

# Actividad de pretratamientos y enzimáticos químicos en residuos de higuera (Ricinus communis) para la producción de biogás

**RESUMEN:** *Ricinus communis* es una planta que tiene diversas aplicaciones en biocombustibles, tal como producción de biodiésel, pellets y etanol, pero existen pocos estudios con esta planta para la producción de biogás. Este proyecto analizó las hojas y tallos de higuera para la producción de biogás. Analizando los efectos de temperatura y pretratamientos para eliminar lignina, hidrolizar la hemicelulosa y reducir la cristalinidad de la celulosa contenidas en esta planta, Evaluando 4 tratamientos, 2 enzimáticos (celulasa y celobiohidrolasa) y 2 químicos (NaOH y HCl), además se dejó un control con únicamente residuos de higuera, con la finalidad de determinar su efecto en el rendimiento de producción. El experimento se realizó en dos procesos de digestión anaerobia (DA), uno a temperatura controlada (37 °C) y otro a temperatura ambiente, ambos experimentos se realizaron durante un periodo de 55 días.

Los resultados obtenidos mostraron que los residuos tratados con enzima celobiohidrolasa a temperatura controlada (37 °C) arrojaron el mayor rendimiento de producción, mientras que a temperatura ambiente el que mayor producción obtuvo fue el tratado con NaOH. El tratamiento a 37 °C que muestra menor rendimiento es el tratado con celulasa, y a temperatura ambiente, el menor rendimiento fue tratado con enzima celobiohidrolasa.

**PALABRAS CLAVE:** Biogás, *ricinus communis*, pretratamientos, digestión anaerobia.



## Colaboración

Diana Laura Quezada Morales; Miguel Angel Ramos López; Francisco de Moure Flores, Juan Campos Guillen; Jorge Noel Gracida Rodríguez, Universidad Autónoma de Querétaro

Fecha de recepción: 25 de noviembre del 2021

Fecha de aceptación: 13 de diciembre del 2021

**ABSTRACT:** *Ricinus communis* is a plant with various applications in biofuels, such as the production of biodiesel, pellets and ethanol, but there are few studies with this plant for the production of biogas. This project analyzed castor leaves and stems for biogas production. Analyzing the effects of temperature and pretreatments to eliminate lignin, hydrolyze the hemicellulose and reduce the cellulose crystallinity contained in this plant, Evaluating 4 treatments, 2 enzymatic (cellulase and cellobiohydrolase) and 2 chemical (NaOH and HCl), in addition a control with only castor residues, in order to determine effects on yield production. The experiment was carried out in two anaerobic digestion (AD) processes, one at a controlled temperature (37 °C) and the other at room temperature, both experiments were carried out for a period of 55 days.

The results obtained showed that the residues treated with cellobiohydrolase enzyme at a controlled temperature (37 °C) they showed the highest production yield, while at room temperature the one with the highest production was the one treated with NaOH. The treatment at 37 °C that shows the lowest yield is the treated with cellulase, and at room temperature, the lowest yield was treated with cellobiohydrolase enzyme.

**KEYWORDS:** Biogas, *ricinus communis*, pretreatments, anaerobic digestion.

## INTRODUCCIÓN

Los problemas ambientales, aunados a la dependencia de combustibles fósiles, han llevado al desarrollo de alternativas sustentables como la generación de biocombustibles [1]. En este sentido, la biomasa, es una de las fuentes para la generación de energías renovables más importantes debido a que es materia lignocelulósica, la cual contiene en su mayoría celulosa (32-45%), hemicelulosa (19-25%) y lignina (14-26%), compuestos orgánicos usados para procesos químicos y generación de energía [2].

Los recursos obtenidos de biomasa son fácilmente degradables, es decir, azúcares y materiales con almidón pueden llevar a la producción de biogás [3], considerando a la biomasa lignocelulósica como un recurso económico y rico, para la producción de biogás [4]. Las caracte-

rísticas hemicelulósicas se pueden encontrar en especies vegetales como la higuera, la cual es un matorral perenne perteneciente a la familia Euphorbiaceae originaria de África [5], que contiene celulosa, hemicelulosa y lignina en un 38.4%, 22.4 % y 20.2%, respectivamente [2].

