



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



Estudio preliminar de la producción de ácidos grasos volátiles para
la obtención de biopolímeros mediante la valorización de residuos
orgánicos complejos

POR

Isidora Antonia Casanova Müller

Memoria de Título presentada a la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Ingeniero(a) Civil Químico

Profesor Guía

José Matías Garrido Acuña

Profesor Comisión

Claudio Alfredo Zaror Zaror

Abril 2024

Concepción (Chile)

© 2024, Isidora Antonia Casanova Müller

© Isidora Antonia Casanova Müller

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.

Me gustaría agradecer:

A mi familia por apoyarme desde lejos, donde cada videollamada cuenta. Sobre todo, gracias por las visitas.

A mis amigos en Chile por mantenerse junto a mí y darme ánimos a pesar de la distancia.

A mis amigos en España por siempre tener una palabra de ánimo o un plan para convencernos a todos de seguir adelante (sabemos que Ale es la planificadora designada). Pasamos por momentos difíciles, pero siempre pudimos contar con el grupo.

Al 8G (Cata Grau, Cata Prado y Mario) que siempre estuvo presente.

A mis compañeros del BioGroup, por nunca vacilar en ayudarme con los equipos, las analíticas o cualquier cosa. Siempre hicieron parecer que cualquier pregunta era válida, por muy básica que fuera. Son un grupo excelente y lleno de ánimo y les deseo lo mejor.

A Alba, quien nunca perdió la paciencia a pesar de mis preguntas constantes y a pesar de que tuvo que explicarme las cosas más de una vez. También gracias por subir corriendo como 3 pisos por mi mensaje de ayuda. Sin su ayuda y su guía, no hubiese podido hacer este trabajo.

A Anuska por detener lo que está haciendo cuando irrumpo en su despacho para pedirle ayuda; y gracias por cada palabra de ánimo, siempre hicieron la diferencia.

A Ángeles por quedarse hasta tarde con nosotros en el laboratorio para que podamos terminar las analíticas. Cada minuto contó.

A Mar y Mónica por explicarme cada equipo de su laboratorio, por darme ánimo y por siempre estar dispuestas a ayudarme con una buena cantidad de muestras.

A Ovidio por ayudarme con el reactor más veces de las que se dio cuenta.

A Mario, quien cuidó de mí cuando ni yo quería cuidar de mí.

A mí, que me pasé todo el tiempo creyendo que no iba a llegar a la convocatoria de febrero.

“It is funny, how time works.”

A Crown as Sharp as Pines, Jennifer Krofp

Resumen

La digestión anaeróbica es una alternativa atractiva para revalorizar líneas residuales ricas en lípidos y carbohidratos. Este proceso consta de cuatro pasos: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Al inhibir la metanogénesis se logra incrementar la formación de ácidos grasos volátiles (AGV) formados durante la acidogénesis y acetogénesis. Éstos se pueden utilizar como fuente de carbono para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA), biopolímeros con propiedades plásticas y biodegradables, con mayor valor en el mercado.

En este trabajo se evalúa, de manera preliminar, el potencial de producción de AGV a partir de corrientes lipídicas con vistas a su utilización en la síntesis de PHA. Para ello, se realizaron 3 ensayos en reactores discontinuos (batch) de 400 mL con distintos sustratos (glucosa, ácido oleico y aceite usado de cocina). En el primer ensayo, se utilizó glucosa y aceite residual, y un inóculo refrigerado. Se constató que el amoníaco libre produjo una inhibición total de la metanogénesis. En el segundo ensayo, se utilizó la misma fuente de carbono, pero un inóculo fresco de origen industrial. Se logró consumir completamente la glucosa, pero el aceite no se solubilizó por completo, quedando en forma de flóculos en la superficie del líquido. El objetivo del tercer ensayo era estudiar el efecto de la hidrólisis utilizando ácido oleico, además de dos corrientes de aceite con menor concentración. El ácido oleico tampoco pudo solubilizarse y se observaron flóculos en la superficie. Una de las corrientes de aceite con menor concentración formó AGV con una mayor proporción de acético que en el ensayo 2, seguido de nuevo por el ácido propiónico.

Se logró un aumento de la producción de AGV al utilizar un inóculo activo, sin embargo, los tres intentos de mejora en el proceso en el ensayo 3 fallaron. La hidrólisis de lípidos se vio muy afectada por el área superficial disponible. El máximo de AGV logrados a partir de la DQO introducida fue 23% para el aceite y 13% para el ácido oleico. Los AGV específicos obtenidos en cada ensayo fueron diferentes, mostrando el potencial de obtención de materiales con diferentes propiedades bioplásticas a partir de aceite residual adaptando el modo de operación.

Abstract

Anaerobic digestion is an attractive alternative for valorizing residual streams rich in lipids and carbohydrates. This process consists of four steps: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis. By inhibiting methanogenesis, it is possible to increase the formation of volatile fatty acids (VFAs) formed during acidogenesis and acetogenesis. These can be used as a carbon source to produce polyhydroxyalkanoates (PHA), biopolymers with plastic and biodegradable properties, which have higher value in the market.

This work preliminarily evaluates the production potential of VFAs from lipid streams for their use in PHA synthesis. For this purpose, three assays were carried out in 400 mL batch reactors with different substrates (glucose, oleic acid, and used cooking oil). In the first assay, glucose and residual oil were used, along with a refrigerated inoculum. It was found that free ammonia completely inhibited methanogenesis. In the second assay, the same carbon source was used, but a fresh inoculum from an industrial source was employed. Glucose was completely consumed, but the oil was not completely solubilized, remaining in the form of floccules on the liquid surface. The objective of the third assay was to study the effect of hydrolysis using oleic acid, in addition to two oil streams with lower concentrations. Oleic acid also could not be solubilized, and floccules were observed on the surface. One of the oil streams with lower concentration formed VFAs with a higher proportion of acetic acid than in assay 2, followed again by propionic acid.

An increase in VFA production was achieved using an active inoculum; however, all three attempts to improve the process in assay 3 failed. Lipid hydrolysis was greatly affected by the available surface area. The maximum VFAs obtained from the introduced COD were 23% for oil and 13% for oleic acid. The specific VFAs obtained in each assay were different, demonstrating the potential for obtaining materials with different bioplastic properties from residual oil by adapting the operation mode.

Índice

1.	Introducción	1
2.	Objetivos	3
3.	Antecedentes teóricos	4
3.1	Digestión anaerobia.....	4
3.1.1	Hidrólisis	4
3.1.2	Acidogénesis	5
3.1.3	Acetogénesis.....	5
3.1.4	Metanogénesis.....	6
3.2	Producción de ácidos grasos volátiles como plataforma química.....	6
3.2.1	Factores que afectan la producción de Ácidos Grasos Volátiles	6
3.3	Producción de biopolímeros	8
3.4	Corrientes residuales aceitosas.....	10
4.	Materiales y métodos	11
4.1	Sustratos empleados	11
4.2	Montaje de reactores en discontinuo.....	11
4.2.1	Primer ensayo	12
4.2.2	Segundo ensayo.....	12
4.2.3	Tercer ensayo.....	13
4.3	Métodos de análisis	14
4.3.1	Análisis realizados a la biomasa.....	14
4.3.2	Análisis realizados a la fase líquida	14
4.3.3	Análisis realizados a la fase gaseosa	15
4.4	Parámetros calculados	16
4.4.1	Producción de biomasa.....	16

4.4.2	Ácidos grasos volátiles producidos	17
4.4.3	Aceite no hidrolizado	17
4.4.4	Aceite hidrolizado a DOQ soluble	17
4.4.5	Cantidad de dióxido de carbono, metano e hidrógeno	18
4.4.6	Balance de DQO.....	18
4.4.7	Ratios.....	18
4.4.8	Estimación de la composición de PHA teórico	19
5.	Resultados y discusión	20
5.1	Ácidos Grasos Volátiles formados	20
5.2	Sustrato sin consumir	27
5.3	Efecto de la DOQ soluble y pH sobre los ratios establecidos.....	28
5.4	Cantidad teórica de PHA que se puede producir.....	36
6.	Conclusiones	38
7.	Bibliografía	39
8.	Anexos.....	44

Índice de tablas

Tabla 1. Composiciones alcanzables según la mezcla de AGV alimentada. Fuente: elaboración propia.....	9
Tabla 2. Valores calculados para realizar las correlaciones para la estimación teórica de la producción de PHA a partir de las corrientes de AGV de este trabajo.....	19
Tabla 3. Valores máximos obtenidos de AGV en los ensayos en unidades de DQO/L.....	35
Tabla 4. Porcentaje teórico de PHA producible con las corrientes obtenidas en los ensayos.	36
Tabla 5. Masas molares de los AGV.....	49
Tabla 6. Equivalencias de AGV a DQO.....	49
Tabla 7. Reacciones de formación de AGV. Fuente: (Rombouts, 2020).....	50
Tabla 8. Reacciones secundarias de formación de ácidos grasos. Fuente: adaptado de: (den Boer et al., 2016).....	50
Tabla 9. Reacciones de formación de acetato a partir de otros AGV, AGCL y compuestos generados durante la hidrólisis.	50
Tabla 10. Ecuaciones de formación de AGV a partir de glucosa.	51
Tabla 11. Reacciones de la metanogénesis.....	52
Tabla 12. Propiedades de PHA según su ratio HB:HV. Adaptado de (Palmeiro, 2017).....	54
Tabla 13. Compuestos que podrían encontrarse entre los compuestos “desconocidos” que no pudieron ser identificados por HPLC ni cromatografía de gases.....	57
Tabla 14. Propiedades del aceite utilizado. Fuente: datos previos obtenidos en proyectos del grupo de investigación.....	57
Tabla 15. Composición del aceite obtenida mediante análisis de triacilglicéridos.	58
Tabla 16. Estructura y formulas del ácido oleico. Fuente: elaboración propia.	59
Tabla 17. Propiedades del ácido oleico. Fuente: datos previos obtenidos en proyectos del laboratorio de investigación.	59
Tabla 18. Cantidad de compuestos en cada botella en los ensayos en unidades de mililitros.	61
Tabla 19. Macronutrientes utilizados en los ensayos.	62
Tabla 20. Masa de las botellas de los ensayos 1 y 2 en gramos	62
Tabla 21. Masa de las botellas del ensayo 3 en gramos	63
Tabla 22. Factores de respuesta de los gases del cromatógrafo de biogás.....	84

Tabla 23. Valores calculados para realizar las correlaciones para la estimación teórica de la producción de PHA a partir de las corrientes de AGV de este trabajo.....86

Índice de figuras

Figura 1. Ácidos grasos volátiles producidos en las botellas con glucosa (a) y de aceite (b) en el primer ensayo batch.	22
Figura 2. Ácidos grasos volátiles producidos en las botellas con glucosa en el segundo ensayo batch..	24
Figura 3. Ácidos grasos volátiles producidos en las botellas con aceite en el segundo ensayo batch.	25
Figura 4. Ácidos grasos volátiles producidos en las botellas de ácido oleico en el tercer ensayo.	26
Figura 5. Ácidos grasos volátiles producidos en las botellas de Aceite 1,87 g DQO/L en el tercer ensayo.....	27
Figura 6. Valores de pH e inhibición por amoníaco libre (AL) en la acidogénesis alcanzados durante el primer ensayo.	29
Figura 7. Valores de pH alcanzados durante el segundo ensayo.	31
Figura 8. Valores de pH alcanzados durante el tercer ensayo.	33
Figura 9. Esquema simplificado representativo de las reacciones llevadas a cabo durante la digestión anaerobia de materiales poliméricos. La línea discontinua horizontal representa la etapa de metanogénesis, la se busca evitar para que los AGV no sean consumidos. Fuente: adaptado de (López et al., 2017)	44
Figura 10. Digestión anaerobia de lípidos. Fuente: adaptado de (Holohan et al., 2022)	47
Figura 11. Jerarquía de gestión de residuos para la gestión de grasas y aceites.....	48
Figura 12. Estructura general de un polihidroxialcanoato (PHA). Fuente: elaboración propia a partir de (Priyadarshi et al., 2014)	53
Figura 13. Diagrama resumido de la producción de PHA. Fuente: adaptado de (Albuquerque et al., 2011).....	55
Figura 14. Aceite utilizado en los ensayos.	58
Figura 15. Agitador.....	60
Figura 16. Concentración de AGV en g DQO/L de cada botella en el segundo ensayo.	64

Figura 17. Presiones de las botellas de glucosa y aceite durante el segundo ensayo. Los bordes negros indican los días que se tomó muestra.	65
Figura 18. Recta de calibración del transductor.	66
Figura 19. Transductor.....	68
Figura 20. Variación de las presiones durante el primer ensayo para ejemplificar el criterio de toma de muestra. Los puntos bordeados en negro indican los días en que se tomó muestra.	69
Figura 21. Analizador TOC-LCSN.	75
Figura 22. Cromatógrafo de líquidos a alta presión, columna, detector y computador.	76
Figura 23. Cromatógrafo modelo Hewled Packard 5890 serie II e integrador.	78
Figura 24. Ejemplo de muestra patrón para interpretación del cromatograma.	78
Figura 25. Cromatógrafo de gases CG-TCD YL Instrument 6500GC System.	79
Figura 26. Balance de masa en unidades de g de DQO equivalentes, ejemplo aclaratorio.	86
Figura 27. Correlación entre AGV de carbonos pares y producción de PHB y PHV.	87
Figura 28. Correlación entre AGV de carbonos impares y producción de PHB y PHV.	87
Figura 29. Balance de masa del segundo ensayo. (a) serie glucosa), (b) serie aceite.	89
Figura 30. Balance de masa del tercer ensayo. (a) Ácido oleico, (b) Aceite (1,87 g DQO/L).....	91
Figura 31. Ratios calculados en el primer ensayo. (a) Ratio 1, (b) Ratio 1.	92
Figura 32. Ratios calculados en el segundo ensayo. (a) Ratio 1, (b) Ratio 1.....	92
Figura 33. Ratios calculados en el tercer ensayo. (a) Ratio 1, (b) Ratio 1.	92
Figura 34. Fotografías de las botellas de la serie de aceite del segundo ensayo.	93
Figura 35. Fotografías de las botellas de la serie de aceite y ácido oleico del tercer ensayo.....	94
Figura 36. AGV acumulados y DQO soluble en unidades de DQO/L durante el primer ensayo. .	95
Figura 37. AGV acumulados y DQO soluble en unidades de DQO/L durante el segundo ensayo.	96
Figura 38. AGV acumulados y DQO soluble en unidades de DQO/L en el tercer ensayo.	97

Nomenclatura

Notación	Definición
HAc o $C_2H_4O_2$	Ácido acético
HBt o $C_4H_8O_2$	Ácido butírico
$(C_3H_6O_3)$,	Ácido láctico
HPr o $C_3H_6O_2$	Ácido propiónico
H_2S	Ácido sulfhídrico
HVa	Ácido valérico
AGCL	Ácidos grasos de cadena larga
AGV	Ácidos grasos volátiles
H_2O	Agua
(NH_4^+)	Amonio
AL	Amonio libre
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sodio
CO_2	Dióxido de carbono
EDAR	Estación de depuración de aguas residuales
C_2H_6O	Etanol
$-COOH$	Grupo carboxilo
H_2	Hidrógeno
HB	Hidroxibutirato
HV	Hidroxivalerato
CH_4	Metano
NT	Nitrógeno total
M_1	Peso del filtro
M_3	Peso del filtro después de calcinar la fracción orgánica
M_2	Peso del filtro después de ser secado en la estufa
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
PHV	Polihidroxivalerato

SST	Sólidos en suspensión totales
SSV	Sólidos en suspensión volátiles
FAS	Sulfato amónico ferroso
V	Volumen de la muestra líquida filtrada

1. Introducción

El aumento de la población mundial ha llevado a un crecimiento exponencial en la demanda de recursos (agua, energía y materiales) y en la cantidad de desechos orgánicos producidos. Estos residuos orgánicos requieren un tratamiento sostenible que impida el agotamiento de los recursos naturales, permita minimizar el riesgo para la salud humana, reduzca los problemas ambientales y mantenga un balance general en el ecosistema (Khalid et al., 2011; Wainaina et al., 2019). La reutilización, reciclaje y revalorización de residuos ha sido utilizada para mejorar la gestión de estos recursos materiales. Al respecto, la digestión anaerobia ha sido ampliamente aceptada como un método de tratamiento flexible y amigable con el medioambiente que no solo estabiliza los desechos, si no que provee una vía de valorización energética de los residuos en forma de biogás (Khalid et al., 2011). Además, la digestión anaerobia es aplicable en un amplio rango de materiales, incluyendo los residuos industriales, agrícolas y residuos de plantas (Chen et al., 2008). Comúnmente, la digestión anaerobia consta de 4 pasos: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Es en este último paso donde se produce el metano.

Los ácidos grasos volátiles (AGV) son importantes intermediarios producidos durante los procesos de acidogénesis y acetogénesis. En la actualidad, los AGV y sus derivados, se consideran plataformas químicas y son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, textil, farmacéutica y de plásticos (Zhou et al., 2018). En los últimos años, la Unión Europea, con la implementación de la Directiva Marco de Residuos, ha dado grandes pasos para promover la recuperación de materiales de preferencia a la valorización energética (Kleerebezem et al., 2015).

Aplicando esta Directiva al tratamiento de aguas residuales, éstas deben considerarse como un recurso renovable del que se obtienen agua tratada, materiales y energía (Wallace et al., 2017). Esta estrategia se ilustra en la Figura 11, anexo 8.1.1, para el caso de grasas y aceites, dado que es el residuo de interés en el presente trabajo.

Los aceites y grasas presentan un desafío en su tratamiento debido a factores como su baja solubilidad en agua, además de que la acumulación de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) afecta la permeabilidad celular, provocando efectos inhibidores sobre los microorganismos, afectando así la fermentación anaeróbica (Song et al., 2023). En este contexto, resulta más apremiante explorar alternativas para su valorización.

Varias industrias de alimentos y de procesos tienen aguas residuales caracterizadas por un alto contenido en aceites y grasas, como las fábricas de productos lácteos, aceite comestible, pescados, mataderos, fábricas de bioetanol y biodiésel y el lavado de lana (Holohan et al., 2022).

Un enfoque alternativo a la formación de biogás mediante digestión anaerobia de biomasa consiste en privilegiar la producción de ácidos orgánicos y/o alcoholes en lugar del biogás. La recuperación directa de estos productos solubles en agua o el posprocesamiento de esta para obtener otras moléculas (por ejemplo, polihidroxialcanoatos (PHA)) puede dar como resultados la obtención de productos finales más valiosos (Kleerebezem et al., 2015). 8.1.1 La recuperación efectiva de los AGV del caldo de fermentación representa el principal desafío para la producción de AGV a partir de desechos orgánicos, debido a que se trata de una corriente con alto contenido en agua y baja concentración de AGV (alrededor de 20 g AGV/L (Atasoy et al., 2018)). Entre los métodos de extracción más utilizados para el caldo de fermentación anaerobia se encuentran la extracción líquido-líquido, la separación por membranas y el intercambio iónico (Xing et al., 2023). Para ver la problemática de estos procesos se puede revisar el anexo 8.1.3.

La producción de biopolímeros como el PHA a partir de bacterias como compuestos de almacenamiento intracelular evita una extracción costosa, a la vez que se obtiene un producto con mayor valor añadido en el mercado (Kleerebezem et al., 2015).

Así, los polihidroxialcanoatos (PHA) se han convertido en una alternativa a los polímeros sintéticos, ya que son completamente biodegradables, biocompatibles, tienen propiedades plásticas y pueden producirse a partir de fuentes renovables (Szacherska et al., 2021). Estos biopolímeros se pueden producir utilizando mezclas de AGV como fuente de carbono para el cultivo de mixto de bacterias productoras de PHA. Las propiedades fisicoquímicas de los PHA dependen, entre otros factores, del perfil de AGV alimentado (Palmeiro, 2017). Específicamente, la composición en términos de los monómeros hidroxibutirato (HB) y hidroxivalerato (HV) determinarán propiedades como la flexibilidad y dureza del polímero, determinando por tanto las aplicaciones de los bioplásticos obtenidos. Un ejemplo se puede ver en el anexo 8.1.6.1

Según la revisión presentada aquí, existe un interesante potencial para aprovechar las corrientes residuales ricas en lípidos y carbohidratos para producir AGV que pueden utilizarse como fuente de síntesis de PHA. El trabajo aborda esta problemática y debe considerarse como una primera aproximación exploratoria al tema por parte del grupo de investigación involucrado.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es la evaluación preliminar del potencial de corrientes lipídicas en la producción de ácidos grasos volátiles mediante ensayos en discontinuo que permita su posterior valorización a polihidroxicanoatos.

Los objetivos específicos del trabajo son:

- Realizar un estudio preliminar de la evolución en el tiempo de la producción de ácidos grasos volátiles mediante ensayos de acidificación discontinua anaerobia utilizando diferentes sustratos.
- Estimar de manera teórica la composición de PHA teórica obtenible a partir de las mezclas de AGV producidas en los ensayos.

3. Antecedentes teóricos

En este capítulo se resumen los diferentes conceptos y estado del arte relevante a la ejecución de este trabajo, los que se complementan con información entregada en el anexo 8.1.

En primer lugar, se entrega a modo de referencia una breve descripción del proceso de digestión anaeróbica. En seguida, se presentan antecedentes acerca de la formación de AGV mediante digestión anaeróbica. Finalmente, se revisan los principales conceptos acerca de la formación de PHA a partir de AGV.

3.1 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso de múltiples etapas compuesto por varias reacciones en serie y en paralelo (Figura 9, anexo 8.1.1).

El proceso de digestión anaerobia involucra una red trófica compleja, en la cual la materia orgánica se degrada de manera secuencial por una gran variedad de microorganismos, principalmente bacterias y arqueas (en la última etapa). Estos microorganismos convierten la materia orgánica, que finalmente se convierte a metano, dióxido de carbono, ácido sulfhídrico y agua. Este proceso se lleva a cabo en cuatro etapas sucesivas conocidas como: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Mohan et al., 2009, López et al., 2017).

3.1.1 Hidrólisis

Debido a que las bacterias son incapaces de consumir la materia orgánica en forma de macromoléculas, el primer paso de la digestión anaerobia consiste en la hidrólisis de polímeros. En este primer proceso, los sustratos poliméricos complejos se transforman en compuestos monoméricos o diméricos que pueden ser incorporados al interior celular y consumidos por las bacterias acidogénicas. La hidrólisis suele ser el primer paso, si bien a veces puede requerir un pretratamiento fisicoquímico para que se pueda llevar a cabo. En la mayoría de los casos es la etapa limitante para la velocidad de digestión global. En el caso de sustratos complejos, la limitación no suele ser la actividad enzimática, sino la disponibilidad de área superficial libre en las partículas. Además, la hidrólisis es muy sensible a la temperatura y sus fluctuaciones (López et al., 2017).

3.1.2 Acidogénesis

Durante esta etapa, los productos de la hidrólisis (aminoácidos, azúcares simples, ácidos grasos), que son compuestos solubles relativamente pequeños, se difunden en el interior de las células bacterianas a través de la membrana celular y, posteriormente, son fermentados u oxidados anaeróbicamente. Los productos de la acidificación consisten en una variedad de compuestos orgánicos de cadena corta, principalmente AGV, es decir, acetato propionato y butirato, además de hidrógeno, dióxido de carbono, ácido láctico, etanol y amonio (López et al., 2017). Algunas de las principales reacciones de obtención de los AGV a partir de glucosa se muestran en la Tabla 7, anexo 8.1.4. Comúnmente, el acetato, propionato y butirato son los productos obtenidos en mayor cantidad durante la acidogénesis de residuos alimentarios (Zhou et al., 2018).

Esta etapa presenta la velocidad de crecimiento de bacterias y de conversión más alta de los 4 etapas, por esta razón, los reactores anaerobios son susceptibles a la acidificación cuando existen sobrecargas en los reactores o perturbaciones por compuestos tóxicos. Una vez que se comienzan a formar los AGV, el pH continúa disminuyendo, inhibiendo cada vez más la metanogénesis, hasta que ésta queda totalmente inhibida. Dado que los microorganismos pueden usar los AGV como aceptores de electrones, y el hidrógeno y el etanol como dadores de electrones, es posible que se generen AGV a partir de los ya generados (fermentación secundaria), como el ácido valérico y caproico (Steinbusch et al., 2011). Estas reacciones están representadas en la Tabla 8, anexo 8.1.4.

