane yield
Mulatto pasture	(0,485±0,020 m ³ /kg VS)	(0,268±0,01 m ³ CH ₄ /kg VS)
Natural pasture	(0,452±0,041 m ³ /kg VS)	(0,254±0,023 m ³ CH ₄ /kgVS)
CT-115 pasture	(0,461±0,026 m ³ /kg VS)	(0,258±0,018 m ³ CH ₄ /kg VS)

From the analysis in Table 3, it was observed that the maximum values of the specific biogas yield were obtained in the mulatto pasture (0.485 m³ / kg VS). Meanwhile, the minimum value was obtained with natural pasture (0.452 m³ / kg VS). Similarly, the maximum specific yield values of methane were observed with the mulatto pasture (0.268 m³ CH₄ / kg VS) and the minimum values obtained coincided with the natural pasture (0.254 m³ CH₄ / kg VS). These results achieved on the laboratory level differ from those obtained by Martínez et al. (2014), which studied other biomass valued without the addition of enzymes on laboratory scale; as well as from those obtained by Martínez et al. (2015), where they used a chemical-thermal pre-treatment for those same substrates.

The results of the statistical analysis of the specific methane yield variable (m³ CH₄ / kg VS) in the evaluated treatments are presented in Figure 3.

From the analysis of Figure 3, it was observed that the highest values of the specific yield of methane (m³ CH₄ / kg VS), are obtained with the substrates treated with enzymes with respect to the reference substrate (Standard Hay) presenting significant differences with respect to substrates not treated with enzymes with the exception of CT-115.

Del análisis de la Tabla 3, se observó que los valores máximos del rendimiento específico de biogás se obtuvieron en el pasto variedad mulato (0,485 m³/kg VS); mientras, el mínimo valor se obtuvo con el pasto natural (0,452 m³/kg VS). Similarmente, los valores máximos de rendimiento específico de metano se observaron con el pasto variedad mulato (0,268 m³ 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 Martínez et al. (2014), los cuáles estudiaron otras biomásas valoradas sin la adición de enzimas a escala de laboratorio; así como a los obtenidos por Martínez et al. (2015), donde utilizaron un pre-tratamiento químico-térmico para esos mismos sustratos.

En la Figura 3 se presenta los resultados del análisis estadístico de la variable rendimiento específico de metano (m³ CH₄ / kg VS) en los tratamientos evaluados.

Del análisis de la figura 3, se pudo observar que los valores más altos del rendimiento específico de metano (m³ CH₄/kg VS), se obtienen con los sustratos tratados con enzimas respecto al sustrato referencia (Hay estándar) presentando diferencias significativas con respecto a los sustratos no tratados con enzimas con la excepción del CT-115.

Tukey HSD test, variable Rend Met (metano-a)						
Homogenous Groups, alpha = .05000						
Error: Between MS = .00021, df = 16.000						
Cell No.	Tto	Rend Met Mean	1	2	3	4
8	Inóculo vacuno	0.013000				****
4	Pasto mulato sin enzimas	0.210667		****		
6	Pasto natural sin enzimas	0.216667		****	****	
2	CT-115 sin enzimas	0.234000	****	****	****	
7	Pasto natural con enzimas	0.254333	****		****	
3	CT-115 con enzimas	0.258000	****			
5	Pasto mulato con enzimas	0.268333	****			
1	Hay estandar	0.272667	****			

FIGURE 3. Tukey test in the variable specific yield of methane ($m^3 CH_4 / kg VS$) in the evaluated treatments.
 FIGURA 3. Tukey test en la variable rendimiento específico de metano ($m^3 CH_4 / kg VS$) en los tratamientos evaluados.