Aunque los materiales lignocelulósicos tienen una cantidad considerable de carbohidratos, que pueden convertirse en biogás, su estructura recalcitrante es un obstáculo en su conversión directa [6]. Por tanto, un proceso de pretratamiento es una etapa fundamental necesaria para reducir la recalcitración de los materiales, es decir, reducir la cristalinidad de la celulosa, aumentar el área de superficie accesible y eliminar la lignina y la hemicelulosa [7,8], para alterar la estructura de los materiales lignocelulósicos, los pretratamientos incluyen métodos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos [3]. El pretratamiento alcalino con hidróxido de sodio es uno de los procesos químicos más efectivos, que puede mejorar el rendimiento de producción de biogás a partir de lignocelulosas [3], por otra parte se han realizado tratamientos con ácido clorhídrico en paja de avena y encontraron que el 85.5% del contenido de hemicelulosa en la paja de avena se hidrolizó aunque también ocurrió hidrolizado en la celulosa [9], por otra parte, se encontró aumento de metano del 18% en el bagazo de caña tratado con ácido sulfúrico en comparación con el no tratado [10], el manejo de enzimas ha sido muy usado en hidrolización de la materia orgánica para la producción de biogás, ejemplo de ello es la obtención de 13% más biogás en el pretratamiento con enzimas en pulpa de remolacha azucarera en comparación con la no tratada [11], de igual manera, en otro estudio realizado, haciendo uso de hidrolizado de enzimas, obtuvieron 96.8% de solubilización de hemicelulosa y el 42.2% de lignina en la paja de avena [9].

La producción de biogás después del pretratamiento, el sustrato se somete a digestión anaerobia, con el cual se produce metano (CH<sub>4</sub>) en ausencia de oxígeno (O<sub>2</sub>) [12]. En este proyecto se analizó el potencial para la producción de biogás a partir de residuos (hojas y tallos) de *Ricinus communis*. Adicionalmente, se corroboró el efecto de pretratamientos, temperatura y humedad realizados sobre esta biomasa, y el impacto de éstos sobre la eficiencia en la producción de biogás.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Sustrato.

Se trabajó con las partes aéreas de *Ricinus communis* (hojas y tallos), denominada paja; el material vegetal se obtuvo de un plantío ubicado en Corregidora, Qro., México (20°31'40.1" latitud N 100°25'42.7" longitud O), la planta se manipuló en estado húmedo (recién cortada).

### Aplicación de pretratamientos

Los residuos se sometieron a pretratamiento físico al cortar y triturar en una licuadora doméstica y consecutivamente se tamizaron para dejar un tamaño de partícula de hasta 2 mm esto con el fin de mejorar el

rendimiento de metano de la biomasa lignocelulósica, posteriormente se les aplicaron cuatro diferentes pretratamientos: dos enzimáticos (celobiohidrolasa y celulasa), uno alcalino (NaOH), y uno ácido (HCl), los cuales se aplicaron dentro de la etapa de hidrólisis, además de dejar un control (sustrato sin pretratamiento). Los pretratamientos enzimáticos definen un tiempo y una temperatura adecuadas para la activación de la enzima sin ser abrasivos para ellas, el tratamiento alcalino no requiere de calor, ya que al ser aplicado genera una reacción exotérmica, sin embargo, el tratamiento ácido se debe mantener a una temperatura adecuada para la ruptura de la lignina pero sin mantener el sustrato mucho tiempo con ese nivel de pH ya que destruiría completamente la planta, por estos motivos, en la Tabla 1 se muestran los parámetros aplicados a cada uno de los pretratamientos, donde antes de ser sometidos a DA se neutralizó el pH usando NaOH o HCl 2 M.

Tabla 1. Pretratamientos realizados a *Ricinus communis*.