3.1.3 Acetogénesis

En esta etapa, los ácidos grasos de cadena corta producidos durante la acidogénesis, diferentes al acetato, son convertidos en acetato, dióxido de carbono e hidrógeno por las bacterias acetogénicas. (López et al., 2017). Los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) (ácidos grasos con una cadena formada entre 12 a 18 átomos de carbono), que fueron formados durante la hidrólisis de lípidos como aceites y grasas, son transformados mediante la β -oxidación, un proceso que solo llevan a cabo algunas bacterias acetogénicas específicas. Aunque las bacterias acetogénicas son productoras obligadas de hidrógeno, su metabolismo se ve inhibido por este gas. En la Tabla 9, anexo 8.1.4 se tienen las reacciones más importantes de formación de acetato a partir de otros productos de la acidogénesis.

3.1.4 Metanogénesis

Las arqueas metanogénicas se encargan de llevar a cabo el paso final en la conversión anaerobia de la materia orgánica a metano y dióxido de carbono. En esta etapa, estas bacterias son responsables de reducir el dióxido de carbono utilizando el hidrogeno como donador de electrones y de descarboxilar el acetato para formar metano. Las reacciones de la metanogénesis y algunos inhibidores se encuentran en los anexos 8.1.5. y 8.1.5.1.

3.2 Producción de ácidos grasos volátiles como plataforma química

Los ácidos grasos son moléculas compuestas por hidrocarburos con un grupo carboxilo al final de la cadena. Según el largo de su cadena se clasifican en: ácidos grasos volátiles (de 2 a 6 carbonos), ácidos grasos de cadena media (de 6 a 12 carbonos), ácidos grasos de cadena larga (de 12 a 18 carbonos) y ácidos grasos de cadena muy larga (cadena mayor a 18 carbonos) (Agostoni & Bruzzese, 1992).

En el marco de la economía circular, la conversión de corrientes residuales en AGV ha ganado recientemente atención debido a su amplia variedad de aplicaciones (Kleerebezem et al., 2015). Los AGV pueden utilizarse como fuente de carbono durante la desnitrificación o la remoción biológica de fósforo. También tienen un amplio rango de aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria y química, además de servir como materia prima en la producción de biodiesel, bioplásticos y biohidrógeno (Atasoy et al., 2018).

3.2.1 Factores que afectan la producción de Ácidos Grasos Volátiles

3.2.1.1 Sustrato

La producción de AGV se ve fuertemente influenciada por el tipo de sustrato utilizado. La cantidad de AGV producidos a partir de una materia prima específica depende del grado de acidificación (Begum et al., 2018). En un estudio de Silva et al. (2013) realizado con aproximadamente la misma concentración inicial de materia orgánica que la utilizada en este trabajo (8 g DQO/L), se observó que la fermentación de ocho flujos de desechos orgánicos diferentes resultó en diferentes producciones de AGV debido a variaciones significativas en el grado de acidificación.

Estos valores, además de la discrepancia encontrada para la producción de AGV según si el sustrato es de naturaleza lipídica, un carbohidrato o una proteína pueden verse en el anexo 8.1.1.1. Además, se discute el efecto del sustrato en la hidrólisis.

3.2.1.2 Inóculo

La degradación de los residuos orgánicos requiere una gran diversidad microbiana donde los diferentes procesos estén balanceados. Adicionalmente, la variación del inóculo, como su origen o un pretratamiento, puede favorecer algunas rutas metabólicas de producción de AGV en la fase acidogénica. Por esto, la elección del inóculo puede influir en la producción específica de ácidos (Yan et al., 2014).

3.2.1.3 pH

El pH es uno de los factores críticos a controlar en la producción de AGV en este trabajo. El pH del sistema afecta la actividad de los microorganismos, ya que la mayoría de las enzimas no pueden tolerar los medios hostiles ácidos ($\text{pH} < 3$) o alcalinos ($\text{pH} > 12$). Si bien el pH de operación óptimo de los microorganismos metanogénicos es en un rango de 6,5-8,5 (Fra-Vázquez et al., 2020), los microorganismos productores de enzimas hidrolíticas y los acidogénicos operan en un rango óptimo de pH de 5-11 y no pueden sobrevivir en ambientes extremadamente ácidos ($\text{pH} < 3$) o alcalinos ($\text{pH} > 12$). Sin embargo, los AGV también son tóxicos para las bacterias acidogénicas a un pH demasiado bajo (3), reduciendo su actividad.

Mantener un equilibrio entre producción de AGV e inhibición de la metanogénesis cuando el pH comienza a bajar es un reto. En la literatura, se encuentran numerosos ensayos (Cheah et al., 2019; Peña Picola, 2022; Valença et al., 2021) en los cuales se utiliza NaHCO_3 u otras soluciones tampón para mantener el pH en condiciones óptimas. Sin embargo, la adición de estas soluciones genera un compromiso económico que se busca reducir en este proceso.

3.2.1.4 Temperatura

Las temperaturas mesofílicas favorecen la producción de AGV. Según la investigación llevada a cabo por Wainaina et al., 2019, las condiciones termófilas (55 °C) e hipertermófilas (70°C) causan una disminución en la producción total de AGV. Finalmente, en condiciones psicrófilas (15-20 °C), la producción es extremadamente baja. Como la temperatura de crecimiento de las arqueas

metanogénicas y la producción de metano tienen una temperatura óptima en el rango de 30 °C a 40 °C, este parámetro no se consideró viable para manipular la acumulación de AGV.

3.2.1.5 Amonio libre

El proceso de digestión anaerobia es vulnerable a la inhibición por amoníaco libre (AL) (NH_3). Aunque el amonio es necesario para el crecimiento microbiano, se pueden alcanzar concentraciones demasiado altas que perjudiquen el proceso (Yenigün & Demirel, 2013), generando efectos inhibitorios. En un estudio realizado por (Zhao et al., 2018) con aguas de tratamiento municipales, se encontró que a una concentración de AL de 19,3 mg/L, la hidrólisis se veía inhibida alrededor de un 45% y la acidogénesis en un 48% aproximadamente. En esa misma concentración, la metanogénesis se encontraba completamente inhibida. En una concentración de 1,9 mg AL/L, la hidrólisis se ve inhibida en un 23%, la acidogénesis en un 25% y la metanogénesis en un 23% aproximadamente.

El cálculo del amonio libre se puede realizar según la *ecuación (1)* expuesta por Anthonisen et al., 1976. En esta se observa la dependencia lineal con la concentración de amonio y exponencial con el pH, viéndose incrementada la concentración de AL con un incremento de pH.

$$AL(mg NH_3 - N/L) = \frac{NH_4^+ - N}{\left(\frac{e^{(6344/(T+273))}}{10^{pH}} + 1\right)} \quad (1)$$

3.3 Producción de biopolímeros

El uso de polímeros sintéticos para una gran variedad de productos está muy extendido en la sociedad moderna. Sin embargo, estos productos, al ser desechados, contribuyen en gran medida a la contaminación medioambiental debido a su persistencia y acumulación como desechos sólidos (Aremu et al., 2021). Los biopolímeros tienen diferentes aplicaciones, por ejemplo, pueden ser usados como emulsiones, materiales de embalaje en la industria alimentaria y se utilizan en la industria farmacéutica como materiales de transporte de medicamentos, curación de heridas, soportes de tejidos y materiales de apósito (Baranwal et al., 2022). La estructura general de un PHA se puede ver en la Figura 12, anexo 8.1.6.1.

Aunque los PHA presentan ventajas ambientales, la producción de PHA a gran escala está basada en el uso de cultivos puros o microorganismos genéticamente modificados, lo que requiere

condiciones estériles y sustratos específicos altamente costosos. En consecuencia, los PHA aún no son competitivos en los mercados (Argiz et al., 2020). Más información del mercado se encuentra en el anexo 8.1.6.1.

Una estrategia prometedora para reducir el costo de producción de PHA es el uso de cultivos microbianos mixtos con gran diversidad microbiana, como lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales (Gracia et al., 2023). Este enfoque requiere menos energía (condiciones no estériles), equipamiento más simple y son más robustos ante fluctuaciones en su alimentación permitiendo emplear mezclas de AGV como fuentes de carbono (Perez-Zabaleta et al., 2021). Un diagrama simplificado del proceso se presenta en el anexo 8.1.6.2.

Según estudios realizados por Vázquez-Fernández et al., 2022 y Palmeiro, 2017 sobre la obtención de PHA a partir de una alimentación en continuo de corrientes ricas en AGV, se establecieron las relaciones que se presentan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Composiciones alcanzables según la mezcla de AGV alimentada. Fuente: elaboración propia.

Sustrato	Composición de AGV (% mol) (HAc:HPr:HBt:HVa)*	Composición de PHA (%mol) (HB:HV)**	Contenido de PHA (% g PHA/g SSV)	Referencia
Mezcla de AGV 1	47:18:22:13	61:39	77	Vázquez-Fernández et al., 2022
Mezcla de AGV 2	73:13:12:0,02	79:21	68	Vázquez-Fernández et al., 2022
Mezcla de AGV 3	74:7:16:3	85:15	56	Vázquez-Fernández et al., 2022
Mezcla de AGV 4	55:45:0:0	47:53	54	Palmeiro, 2017
Mezcla de AGV 5	67:22:5:6	65:35	51	Palmeiro, 2017
Acético	100:0:0:0	96:4	54	Palmeiro, 2017
Propiónico	0:100:0:0	37:63	46	Palmeiro, 2017

**HAc: ácido acético, HPr: ácido propiónico, HBt: ácido butírico, HVa: ácido valérico.*

***HB: polihidroxibutirato, HV: polihidroxivalerato*

Los PHA están principalmente compuestos por polihidroxibutirato (PHB) y/o polihidroxivalerato (PHV), los cuales pueden ser sintetizados intracelularmente por algunos microorganismos como reservas de carbono y energía (Albuquerque et al., 2011). La relación entre los monómeros HB y HV del polímero obtenido depende principalmente los AGV empleados como sustrato.

3.4 Corrientes residuales aceitosas

El aceite es una sustancia de origen vegetal o animal que consiste principalmente en una mezcla de ésteres de la glicerina con los ácidos grasos, es decir, triglicéridos. Los aceites usados tanto de aplicaciones industriales como domésticas son fuentes potenciales de carbono para producir PHA. Según lo encontrado por Verlinden et al., 2011, el aceite usado para freír se puede usar sin necesidad de ser filtrado para la producción de PHA, a diferencia de cuando se usan para la producción de jabón o biodiesel.

Los aceites de cocina usados no son comestibles debido a cambios químicos en el aceite durante el proceso de fritura, lo que los excluye eventualmente de la cadena alimentaria. A nivel mundial, se producen 29 millones de toneladas de aceite al año, equivalente a aproximadamente 4,1 kg por persona (Chuah et al., 2016). Su gestión es un problema y debido a las normativas europeas se está acumulando. Para más información revisar el anexo 8.1.7.1.

Durante el primer paso de la digestión anaerobia ocurre la hidrólisis del aceite. Durante la hidrólisis, cada triglicérido es transformado en 3 moléculas de ácidos grasos lineales y una molécula de glicerol. Los AGCL más comunes son: palmítico, esteárico, oleico y linoleico. El proceso de digestión anaerobia de corrientes lipídicas se puede resumir en la Figura 10, anexo 8.1.1.

La hidrólisis de lípidos es un proceso relacionado con la superficie, y su velocidad puede variar dependiendo de la longitud de la cadena de ácidos grasos, el estado físico del sustrato (sólido o líquido) y la superficie disponible. Cuando la concentración de grasa es muy alta, la hidrólisis puede convertirse en el paso limitante de la velocidad en todo el proceso de digestión anaerobia. Por ejemplo, en sistemas de tratamiento de aguas residuales, se pueden formar grandes gotas insolubles con una baja superficie disponible para la hidrólisis (Holohan et al., 2022).

4. Materiales y métodos

En este capítulo se mencionan los sustratos utilizados en los ensayos, se describe el montaje de los reactores y las analíticas realizadas. Además, se presentan las ecuaciones principales utilizadas para los cálculos. Se complementa con los anexos 8.2, 8.3, 8.6, 8.7, 8.8 y 8.9.

4.1 Sustratos empleados

Se utilizó aceite de cocina usado para freír, ácido oleico y glucosa dependiendo del ensayo realizado. Los detalles de los sustratos como sus propiedades e información general se encuentran en el anexo 8.2.

4.2 Montaje de reactores en discontinuo

Los sustratos empleados en los ensayos fueron glucosa, aceite de cafetería y ácido oleico. El inóculo utilizado fue un lodo anaeróbico proveniente del digestor de fangos de la estación de depuración de aguas residuales (EDAR) de Vigo.

Los experimentos se llevaron a cabo en modo discontinuo, por triplicado (salvo el último ensayo), utilizando botellas de vidrio Pyrex con un volumen de 500 mL y un volumen útil de aproximadamente 400 mL (100 mL aproximadamente de espacio de cabeza). Las botellas fueron taradas antes de la ejecución de los ensayos para determinar estos volúmenes de forma específica para cada ensayo.

Se ha trabajado con una concentración de sólidos en suspensión volátiles (SSV) de 0,75 g SSV/L, volúmenes de macronutrientes y de micronutrientes de acuerdo con (Fra-Vázquez et al., 2020). Dado que se han preparado disoluciones stock más concentradas, los volúmenes requeridos en cada botella fueron de 40 y 4,5 mL para macronutrientes y micronutrientes, respectivamente. Los macronutrientes agregados se encuentran en la Tabla 19, anexo 8.3.1.

Para determinar la concentración de SSV presentes en el inóculo, se hizo un análisis de sólidos siguiendo el protocolo detallado en el apartado 4.3.1.1 Concentración de sólidos en suspensión totales (SST) y volátiles (SSV).

Una vez añadidos todos los compuestos (inóculo, sustrato, macro y micronutrientes y agua) en las botellas, estas se cerraron con tapones de goma afirmados por una tapa plástica. Luego, se burbujeó con gas (helio o nitrógeno según el ensayo) para eliminar el oxígeno presente en la fase gaseosa.

El gas de purga se inyecta con agujas en la fase líquida durante unos 15 minutos por botella. Finalmente, las botellas fueron colocadas en un agitador orbital a 30 °C, con una velocidad de agitación de 150 rpm (Figura 15, anexo 8.3). De manera general, se consideró un tiempo de 2 horas para que los microorganismos dentro de las botellas de aclimaten térmicamente. Una vez pasado ese tiempo, se tomó la primera muestra y se consideró iniciado el experimento. El protocolo establecido para la toma de muestras se encuentra en el anexo 8.6.1. Los datos de peso de las botellas, espacio de cabecera y otros datos pueden ver en la Tabla 20 y Tabla 21, anexo 8.3.2.

4.2.1 Primer ensayo

En el primer ensayo, se emplearon residuos de aceite de cafetería y una solución de glucosa como sustratos. El objetivo, además de familiarizarse con la metodología, fue comparar la producción de AGV en términos de velocidad, rendimiento y composición de ácidos individuales (perfil) empleando un sustrato complejo (aceite) y el caso más simple posible (glucosa). El inóculo utilizado fue un lodo anaeróbico proveniente de la EDAR de Vigo que estaba almacenado en la cámara fría de las instalaciones de la Universidad de Santiago de Compostela. Este ensayo se realizó con triplicados de cada botella.

En esta primera experiencia, se empleó una concentración de sustrato de 10 g DQO/L, la cual estaba en exceso en comparación con los ensayos llevados a cabo por Fra-Vázquez et al., 2020, con el objetivo de garantizar un exceso tal que permita medir mejor el consumo de este a lo largo del tiempo. Para este lodo se obtuvo una concentración de 3,25 g SSV/L. La cantidad de los compuestos dentro de las botellas es la que se muestra en la Tabla 18, anexo 8.3.1 en unidades de mL.

Estas botellas fueron purgadas con helio. Esto generó un problema al realizar la cromatografía para detectar hidrógeno, ya que el equipo detectaba tanto hidrógeno como helio casi al mismo tiempo de retención, por lo que no se podía cuantificar la producción de hidrógeno.

4.2.2 Segundo ensayo

Se emplearon los mismos sustratos que en el ensayo 1. En este ensayo se inoculó con lodo anaeróbico recogido el día anterior en la EDAR de Vigo (misma fuente). Se presume que este inóculo estaba más activo y, además, la concentración de sólidos fue de 11,53 g SSV/L. Una mayor concentración de SSV hace que la cantidad de inóculo requerida en cada botella sea inferior y, por

lo tanto, se espera una menor concentración de otros compuestos (como materia orgánica residual, amonio) que se arrastran con el propio fango. La cantidad añadida de los compuestos a cada botella es la que se muestra en la Tabla 18, anexo 8.3.1 en unidades de mL.

El gas de purga se cambió por nitrógeno, porque la presencia de helio impedía, mediante cromatografía gaseosa disponible, determinar hidrógeno en la fase gas al registrarse ambos compuestos en el mismo tiempo de retención. El día 9 del ensayo, se inyectaron 4mL de glucosa (1g DQO/L) en las botellas de aceite para acelerar la hidrólisis. Al ser la glucosa fácilmente biodegradable, se espera que se utilice para obtener la energía necesaria para producir las enzimas hidrolíticas y, por tanto, pueda proseguir la degradación del aceite.

El objetivo principal de este ensayo era analizar el efecto del cambio de sustrato desde uno viejo a uno nuevo y activo. Además, permitió analizar la cantidad de hidrógeno producida.

4.2.3 Tercer ensayo

El objetivo del tercer ensayo es estudiar en más detalle el proceso de hidrólisis. Para ello, se presentan dos opciones:

(i) En la literatura (Holohan et al., 2022) encontró que, idealmente, se debe tener una relación entre DQO del sustrato y biomasa menor a 1 kg DQO/1 kg SSV, aunque los lodos bien adaptados todavía podrían tener un buen desempeño con aproximadamente 3 veces este valor. Con este concepto, se plantea el uso del aceite en menores cantidades, proponiéndose 2,5 kg DQO/kg SSV y 1 kg DQO/kg SSV para tener dos valores cercanos a lo encontrado en el artículo mencionado. La concentración de los ensayos anteriores era de 13,3 kg DQO/kg SSV (como se mencionó en el apartado 4.2.1 Primer ensayo, se usó una cantidad de DQO en exceso con objetivo de medir mejor el consumo). Aunque se aconseja usar una relación de DQO/biomasa menor a 1 kg DQO/kg SSV, se calcula que los equipos del laboratorio no medirían concentraciones tan bajas de AGV para llevar un seguimiento del proceso.

(ii) Como el aceite es difícil de hidrolizar, se propone utilizar una forma hidrolizada del aceite, en este caso, el ácido oleico, el cual se cuenta entre los más abundantes en las corrientes residuales con presencia de aceite, por lo que se considera representativo. Al ser un AGCL, se espera que las bacterias logren utilizarlo de manera más fácil que el aceite.

El inóculo empleado fue el mismo del segundo ensayo. La composición de cada botella se puede observar en la Tabla 18, anexo 8.3.1. El resto del procedimiento fue igual al del ensayo 2.

4.3 Métodos de análisis

Los análisis realizados se dividen en tres tipos, según la fase a la que se le aplica.

4.3.1 Análisis realizados a la biomasa

4.3.1.1 Concentración de sólidos en suspensión totales (SST) y volátiles (SSV)

Los SST indican la fracción total de los sólidos presentes en la muestra y se compone de los sólidos sedimentables y en disolución. Por otro lado, los SSV representan la fracción orgánica de los sólidos totales. Esta analítica se realizó a los lodos utilizados en las botellas y a la muestra final de cada ensayo para evaluar el crecimiento de la biomasa. El protocolo se encuentra en el anexo 8.6.3.

Para obtener los valores se utiliza el peso del filtro (M_1), el peso del filtro después de ser secado en la estufa (M_2) y el peso del filtro después de calcinar la fracción orgánica (M_3), además del volumen de muestra líquida filtrada (V). Los pesos se encuentran en mg y el volumen en mL.

$$SST = \frac{M_2 - M_1}{V} \quad (2)$$

$$SSV = \frac{M_2 - M_3}{V} \quad (3)$$

4.3.2 Análisis realizados a la fase líquida

Exceptuando el caso de la determinación del grado de acidez de la muestra, para el resto de las analíticas realizadas a la fase líquida es necesario previamente centrifugar a 7500 rpm durante 10 minutos. Luego, esta muestra se pasa a través de un filtro con un poro de 0,45 μm .

3.3.2.1 Determinación del grado de acidez y basicidad (pH)

Esta es la primera analítica realizada a las muestras líquidas extraídas de cada una de las botellas. Desde las jeringas, se transfiere la muestra a tubos plásticos donde se mide el pH con un medidor de pH. Los detalles del equipo se encuentran en el anexo 8.6.4.

3.3.2.2 Demanda Química de oxígeno

Este parámetro representa la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica presente en una muestra líquida mediante la digestión de ésta, utilizando dicromato potásico en un medio ácido, como agente oxidante. Se realiza una digestión a 150 °C, donde una parte del dicromato potásico queda sin consumirse. Este oxidante no reducido es titulado con Sulfato Amónico Ferroso (FAS) para determinar la cantidad de dicromato consumido y por tanto calcular la materia orgánica oxidada en términos de oxígeno equivalente. Las ecuaciones necesarias y el proceso en detalle se encuentran en el anexo 8.6.5.

3.3.2.3 Concentración de Nitrógeno Total

Se utilizó el analizador TOC-LCSN (Shidmazu, Japón) (Figura 21, anexo 8.6.6) para medir este parámetro. Se realizó una prueba con el lodo para saber si se debía diluir las muestras tomadas de las botellas para que entren en el rango de medición del equipo. Se obtuvo una concentración de 2203 mg N/L en el lodo utilizado en el primer reactor. En el caso del segundo reactor, se obtuvo un valor de 54,5 mg N/L en el lodo. Se hizo disoluciones 1:20 en los ensayos 1, 2 y 3.

3.3.2.4 Cromatografía de gases para la detección de ácidos grasos volátiles

Este método permite analizar y cuantificar las concentraciones de los AGV en la muestra líquida. Este cromatógrafo detecta los siguientes AGV: acético, propiónico, isobutírico, n-butírico, isovalérico, n-valérico, caproico e isocaproico. El equipo y el protocolo se pueden ver en el anexo 8.6.7.

3.3.2.5 Cromatografía líquida de alta resolución

Esta analítica se utilizó para determinar los compuestos no identificados que pudiesen encontrarse en la mezcla durante el ensayo. Entre estos compuestos pueden estar el glicerol o el ácido láctico, los cuales se forman durante la hidrólisis de aceites, además, de otros AGCL. El protocolo se puede ver en el anexo 8.6.8.

4.3.3 Análisis realizados a la fase gaseosa

3.3.2.1 Presión de gases en las botellas

Diariamente se llevó un registro de la presión de las botellas por la mañana antes de tomar muestras. Si se tomaba muestra gaseosa y líquida, se tomaba también luego la presión para poder calcular la producción de gas entre los muestreos. Por otra parte, durante los primeros días se tomó también

la presión en las botellas al final del día. Así, con este método se puede ver si se está produciendo más o menos gases y modificar la frecuencia de muestreo según la actividad estimada. El transductor utilizado tiene su propia recta de calibrado que se puede ver en el anexo 8.6.2 junto con su protocolo.

3.3.2.2 Cromatografía de gases (biogás)

En este método se separa, identifica y cuantifican los componentes de una mezcla de gases mediante la Cromatografía de Gases con Detector de Conductividad Térmica. Los gases que se miden en este método son el nitrógeno, el metano, el dióxido de carbono y el sulfuro de hidrógeno. Este equipo tiene un tiempo de detección extremadamente parecido para el nitrógeno y el oxígeno, por lo que en los ensayos 2 y 3 no se podía saber si había presencia de oxígeno en las botellas mediante este método. El protocolo seguido para esta analítica se puede ver en el anexo 8.6.9.