CONCLUSIONS

- In all cases, significant increases in the specific methane yield were achieved when a pre-treatment with the enzyme ZY maXX XL 200 was applied to the substrates. The best results took place with mulatto pasture ($0.268 m^3 CH_4 / kg VS$), followed by CT-115 pasture ($0.258 m^3 CH_4 / kg VS$) and culminating with natural pasture ($0.254 m^3 CH_4 / kg VS$). Significant increases were obtained when the pre-treatment with enzymes and bovine inoculum were used vs. those without them.
- The results achieved on the field level in Cuba with the same biomass evaluated in Germany using pig inoculum were not favorable; however, these results should not be taken as conclusive.
- The pre-treatment with the enzyme ZY maXX XL 200 did not affect the critical pH value in the pre-treated biomass, both in the case of the use of bovine inoculum and porcine inoculum.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the national Project of CUBAENERGIA. Study of basic and special pre-treatments to improve the production and quality of the biogas. Code: 9917;

To the University of Hohenheim. Germany.

CONCLUSIONES

- En todos los casos, se lograron incrementos significativos en el rendimiento específico de metano cuando en los sustratos fue aplicado un pre-tratamiento con la enzima ZY maXX XL 200. Los mejores resultados tuvieron lugar con el pasto mulato ($0,268 m^3 CH_4 / kg VS$); seguidos por el pasto variedad CT-115 ($0,258 m^3 CH_4 / kg VS$) y culminando con el pasto natural ($0,254 m^3 CH_4 / kg VS$) obteniéndose incrementos significativos 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 biomásas evaluadas en Alemania utilizando inóculo porcino no fueron favorables; sin embargo, estos resultados no deben tomarse como conclusivos.
- El pre-tratamiento con la enzima ZY maXX XL 200 no afectó el valor crítico del pH en las biomásas pre-tratadas, tanto en el caso de la utilización de inóculo vacuno como de inóculo porcino.

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.

REFERENCES / REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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].
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

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

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.

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>.

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.

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.

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>.

Carlos M. Martínez Hernández, Profesor 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

Hans Oechsner, Professor, Universidad de Hohenheim, Landensanstalt fur Agrartechnik und Bioenergie (740). Garbenstrasse 9, Stuttgart. Germany, e-mail: carlosmh@uclv.edu.cu

Annett Reinhard, Universidad de Hohenheim, Landensanstalt fur Agrartechnik und Bioenergie (740). Garbenstrasse 9. Stuttgart. Germany, e-mail: carlosmh@uclv.edu.cu

Yaser García López, Profesor, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní km.5.5. CP: 54830. Santa Clara. Villa Clara. Cuba, e-mail:

Arnaldo Martínez Hernández, Profesor, Dpto de Ciencias Naturales. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. CP: 50300. Santa Clara. Villa Clara. Cuba, e-mail: carlosmh@uclv.edu.cu

The authors of this work declare no conflict of interests.

This item is under license Reconocimiento-NoComercial de Creative Commons 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0).

The mention of trademarks of specific equipment, instruments or materials is for identification purposes, there being no promotional commitment in relation to them, neither by the authors nor by the publisher.

Programa de Asociación de País
Fortalecimiento de Capacidades para la Coordinación de Información y los sistemas de Monitoreo/ MST en Áreas con problemas de manejo de los Recursos Hídricos

El "Programa de asociación de País" (CPP OP-15) en "Apoyo a la implementación del Programa Nacional de Lucha contra la Desertificación y la Sequía de la República de Cuba", recoge los fundamentos que propician el Manejo Sostenible de Tierras (MST). Para ello, propone fortalecer la coordinación entre las entidades nacionales, ofrece las alternativas para prevenir la degradación de tierras, así como recuperar y rehabilitar las funciones, resiliencia y productividad de los ecosistemas e incrementar la seguridad alimentaria.

Sus acciones se centran en la eliminación de las barreras que se oponen al logro del MST, mediante la aplicación de modelos que mejoren la integración entre los actores a todos los niveles, mediante acciones en el terreno, en el contexto de las políticas, el planeamiento, las regulaciones y en la toma de conciencia ciudadana en el manejo de los recursos naturales sobre bases científicamente argumentadas. En particular, el Proyecto 2 tiene como objetivo fortalecer la coordinación de la información y los sistemas de Monitoreo en la gestión de los recursos hídricos en función del MST".

Todos por nuestra tierra