Pretratamiento	Tiempo [h]	Temperatura [°C]
Sin tratar	0	Ambiente
Enzima celobiohidrolasa, extraída de <i>Hipocrea jecorina</i> (0.1 % p/v)	18	60
Enzima celulasa extraído de <i>Trichoderma longibrachiaum</i> (al 0.5 % p/p)	18	60
NaOH (al 4 % p/p)	24	Ambiente
HCl (al 4 % p/v)	2	80

Fuente Elaboración propia

### Análisis fisicoquímicos

La determinación de sólidos totales (ST) sólidos volátiles (SV), sólidos fijos (SF), se caracterizaron de acuerdo con métodos APHA [13], los análisis de la demanda química de oxígeno (DQO) se determinaron midiendo la cantidad de oxidante consumido por el método fotométrico de Boyles [14], mientras que la cuantificación de azúcares se realizó mediante el método ácido sulfúrico y fenol [15], donde se pueden medir azúcares totales, para esta investigación se midieron únicamente hexosas por medio de espectrofotometría UV a 490 nm.

### Proceso de digestión anaerobia

Los procesos de digestión se llevaron a cabo con 4% de ST. Los experimentos se realizaron por triplicado en reactores tipo batch de 120 mL. Se dejó un volumen de cabeza de 40 mL y se trabajó con un volumen de 80 mL, de los cuales se inocularon al 20% con inóculo de un biodigestor que opera con excreta vacuna. Todos los biorreactores se sellaron herméticamente. Los ex-

perimentos se llevaron a cabo a 37°C, y a temperatura ambiente, además, se realizó medición de biogás diariamente a través de desplazamiento volumétrico por un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 55 días.

**RESULTADOS**

Para la evaluación del efecto de los pretratamientos se observó el cambio en las estructuras físicas de los sustratos, los cuales se muestran en la Figura 1, las capturas se realizaron en un microscopio biológico binocular de la marca VELAB VE-B0, empleando el objetivo 40X re-tráctil; ya que el objetivo principal de los pretratamientos es convertir la estructura compleja del material de alimentación en una forma más simple para mejorar la velocidad de reacción y reducir el tiempo de hidrólisis e investigar los cambios en la estructura microscópica de los residuos después del pretratamiento.

La presencia de fibras de celulosa organizadas y cristalinas es uno de los obstáculos más importantes con respecto a la digestibilidad de los materiales lignocelulósicos [16]. Esta estructura organizada se puede ver para los residuos sin tratar (Figura 1 a), sin embargo, al realizar los pretratamientos (Figura 1 b-e), se puede observar una modificación morfológica significativa, lo que podría significar alimento digerible para las bacterias metanogénicas en la DA [17].

por litro de ST y SV contenidos en las muestras con y sin pretratamiento, en ella se observa que dos de los 4 pretratamientos aumentaron sus concentraciones de ST, estos fueron los pretratados con NaOH y celulasa con un 66% y 251% respectivamente, mientras que el tratado con celobiohidrolasa disminuyó en 60% y el tratado con HCl no presentó cambio, por otra parte, en relación a su contenido de SV, dos pretratamientos mostraron aumento y dos disminución en sus concentraciones, el tratado con NaOH y celulasa, aumentaron en 73 y 264% respectivamente, mientras que los tratados con celobiohidrolasa y HCl disminuyeron sus concentraciones en 65 y 35%. Un estudio realizado por Şenol et al. [18] evaluaron las concentraciones de ST y SV para pretratamientos con ácido sulfúrico al 5% (v/v) y alcalino a 3N con NaOH, a la pulpa de la remolacha azucarera, en donde observaron disminuciones en las concentraciones con relación a la remolacha sin tratar, encontrando disminuciones de 25% y 22.73% de ST y SV para el tratamiento alcalino, mientras que para la remolacha tratada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> obtuvieron disminuciones de 22% y 14.78% de ST y SV respectivamente, por lo que en comparación con esta investigación, el tratamiento ácido presentó disminuciones en los SV y estabilidad en los ST, sin embargo, si se logró aumentar las concentraciones de ST y SV para el tratamiento alcalino, debido al aumento en la concentración de ST y SV para los tratamientos ácido y alcalino, los aumentos en las concentraciones de ST y SV con pretratamientos, de acuerdo a Moreno [19] denotan que pueden ser convertidos a metano. El estudio realizado por Passos et al. [20] donde aplicaron un tratamiento enzimático con celulasas a una comunidad mixta de microalgas para la producción de biogás, encontraron que la concentración de SV aumentó en 5324.68 % para las algas pretratadas con enzimas, el aumento en las concentraciones de SV realizando pretratamiento con celulasa para las partes aéreas de *R. communis* también se vio reflejado.