3.3.2.3 Cromatografía de gases para la detección de hidrógeno

Esta analítica se utilizó para determinar la concentración de hidrógeno presente en la muestra, debido a su relación con la cantidad de ácidos formados. El equipo utilizado y el protocolo se encuentran en el anexo 8.6.10.

4.4 Parámetros calculados

4.4.1 Producción de biomasa

El crecimiento celular es el único proceso de los que tiene lugar en el que se consume nitrógeno, por lo que se empleará el consumo de NT como un método indirecto para estimar la producción de biomasa. El nitrógeno agregado corresponde al nitrógeno del lodo y al NH_4Cl agregado de los macronutrientes.

$$NT_{\text{teórico}}(mg/L) = NT_{\text{Lodo botella}} + NT_{NH_4Cl} \quad (4)$$

Este cálculo sirve para calcular la dilución que se debe hacer en las analíticas de nitrógeno total. En todos los ensayos se utilizó una relación 1:20. El proceso se muestra más detallado en el anexo 8.7.1.

4.4.2 Ácidos grasos volátiles producidos

Mediante la cromatografía de gases para la detección de AGV, se obtienen las concentraciones de estos en mg/L para cada muestra tomada. Primero, es necesario obtener las equivalencias de AGV a DQO. Estas, pueden calcularse con la ecuación de formación de cada ácido y se presentan en la Tabla 10, anexo 8.1.4. Con estos datos se aplica la *ecuación (5)*, que permite obtener el equivalente a las concentraciones de AGV en unidades de DQO/L.

$$AGV (g DQO/L) = AGV_{i,f} \cdot Factor de conversión \cdot \frac{1 g}{1000 mg} \quad (5)$$

Donde el factor de conversión depende del ácido graso volátil y está en unidades de (mg DQO/mg AGV) (Tabla 6, anexo 8.1.4)

4.4.3 Aceite no hidrolizado

La biomasa obtenida en la primera parte (determinación de SSV) es mayor, dado que considera gotas de aceite sin solubilizar y/o adherido al fango; en cambio, el segundo fue centrifugado y filtrado, librándose de cualquier suciedad. Entonces, con la *ecuación (6)* se pueden obtener los gramos de aceite (g) que quedan en la mezcla.

$$Aceite_{No hidrolizado} = [Biomasa_{Analítica} - (Biomasa_{Crecimiento} + Biomasa_{Inicial lodo})] \cdot Volumen \text{ útil} \cdot 1,42 g DQO/g SSV \quad (6)$$

Donde el *Aceite_{No hidrolizado}* es el que queda en la botella (g DQO), la *Biomasa_{Analítica}* es la obtenida de la analítica de sólidos suspendidos volátiles del apartado 4.3.1.1 Concentración de sólidos en suspensión totales (SST) y volátiles (SSV) al lodo que quedó al final del experimento (g SSV/L), la *Biomasa_{Crecimiento}* es la obtenida al realizar los cálculos del apartado 3.3.1 Producción de biomasa (g SSV/L) y *Biomasa_{Inicial lodo}* es la obtenida de la analítica de sólidos suspendidos volátiles del apartado 4.3.1.1 Concentración de sólidos en suspensión totales (SST) y volátiles, realizada al lodo que se puso inicialmente en las botellas (g SSV/L).

4.4.4 Aceite hidrolizado a DOQ soluble

A partir de la Tabla 18, anexo 8.3.1 se conoce la cantidad teórica de aceite agregado a las botellas inicialmente. Así, restando de este valor inicial el aceite restante calculado en la ecuación anterior, se puede obtener, con la *ecuación (7)*, el aceite convertido en unidades de gramos.

$$Aceite_{Convertido} = Aceite_{Inicial} - Aceite_{Restante} \quad (7)$$

Donde $Aceite_{convertido}$ es el aceite hidrolizado a DQO soluble (g), $Aceite_{inicial}$ es el aceite introducido al inicio del experimento (g). Este valor es luego transformado a g DQO como se puede ver en el anexo 8.7.4.

4.4.5 Cantidad de dióxido de carbono, metano e hidrógeno

Primero, se calcula el porcentaje de CO_2 o CH_4 a partir de las áreas obtenidas en los cromatogramas de biogás, según la ecuación (8).

$$\%m_i = \left(\frac{A_i/f_i}{\sum A_i/f_i} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

Donde $\%m_i$ es el porcentaje molar de N_2 , CH_4 o CO_2 , A: área ocupada por el gas y f: factor de respuesta que depende del gas. Los factores f se encuentran en la Tabla 22, anexo 8.7.5.

Luego el porcentaje molar debe ser recalculado para considerar la presencia de hidrógeno y se calculan los gramos de DQO a los que equivalen al H_2 y al CH_4 como se presenta en el anexo 8.7.5.

4.4.6 Balance de DQO

Se realiza un balance de DQO a todas las cantidades finales de compuestos presentes en las botellas de cada serie, en unidades equivalentes a DQO.

El balance de materia se presenta inicialmente en la ecuación (9) en unidades de gramos de DQO.

$$DQO_{inicial} = DQO_{soluble} + DQO_{biomasa} + DQO_{gases} + DQO_{no\ hidrolizada} \quad (9)$$

Aquí, la $DQO_{soluble}$ corresponde a AGV, otros productos (algunos identificados mediante HPLC) y sustrato no convertido, pero si hidrolizado. La ecuación se analiza en detalle en el anexo 8.7.6.

4.4.7 Ratios

Ratio 1: representa el grado de acidificación global. Es la cantidad de DQO que fue transformada a AGV. Para esto, se utilizan los datos de g DQO/L equivalentes a AGV obtenidos en la sección 4.4.2 Ácidos grasos volátiles producidos y totalizar esta DQO. Con esto, se reemplaza en la ecuación (10) para obtener el siguiente Ratio.

$$Ratio\ 1 = \frac{DQO_{AGVf}}{DQO_{t0}} \quad (10)$$

Donde f corresponde a la concentración en DQO/L de cada AGV en una muestra determinada.

Ratio 2: representa el porcentaje de acidificación puntual. Mientras más se acerque el valor de este Ratio a 1, mayor es la cantidad de AGV que se corresponden a la DQO soluble medida en las analíticas. Para esto, se utilizan los datos de g DQO/L equivalentes a AGV obtenidos en la sección 4.4.2 Ácidos grasos volátiles producidos. Con esto, se reemplaza en la *ecuación (11)* para obtener el siguiente Ratio.

$$Ratio\ 2 = \frac{DQO_{AGVf}}{DQO_{ti}} \quad (11)$$

Donde t_i es la concentración de DQO en una muestra determinada y f es la concentración en DQO/L de cada AGV en una muestra determinada.

4.4.8 Estimación de la composición de PHA teórico

A partir de la Tabla 1 se pueden realizar correlaciones para estimar la composición de PHB y PHV que se puede producir a partir de las corrientes de AGV obtenidas en este trabajo. Con estos datos se obtiene la Tabla 2.

Tabla 2. Valores calculados para realizar las correlaciones para la estimación teórica de la producción de PHA a partir de las corrientes de AGV de este trabajo.

	HB % mol	HV %mol	Carbono par	Carbono impar
Ácido acético	96	4	100	
Ácido propiónico	37	63		100
Mezcla 4	47	53	55	45
Mezcla 5	65	35	72	28
Mezcla 1	61	39	69	31
Mezcla 2	79	21	85	15
Mezcla 3	85	15	90	10

Graficando estos datos, se puede obtener las correlaciones del anexo 8.7.7. Para poder estimar los porcentajes de PHB y PHV que se pueden producir a partir de las corrientes generadas en este trabajo, se debe seguir la *ecuación (12)*.

$$\%Moles_j = \left(\frac{\%masa/masa_j}{Moles_{Totales}} \right) \cdot 100 \quad (12)$$

Donde j corresponde al AGV de cada corriente. Luego, simplemente se suman los $\%Moles_j$ de los AGV de carbonos par y los impares y se aplican las correlaciones.

5. Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la cantidad de AGV formados según el sustrato y el inóculo, y la discusión correspondiente. Seguido a esto, se presentan las dificultades para determinar el sustrato sin consumir. Luego se analizan los resultados de pH obtenidos en los ensayos y su efecto en los ratios planteados, para llevar un registro de la evolución de los ensayos. Finalmente, se presentan los resultados teóricos de PHA que se obtendrían de cada corriente experimental y se compara con bibliografía.

5.1 Ácidos Grasos Volátiles formados

A continuación, se presentan los ácidos grasos volátiles obtenidos, en unidades de mg AGV/L. Los resultados se presentan por ensayo. Los valores entregados corresponden a un promedio de los triplicados de las series, donde se visualizan las correspondientes desviaciones estándar. Un ejemplo se encuentra en el anexo 8.4.

- **Primer ensayo: influencia de la matriz lipídica compleja del aceite sobre la producción de AGV en comparación con un sustrato simple (glucosa)**

Como se puede observar en la Figura 1, el AGV más producido fue el ácido acético, aumentando sobre todo hacia el final del ensayo, indicando que se llegó a la acetogénesis y sugiriendo la existencia de una fase de aclimatación/activación al inicio del ensayo. Esta fase de latencia puede explicarse por el hecho de que el inóculo haya estado previamente almacenado a 4 °C. La toma de muestras de este ensayo según la presión puede verse en el anexo 8.6.2

Si bien es cierto que el ácido acético ha sido el producto principal para ambos sustratos, las cantidades producidas son significativamente diferentes alcanzándose 3.557 y 589 mg acético/L, para las series de glucosa y aceite, respectivamente. Esto sugiere que, o bien una gran proporción del aceite ha quedado sin convertirse o bien que los productos formados son otros diferentes a los AGV.

Como se puede observar en la Figura 1.a, la cantidad de ácido N-butírico disminuye ligeramente el día 8 en la serie de glucosa, implicando un aumento del ácido acético que puede estar relacionado con las reacciones de formación de acetato de la Tabla 9.

Cabe mencionar que, para la serie de blancos se excluyó la botella A, en la serie de glucosa la botella B y en la serie de aceite la botella A. Dado que no se agregó sustrato a las botellas blancas, era de esperar que no se produjera una gran cantidad de AGV en las mismas, logrando un máximo de 70 mg AGV/L, valor que resulta despreciable con respecto a las otras series.

En cuanto al pH, en la serie de blancos, este bajó de 8,12 a 7,10 aproximadamente. En el caso de la serie de aceite, ésta logró bajar de un pH de 7,46 a 7,14. En ambos casos, el pH se encuentra dentro del rango de buen funcionamiento de las bacterias metanogénicas, sin embargo, no se observó producción de metano, presumiblemente debido a la alta concentración de amonio libre (Figura 6), donde según lo encontrado por (Zhao et al., 2018), con una concentración de 19,3 mg AL/L las arqueas metanogénicas están completamente inhibidas y con 1,9 mg AL/L lo están en un 23%. De hecho, esta alta concentración afectó a tal punto al proceso, que incluso inhibió la acidogénesis en un 48% y 25% y la hidrólisis en un 45% y 23% según el día y la disminución del pH (Figura 6).

Como se ha mostrado en la *ecuación (1)*, el pH es el factor que afecta en mayor medida a la concentración de AL y lo hace de forma exponencial. Así el pH se ha seleccionado como el parámetro clave para la discusión de la posible inhibición por AL. En las botellas de la serie de aceite, el pH inicial era de 8,2 por lo que el valor de AL resultante indica inhibición de metanogénesis hasta el día 5, con una inhibición de hidrólisis y acidogénesis cercana al 50% (Zhao et al., 2018), como se describe en la sección 3.2.1.5 Amonio libre, por lo que no resulta extraño que se hayan obtenido resultados tan bajos de AGV comparados con los de la serie de botellas de glucosa.

En el ensayo en el que se ha empleado glucosa como sustrato, la producción de ácidos (AGV) hizo que el valor de pH descendiese más rápido y, por consiguiente, la concentración de AL, por lo que la hidrólisis estuvo inhibida en un 48% y la acidogénesis en un 45% sólo hasta el segundo día.

Los resultados contradicen en parte lo expuesto por (García-Aguirre et al., 2017) sobre que los sustratos ricos en carbohidratos favorecen la producción de ácido propiónico y butírico. Por otra parte, los resultados se encuentran dentro de lo esperado según Rombouts, 2020, quien obtuvo corrientes mayoritarias en ácido acético con respecto a otros AGV usando glucosa como sustrato a una temperatura de 30 °C.

En el caso del aceite, los resultados obtenidos por (Silva et al., 2013) para corrientes ricas en aceites y grasas a 37 °C indican que se obtiene como principal producto el ácido acético, lo que se corresponde con los resultados. Sus experimentos con corrientes aceitosas tenían pH alrededor de 6,2 (suero de queso) y 5,3 (residuos de almazara).

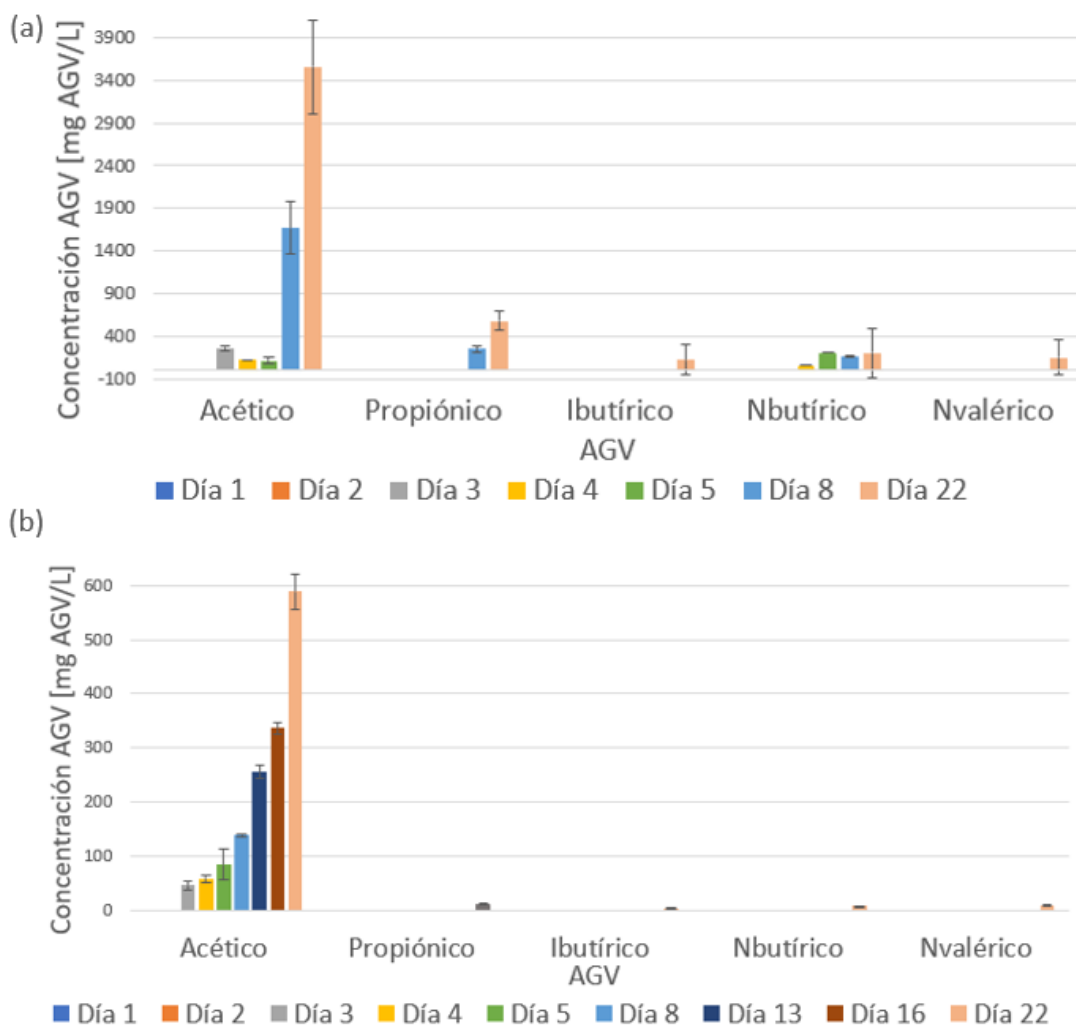


Figura 1. Ácidos grasos volátiles producidos en las botellas con glucosa (a) y de aceite (b) en el primer ensayo batch.

Si bien se quería inhibir la metanogénesis, la alta concentración de AL resulta demasiado dañina para la velocidad del resto del proceso.

- **Segundo ensayo: análisis del efecto del cambio de sustrato en la producción de AGV con un sustrato de matriz lipídica compleja como el aceite en comparación con un sustrato simple (glucosa)**

En este ensayo, para efecto de los gráficos, en la serie de glucosa se eliminó la botella B y se promedió la A y la C. En el caso de la serie de aceite se eliminó la botella A.

Con el cambio de inóculo por uno recién recogido en la EDAR de Vigo, se obtuvo resultados de AGV mucho más altos que en el anterior ensayo (Figura 1), como se puede ver en la Figura 2 y Figura 3. Esto se debe principalmente a que el nuevo lodo utilizado estaba más activo y no contenía niveles tan altos de nitrógeno.

El primer día hubo una concentración promedio de 7 mg AL/L, para el segundo día, las botellas con glucosa ya tenían menos de 1,9 mg AL/L y las de aceite sólo 2 mg AL/L. Más que realmente un efecto de inhibición, se considera que el nitrógeno era alto porque recién estaba comenzando el proceso de aclimatación, y la concentración de nitrógeno disuelto comenzó a disminuir con el crecimiento de los microorganismos. El resto del ensayo, el nivel de AL se mantuvo por debajo de los niveles de inhibición establecidos.

Además de diferencias en la producción total, se observa que, en este caso, el perfil de productos obtenidos en el caso del ensayo de glucosa es diferente con una mayor prevalencia de ácido butírico seguido por ácido acético.

A diferencia del ensayo anterior, en este se tuvo que tomar muestras extra de las botellas de glucosa durante el mismo día, dado que la reacción de producción de AGV era mucho más veloz que en el caso del aceite.

Se observa que el máximo de producción de AGV se ha medido en el día 7 (881 mg acético/L y 2.285 mg Nbutírico/L), y las botellas presumiblemente se estabilizaron durante el fin de semana ya que, aunque durante este día no se observó un incremento de presión y por lo tanto no se tomó muestra de nuevo hasta finalizar el ensayo, se observó un ligero descenso de los AGV producidos.

En este caso, los AGV obtenidos están de acuerdo con lo propuesto por Garcia-Aguirre et al., 2017 sólo con respecto a que las corrientes ricas en carbohidratos favorecen la producción de ácido butírico. Por otra parte, no se sostuvo el favorecimiento de la producción de ácido propiónico.

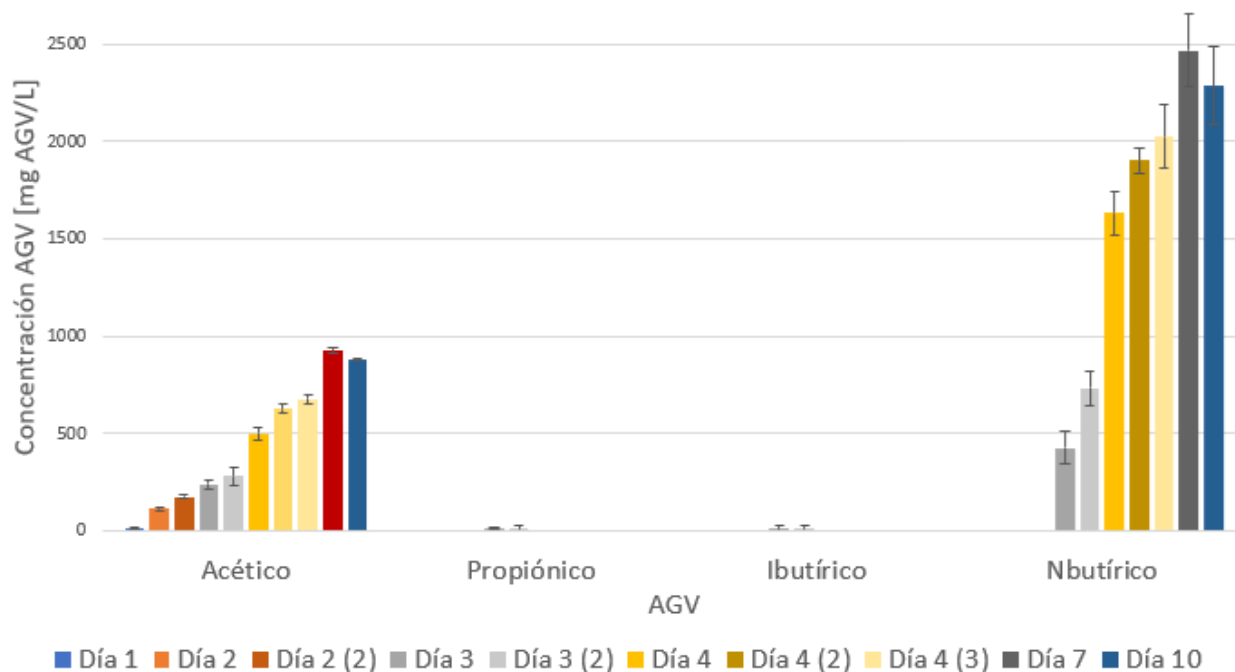


Figura 2. Ácidos grasos volátiles producidos en las botellas con glucosa en el segundo ensayo batch..

Esta serie sí presentó producción de metano, aunque en cantidades muy bajas y cada vez en menor concentración (menos de 1 mol en ambas series hacia el final del ensayo). Esto se debe a que, al aumentar la cantidad de AGV producidos, disminuye el pH, inhibiendo la metanogénesis.

Como se puede ver en la Figura 3, las cantidades obtenidas de AGV en las series de aceite en todos los casos es menor que los obtenidos por la serie de botellas de glucosa. En este caso, el perfil de AGV es claramente diferenciado, con ácido acético como producto principal seguido del ácido propiónico, butírico y concentraciones bajas pero detectables de ácido valérico, el cual no se obtuvo en el ensayo anterior (Figura 1).

En el caso de este ensayo con aceite, este se extendió durante el período no lectivo de Navidad. En ese período, se tomaron 3 muestras que se congelaron, pero no se consideró que la congelación puede alterar gravemente los resultados obtenidos en las analíticas de AGV. Por esto, los datos de esos días fueron eliminados del análisis de resultados.

La obtención de cantidades menores de AGV en la serie de botellas de aceite no es una sorpresa, debido principalmente a que el aceite tuvo que ser hidrolizado por enzimas primero para luego poder usar el sustrato soluble.

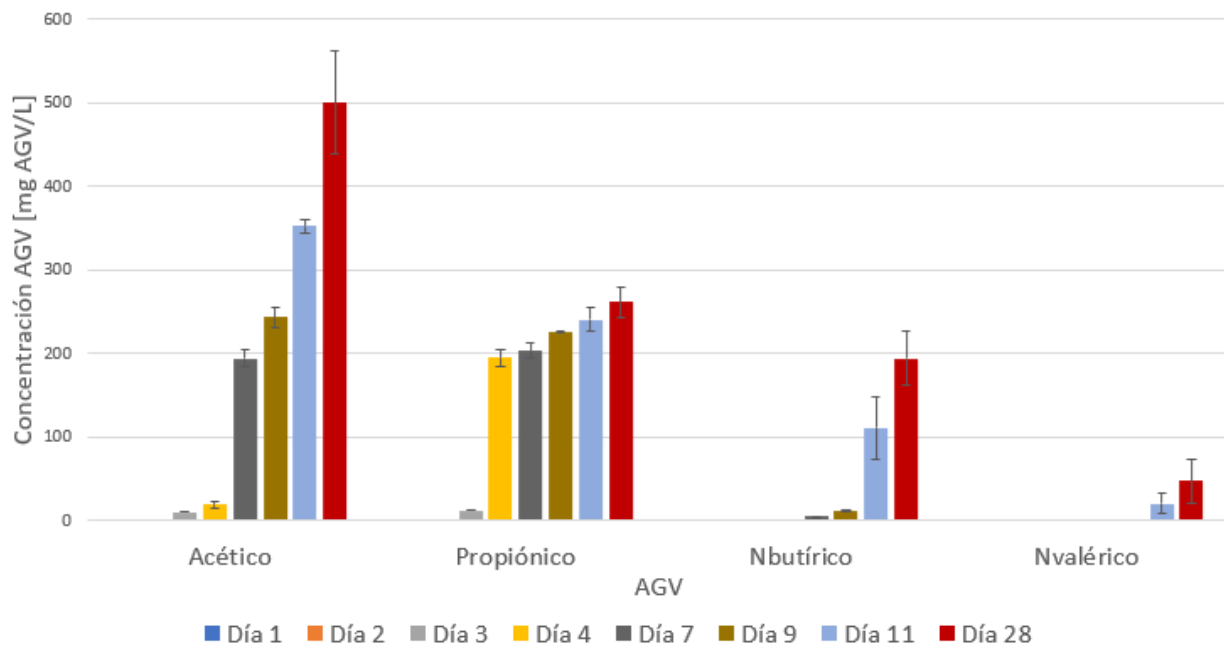


Figura 3. Ácidos grasos volátiles producidos en las botellas con aceite en el segundo ensayo batch.

Como se mencionó en un principio, la hidrólisis es considerada la etapa limitante en la velocidad global de los procesos de digestión anaerobia. Estas botellas estuvieron 28 días en funcionamiento y el proceso pudo haber sido detenido el día 26 de diciembre (día 14) cuando la sobrepresión dejó de aumentar, sin embargo, las instalaciones se encontraban cerradas, por lo que el proceso se terminó el día 8 de enero. Resulta interesante la aparición de ácido valérico, dado que este comenzó a aparecer en el día 11. Su generación puede deberse principalmente a las reacciones secundarias mencionadas en la Tabla 8, anexo 8.1.4, dado que, si se pone atención al ácido propiónico, este tuvo un descenso en las últimas muestras.

Al comparar los datos con la literatura, se observa que Silva et al., 2013 estudiando la fermentación acidogénica para la producción de AGV empleando una concentración de materia orgánica de 8 g DQO/L y con una corriente residual de suero de queso (considera rica en grasas) obtuvo entre 2,40 y 3,40 AGV en unidades de g DQO/L. Como el suero de queso pertenece a una de las industrias productoras de corrientes residuales altas en aceites y grasas (Holohan et al., 2022), se considera una buena comparación. Según este estudio, entonces, los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros esperados, dado que se obtuvo 2,34 g DQO/L equivalentes a AGV.

- **Tercer ensayo: vías estudiadas para mejorar el proceso de hidrólisis mediante la disminución de concentración de aceite y el cambio de inóculo a ácido oleico**

En este ensayo no se eliminó ninguna botella para los análisis, dado que no hubo resultados anómalos. En la Figura 4 se puede observar la concentración de AGV en mg/L durante el ensayo realizado con 10 g DOQ/L de aceite.

En este ensayo, los productos principales obtenidos son acético y butírico. El día 8 se inyectaron 4 mL de glucosa (1 g DQO/L) y su efecto se puede ver de manera casi inmediata en la cantidad de AGV producidos durante el mismo día, incrementándose considerablemente.

El descenso en la cantidad de AGV en el día 14 puede deberse a que los AGV comenzaron a transformarse en metano, dado que hubo un gran aumento de metano entre el día 11 y 14.

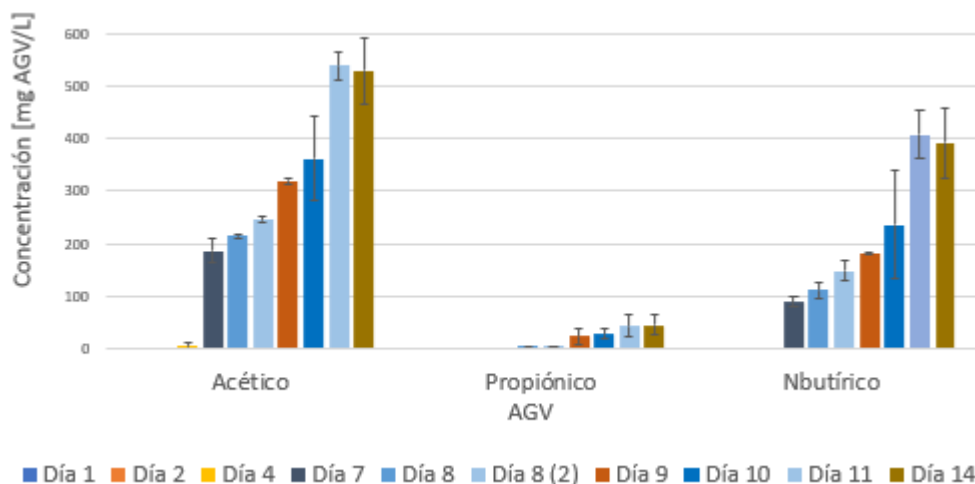


Figura 4. Ácidos grasos volátiles producidos en las botellas de ácido oleico en el tercer ensayo.

En el caso de las botellas de aceite con menor concentración de DQO que en los ensayos anteriores, se tiene que la serie de Aceite de menor concentración de DQO no produjo una cantidad suficiente de AGV como para que entrara en el rango de lectura del equipo.

Los AGV producidos por la serie de botellas de Aceite con 2,50 g DQO/g SSV se presentan a continuación (Figura 5). De nuevo, como en el anterior ensayo con aceite, los principales compuestos obtenidos son ácido acético y ácido propiónico.

Como se aprecia en la Figura 5, no se produjeron AGV suficientes para ser cuantificados por el equipo hasta el día 4.

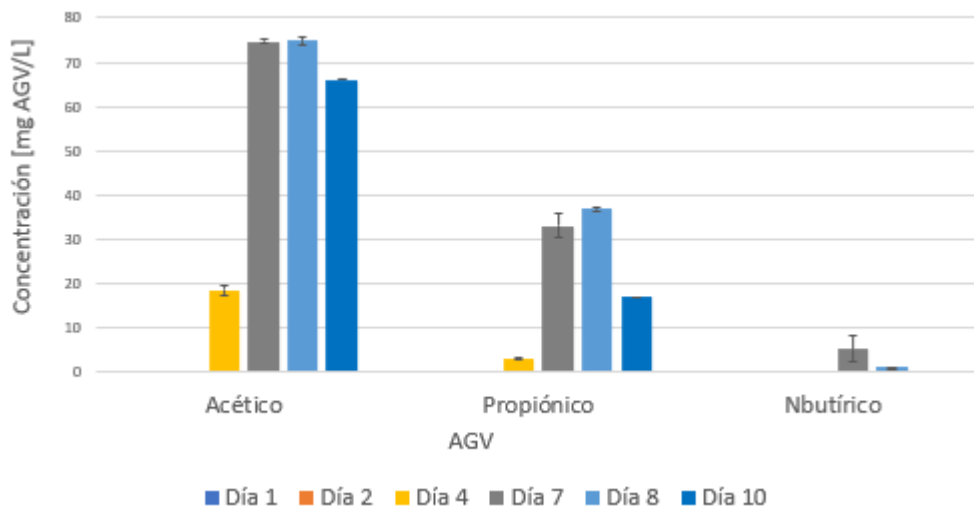


Figura 5. Ácidos grasos volátiles producidos en las botellas de Aceite 1,87 g DQO/L en el tercer ensayo.

En el estudio de Silva et al., 2013 con una corriente de residuo de almazara con una concentración de 8 g DQO/L obtuvo una cantidad de AGV de 0,93 g DQO/L. Este tipo de corriente también es alta en contenido de ácidos y grasas según (Holohan et al., 2022). En este caso, el parámetro obtenido en el trabajo estaría por encima de lo esperado, sin embargo, al compararlo con sus resultados para el suero de queso (2,3-3,4 g DQO/L) se encuentra por debajo de lo esperado, dado que se logró producir sólo 1,34 g DQO/L correspondientes a AGV.

5.2 Sustrato sin consumir

El sustrato sin consumir se relaciona al balance de materia, el cual tuvo muchas dificultades y se puede ver con más detalle en el anexo 8.8. Entre las dificultades se encuentra el hecho de que durante el segundo ensayo se tuvo que dejar botellas despresurizando para evitar accidentes (por lo que no se pudo medir los moles de gases). Además, el segundo ensayo se extendió demasiado por el periodo no lectivo de Navidad. En el tercer ensayo se obtuvo una gran cantidad de compuestos desconocidos.

Un análisis del avance de la DQO soluble en los ensayos se llevó a cabo como primera aproximación a su influencia en el tratamiento de los parámetros. Ver anexo 8.11.

5.3 Efecto de la DQO soluble y pH sobre los ratios establecidos

En el siguiente apartado se estudiará como varían los Ratios según los AGV obtenidos y el consumo o formación de DQO soluble. Los gráficos que representan los Ratios se encuentran en el anexo 8.9, Figura 31, Figura 32 y Figura 33 para los ensayos 1, 2 y 3, respectivamente.

- **Primer ensayo**

Hay una muy notable diferencia entre la DQO soluble presente en la serie a la que se le puso glucosa (9,97 g DQO/L) y a la que se le puso aceite (1,32 g DQO/L).

Como se puede ver en la Figura 6, el valor de pH se mantiene alrededor de 6 entre los días 3 y 5.

Como se puede ver en la Figura 1, durante los días 8 y 22 los valores aumentan significativamente con respecto a los anteriores. Debido a la diferencia de 14 días entre el día 8 y el 22, se podría esperar que la cantidad de AGV hubiese seguido aumentando, sin embargo, al revisar el valor de DQO no convertida, se ve que este es muy cercano a 0, por lo que se entiende que esta serie no continuó produciendo AGV porque no quedaba DQO soluble (glucosa) para consumir.

De manera completamente diferente, se tiene el caso del aceite, el cual inicia el ensayo con un valor de DQO soluble de 1,31 g DQO, esto debido a que este debe pasar por el proceso de hidrólisis. Por otra parte, los microorganismos se encontraron inhibidos alrededor del 50% hasta el día 4. Así, se tiene que la DQO soluble aumenta lentamente a medida que la hidrólisis se lleva a cabo y esta es transformada a AGV.

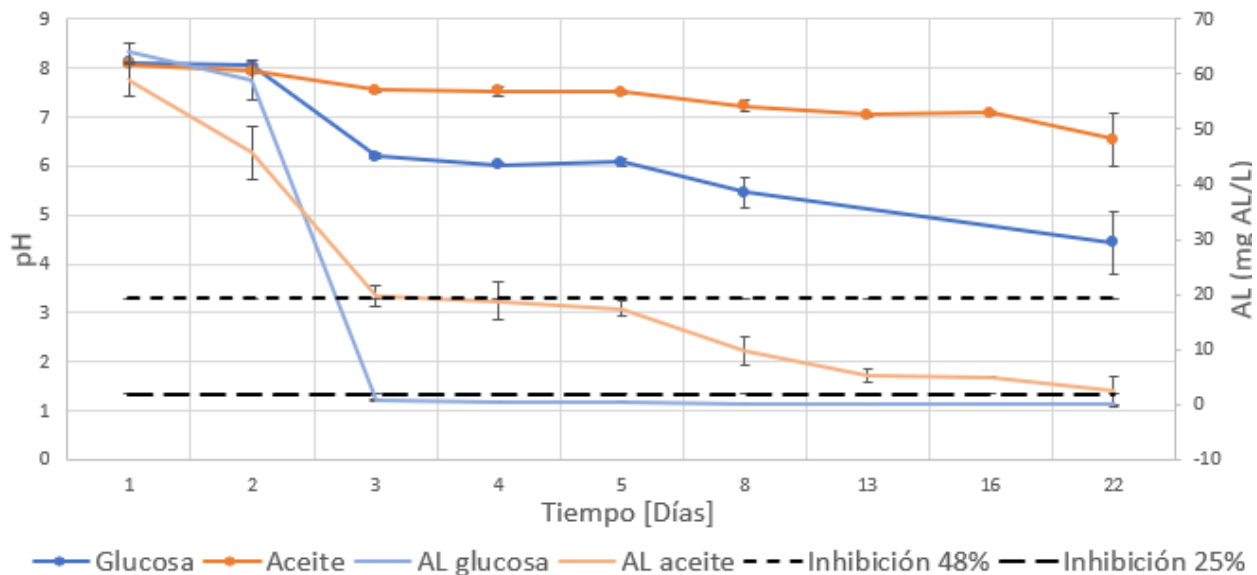


Figura 6. Valores de pH e inhibición por amoníaco libre (AL) en la acidogénesis alcanzados durante el primer ensayo.

El comportamiento de los ratios propuestos se encuentra en la Figura 31, anexo 8.9. Se observa que la glucosa inicia en un 100% de DQO soluble con respecto a la puesta inicialmente en la botella. Con el Ratio 1 se puede comprobar que los AGV siguieron produciéndose, sin embargo, también representa que no toda la DQO fue convertida a AGV ya que estos representan un 40% de la DQO inicial. Debe tenerse en consideración la DQO que se utiliza para generar energía y llevar a cabo el crecimiento celular (6% en el caso de la serie de glucosa y 2% en el caso de la serie de aceite).

Además, puede haber productos solubles no identificados por los equipos, como muestra el Ratio 2 (Figura 31.c, anexo 8.9), en la cual se puede ver que aproximadamente el 40% de la DQO soluble al final del ensayo se corresponde con los AGV. Si bien a primera vista pareciera que la serie del aceite no alcanzó un valor muy alto de acidificación (29%), según lo encontrado por (Atasoy et al., 2018) sobre el glicerol, un producto de la hidrólisis del aceite, el glicerol solo logró un 11-13% de acidificación, siendo que se hubiese esperado que el valor fue mayor al no tener una hidrólisis tan limitante.

Todo apunta a que, si no hubiesen estado tan inhibidos por AL o si el ensayo hubiese continuado, los Ratios 2 y 3 podrían haber sido mucho más altos. Al igual que en el caso del Ratio 1 en la glucosa, esto indica que no toda la DQO se convirtió en AGV. Al realizar una cromatografía líquida de alta resolución se encontró presencia de otros compuestos, los cuales no pudieron ser

identificados. Los compuestos que se cree que podrían estar presentes se encuentran en la Tabla 13, anexo 8.1.8.

- **Segundo ensayo**

Durante el segundo ensayo se obtuvo valores significativamente diferentes con respecto al primer ensayo. Una de las principales diferencias es que el ensayo 2 en la serie de glucosa iba tan rápido que hubo días como el 4 y 5 donde se tomaron 2 y 3 muestras, respectivamente.

La larga duración de la serie de botellas de aceite se puede explicar debido a dos razones. Por una parte, como la hidrólisis es la etapa cinética limitante del proceso global y apenas se observaba un incremento en la presión de las botellas y el de la DQO era también muy limitado, se decidió inyectar 4 mL (1 g DQO/L) de glucosa el día 9, con intención de que esto facilitara la hidrólisis al proveer DQO soluble que sirviera de alimento para que las bacterias con capacidad de sintetizar las enzimas hidrolíticas pudieran operar. Este cambio se vio representado en la siguiente toma de muestra (día 11), en la que se observa un incremento de la DQO soluble. Para ese día en específico se realizó un análisis de HPLC a las muestras y se encontró que había 577 mg/L de glucosa y 46 mg/L de ácido succínico. Esto indica que la glucosa se estaba consumiendo, no ayudando a hidrolizar. Por otra parte, este ensayo coincidió con las vacaciones de Navidad, por lo que no se podía trabajar en la facultad ni analizar tomar muestras.

Si se observa la Figura 7, se puede ver que hasta el día 11, el pH disminuyó y prácticamente se estabilizó hasta el día 28. Si se compara esto con la Figura 37, se ve que se siguieron produciendo AGV.

Como se discutió en el apartado de 3.2.1.1 Sustrato, la lentitud de la hidrólisis en lípidos se debe a que esta produce AGCL y glicerol. Los AGCL podrían inhibir el metabolismo de las bacterias anaeróbicas, ya que se adhieren a las paredes celulares y tienden a disminuir el transporte de nutrientes (Alibardi & Cossu, 2016; Yin et al., 2016).

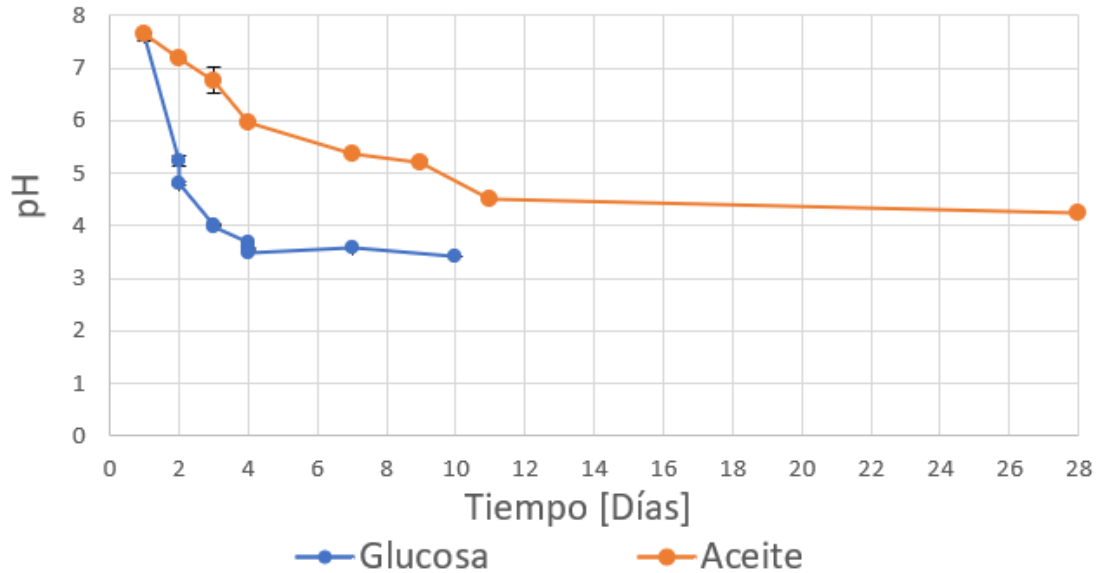


Figura 7. Valores de pH alcanzados durante el segundo ensayo.

Esto último puede explicar porque, a pesar de inyectar glucosa, esta no pudo actuar de manera veloz como se esperaba que pasase, si no que los resultados comenzaron a verse 2 días después a través de la presión (Figura 17, anexo 8.5). Por otra parte, en el caso de los sustratos complejos la hidrólisis es limitada por la disponibilidad de área superficial libre en las partículas (López et al., 2017). Esto podría explicar la fase de latencia observada una vez añadida la glucosa. Se pueden ver fotografías de las botellas en la Figura 34, anexo 8.10.

En este ensayo y en el anterior, las series de aceite presentaron grandes aglomeraciones de aceite en la superficie del líquido. Esto afectó la posibilidad de llevar a cabo la hidrólisis. En comparación con el primer ensayo, el consumo de glucosa fue mucho más rápido al principio, además de que se produjeron muchos más AGV como se comenta en la sección 5.1 Ácidos Grasos Volátiles formados.

Al igual que en el ensayo anterior, la serie de botellas de glucosa que obtuvo valores de pH más ácidos. Al no estar inhibidos por AL, esta vez, el pH alcanzó un valor de 3,43. Si bien las bacterias acidogénicas todavía pueden estar activas en un pH 3-4, su rango óptimo, es de 5-11 (Fra-Vázquez et al., 2020), por lo que posiblemente ya no estaban funcionando normalmente después del día 4. Por otra parte, al calcular la DQO no convertida se observa que se consumió toda la glucosa. A continuación, en la Figura 32 se presenta el efecto de los sucesos en los Ratios determinados.

Sobre el Ratio 1, el 70% de la glucosa fue valorizada a AGV, observándose que prácticamente el total de la DQO soluble se justifica con las concentraciones de acético y butírico determinadas (Ratio 2). Resultados similares fueron encontrados por Tamis et al., 2015 en su estudio de la fermentación de glucosa a distintos pH. Para un pH de 4,5 tuvo una conversión del 66%, siendo el producto mayoritario ácido butírico, y por sus resultados se intuye que de haber seguido bajando el pH se hubiesen producido más AGV. El resto puede encontrarse como crecimiento de biomasa, producción de hidrógeno u otros productos de la fermentación.

El Ratio 1 en el caso del aceite, también alcanza un valor aproximado del 20% pero, al igual que en el ensayo 1, éste aumenta progresivamente a lo largo del ensayo indicando la conversión de los productos solubles de la hidrólisis en AGV. Además, un 9% pertenece a la biomasa inicial y una parte corresponde a otros compuestos. Dado que se trata de aceite, los compuestos podrían ser glicerol u AGCL que se verían en un HPLC. Este Ratio es menor al esperado (30%) según el estudio de Silva et al., 2013 con suero de queso. Por otra parte, es mucho mayor que el Ratio 2 del ensayo 1 (6%), indicando que se logró hidrolizar y formar más del triple de aceite a AGV.

El Ratio 2 es el que resulta más llamativo, y claramente diferente al ensayo 1, dado que indica, en ambos casos, que la DQO soluble que había en el líquido hacia el final del ensayo corresponde casi en su totalidad a AGV. Dado que uno de los objetivos de este trabajo es producir AGV, esto resulta bastante alentador para futuras investigaciones.

- **Tercer ensayo**

Dados los objetivos de este ensayo, las concentraciones de aceite en unidades de DQO empleadas fueron son de 10 g/L, 1,87 g/L y 0,75 g/L, en el caso del ácido oleico y las dos muestras de aceite, respectivamente.

Ninguna de las series tenía todo el sustrato introducido en forma de DQO soluble. En el caso de los aceites se tuvo que pasar por un proceso de hidrólisis, el cual es un proceso lento. Por otra parte, el ácido oleico, al ser un resultado de la hidrólisis del aceite, no debería pasar por esa etapa, sino que sólo por la solubilización. En todos los casos de esta serie se formaron flóculos que flotaban en la superficie del líquido. Esto se puede ver en fotografías en la Figura 35, anexo 8.9.

En el caso del ácido oleico, la cantidad de DQO soluble aumenta lentamente, hasta que el día 8 se le inyecta 1 g DQO/L correspondiente a glucosa, aumentando la DQO soluble significativamente.

Se esperaba que esta inyección lograra acelerar la hidrólisis, sin embargo, la DQO fue consumida para la producción de AGV. Esto se puede contrastar con la Figura 8 donde se ve que el valor del pH sigue bajando hasta el día 10. En esta figura, además, se puede ver que la pendiente de disminución de pH se ve incrementada tras la adición de la glucosa, sugiriendo una mayor producción de AGV.

Un problema presentado con el ácido oleico es el encontrado por (Cavaleiro et al., 2016) es que durante la hidrólisis los AGCL no logran degradarse completamente. Además, el ácido oleico es continuamente convertido a ácido palmítico sin degradarse completamente mediante la β -oxidación, pero su razón es desconocida. En un estudio sobre degradación del ácido oleico llevada a cabo por (Pereira et al., 2005), se encontró que se acumulan AGCL en el líquido, siendo estos en un 80% ácido palmítico. En un estudio llevado a cabo con ácido oleico por Lalman & Bagley, 2001 en un reactor semicontinuo, para degradar una concentración de 100 mg/L de este ácido tardaron 30 días.

En el caso de las botellas de aceite sus pH bajaron lentamente. Como estas dos series nunca salieron del pH óptimo para el crecimiento y funcionamiento de las bacterias metanogénicas, se produjo metano.