Tabla 2 Caracterización del sustrato en base seca.

Humedad (%)	Sólidos Totales (ST %)	Sólidos Volátiles (SV %)	Sólidos Fijos (SF %)
73.47±0.36	26.53±0.36	23.1±0.27	3.44±0.09

Fuente Elaboración propia

Tabla 3. Determinación de ST y SV de *R. communis* con y sin pretratamiento.

Tratamiento	ST (g L <sup>-1</sup> )	SV (g L <sup>-1</sup> )
Sin tratar	96	91
NaOH	159	157
Celulasa	337	331
Celobiohidrolasa	38	32
HCl	96	59

Fuente Elaboración propia

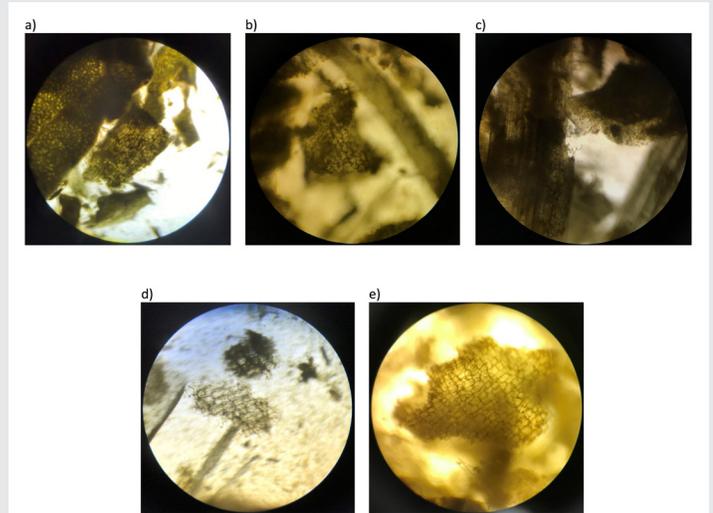


Figura 1. Micrografía 40X de las partes aéreas húmedas de *Ricinus communis* después de los pretratamientos. a) Sin tratar; b) Tratado con NaOH; c) Tratado con enzima celulasa (*Trichoderma l.*); d) Tratado con enzima celobiohidrolasa (*Hypocrea j.*); e) Tratado con HCl.

Fuente Elaboración propia.

En cuanto a los análisis fisicoquímicos fueron determinados antes (Tabla 2) y después (Tabla 3) de la realización de los pretratamientos, en la Tabla 2 se observa el porcentaje de humedad, ST, SF y SV obtenidos del sustrato en base seca, con el fin de someter la materia prima a un 4% de ST y así conocer el rendimiento de biogás, mientras que en la Tabla 3 señala los gramos