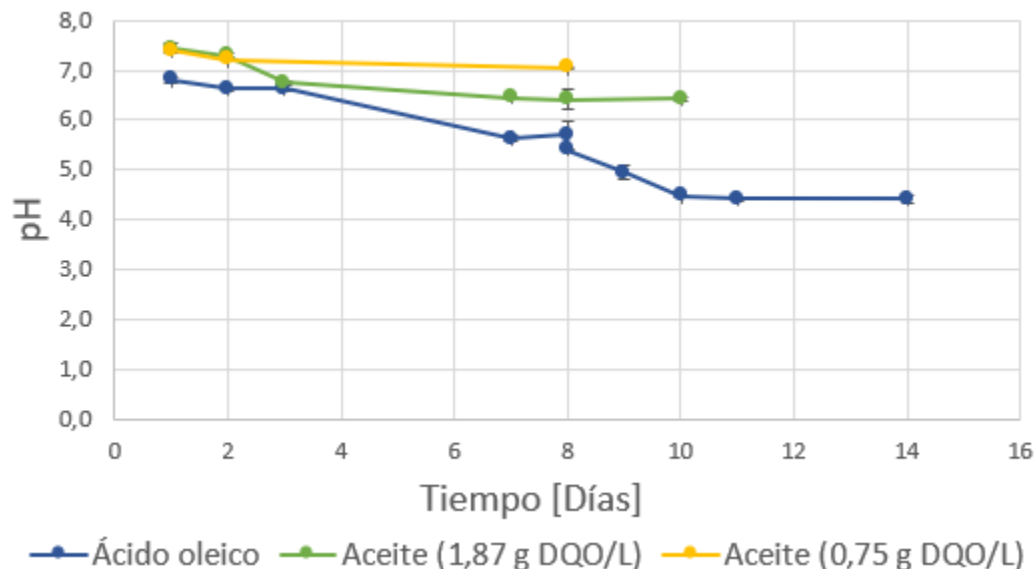


Figura 8. Valores de pH alcanzados durante el tercer ensayo.

Las botellas con ácido oleico, por otra parte, tardaron alrededor de 5 días en lograr pasar el límite inferior de pH óptimo de las arqueas metanogénicas (6,5), por lo que también se formó metano en este ensayo. El ácido oleico tenía un porcentaje menor de metano que la serie de aceite del ensayo 2. El efecto en los Ratios propuestos en este trabajo se puede ver en la Figura 33, anexo 8.9.

En el Ratio 1 y 2 en el caso del Aceite (1,87 g DQO/L) se puede ver un descenso, debido a una menor cantidad de AGV. Esto puede deberse a una degradación en las muestras o simplemente a un error, dado que las concentraciones eran muy bajas. De nuevo, el Ratio 1, no superó el 10% y, al contrario del anterior ensayo, en este caso los AGV tan solo representan como máximo el 30% de la DQO soluble, apoyando la hipótesis de que las concentraciones bajas de AGV presentes pueden llevar a importantes errores analíticos.

En el Ratio 2 de la serie de ácido oleico, se puede ver que el porcentaje de acidificación aumenta hasta el día 7, luego se mantiene hasta el 8 sugiriendo una limitación de la hidrólisis/solubilización y comienza a descender. Posiblemente los microorganismos comenzaron a consumir los AGV. En este mismo Ratio, en el día 8 hay un súbito descenso desde un 43% a un 26%. Esto se debe a un aumento de la DQO soluble disponible debido a la inyección de glucosa. Al día siguiente (día 9), se puede ver que comienzan a formarse en AGV y aumenta la acidificación hasta llegar a un valor de 77% en el último día.

Se esperaba alcanzar un grado de acidificación mayor tanto en la serie de ácido oleico como en la de Aceite (1,87 g DQO/L), sin embargo, comparado con el ensayo 2 (99%), se obtuvo valores mucho menores. En el caso del ácido oleico puede ser porque se produce ácido palmítico continuamente según lo encontrado por Cavaleiro et al., 2016, el cual no es un AGV, si no un AGCL de 18 carbonos. La transformación de ese AGCL en ácido palmítico probablemente entorpeció el proceso volviéndolo menos eficiente, dado que la degradación de este ácido es lenta y también se identificó como el principal compuesto en las bolas de grasa que flotan (Holohan et al., 2022). En el caso del Aceite (1,87 g DQO/L), se esperaban mejores resultados dado que una mayor cantidad de área del aceite quedaría expuesta, sin embargo, se repitió lo visto en los ensayos 1 y 2, o sea que se forman flóculos.

- Comparación de resultados de los ensayos

En la siguiente tabla se presentan los valores máximos de AGV obtenidos en cada serie. Entre el primer y segundo ensayo vemos que, al cambiar el inóculo, la producción de AGV aumentó en un 42,7% y un 78% en los casos de la glucosa y el aceite, respectivamente. Al comparar el segundo ensayo con el tercero la producción de AGV disminuyó en un 54% para el ácido oleico al compararlo con el aceite.

Debe tenerse en cuenta que las concentraciones de aceite del segundo ensayo y el ácido oleico tenían la misma concentración de g DQO/L, pero el Aceite (1,87 g DQO/L) tiene una menor concentración. Por eso, habrá que compararlo como porcentaje de AGV obtenidos según la concentración inicial. En el segundo ensayo, de los 10 g DQO/L introducidos, sólo 2,94 g DQO/L se convirtieron a AGV, o sea un 29,4%. En el tercer ensayo se introdujo 1,87 g DQO/L y se transformaron 0,14 g DQO/L a AGV, o sea un 7,25%.

Tabla 3. Valores máximos obtenidos de AGV en los ensayos en unidades de DQO/L.

Primer ensayo	Glucosa	3,97
	Aceite	0,63
Segundo ensayo	Glucosa	6,93
	Aceite	2,94
Tercer ensayo	Ácido oleico	1,34
	Aceite	0,14

**La serie de botellas aceite del tercer ensayo eran las únicas con 1,87 g DQO/L, las otras tenían 10 g DQO/L*

Así, se pudo aumentar la producción de AGV entre el primer y segundo ensayo, pero entre el segundo y el tercero, no se logró. Dadas las hipótesis presentadas, llama la atención que el ácido oleico no haya logrado una mayor producción que el aceite. Comparando con la bibliografía, según los resultados de Silva et al., 2013 para la producción de AGV a partir de suero de queso (3,37 g DQO/L) y residuos de almazara (0,934 g DQO/L), los resultados para el segundo ensayo, el cual fue el de mayor producción, se encontraban entre lo esperado, sin lograr superar el máximo.

5.4 Cantidad teórica de PHA que se puede producir

En la Tabla 4 se presentan los datos de las composiciones calculadas para cada ensayo. Como es habitual, en todos los casos se forma una mayoría de PHB con respecto a PHV. Esto debido a dos razones: la primera, el ácido acético es el AGV de mayor cantidad en todos los casos y, al ser de cadena de carbonos par, genera PHB en su mayoría. La segunda, aunque hubiese una corriente con una gran cantidad de AGV de cadenas impares, como se puede ver en la Tabla 1 en la corriente de ácido propiónico puro, estas de todas formas forman una gran cantidad de PHB (HB:HV; 37:63). Según la relación de HB y HV el polímero tendrá unas propiedades (dureza, punto de fusión, cristalinidad, entre otras) diferentes. Ver anexo 8.1.6.3.

Los PHA obtenidos de estos ensayos corresponden a PHA de cadena corta, según lo descrito por (Cruz et al, 2015), dado que están formados a partir de ácidos grasos con un máximo de 5 carbonos. En general, la mayoría de los PHA de cadena corta son muy rígidos y quebradizos debido a su alta cristalinidad.

Tabla 4. Porcentaje teórico de PHA producible con las corrientes obtenidas en los ensayos.

Ensayo	Sustrato	Composición de AGV	Composición de PHA
		(%mol) (HAc:HPr:HBt:HVa)	(%mol) (HB:HV)
1	Aceite	97:1:1:1	93:7
	Glucosa	82:11:5:2	82:18
2	Aceite	57:24:15:3	66:34
	Glucosa	36:0:64:0	96:4
3	Ácido oleico	64:4:32:0	91:9
	Aceite (1,87 g DQO/L)	83:17:0:0	77:23

*HAc: ácido acético, HPr: ácido propiónico, HBt: ácido butírico, HVa: ácido valérico.

**HB: polihidroxibutirato, HV: polihidroxivalerato

En el ensayo 2, en la corriente de aceite se tiene el mayor porcentaje de composición de PHV, por lo que resulta interesante de estudiar para la producción de PHA, dado que tanto en las corrientes revisadas en la literatura (Palmeiro, 2017 y Vázquez-Fernández et al., 2022), el mayor porcentaje de composición fue de 63% HV. Además de esto, el porcentaje de PHV o PHB no parece depender

sólo del sustrato en sí, sino también de su composición o disponibilidad según inhibición. Al comparar las series de aceite de los ensayos 1, 2 y 3 se tienen composiciones completamente distintas en la razón HB:HV, siendo 93:7, 66:34 y 77:23, respectivamente. Entre el ensayo 1 y 2 resulta interesante comparar el grado de acidificación (29% y 99%), dado que afectaron las rutas metabólicas de producción de AGV, obteniéndose no sólo distintos AGV (ensayo 2 no tiene isobutírico y el ensayo 1 tiene sí), sino que cantidades muy distintas.

Incluso el caso de la glucosa representa el efecto del grado de acidificación en la formación de distintos PHA, dado que en el primer ensayo se obtuvo un 41% y en el segundo un 96%, quedando en el final del segundo ensayo sólo AGV pares y formando en consecuencia una relación HB:HV de 96:4, la cual es muy diferente de la del primer ensayo (82:18). El efecto del grado de acidificación en la composición de los PHA sería de gran interés de estudio para poder controlar la composición de PHB y PHV según lo que se quiera obtener.

Se ha determinado que un biopolímero con una composición del 88:12 (HB:HV) podría sustituir al polietileno, mientras que es necesaria una mayor proporción de HV (81:19) para obtener características similares al propileno, siendo éstos los plásticos petroquímicos más empleados (Palmeiro, 2017). Así, se observa que el aceite es un sustrato con gran potencial para la obtención de biopolímeros con mayor HV, generalmente los más complejos de obtener, incluso en cultivos puros.

6. Conclusiones

La producción de AGV se ve fuertemente afectada por factores como pH, amoníaco libre y sustrato, principalmente. La concentración de nitrógeno puede llevar a una inhibición, sin embargo, si el pH desciende por la producción de AGV, aunque sea de manera lenta, se puede superar la inhibición. Por otra parte, todo el proceso se ve afectado por la hidrólisis del sustrato, la cual puede ser un gran limitante, por ejemplo, en las corriente ricas en lípidos.

Las hipótesis planteadas para el tercer ensayo con el objetivo de mejorar la hidrólisis fracasaron, dado que ni al utilizar ácido oleico ni al disminuir la relación de aceite/microorganismos se logró aumentar la cantidad de AGV producidos. Se observó que la variación de este último parámetro afecta al perfil de productos obtenidos.

La hidrólisis del aceite es un proceso complejo donde no todos los AGCL formados se logran degradar completamente. En específico, el ácido oleico se convierte en ácido palmítico, entorpeciendo el proceso de conversión a AGV. Además, en el caso de los sustratos complejos como los lípidos, la hidrólisis está limitada por la disponibilidad de área superficial y en este trabajo, tanto el aceite como el ácido oleico formaron flóculos que flotaban en la superficie del líquido. El uso de cultivos aclimatados a los lípidos, además de una agitación para un mezclado correcto podrían ser un buen acercamiento a la mejora en la producción de AGV a partir de estos.

La composición de PHA teórico que se obtendría de las corrientes de AGV resultantes fue estimada teóricamente, considerando que la relación entre PHB y PHV varía según el sustrato y condiciones de inhibición, entre otras.

Resulta llamativo estudiar a futuro el efecto del grado de acidificación sobre la composición de PHA, dado que se obtuvo valores muy distintos de PHV y PHB según este parámetro.

La inyección de la glucosa como método de aumento de la velocidad de la hidrólisis en las corrientes de aceite y ácido oleico, no surtió el efecto deseado en la corriente de aceite donde sólo se consumió sin promover la hidrólisis y degradación del aceite. Por otra parte, si se obtuvo un efecto en la corriente ácido oleico, pero retardado en dos días debido a que los AGCL pueden inhibir el metabolismo de las bacterias anaeróbicas al adherirse a las paredes celulares, disminuyendo el transporte.

7. Bibliografía

- Agostoni, C., & Bruzzese, M. G. (1992). Fatty acids: their biochemical and functional classification. *La Pediatria Medica e Chirurgica: Medical and Surgical Pediatrics*, 14(5).
- Albuquerque, M. G. E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., & Reis, M. A. M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, 151(1), 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.070>
- Alibardi, L., & Cossu, R. (2016). Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Management*, 47, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.049>
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., & Srinath, E. G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Water Pollution Control Federation*, 48, 835–852.
- Aremu, M. O., Ishola, M. M., & Taherzadeh, M. J. (2021). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from volatile fatty acids (VFAs) from organic wastes by pseudomonas oleovorans. *Fermentation*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation7040287>
- Argiz, L., Fra-Vázquez, A., del Río, Á. V., & Mosquera-Corral, A. (2020). Optimization of an enriched mixed culture to increase PHA accumulation using industrial saline complex wastewater as a substrate. *Chemosphere*, 247. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125873>
- Atasoy, M., Owusu-Agyeman, I., Plaza, E., & Cetecioglu, Z. (2018). Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. In *Bioresource Technology* (Vol. 268, pp. 773–786). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.042>
- Baranwal, J., Barse, B., Fais, A., Delogu, G. L., & Kumar, A. (2022). Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14050983>
- Begum, S., Anupoj, G. R., Sridhar, S., Bhargava, S. K., Jegatheesan, V., & Eshtiaghi, N. (2018). Evaluation of single and two stage anaerobic digestion of landfill leachate: Effect of pH and initial organic loading rate on volatile fatty acid (VFA) and biogas production. *Bioresource Technology*, 251, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.069>

- Cavaleiro, A. J., Pereira, M. A., Guedes, A. P., Stams, A. J. M., Alves, M. M., & Sousa, D. Z. (2016). Conversion of C_n-Unsaturated into C_{n-2}-Saturated LCFA Can Occur Uncoupled from Methanogenesis in Anaerobic Bioreactors. *Environmental Science and Technology*, 50(6), 3082–3090. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03204>
- Cheah, Y. K., Dosta, J., & Mata-Álvarez, J. (2019). Enhancement of volatile fatty acids production from food waste by mature compost addition. *Molecules*, 24(16). <https://doi.org/10.3390/molecules24162986>
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 99, Issue 10, pp. 4044–4064). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>
- Chuah, L. F., Yusup, S., Aziz, A. R. A., Klemeš, J. J., Bokhari, A., & Abdullah, M. Z. (2016). Influence of fatty acids content in non-edible oil for biodiesel properties. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 18(2), 473–482. <https://doi.org/10.1007/s10098-015-1022-x>
- Cruz, M., Freitas, F., Paiva, A., Mano, F., Dionísio, M., Ramos, A. y Reis, M. (2015) Valorization of fatty acids-containing wastes and byproducts into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates. *New Biotechnology* 33, 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.05.005>.
- Fra-Vázquez, A., Pedrouso, A., Val del Rio, A., & Mosquera-Corral, A. (2020). Volatile fatty acid production from saline cooked mussel processing wastewater at low pH. *Science of the Total Environment*, 732. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139337>
- Garcia-Aguirre, J., Aymerich, E., González-Mtnez. de Goñi, J., & Esteban-Gutiérrez, M. (2017). Selective VFA production potential from organic waste streams: Assessing temperature and pH influence. *Bioresource Technology*, 244, 1081–1088. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.187>
- Gracia, J., Montenegro, C., Moreno, N., & Cabeza, I. (2023). Production of Polyhydroxyalkanoates using Volatile Fatty Acids from Municipal Wastewater Treatment Plant Sludge. *Chemical Engineering Transactions*, 100, 559–564. <https://doi.org/10.3303/CET23100094>
- Holohan, B. C., Duarte, M. S., Szabo-Corbacho, M. A., Cavaleiro, A. J., Salvador, A. F., Pereira, M. A., Ziels, R. M., Frijters, C. T. M. J., Pacheco-Ruiz, S., Carballa, M., Sousa, D. Z., Stams, A. J. M., O’Flaherty, V., Van Lier, J. B., & Alves, M. M. (2022). Principles, Advances, and Perspectives of Anaerobic Digestion of Lipids. In *Environmental Science and Technology*

- (Vol. 56, Issue 8, pp. 4749–4775). American Chemical Society.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08722>
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., & Dawson, L. (2011). The anaerobic digestion of solid organic waste. In *Waste Management* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1737–1744).
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.021>
- Kleerebezem, R., Joosse, B., Rozendal, R., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2015). Anaerobic digestion without biogas? In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 787–801). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9374-6>
- Lalman, J. A., & Bagley, D. M. (2001). Anaerobic Degradation and Methanogenic Inhibitory Effects of Oleic and Stearic Acids. In *Wat. Res* (Vol. 35, Issue 12).
- López, C., Buitrón, G., García, H., & Cervantes, F. (2017). *Tratamiento biológico de aguas residuales principios, modelación y diseño* (Primedra edición). IWA Publishing.
- Mohan, S. V., Mohanakrishna, G., Goud, R. K., & Sarma, P. N. (2009). Acidogenic fermentation of vegetable based market waste to harness biohydrogen with simultaneous stabilization. *Bioresource Technology*, 100(12), 3061–3068. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.059>
- Palmeiro, T. (2017). *Valorisation of saline wastewaters: a challenge for the obtainment of bioproducts*. Universidade de Santiago de Compostela.
- Peña Picola, S. (2022). *Volatile fatty acids production using waste activated sludge and food waste to produce bioplastics*. Universidad de Barcelona.
- Pereira, M. A., Pires, O. C., Mota, M., & Alves, M. M. (2005). Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: Evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(1), 15–23. <https://doi.org/10.1002/bit.20548>
- Perez-Zabaleta, M., Atasoy, M., Khatami, K., Eriksson, E., & Cetecioglu, Z. (2021). Bio-based conversion of volatile fatty acids from waste streams to polyhydroxyalkanoates using mixed microbial cultures. *Bioresource Technology*, 323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124604>
- Priyadarshi, S., Shukla, A., & Borse, B. B. (2014). Polyhydroxyalkanoates: Role of *Ralstonia eutropha*. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 5(2), 68. <https://doi.org/10.7439/ijbar.v5i2.639>

- Rombouts, J. (2020). *On the ecology and applications of glucose and xylose fermentations* [Delft University of Technology]. <https://doi.org/10.4233/uuid:c6d1d9fe-00e6-4b2c-a643-911a9166aeec>
- Silva, F., Serafim, L., Nadais, H., Arroja, L., & Capela, I. (2013). *Acidogenic fermentation towards valorisation of organic waste streams into volatile fatty acids*.
- Song, B., Xia, D., Guo, H., Dong, Z., Wang, Y., Zhao, W., & Chen, Z. (2023). Effect of fat, oil and grease (FOG) on the conversion of lignite to biogenic methane. *Fuel*, 331. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125367>
- Steinbusch, K. J. J., Hamelers, H. V. M., Plugge, C. M., & Buisman, C. J. N. (2011). Biological formation of caproate and caprylate from acetate: Fuel and chemical production from low grade biomass. *Energy and Environmental Science*, 4(1), 216–224. <https://doi.org/10.1039/c0ee00282h>
- Szacherska, K., Oleskiewicz-Popiel, P., Ciesielski, S., & Mozejko-Ciesielska, J. (2021). Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 3, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13030321>
- Tamis, J., Joosse, B. M., Van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2015). High-Rate Volatile Fatty Acid (VFA) Production by a Granular Sludge Process at Low pH. *Biotechnol. Bioeng*, 112, 2248–2255. <https://doi.org/10.1002/bit.25640/abstract>
- Valença, R. B., Santos, L. A. dos, Firmo, A. L. B., Silva, L. C. S. da, Lucena, T. V. de, Santos, A. F. de M. S., & Jucá, J. F. T. (2021). Influence of sodium bicarbonate (NaHCO₃) on the methane generation potential of organic food waste. *Journal of Cleaner Production*, 317. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128390>
- Vázquez-Fernández, A., Suárez-Ojeda, M. E., & Carrera, J. (2022). Review about bioproduction of Volatile Fatty Acids from wastes and wastewaters: Influence of operating conditions and organic composition of the substrate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107917>
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., Piotrowska-Seget, Z., & Radecka, I. K. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-11>
- Wainaina, S., Lukitawesa, Kumar Awasthi, M., & Taherzadeh, M. J. (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review.

- In *Bioengineered* (Vol. 10, Issue 1, pp. 437–458). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>
- Wallace, T., Gibbons, D., O'Dwyer, M., & Curran, T. P. (2017). International evolution of fat, oil and grease (FOG) waste management – A review. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 187, pp. 424–435). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.003>
- Xing, T., Yu, S., Tang, J., Liu, H., Zhen, F., Sun, Y., & Kong, X. (2023). Liquid–Liquid Extraction of Volatile Fatty Acids from Anaerobic Acidification Broth Using Ionic Liquids and Cosolvent. *Energies*, *16*(2). <https://doi.org/10.3390/en16020785>
- Yan, B. H., Selvam, A., Xu, S. Y., & Wong, J. W. C. (2014). A novel way to utilize hydrogen and carbon dioxide in acidogenic reactor through homoacetogenesis. *Bioresource Technology*, *159*, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.014>
- Yenigün, O., & Demirel, B. (2013). Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. In *Process Biochemistry* (Vol. 48, Issues 5–6, pp. 901–911). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.012>
- Yin, J., Yu, X., Wang, K., & Shen, D. (2016). Acidogenic fermentation of the main substrates of food waste to produce volatile fatty acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, *41*(46), 21713–21720. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.094>
- Zhao, J., Liu, Y., Wang, Y., Lian, Y., Wang, Q., Yang, Q., Wang, D., Xie, G. J., Zeng, G., Sun, Y., Li, X., & Ni, B. J. (2018). Clarifying the Role of Free Ammonia in the Production of Short-Chain Fatty Acids from Waste Activated Sludge Anaerobic Fermentation. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *6*(11), 14104–14113. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02670>
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J. W. C., & Zhang, Y. (2018). Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. In *Bioresource Technology* (Vol. 248, pp. 68–78). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.121>

8. Anexos

8.1 Antecedentes teóricos adicionales

8.1.1 Digestión anaerobia

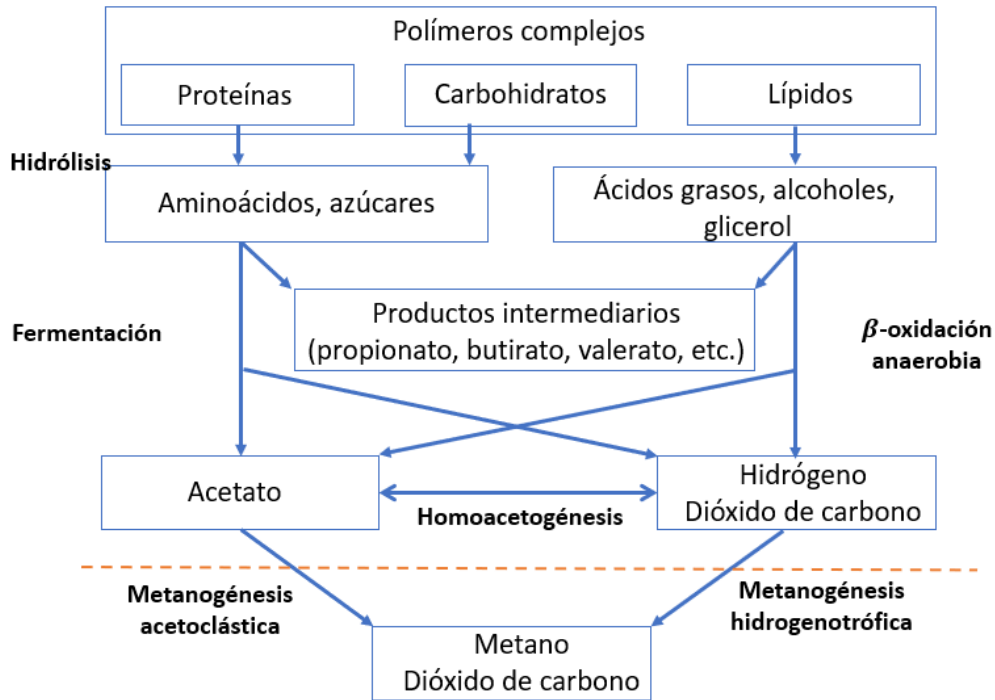


Figura 9. Esquema simplificado representativo de las reacciones llevadas a cabo durante la digestión anaerobia de materiales poliméricos. La línea discontinua horizontal representa la etapa de metanogénesis, la se busca evitar para que los AGV no sean consumidos. Fuente: adaptado de (López et al., 2017)¹

8.1.1.1 Efecto del sustrato

Mientras que el suero de queso y la melaza alcanzaron niveles más altos de acidificación (hasta 40%) con una producción total de AGV de 2707-3374 mg DQO/L, el glicerol alcanzó un grado de

¹ López, C., Buitrón, G., García, H., & Cervantes, F. (2017). *Tratamiento biológico de aguas residuales principios, modelación y diseño* (Primera edición). IWA Publishing.

acidificación del 11-13%, correspondiente a una producción total de 934-1460 mg DQO/L (Atasoy et al., 2018)².