Las concentraciones de hexosas y DQO contenidas con y sin pretratamientos se muestran en la Tabla 4, en ella se puede apreciar que al realizar pretratamientos, se aumentaron la concentración de hexosas en 1.09, 2.87, 1.23 y 1.60 veces más que el control para el tratamiento alcalino, el tratado con enzima celulasa, el tratado con enzima celobiohidrolasa y el tratamiento ácido respectivamente, de igual manera se obtuvieron aumentos en las concentraciones de la DQO para los mismos pretratamientos en 1.78, 3.27, 1.42 y 4.21 veces. Wang et al. [21] realizaron pretratamientos químicos (alcalino y ácido) a la paja de arroz para la obtención de biogás, observando que la conversión de carbohidratos con NaOH al 2% (p/p) aumentó 7.9 veces, mientras que para el tratamiento con HCl al 1% (p/v), la mejora fue 4 veces mayor, este mismo estudio, evaluó los efectos de estos pretratamientos en la DQO, encontrando similitudes, ya que el tratamiento alcalino aumentó su concentración 4.79 veces, mientras que el tratamiento ácido lo hizo 4.65 veces, estas mejoras en las concentraciones de carbohidratos fueron superiores a las obtenidas en esta investigación, el aumento en las concentraciones de DQO es un parámetro que indica el material químicamente oxidable total en la muestra, y por lo tanto el contenido de energía de una materia prima [22].

Tabla 4. Determinación de carbohidratos y DQO en los residuos de *R. communis* con y sin pretratamientos.

Tratamiento	Hexosas (mg L <sup>-1</sup> )	DQO (mg L <sup>-1</sup> )
Sin tratar	447.44	1247.19
NaOH	487.21	2216.76
Celulasa	1286.03	4074.76
Celobiohidrolasa	549.29	1770.82
HCl	716.73	5245.66

Fuente Elaboración propia.

El rendimiento de biogás a temperatura ambiente y controlada se muestran en las Figuras 2 y 3 respectivamente, donde se observa que el rendimiento de biogás a temperatura ambiente, en primer lugar está el tratado con NaOH con 230.96 mL·gSV<sup>-1</sup>, seguido del control con 83.28 mL·gSV<sup>-1</sup>, posteriormente se tiene el tratado con HCl con 66.06 mL·gSV<sup>-1</sup>, en cuarto lugar está el tratado con celulasa con un 51.90 mL·gSV<sup>-1</sup> y finalmente se encuentra el tratado con enzima celobiohidrolasa con 14.95 mL·gSV<sup>-1</sup>, sin embargo, la temperatura controlada cambió estas posiciones, observándose el mayor rendimiento con el pretratado con celobiohidrolasa 233.21 mL·gSV<sup>-1</sup>, seguido del HCl con 227.18 mL·gSV<sup>-1</sup>, el control con 86.57 mL·gSV<sup>-1</sup>, el pretratado con NaOH con 44.93 mL·gSV<sup>-1</sup> y finalmente el tratamiento con celulasa 26.76 mL·gSV<sup>-1</sup>, para los re-

sultados obtenidos, y la temperatura controlada solo los tratamientos con celobiohidrolasa y con HCl incrementaron sus producciones de biogás, un estudio realizado por Jia et al. [23] aplicando los mismos pretratamientos (químicos y uno enzimático) pero a residuos de frutas y hortalizas, demuestra eficacia de los pretratamientos en otro tipo de sustrato, debido a que para el control obtuvieron 125 mL·gSV<sup>-1</sup>, mientras que para el tratamiento con NaOH al 1% (p/v) encontraron 300 mL·gSV<sup>-1</sup>, para el tratamiento con enzima celulasa el resultado fue de 580 mL·gSV<sup>-1</sup> y para el tratamiento con 0.25% (p/v) se obtuvo 730 mL·gSV<sup>-1</sup>, en este sentido se encuentra conveniente la aplicación de pretratamientos a sustratos con más contenido de azúcares para mejores resultados. Por otra parte, Dhanya et al. [24] evaluaron los residuos agrícolas de *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) planta con potencial para la producción de biogás, aunque no aplicaron pretratamientos, realizaron co-digestión con estiércol de ganado, el experimento tuvo un TRH de 10 semanas a temperatura controlada (35 °C) encontrando un rendimiento de biogás de 403.84 mL·gSV<sup>-1</sup>, este estudio podría considerarse para realizar también co-digestión a los residuos de higuera para un mejor rendimiento en la producción de biogás.