Se ha encontrado que, mientras los flujos de desechos ricos en carbohidratos favorecen la producción de ácido propiónico y butírico; los ácidos valérico e isovalérico se ven favorecidos por corrientes ricas en proteínas (Garcia-Aguirre et al., 2017)³. Sin embargo, en contraste con este, están los resultados encontrados por (Rombouts, 2020)⁴ donde una corriente de glucosa genera una cantidad mucho mayor de ácido acético que de otros AGV. El ácido propiónico está favorecido por corrientes ricas en glicerol, sin embargo, otro estudio de Silva et al., 2013⁵ muestra lo contrario, mostrando que, con una corriente rica en glicerol, se obtuvo un 80% de ácido acético y menos del 20% de ácido propiónico. Dado que producción de AGV también se ve afectada por las condiciones de operación, no está muy claro cómo el sustrato afecta realmente la composición de los AGV (Atasoy et al., 2018).

La hidrólisis de lípidos es más lenta que la de carbohidratos (Yin et al., 2016)⁶ y produce AGCL y glicerol. Aunque el glicerol se puede convertir en AGV, los AGCL pueden inhibir el metabolismo

² Atasoy, M., Owusu-Agyeman, I., Plaza, E., & Cetecioglu, Z. (2018). Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. In *Bioresource Technology* (Vol. 268, pp. 773–786). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.042>

³ Garcia-Aguirre, J., Aymerich, E., González-Mtnez. de Goñi, J., & Esteban-Gutiérrez, M. (2017). Selective VFA production potential from organic waste streams: Assessing temperature and pH influence. *Bioresource Technology*, 244, 1081–1088. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.187>

⁴ Rombouts, J. (2020). *On the ecology and applications of glucose and xylose fermentations* [Delft University of Technology]. <https://doi.org/10.4233/uuid:c6d1d9fe-00e6-4b2c-a643-911a9166aeec>

⁵ Silva, F., Serafim, L., Nadais, H., Arroja, L., & Capela, I. (2013). *Acidogenic fermentation towards valorisation of organic waste streams into volatile fatty acids*.

⁶ Yin, J., Yu, X., Wang, K., & Shen, D. (2016). Acidogenic fermentation of the main substrates of food waste to produce volatile fatty acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(46), 21713–21720. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.094>

de las bacterias anaeróbicas al adherirse a las paredes celulares (Alibardi & Cossu, 2016)⁷. Además, los microorganismos acidogénicos encuentran más dificultades para producir AGV a partir de glicerol en comparación con carbohidratos o proteínas. Debido a su menor tasa de degradación, los lípidos tienden a acumularse en los residuos degradados (Owusu-Agyeman et al., 2020)⁸.

En un estudio realizado por (Cavaleiro et al., 2016)⁹ sobre la influencia de la actividad metanogénica en los en los pasos iniciales de la conversión de los AGCL a compuestos más simples, se menciona que esos ácidos grasos no logran degradarse completamente durante la hidrólisis. Además, se observa que el ácido oleico es continuamente convertido a ácido palmítico sin degradarse completamente mediante la β -oxidación, aunque la razón de este fenómeno sigue siendo desconocida.

⁷ Alibardi, L., & Cossu, R. (2016). Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Management*, 47, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.049>

⁸ Owusu-Agyeman, I., Plaza, E., & Cetecioglu, Z. (2020). Production of volatile fatty acids through co-digestion of sewage sludge and external organic waste: Effect of substrate proportions and long-term operation. *Waste Management*, 112, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.05.027>

⁹ Cavaleiro, A. J., Pereira, M. A., Guedes, A. P., Stams, A. J. M., Alves, M. M., & Sousa, D. Z. (2016). Conversion of Cn-Unsaturated into Cn-2-Saturated LCFA Can Occur Uncoupled from Methanogenesis in Anaerobic Bioreactors. *Environmental Science and Technology*, 50(6), 3082–3090. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03204>

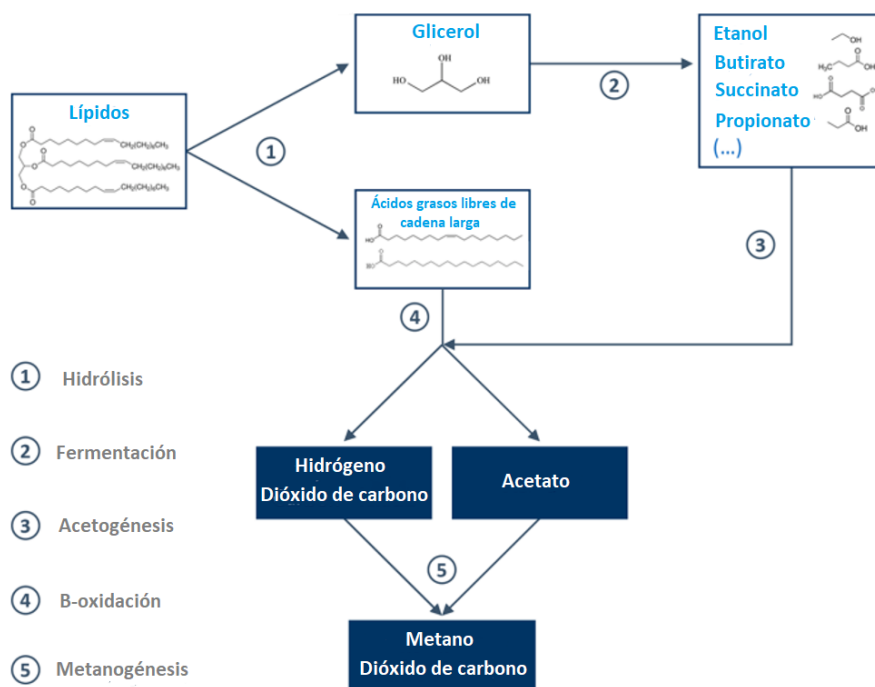


Figura 10. Digestión anaerobia de lípidos. Fuente: adaptado de (Holohan et al., 2022)¹⁰

¹⁰ Holohan, B. C., Duarte, M. S., Szabo-Corbacho, M. A., Cavaleiro, A. J., Salvador, A. F., Pereira, M. A., Ziels, R. M., Frijters, C. T. M. J., Pacheco-Ruiz, S., Carballa, M., Sousa, D. Z., Stams, A. J. M., O’Flaherty, V., Van Lier, J. B., & Alves, M. M. (2022). Principles, Advances, and Perspectives of Anaerobic Digestion of Lipids. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 56, Issue 8, pp. 4749–4775). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08722>

8.1.2 Directiva Marco de Residuos

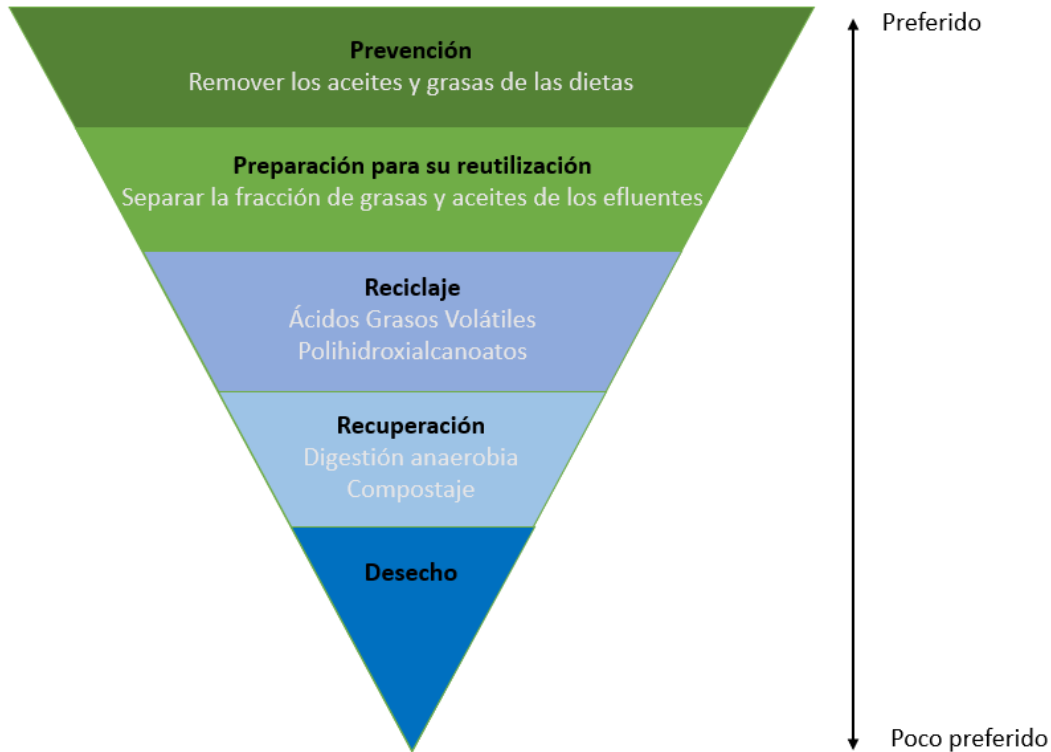


Figura 11. Jerarquía de gestión de residuos para la gestión de grasas y aceites.

Fuente: adaptado de (Argiz Montes, 2022)¹¹.

Esta directiva tiene como objetivo proteger la salud pública y el medioambiente mediante una gestión adecuada de residuos. Se sitúa la prevención y reutilización por delante de la valorización o la eliminación de los residuos.

8.1.3 Problemática de la extracción de los AGV de las corrientes residuales

La extracción líquido-líquido está aceptada como un método eficiente; sin embargo, requiere de reactivos especiales como óxido de trióxilfosfina, trioctilamina o tributilfosfato para formar un complejo ácido-base, lo que aumenta el precio del método. Además, requiere de energía para destilar los líquidos después de la extracción. La separación por membrana es capaz de concentrar, por ejemplo, el ácido valérico, sin embargo, no puede producir soluciones puras de AGV. El intercambio iónico está limitado a la extracción en pH neutro o básico y es extremadamente

¹¹ Argiz Montes, L. (2022). *Mixed-culture biotechnological processes for lipid-rich effluents valorization*. Universidade de Santiago de Compostela.

sensible a sus cambios, los cuales son habituales cuando se producen AGV a partir de corrientes residuales. Por otra parte, la adsorción requiere de resinas que pueden resultar costosas (Edmiston et al., 2018)¹².

8.1.4 Información general de AGV y ecuaciones de formación

Tabla 5. Masas molares de los AGV.

AGV	Masa Molar	Unidades
acético	60,052	mg/mmol
butírico	88,11	mg/mmol
hexanoico	116,1583	mg/mmol
propanoico	74,08	mg/mmol
isocaproico	116,1583	mg/mmol
isovalérico	102,13	mg/mmol
Carbono	12	mg/mmol

Tabla 6. Equivalencias de AGV a DQO.

AGV	Equivalencia	Unidades
Fórmico	0,348	g DQO/ g ácido
Acético	1,067	g DQO/ g ácido
Propiónico	1,514	g DQO/ g ácido
n-butírico/isobutírico	1,818	g DQO/ g ácido
N-valérico	2,039	g DQO/ g ácido

¹² Edmiston, P. L., Gilbert, A. R., Harvey, Z., & Mellor, N. (2018). Adsorption of short chain carboxylic acids from aqueous solution by swellable organically modified silica materials. *Adsorption*, 24(1), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10450-017-9923-0>

Tabla 7. Reacciones de formación de AGV. Fuente: (Rombouts, 2020)¹³

AGV resultante	Reacción
Acetato y butirato	$1 \text{ glucosa} \rightarrow 0,67 \text{ acetato} + 0,67 \text{ butirato} + 1,33\text{H}^+ + 2\text{CO}_2 + 2,67\text{H}_2$
Acetato y propionato	$1 \text{ glucosa} \rightarrow 0,67\text{acetato} + 1,33 \text{ propionato} + 2\text{H}^+ + 2\text{CO}_2$

Tabla 8. Reacciones secundarias de formación de ácidos grasos. Fuente: adaptado de: (den Boer et al., 2016)¹⁴

AGV resultante	Reacción
n-butirato	$2 \text{ acetato}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2 \rightarrow n - \text{butirato}^- + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{acetato}^- + \text{etanol} \rightarrow n - \text{butirato}^- + \text{H}_2\text{O}$
n-valerato	$\text{propionato}^- + \text{etanol} \rightarrow n - \text{valerato}^- + \text{H}_2\text{O}$ $\text{propionato}^- + \text{acetato}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2 \rightarrow n - \text{valerato}^- + 2\text{H}_2\text{O}$
n-caproato	$\text{acetato}^- + 2\text{etanol} \rightarrow 2n - \text{caproato}^- + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{acetato}^- + 2n - \text{butirato}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2 \rightarrow n - \text{caproato}^- + 2\text{H}_2\text{O}$

Tabla 9. Reacciones de formación de acetato a partir de otros AGV, AGCL y compuestos generados durante la hidrólisis.

¹³ Rombouts, J. (2020). *On the ecology and applications of glucose and xylose fermentations* [Delft University of Technology]. <https://doi.org/10.4233/uuid:c6d1d9fe-00e6-4b2c-a643-911a9166aeec>

¹⁴ den Boer, E., Łukaszewska, A., Kluczkiewicz, W., Lewandowska, D., King, K., Reijonen, T., Kuhmonen, T., Suhonen, A., Jääskeläinen, A., Heitto, A., Laatikainen, R., & Hakalehto, E. (2016). Volatile fatty acids as an added value from biowaste. *Waste Management*, 58, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.08.006>

Adaptado de (Holohan et al., 2022; López et al., 2017)^{15 16}

Compuesto	Reacción
Lactato	$CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$
Etanol	$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$
Glicerol	$2C_3H_8O_3 \rightarrow 3CH_3COO^- + 7H^+$
Butirato	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$
Propionato	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$
Metanol	$4CH_3OH + 2CO_2 \rightarrow 3CH_3COOH + 2H_2O$
Oleato	$C_{18}H_{34}O_2 + 16H_2O \rightarrow 9CH_3COO^- + 15H_2 + 8H^+$
H ₂ -CO ₂	$2HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$

Tabla 10. Ecuaciones de formación de AGV a partir de glucosa.

AGV	Ecuación
Acético	$C_2H_4O_2 + 2O_2 \rightarrow 2CO_2 + 2H_2O$
Butírico, N-butírico, isobutírico	$C_4H_8O_2 + 6O_2 \rightarrow 4CO_2 + 4H_2O$
Hexanoico	$C_6H_{12}O_2 + 8O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$
Propanoico, propiónico	$C_3H_5O_2 + 3,5O_2 \rightarrow 3CO_2 + 3H_2O$
Caproico, isocaproico	$C_6H_{12}O_2 + 8O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$
Valérico, N-valérico, isovalérico	$C_5H_{10}O_2 + 6,5O_2 \rightarrow 5CO_2 + 5H_2O$
N-Heptanoico	$C_7H_{14}O_2 + 9,5O_2 \rightarrow 7CO_2 + 7H_2O$

¹⁵ Holohan, B. C., Duarte, M. S., Szabo-Corbacho, M. A., Cavaleiro, A. J., Salvador, A. F., Pereira, M. A., Ziels, R. M., Frijters, C. T. M. J., Pacheco-Ruiz, S., Carballa, M., Sousa, D. Z., Stams, A. J. M., O'Flaherty, V., Van Lier, J. B., & Alves, M. M. (2022). Principles, Advances, and Perspectives of Anaerobic Digestion of Lipids. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 56, Issue 8, pp. 4749–4775). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08722>

¹⁶ López, C., Buitrón, G., García, H., & Cervantes, F. (2017). *Tratamiento biológico de aguas residuales principios, modelación y diseño* (Primedra edición). IWA Publishing.

8.1.5 Metanogénesis

Los microorganismos metanogénicos se dividen en dos grandes grupos: aquellos que convierten el acetato (metanogénicos acetoclásticos) y los que utilizan el hidrógeno (metanogénicos hidrogenotróficos) como donador de electrones. En general, aproximadamente el 70% del metano producido se forma a partir del acetato como precursor principal (López et al., 2017)¹⁷.

Tabla 11. Reacciones de la metanogénesis.

Dador de electrones	Reacción
Acetato	$CH_3COO^- \rightarrow CH_4 + CO_2$
H ₂	$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$

8.1.5.1 Inhibidores de arqueas metanogénicas

Hay dos tipos de inhibidores de metanógenos: específicos y no específicos. Los inhibidores específicos actúan sobre las enzimas que sólo existen en los metanógenos, mientras que los no específicos afectan tanto a la actividad de los metanógenos como de otros microorganismos. Ejemplos de inhibidores específicos son el 2-bromortanosulfonato (BES), 2-cloroetanosulfonato (CES) y 2-mercaptoetanosulfonato (MES), que pueden inhibir competitivamente la reacción de transferencia de metilo durante la formación de metano en metanógenos usando el hidrógeno y el dióxido de carbono (Liu et al., 2011)¹⁸. Entre los inhibidores no específicos destaca el cloroformo, ampliamente utilizado en la fermentación anaerobia. Además de inhibir a las arqueas metanogénicas, el cloroformo también reduce la actividad de las bacterias homoacetogénicas

¹⁷ López, C., Buitrón, G., García, H., & Cervantes, F. (2017). *Tratamiento biológico de aguas residuales principios, modelación y diseño* (Primedra edición). IWA Publishing.

¹⁸ Liu, H., Wang, J., Wang, A., & Chen, J. (2011). Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 89, Issue 5, pp. 1333–1340). <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3066-5>

(Zhang et al., 2018)¹⁹. Sin embargo, la adición de compuestos químicos inhibitorios, aunque es una potente herramienta para generar conocimiento y poder optimizar el proceso, es difícil de implementar más allá de escala laboratorio, además de encarecer el proceso.

8.1.6 Biopolímeros

8.1.6.1 Información general de PHA

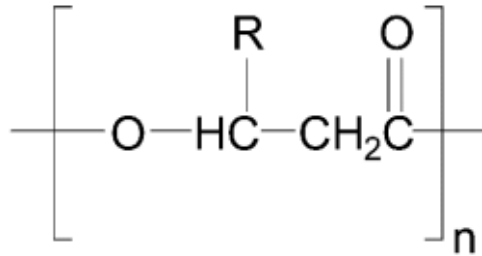


Figura 12. Estructura general de un polihidroxicanoato (PHA). Fuente: elaboración propia a partir de (Priyadarshi et al., 2014)

Su precio actual oscila entre 2,2 y 5 €/kg, más de un tercio del coste informado desde principios de la década pasada, pero aún elevado en comparación con los polímeros de origen petroquímico, que normalmente cuestan alrededor de 1,0 €/kg (Valentino et al., 2017)²⁰. A pesar de estos desafíos, se espera que el mercado del PHA crezca y alcance un valor de 195 millones de USD para el año 2028, con una tasa compuesta de crecimiento anual del 15,9% entre 2023 y 2028 (MarketsandMarkets, 2023)²¹.

¹⁹ Zhang, W., Dai, K., Xia, X. Y., Wang, H. J., Chen, Y., Lu, Y. Z., Zhang, F., & Zeng, R. J. (2018). Free acetic acid as the key factor for the inhibition of hydrogenotrophic methanogenesis in mesophilic mixed culture fermentation. *Bioresource Technology*, 264, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.049>

²⁰ Valentino, F., Morgan-Sagastume, F., Campanari, S., Villano, M., Werker, A., & Majone, M. (2017). Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. In *New Biotechnology* (Vol. 37, pp. 9–23). <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.007>

²¹ MarketsandMarkets. (2023, August). *Polyhydroxyalkanoate (PHA) Market*. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html>

A continuación, se presenta en la Tabla 12 las propiedades de los PHA obtenidos en el estudio de (Palmeiro, 2017)²² según sus composiciones.

Tabla 12. Propiedades de PHA según su ratio HB:HV. Adaptado de (Palmeiro, 2017)

PHA (%)	HB:HV (wt%)	Pureza (%)	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔH_m (J/g)	Cristalinidad (%)	Mw (g/mol)
53.8	96:4	96,6	-6,6	145,4 161,4	5,3 39,6	24,0	$8,7 \cdot 10^4$
46.3	34:66	89,3	-21,0	91,7 n.d	55,6 n.d.	10,5	$1,5 \cdot 10^5$
54.5	44:56	97,0	-12,4	105,0 n.d.	3,4 n.d.	2,3	$1,4 \cdot 10^5$
51.3	62:38	88,5	-7,7	102,0 158,8	5,7 n.d.	3,9	$1,2 \cdot 10^5$
8.4	72:28	81,6	-5,2	103,3 166,7	6,5 9,7	6,7	$2 \cdot 10^5$

²² Palmeiro, T. (2017). *Valorisation of saline wastewaters: a challenge for the obtainment of bioproducts*. Universidade de Santiago de Compostela.

8.1.6.2 Diagrama simplificado de la obtención de PHA

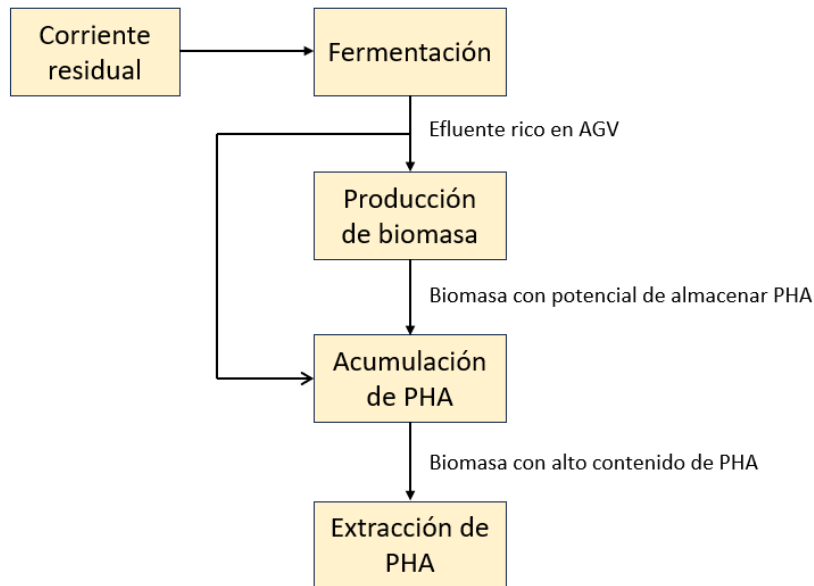


Figura 13. Diagrama resumido de la producción de PHA. Fuente: adaptado de (Albuquerque et al., 2011).²³

8.1.6.3 Propiedades de PHA según su composición

Se ha determinado que un biopolímero con una composición del 88:12 (HB:HV) podría sustituir al polietileno, mientras que es necesaria una mayor proporción de HV (81:19 aproximadamente) para obtener características similares al propileno, siendo éstos los plásticos petroquímicos más empleados. Así, se observa que el aceite es un sustrato con gran potencial para la obtención de biopolímeros con mayor HV, generalmente los más complejos de obtener, incluso en cultivos puros (Palmeiro, 2017)²⁴.

²³ Albuquerque, M. G. E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., & Reis, M. A. M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, 151(1), 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.070>

²⁴ Palmeiro, T. (2017). *Valorisation of saline wastewaters: a challenge for the obtainment of bioproducts*. Universidade de Santiago de Compostela.

8.1.7 Corrientes lipídicas

8.1.7.1 Normativa europea relacionada al aceite de cocina

La gestión adecuada del aceite de cocina usado representa un desafío importante, ya que una eliminación inadecuada al final de su vida útil puede conducir a la contaminación del agua y de los recursos terrestres (Nantha Gopal et al., 2014)²⁵. Con la creciente adopción de la normativa de residuos (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2023)²⁶, las cantidades recogidas crecen de forma continua. Sin embargo, su valorización continúa siendo un reto.

En relación con los residuos aceitosos, la Comisión Europea ha establecido una directiva (Dir. 2018/851 del parlamento europeo y del consejo, de 14 de junio de 2018)²⁷ que define roles específicos para todos los actores, incluidas las industrias, consumidores y los talleres, en la recuperación del aceite usado. Deben asegurarse de entregar el aceite usado a recolectores autorizados y se prohíbe su vertido. Entre los objetivos se encuentran: el tratamiento de los aceites usados de acuerdo con la jerarquía para proteger la salud humana y el medio ambiente, la recolección separada de los aceites usados, evitando su mezcla con aceites usados de características distintas o con otros tipos de residuos o sustancias que puedan dificultar su tratamiento.

²⁵ Nantha Gopal, K., Pal, A., Sharma, S., Samanchi, C., Sathyanarayanan, K., & Elango, T. (2014). Investigation of emissions and combustion characteristics of a CI engine fueled with waste cooking oil methyl ester and diesel blends. *Alexandria Engineering Journal*, 53(2), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2014.02.003>

²⁶ Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2023). *Aceite de cocina usados*. <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/domesticos/fracciones/aceites-cocina.html>

²⁷ Dir. 2018/851 del parlamento europeo y del consejo. (2018). Unión Europea. Directiva (UE) 2018/851 del parlamento europeo y del consejo, de 30 de mayo de 2018, por la que se modifica la Directiva 2008/98/CE sobre los residuos. In *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 150/109, 14 de junio de 2018.

8.1.8 Posibles compuestos no identificados

Tabla 13. Compuestos que podrían encontrarse entre los compuestos “desconocidos” que no pudieron ser identificados por HPLC ni cromatografía de gases.

Compuesto	Número de carbonos
Ácido oxálico	2
Ácido fumárico	4
Ácido palmítico	16
Ácido esteárico	18
Ácido oleico	18
Ácido linoleico	18

8.2 Propiedades de los sustratos

8.2.1 Aceite

Los lípidos se encuentran en la mayoría de los residuos y aguas residuales. La clasificación de “lípidos” incluye un rango extremadamente diverso de compuestos, los cuales pueden ser divididos en 4 grupos principales encontrados en las aguas residuales: triacilgliceroles incluyendo AGCL, glicolípidos, fosfolípidos y colesterol. De estos, los más abundantes son los AGCL y triacilgliceroles, comúnmente conocidos como grasas y aceites (Holohan et al., 2022)²⁸. El aceite utilizado corresponde a uno donado por cafetería, donde se empleaba para freír.

Tabla 14. Propiedades del aceite utilizado. Fuente: datos previos obtenidos en proyectos del grupo de investigación

Propiedad	Valor
Densidad [mg/mL]	891,4
DQO [g DQO/g aceite]	2,83

²⁸ Holohan, B. C., Duarte, M. S., Szabo-Corbacho, M. A., Cavaleiro, A. J., Salvador, A. F., Pereira, M. A., Ziels, R. M., Frijters, C. T. M. J., Pacheco-Ruiz, S., Carballa, M., Sousa, D. Z., Stams, A. J. M., O’Flaherty, V., Van Lier, J. B., & Alves, M. M. (2022). Principles, Advances, and Perspectives of Anaerobic Digestion of Lipids. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 56, Issue 8, pp. 4749–4775). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08722>

Tabla 15. Composición del aceite obtenida mediante análisis de triacilglicéridos.

Fuente: datos previos obtenidos en proyectos del grupo de investigación

Compuesto	% masa/masa	Número de carbonos
Ácido palmítico	4,69	16
Ácido esteárico	11,13	18
Ácido oleico	21,34	18
Ácido linoleico	34,96	18
Desconocido	27,88	-



Figura 14. Aceite utilizado en los ensayos.

8.2.2 Ácido oleico

Los AGCL han sido clasificados en numerosas categorías según la longitud de sus cadenas, sus configuraciones y sus grados de saturación o insaturación. Sólo 20 de estos aparecen extensamente en la naturaleza siendo el palmítico, oleico y linoleico aproximadamente al 80% de los aceites y grasas comunes presentes (Holohan et al., 2022).

En este trabajo, se ha empleado el ácido oleico ya que, al ser un AGCL, se espera que permita analizar el proceso desde un punto de vista independiente a la etapa de hidrólisis del aceite a AGCL. Bajo este supuesto, se espera que el proceso sea más rápido al no tener esa etapa limitante, y por tanto producir una cantidad de AGV superior al tener más DQO hidrolizada disponible.

Tabla 16. Estructura y formulas del ácido oleico. Fuente: elaboración propia.

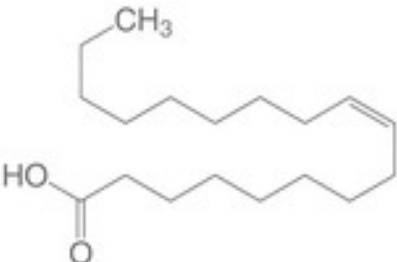
Estructura	Fórmulas
	<p>Fórmula desarrollada</p> $CH_3(CH_2)_7CH = CH(CH_2)_7COOH$
	<p>Fórmula química molecular</p> $C_{18}H_{34}O_2$

Tabla 17. Propiedades del ácido oleico. Fuente: datos previos obtenidos en proyectos del laboratorio de investigación.

Propiedad	Valor
Densidad [mg/mL]	891,4
DQO [g DQO/g aceite]	2,26

8.2.3 Glucosa

La glucosa es un carbohidrato, más específicamente un monosacárido, comúnmente llamado azúcar simple, y es la principal fuente de energía para los organismos de los seres vivos. Su fórmula es $C_6H_{12}O_6$ (Hart et al., 2010)²⁹. La glucosa fue utilizada en los ensayos para tener un parámetro de comparación con el aceite. Esto se basa en que la glucosa, al ser un carbohidrato simple, es fácilmente utilizada por los microorganismos, dado que no debe hidrolizarse. Así, se espera entender el comportamiento “ideal” de la glucosa en contraste con el comportamiento “real” del aceite, y como esto afecta al rendimiento y al perfil de los AGV obtenidos.

²⁹ Hart, Hadad, Craine, & Hart. (2010). *Organic Chemistry: A short course* (13^o Edición). CENGAGE Learning.

8.3 Montaje de los reactores



Figura 15. Agitador.

8.3.1 Compuestos agregados en las botellas

Tabla 18. Cantidad de compuestos en cada botella en los ensayos en unidades de mililitros.

Ensayo 1				
	Blanco (1)	Glucosa (2)		Aceite (3)
Fango	92,3	92,3		92,3
Macronutrientes	40	40		40
Micronutrientes	4,5	4,5		4,5
Carbono	0	40		1,67
Agua	263,2	223,2		261,53
Ensayo 2				
	Blanco (1)	Glucosa (2)		Aceite (3)
Fango	26	26		26
Macronutrientes	40	40		40
Micronutrientes	4,5	4,5		4,5
Carbono	0	40		1,58
Agua	329,5	289,8		327,92
Ensayo 3				
	Blanco (B)	Ácido oleico (O)	Aceite 1 (R1)*	Aceite 2 (R2)**
Fango	26	26	26	26
Macronutrientes	40	40	40	40
Micronutrientes	4,5	4,5	4,5	4,5
Carbono	0	1,98	0,297	0,118
Agua	329,5	327,52	329,2	333,88

*Aceite 1 corresponde a la relación 2,5 kg DQO/kg SSV

** Aceite 2 corresponde a la relación 1 kg DQO/kg SSV

Tabla 19. Macronutrientes utilizados en los ensayos.

Compuestos	Concentración (g/L)
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	6,7809
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	1,2718
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	0,2933
Cloruro de potasio (KCl)	0,2023

8.3.2 Masa de las botellas

- Masa de las botellas de los ensayos 1 y 2 en gramos

Tabla 20. Masa de las botellas de los ensayos 1 y 2 en gramos

Botella	Vacía	Llena	Ensayo	Líquida	Cabecera	Cabecera (mL)
1A	315,05	858,62	711,34	396,29	147,28	122,73
1B	313,62	858,2	709,7	396,08	148,5	123,75
1C	313,42	858,28	708,61	395,19	149,67	124,73
2A	312,51	854,97	711,14	398,63	143,83	119,86
2B	313,34	860,01	708,95	395,61	151,06	125,88
2C	313,45	860,01	709,63	396,18	150,38	125,32
3A	313,48	856,27	709,75	396,27	146,52	122,1
3B	313,32	857,11	710,78	397,46	146,33	121,94
3C	276,08	850,09	670,36	394,36	179,65	149,71

- Masa de las botellas del ensayo 3 en gramos

Tabla 21. Masa de las botellas del ensayo 3 en gramos

Nombre	Vacía	Llena	Ensayo	Líquida	Cabecera	Cabecera (L)
B1	313,62	858,2	713,93	400,31	144,27	0,120225
B2	313,42	858,28	731,02	417,6	127,26	0,10605
O1	276,08	850,09	670,24	394,16	179,85	0,149875
O2	313,48	856,27	711,06	397,58	145,21	0,121008
R1-A	312,51	854,97	706,56	394,05	148,41	0,123675
R1-B	313,34	860,01	711,88	398,54	148,13	0,123442
RX-A	315,05	858,62	715,65	400,6	142,97	0,119142
RX-B	313,45	860,01	716,34	402,89	143,67	0,119725

8.4 Desviación de los datos

Como se puede ver en la Figura 16, los datos no tienen una gran desviación. Las botellas de glucosa (serie 2) tienen casi los mismos valores. Las botellas de aceite (serie 3), siguen una misma tendencia, teniendo puntos comunes sobre todo los primeros días. Los resultados comienzan a variar en las muestras de los días 15 y 23, pero vuelven a ser casi idénticas hacia el final del ensayo.

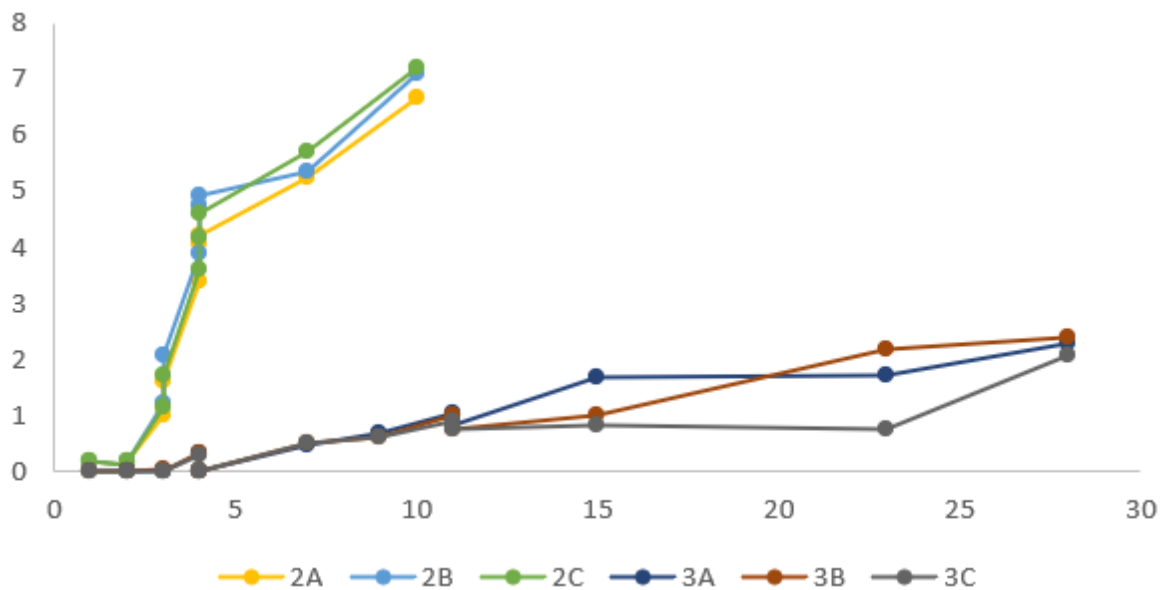


Figura 16. Concentración de AGV en g DQO/L de cada botella en el segundo ensayo.

8.5 Ejemplo de toma de presiones

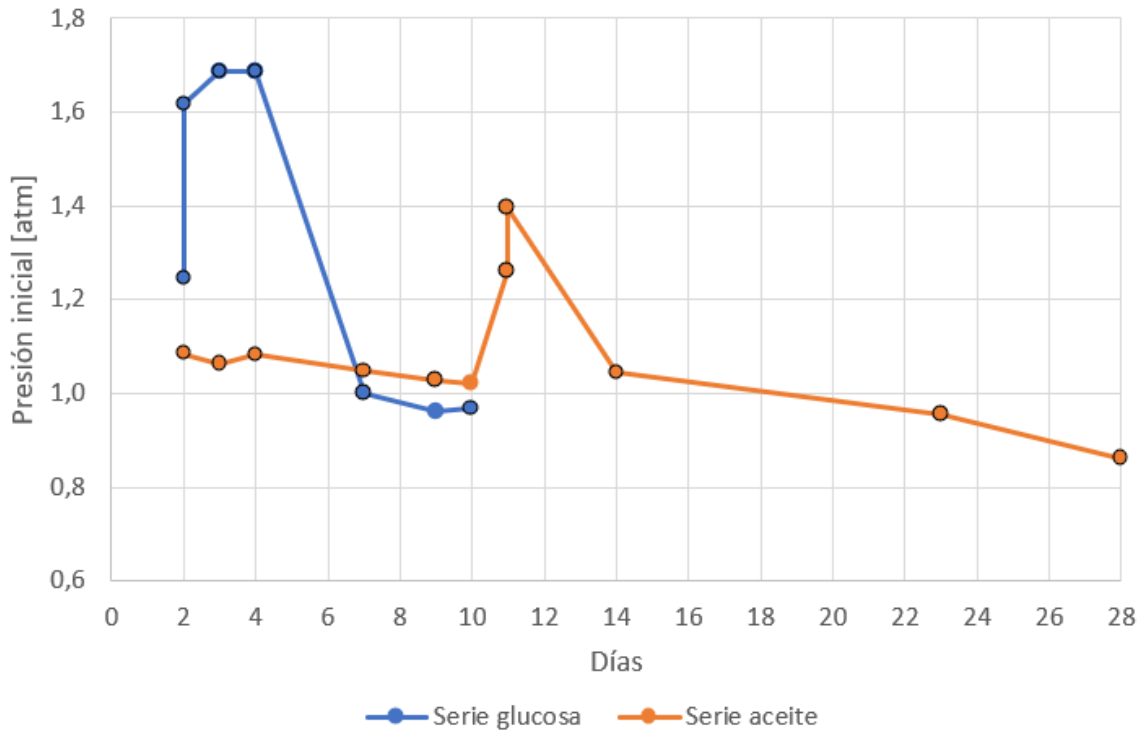


Figura 17. Presiones de las botellas de glucosa y aceite durante el segundo ensayo. Los bordes negros indican los días que se tomó muestra.

8.6 Materiales y métodos

8.6.1 Protocolo establecido para la toma de muestras

A continuación, se presenta el protocolo a seguir con cada muestra botella luego de que estas son puestas en el agitador.

En cada caso, se midió la sobrepresión con un transductor (Figura 19) en las botellas por la mañana, utilizando este parámetro como indicador de actividad, la cual podría ser tanto metanogénica como fermentativa. Si la presión en las botellas variaba muy poco, no se tomaba muestra para evitar el excesivo muestreo que, además de alterar significativamente el volumen, incrementaba el riesgo de entrada de oxígeno en las botellas.

Si se decidía tomar muestra por la mañana, se extraían dos muestras de gas de 1 mL cada una (una para análisis de hidrógeno y otra para análisis de biogás), además de una muestra líquida de

aproximadamente 4 mL. Si además se consideraba necesario tomar una muestra por la tarde (si el incremento de presión es rápido durante el día), se tomaba sólo una muestra líquida, ya que los equipos necesarios para el análisis de la fase gas no se encontraban disponibles.

Después de la toma de muestras, se medía nuevamente la presión. Las muestras gaseosas se analizaban mediante cromatografía de gases. A la muestra líquida se le tomaba el pH y luego se centrifugaba y filtraba. Luego, se tomaban cantidades diferentes de muestra para realizar la determinación de nitrógeno total, ácidos grasos volátiles y demanda química de oxígeno, diluyendo si es necesario. A algunas muestras puntuales se les realizó una cromatografía líquida de alta presión para identificar compuestos distintos a los AGV en las botellas.

Una vez que la presión se mantenía aproximadamente constante durante 2 días consecutivos, se consideró que la producción de AGV dentro de la botella se había detenido o estaba cerca de hacerlo. En este momento final, además de las muestras mencionadas anteriormente, se toma otra muestra para realizar la determinación de SSV.

8.6.2 Protocolo de toma de presiones

Para transformar las medidas en milivoltios (mV), a unidades de presión, en este caso, milímetros de mercurio (mmHg). Esto se puede ver en la Figura 18 a continuación,

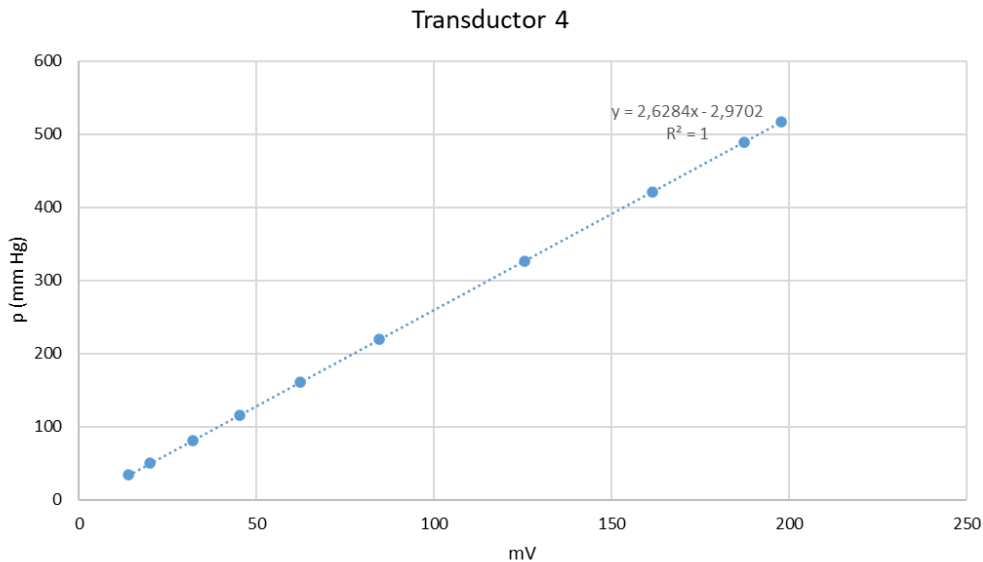


Figura 18. Recta de calibración del transductor.

Materiales y equipos

- Transductor modelo PSI-5, Centrepoint Electronics, Irlanda
- Aguja Sterican Braun de 0,5 mm de diámetro y 16 mm de largo

Metodología

Antes de tomar muestras líquidas o gaseosas se debe medir la presión. Para esto, se conecta el transductor a la corriente. Se revisa que tenga una aguja limpia y que el valor del transductor varíe entre 0 y 0,3 mV. Luego se pincha el septum de la botella con la aguja del transductor y se anota el valor en mV que aparece en la pantalla. Partiendo de la señal eléctrica, se puede obtener el valor de presión equivalente a través de la recta de calibrado que permite transformar de milivoltios a atmósferas según la *ecuación (13)*.

$$P_{atm} = (2,6284 \cdot (Presión_{mV}) - 2,9702) \cdot \frac{1 atm}{760 mmHg} \quad (13)$$

Donde:

$Presión_{mV}$: sobrepresión del transductor expresada en unidades de milivoltios (mV)

P_{atm} : sobrepresión del transductor expresada en unidades de atmósferas (atm)

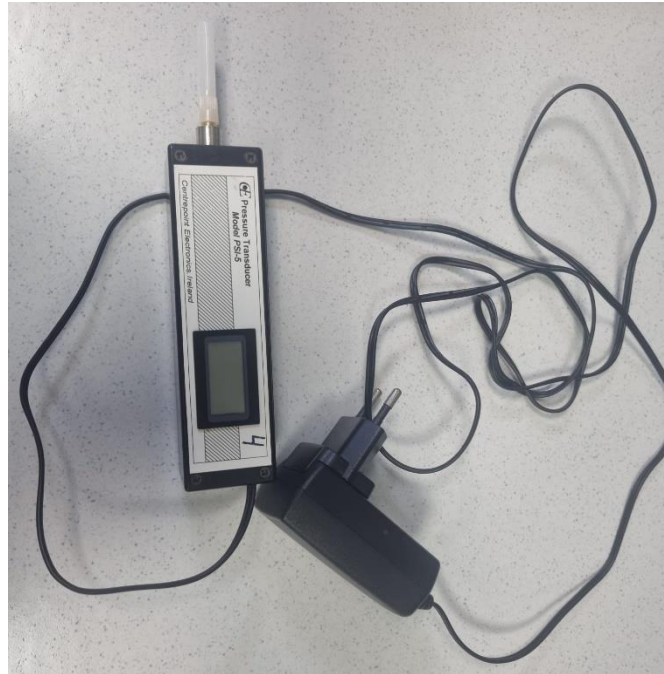


Figura 19. Transductor.

A modo de ejemplificación para una mejor comprensión del proceso de toma de muestra basado en el análisis de presiones, en la Figura 20 se muestran las presiones iniciales de los días del ensayo para cada serie. Los días en que se tomó muestra está marcados con un borde negro. Como se puede observar, se tomó muestra de las botellas principalmente cuando la presión estaba subiendo.

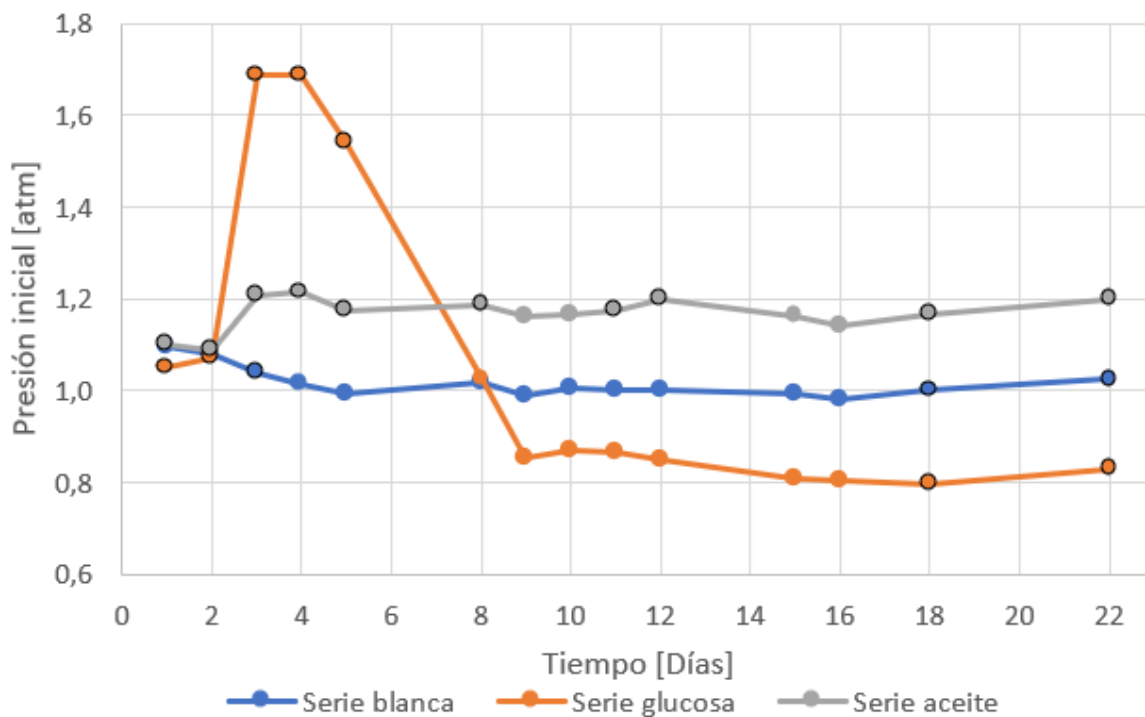


Figura 20. Variación de las presiones durante el primer ensayo para ejemplificar el criterio de toma de muestra. Los puntos bordeados en negro indican los días en que se tomó muestra.