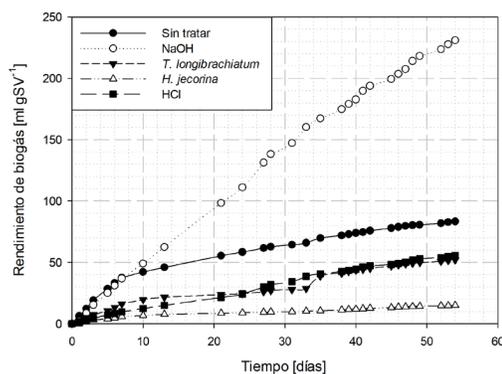


Figura 2. Rendimiento de producción de biogás en biomasa pretratada de *R. communis* a temperatura ambiente. Fuente Elaboración propia.

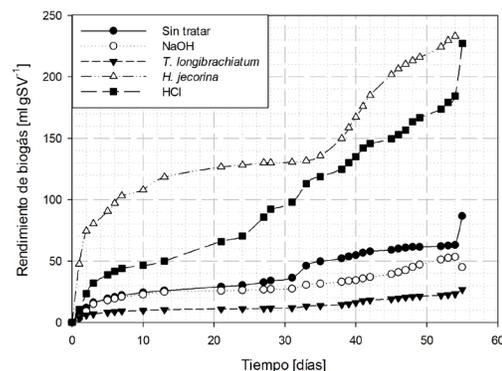


Figura 3. Rendimiento de producción de biogás en biomasa pretratada de *R. communis* húmeda a 37 °C. Fuente Elaboración propia.

## CONCLUSIONES

El pretratamiento a temperatura ambiente que mostró el mayor rendimiento de biogás fue el realizado con NaOH, aumentando 3 veces más producción de biogás en comparación con el control, mientras que, el menor rendimiento obtenido fue de 5 veces inferior con el tratamiento con celobiohidrolasa en comparación con el control.

Para los resultados obtenidos a partir de los residuos a temperatura controlada, los tratamientos con celobiohidrolasa y HCl incrementaron sus producciones de biogás en 2.7 y 2.6 veces más que el control, mientras que el tratado con celulasa mostró una disminución de 3.2 veces en comparación con el control.

Los residuos de *R. communis* son sustratos con potencial para la producción de biogás, sin embargo, se necesita realizar pretratamientos y controlar la temperatura para eficientizar la producción de biogás.

## AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) por contribuir para la realización de este proyecto, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] H. Bateni, K. Karimi, A. Zamani, and F. Benakshani, "Castor plant for biodiesel, biogas, and ethanol production with a biorefinery processing perspective," *Appl. Energy*, vol. 136, pp. 14–22, 2014, doi: 10.1016/j.apenergy.2014.09.005.

[2] R. Kaur, P. Gera, M. K. Jha, and T. Bhaskar, "Pyrolysis kinetics and thermodynamic parameters of castor (*Ricinus communis*) residue using thermogravimetric analysis," *Bioresour. Technol.*, vol. 250, pp. 422–428, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.077.

[3] P. Salehian and K. Karimi, "Alkali pretreatment for improvement of biogas and ethanol production from different waste parts of pine tree," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, no. 2, pp. 972–978, 2013, doi: 10.1021/ie302805c.

[4] P. Salehian, K. Karimi, H. Zilouei, and A. Jeihani-pour, "Improvement of biogas production from pine wood by alkali pretreatment," *Fuel*, vol. 106, pp. 484–489, 2013, doi: 10.1016/j.fuel.2012.12.092.

[5] "Tropicos | Name - *Ricinus communis*." <https://www.tropicos.org/name/12800093> (accessed Feb. 22, 2021).

[6] F. Monlau, E. Latrille, A. C. Da Costa, J.-P. Steyer, and H. Carrère, "Enhancement of methane production from sunflower oil cakes by dilute acid pretreat-

ment," *Appl. Energy*, vol. 102, pp. 1105–1113, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.apenergy.2012.06.042.

[7] M. Adl, K. Sheng, and A. Gharibi, "Technical assessment of bioenergy recovery from cotton stalks through anaerobic digestion process and the effects of inexpensive pre-treatments," *Appl. Energy*, vol. 93, pp. 251–260, May 2012, doi: 10.1016/j.apenergy.2011.11.065.

[8] M. Shafiei, H. Zilouei, A. Zamani, M. J. Taherzadeh, and K. Karimi, "Enhancement of ethanol production from spruce wood chips by ionic liquid pretreatment," *Appl. Energy*, vol. 102, pp. 163–169, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.apenergy.2012.05.060.

[9] F. Gomez-Tovar, L. B. Celis, E. Razo-Flores, and F. Alatríste-Mondragón, "Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production," *Bioresour. Technol.*, vol. 116, pp. 372–378, 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.109.

[10] M. Badshah, D. M. Lam, J. Liu, and B. Mattiasson, "Use of an Automatic Methane Potential Test System for evaluating the biomethane potential of sugarcane bagasse after different treatments," *Bioresour. Technol.*, vol. 114, pp. 262–269, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.022.

[11] K. Ziemiński, I. Romanowska, and M. Kowalska, "Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production," *Waste Manag.*, vol. 32, no. 6, pp. 1131–1137, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.WASMAN.2012.01.016.

[12] H. Ghavinati and M. Tabatabaei, *Biogas: Fundamentals, Process, and Operation*. 2018.

[13] W. A. Telliard, "Method 1684: Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids, and Biosolids," *U. S. Environ. Prot. Agency*, no. January, p. 13, 2001.

[14] C. O. Demand, "The Science of Oxidation Efficiency of Organic Compounds," 2005.

[15] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances," *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956, doi: 10.1021/ac60111a017.

[16] F. Momayez, K. Karimi, I. S. Arváriarvári Horváth, and H. Horváth, "Sustainable and efficient sugar production from wheat straw by pretreatment with biogas digestate," 2019, doi: 10.1039/c9ra05285b.

[17] K. Ziemiński, I. Romanowska, and M. Kowalska, "Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to

improve biogas production,” *Waste Manag.*, vol. 32, no. 6, pp. 1131–1137, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.wasman.2012.01.016.

[18] H. Şenol, Ü. Açıklı, and V. Oda, “Anaerobic digestion of sugar beet pulp after acid thermal and alkali thermal pretreatments,” *Biomass Convers. Biorefinery*, vol. 11, no. 3, pp. 895–905, 2021, doi: 10.1007/s13399-019-00539-6.

[19] M. T. V. Moreno, “Manual de biogás,” 2011.

[20] F. Passos, A. Hom-Díaz, P. Blázquez, T. Vicent, and I. Ferrer, “Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment,” *Bioresour. Technol.*, vol. 199, pp. 347–351, 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.084.

[21] D. Wang, P. Ai, L. Yu, Z. Tan, and Y. Zhang, “Comparing the hydrolysis and biogas production performance of alkali and acid pretreatments of rice straw using two-stage anaerobic fermentation,” *Biosyst. Eng.*, vol. 132, pp. 47–55, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.biosystemseng.2015.02.007.

[22] A. T. W. M. Hendriks and G. Zeeman, “Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass,” *Bioresour. Technology*, vol. 100, no. 1, Elsevier Ltd, pp. 10–18, Jan. 01, 2009, doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.027.

[23] X. Jia et al., “Integration of fermentative biohydrogen with methanogenesis from fruit-vegetable waste using different pre-treatments,” *Energy Convers. Manag.*, vol. 88, pp. 1219–1227, 2014, doi: 10.1016/j.enconman.2014.02.015.

[24] M. Dhanya, N. Gupta, and H. Joshi, “Biogas Potentiality of Agro-wastes *Jatropha* Fruit Coat.,” *Int. J. Environ. Chem. Ecol. Geol. Geophys. Eng.*, vol. 3, no. 3, pp. 432–436, 2009, [Online]. Available: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Biogas+Potentiality+of+Agro-wastes+Jatropha+Fruit+Coat#0>.