En el caso de los días 3 y 4 de la serie de glucosa, la sobrepresión medida por el transductor se salía del rango, por lo que se tomó el valor mayor medible (200 mV) de manera representativa para poder hacer el gráfico. Luego del octavo día, la presión se mantuvo bajo la presión atmosférica, lo cual sale del rango del transductor, por lo que se usa sólo como una guía para saber que no se está produciendo una cantidad relevante de gas. Por eso, sólo se volvió a tomar muestra de la botella de glucosa el último día.

8.6.3 Protocolo de medición de SSV y SST

Materiales y equipos

- Filtros de microfibras de vidrio de un tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$
- Equipo de filtración: consta de un matraz de Kitasato, una placa filtrante, una manguera, un embudo, pinzas de metal y una conexión a un equipo de vacío.
- Estufa con capacidad de calentar hasta $105 \text{ }^\circ\text{C}$
- Mufla con capacidad de calentar hasta $550 \text{ }^\circ\text{C}$

- Pipetas de 5 mL
- Desecador
- Cápsulas de aluminio
- Balanza analítica capaz de pesar hasta 0,0001 gramos

Metodología

Primero, se toma un filtro y una cápsula de aluminio que sirve como portador del filtro. Ambos se colocan en la mufla durante 30 minutos para deshidratarlos. Luego de esto, se dejan enfriar en el desecador y se pesan los filtros en la balanza analítica (M_1).

El siguiente paso es montar la placa filtrante sobre el matraz Kitasato, conectado a una bomba de vacío para facilitar la filtración. Se colocan el filtro seco y el embudo de cristal y se aseguran con pinzas metálicas.

Luego, se toma una muestra de lodo anaerobio y se vierte sobre el filtro. Se abre la llave de vacío para comenzar la filtración hasta que no quede líquido visiblemente retenido. Se desmonta el embudo, se retira el filtro y se devuelve a su cápsula para ser secado en la estufa durante al menos dos horas a 150 °C, con el fin de eliminar la humedad de la muestra. Después del secado, las cápsulas son enfriadas en el desecador. Luego, se vuelven a pesar los filtros en la balanza analítica (M_2).

Finalmente, los filtros se colocan nuevamente en la mufla a 550 °C durante 30 minutos y se enfrían en el desecador para ser posteriormente pesados en la balanza analítica (M_3). Este proceso de calcinación permite eliminar la materia orgánica, dejando solo los compuestos inorgánicos en el filtro.

Las concentraciones de SST y SSV se pueden calcular según las ecuaciones (2) y (3) obteniéndose resultados en unidades de mg SST/L y mg SSV/L, respectivamente.

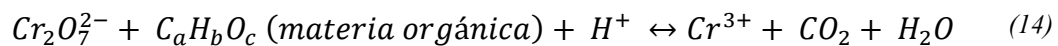
8.6.4 Protocolo de determinación de pH

Para la determinación del pH, se emplea un electrodo de vidrio Crison, modelo U-455, conectado a un medidor de pH Crison GLP 22. Previo a las mediciones, se debe asegurar que el equipo esté calibrado con una disolución tampón de pH 4,0 compuesta por ftalato ácido de potasio y una de

pH 7,0 compuesta por fosfatos potásico y disódico (ambas disoluciones son comerciales). En todo momento el electrodo debe contener un electrolito comercial de KCL 3 M. La medición del pH de la muestra y el calibrado se realizan a temperatura ambiente.

8.6.5 Protocolo de determinación de DQO

Este parámetro representa la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica presente en una muestra líquida mediante la digestión de esta, utilizando un fuerte agente químico oxidante como el dicromato potásico en un medio ácido. La reacción producida se puede ver en la *ecuación (14)*, a continuación,



Una vez terminada la digestión a 150 °C, una parte del dicromato potásico queda sin consumirse. Este oxidante no reducido es titulado con Sulfato Amónico Ferroso (FAS) para determinar la cantidad de dicromato consumido y por tanto calcular la materia orgánica oxidada en términos de oxígeno equivalente. La medición de este parámetro se realiza según lo expuesto en (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1999).

En este caso, como la muestra fue previamente centrifugada y filtrada, se mide sólo la DQO soluble, dado que es la que está disponible para el consumo del cultivo microbiano.

Materiales

- Tubos de vidrio Pyrex con tapón
- Cintas de teflón
- Pipetas de 5 mL y 0,2 mL
- Agua destilada
- Bureta de 10 mL
- Matraz Erlenmeyer
- Placa agitadora y barra magnética
- Filtro de membrana de 0,45 μm de tamaño de poro para jeringas
- Jeringa de 5 mL

Reactivos y equipos

- Termo-digestor que alcance una temperatura de 150 °C que se pueda mantener por 2 horas

- Centrífuga Eppendorf
- Campana extractora
- Disolución de sulfato amónico ferroso (FAS): se disuelven 13,72 g de sulfato amónico ferroso hexahidratado $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ en agua destilada. Luego se agregan 20 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Finalmente, la solución se enrasa con agua destilada hasta obtener 1 litro. Suele tener una normalidad de 0,035, la que es evaluada antes de utilizarse. En los ensayos con baja concentración de DQO se utilizó una solución FAS con normalidad de 0,016.
- Solución catalítica: se disuelven 10,7 g de sulfato de plata $(AgSO_4)$ en 1000 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 96% y se deja reposar por 2 días. La función del sulfato de plata es ser un catalizador para mejorar la oxidación de algunos compuestos orgánicos durante la digestión de las muestras.
- Solución digestora: se disuelven 33 g de sulfato de mercurio II $(HgSO_4)$ y 10,216 g de dicromato de potasio $(K_2Cr_2O_7)$ en 500 mL de agua destilada. Luego se añaden 167 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 96% y se enrasa con agua destilada hasta 1 L de disolución.
- Solución indicadora: se disuelven 0,695 g de sulfato de hierro heptahidratado $(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$ y 1,485 g de fenantrolina monohidratada $(C_{12}H_8N_2)$ en 100 mL de agua destilada. Se obtiene una solución de ferroína con normalidad de 1/40 N.
- Patrón de dicromato: se disuelven 1,2258 g de dicromato de potasio $(K_2Cr_2O_7)$ en 500 mL de agua destilada. Debe tener una normalidad de 0,05. El reactivo se debe secar durante 2 horas a 105 °C.

Antes de utilizar la disolución FAS se determina su normalidad. Para esto se usan 5 mL de agua destilada y 3,5 de disolución catalítica en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Una vez enfriado, se añaden 5 mL de disolución patrón de dicromato. Se añaden dos gotas de la solución indicadora y se valora la disolución con la disolución FAS. Así, la normalidad del FAS se calcula mediante la ecuación (15).

$$N_{FAS} = \frac{V_{K_2Cr_2O_7} \cdot N_{K_2Cr_2O_7}}{V_{FAS}} \quad (15)$$

Donde:

$V_{K_2Cr_2O_7}$: volumen añadido del patrón de dicromato potásico [mL]

$N_{K_2Cr_2O_7}$: normalidad del patrón de dicromato potásico [N]

V_{FAS} : volumen utilizado de disolución FAS durante la valoración [mL]

Metodología

El límite máximo de detección de esta técnica utilizando FAS con normalidad de 0,035N es de 900 mg O_2/L . Utilizando FAS con normalidad de 0,016N y disolución digestora diluida, el límite de detección del método es de 20-100 mg O_2/L . En todos los casos, por restricciones en el volumen de muestra tomado, se hizo una dilución 1:20 con agua destilada hasta un volumen final de 2,5 mL. Para esta analítica se usan 125 μL de muestra y 2375 μL de agua destilada. Esta disolución debe estar contenida en un tubo de vidrio Pyrex apto para altas temperaturas (150 °C). Es recomendable trabajar con al menos duplicados para garantizar la correcta determinación. Además, se requieren 2 disoluciones blancas (2,5 mL de agua destilada), que serán sometidas al mismo proceso que las muestras como referencia, permitiendo obtener el valor de la DQO del agua destilada e identificar impurezas. Además, permiten normalizar al estado de las disoluciones.

Trabajando en la campana extractora, debido a la toxicidad de las disoluciones, se añaden 1,5 de disolución digestora y luego 3,5 mL de solución catalítica de manera lenta por los bordes del tubo con el objetivo de obtener dos fases y evitar que comience la reacción, altamente exotérmica. Cabe destacar por seguridad que, dado que se produce una reacción exotérmica, si no se producen las dos fases, la temperatura de la disolución aumenta y quemara ligeramente las manos.

Una vez hecha la disolución, se enrolla una cinta de teflón (para evitar la evaporación durante la digestión) en la parte superior de cada tubo en sentido horario para evitar abrirlo cuando se enrosca la tapa. Se agitan las disoluciones cuidadosamente hasta que se mezclen las dos fases y se ponen inmediatamente en el digestor precalentado a 150 °C, durante 2 horas.

Una vez pasadas las 2 horas, los tubos son retirados del digestor y se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para la valoración de cada disolución, el contenido de cada tubo se traspara a un matraz Erlenmeyer de 50 mL con una barra magnética. EL tubo se lava con agua destilada (aproximadamente misma cantidad siempre para evitar efectos visuales) para asegurarse

de que toda la disolución está en el matraz. Luego se agregan dos gotas de la disolución de ferroína indicadora.

Se pone el matraz encima de la placa magnética y se comienza la valoración con disolución FAS. Se debe anotar la cantidad de FAS (mL) que se consume para realizar el cambio de color del contenido del matraz de verde a rojo.

8.6.6 Protocolo de la determinación de concentración de NT

Se utilizó el analizador TOC-LCSN (Shidmazu, Japón) (Figura 21) para medir este parámetro. La calibración de este equipo depende del parámetro que se quiera medir (nitrógeno total, carbono total y carbono inorgánico). En el caso del nitrógeno total se utiliza una disolución estándar de cloruro de amonio (NH_4Cl). El límite de detección del equipo se encuentra en el rango 0,50 y 1000 mg NT/L.

Se realizó una prueba con el lodo para saber si se debía diluir las muestras tomadas de las botellas para que entren en el rango de medición del equipo. Para esto se realizó una disolución 1:20 con agua destilada, obteniéndose una concentración de 2203 mg N/L en el lodo utilizado en el primer reactor. Con este conocimiento, todas las muestras fueron analizadas en una disolución 1:20 con agua destilada en 5 mL de volumen. En el caso del segundo reactor, al realizar la prueba, se obtuvo un valor de 54,509 mg N/L en el lodo. Como seguía entrando en el rango, se hizo disoluciones 1:20 en los ensayos 2 y 3 también.

Materiales y equipos

- Analizador TOC-LCSN (Shidmazu, Japón)
- 5 mL de muestra líquida

Metodología

La muestra se inyecta en un tubo de combustión, donde se produce una pirólisis oxidativa a 720 °C. Así, los compuestos nitrogenados pasan a óxido nítrico (NO) en estado gaseoso. Esta corriente gaseosa pasa por un sistema de refrigeración, eliminando condensaciones que puedan dañar el sistema. Luego, el óxido nítrico (NO) reacciona con ozono (O_3) formando dióxido de nitrógeno (NO_2) inestable, el cual vuelve a su estado elemental emitiendo un fotón en el rango de 290 a 590 nm, el cual es detectado mediante quimioluminiscencia.



Figura 21. Analizador TOC-LCSN.

8.6.7 Protocolo de determinación de AGV con cromatografía de gases

El cromatógrafo usado es un modelo Agilent 6850, serie II, con una columna DB-Wax de Agilent Technologies. El gas portador es nitrógeno con un caudal de 1 mL/min.

Material

- 1 mL de muestra líquida centrifugada y filtrada
- Cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo CG 6850 serie II

Metodología

Para este método se inyecta 1 μL de la muestra, la cual debe ser filtrada con un filtro de 0,45 μm y acidificada con H_3PO_4 al 85% para facilitar la detección del ácido acético. Después pasa a través de la columna DB-Wax donde son separadas por su peso molecular. Luego, pasan por el inyector a una temperatura de 250 $^\circ\text{C}$ y posteriormente por el detector, el cual opera a 280 $^\circ\text{C}$. Finalmente,

se obtiene un cromatograma con diferentes picos donde el área resultante se relaciona con la concentración de cada AGV en mg de ácidos grasos volátiles por litro.

8.6.8 Protocolo de cromatografía líquida de alta resolución

Se utiliza un cromatógrafo modelo Agilent 1260 Infinity II (Figura 22), con una columna RECEX ROA-Organic Acid H+150 x 7,8 mm, 8 μm -8% (Phenomenex). El detector es mediante índice de refracción modelo 1260. La fase móvil es H_2SO_4 a una concentración de 5mM.

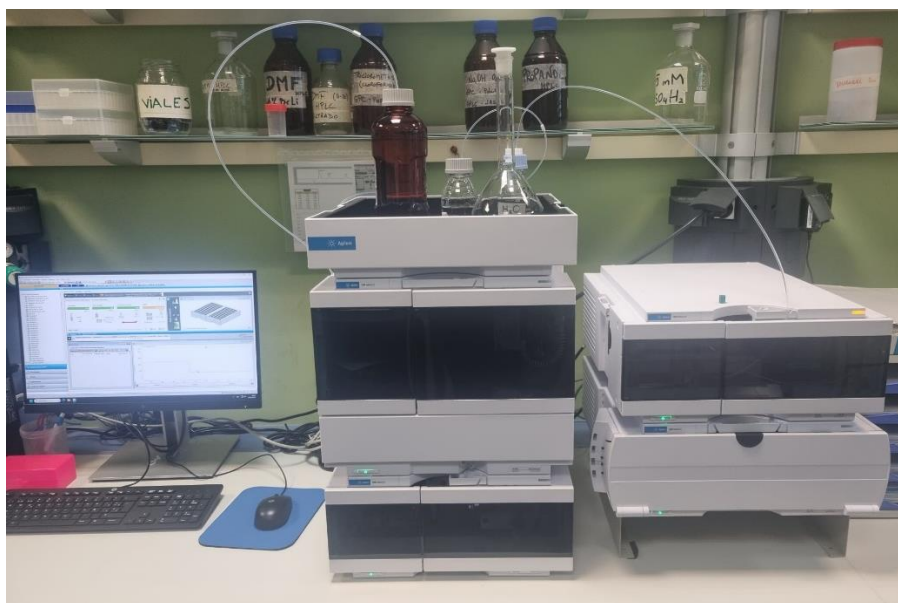


Figura 22. Cromatógrafo de líquidos a alta presión, columna, detector y computador.

Materiales

- 1 mL de muestra líquida centrifugada y filtrada
- Cromatógrafo Agilent 1260 Infinity II

Metodología

Se inyectan 20 μL de la muestra líquida, la cual pasa a través de la columna, donde los compuestos son separados. La columna opera a 55 $^{\circ}\text{C}$. Luego, los compuestos llegan al detector, el cual opera a 50 $^{\circ}\text{C}$. Aquí los compuestos son identificados y mostrados en la aplicación del computador aledaño.

8.6.9 Protocolo de cromatografía de gases (biogás)

La calibración del equipo se lleva a cabo con una mezcla estándar de gases (29,0% N_2 , 49,7 % CH_4 , 17,5% CO_2 , 2,4 % N_2O y 1,4% H_2S en fracciones molares), usando un método de factor de respuesta.

Para realizar esta analítica se requiere tomar una muestra de 1 mL de gas de cada botella. El cromatógrafo utilizado es un modelo Hewled Packard 5890 serie II. La columna utilizada es una Porapack Q80/100 de 2 metros de longitud y 1" de diámetro externo (SUPELCO). Además, se utiliza un integrador HP3396A Hewlett Packard. El equipo puede verse en la Figura 23.

Previo a inyectar la muestra gaseosa, se deben llevar los parámetros a sus estándares de operación. En este caso, la temperatura del horno debe llegar a 35 °C y el inyector y el eyector deben llegar a 110 °C. Además, se debe corroborar que el parámetro de señal no sea menor a 0,2 (el gas no llegará al detector) ni mayor a 3 (la columna se encuentra contaminada).

Una vez inyectado el gas, estos se separan dentro de la columna y son llevados al detector de conductividad térmica (TCD), donde se mide la amplitud de la señal eléctrica de un filamento por donde pasan los gases. La amplitud varía según la diferencia entre la conductividad térmica del gas patrón y del gas de muestra. Finalmente, se obtiene un cromatograma donde cada pico corresponde con un gas determinado. Un ejemplo de cromatograma está en la Figura 24, el cuál es el patrón que se utiliza para interpretar los cromatogramas obtenidos y calcular la composición del biogás producido. La limitación de este método es que no puede detectar la presencia de hidrógeno en el gas, que se determinará mediante el uso de otro cromatógrafo, descrito en el siguiente anexo.



Figura 23. Cromatógrafo modelo Hewled Packard 5890 serie II e integrador.

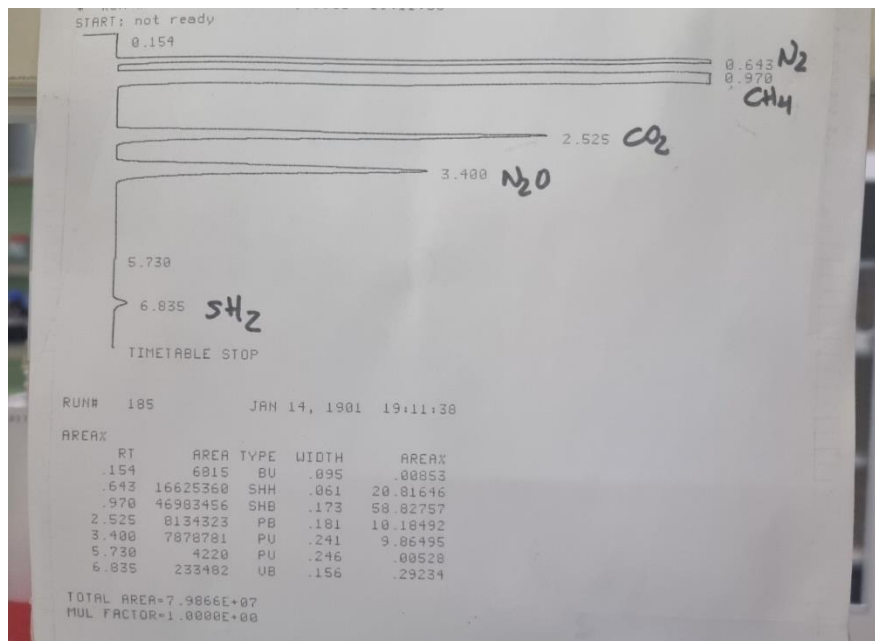


Figura 24. Ejemplo de muestra patrón para interpretación del cromatograma.

Del cromatograma se extrae el valor de “Área” el cuál será utilizado para cálculos.

8.6.10 Protocolo de cromatografía de gases para la detección de hidrógeno



Figura 25. Cromatógrafo de gases CG-TCD YL Instrument 6500GC System.

Materiales y equipos

- 1 mL de muestra gaseosa
- Cromatógrafo de gases CG-TCD YL Instrument 6500GC System

Metodología

Este cromatógrafo tiene una columna de tamiz molecular activado A1843-HA. Se utiliza el método H₂-Tamiz Ar₆, donde el gas portador es 50 ml/min de argón. La columna opera a 100 °C, el inyector a 120 °C y el detector de conductividad térmica a 120 °C.

Este equipo entrega un área y un porcentaje molar de hidrógeno. Utilizando este porcentaje y la ley de los gases ideales, se pueden calcular los moles de hidrógeno producidos.

8.7 Cálculos

Cálculos realizados para la obtención de los resultados tratados.

En todos los cálculos se desprecia la variación del volumen útil de la botella, a pesar de las extracciones de líquido, debido a que la variación entre el volumen inicial y el final es menor al

15% cuando se trata de la fase líquida. Sin embargo, para la fase gas, se considera un aumento de 4 mL de volumen que corresponde al volumen líquido retirado en la muestra anterior.

8.7.1 Producción de biomasa

El crecimiento celular es el único proceso de los que tiene lugar en el que se consume nitrógeno, por lo que se empleará el consumo de NT como un método indirecto para estimar la producción de biomasa. Esto permite reducir el volumen de muestra necesario comparado con la determinación directa mediante SSV y reduce la carga analítica. Además, da una mejor estimación del crecimiento de la biomasa que la determinación de SSV cuando se emplean sustratos no solubles (aceite) que contribuyen a la masa medida en el análisis de SSV.

Primero, se calcula el NT inicial introducido en las botellas. Para esto se utilizan los valores de NT de la sección 3.2 Montaje de reactores en discontinuo. En ambos casos, el nitrógeno agregado corresponde al nitrógeno del lodo y al NH_4Cl agregado de los macronutrientes.

Con los valores de las analíticas obtenidas en la sección 4.3.1.1 Concentración de sólidos en suspensión totales (SST) y volátiles y la ecuación (16), se puede calcular la concentración de nitrógeno en la botella para cada lodo. Además, se encuentran los valores de volumen de lodo agregado y volumen útil de las botellas.

$$TN_{Lodo\ botella}(mg/L) = TN_{Lodo} \cdot \frac{Volumen\ de\ lodo\ agregado}{Volumen\ útil\ de\ la\ botella} \quad (16)$$

Luego, se calcula la cantidad de nitrógeno agregada en los macronutrientes, según la ecuación (17).

En todos los casos, a los reactores batch se les agregó 6780,8 mg/L de NH_4Cl .

$$TN_{NH_4Cl}(mg/L) = 6780,8 \frac{mg\ NH_4Cl}{L} * \frac{Volumen\ agregado}{Volumen\ útil\ de\ la\ botella} \cdot \frac{1\ mmol\ NH_4Cl}{53,491\ mg\ NH_4Cl} \cdot \frac{14\ mg\ N}{1\ mmol\ N} \quad (17)$$

Se obtuvo una concentración de 177 mg N/L.

Así, siguiendo la ecuación (18), se tiene la concentración inicial de nitrógeno total en el lodo.

$$NT_{toteórico}(mg/L) = NT_{Lodo\ botella} + NT_{NH_4Cl} \quad (18)$$

Este cálculo sirve para calcular la dilución que se debe hacer en las analíticas de nitrógeno total.

En todos los ensayos se utilizó una relación 1:20. Con objetivo de tener valores más precisos, se

utilizó en los cálculos de crecimiento de biomasa el primer valor de NT obtenido en las analíticas como el valor total inicial de TN en cada botella NT_{t_0} (mg/L).

Ahora, el crecimiento de la biomasa se puede calcular en unidades de g DQO/L. Esta medida se puede calcular para un momento determinado en el tiempo, dependiendo de los valores obtenidos en de NT para cada muestra tomada.

- Concentración de DQO/L equivalentes al crecimiento de biomasa

A partir de esta ecuación de formación de la biomasa, se establece que la relación estequiométrica entre la biomasa y el nitrógeno es de 1:1. Además, se determina que la DQO teórica de la biomasa es de 1,42 mg DQO/mg biomasa. Con estos datos, la *ecuación (19)*, presentada a continuación, permite conocer la biomasa formada en unidades de DQO/L equivalentes.

$$Biomasa (g DQO/L) = (NT_{t_0} - NT_{t_i}) \cdot \frac{1}{MM_N} \cdot MM_{biomasa} \cdot \frac{1 \text{ mmol biomasa}}{1 \text{ mmol N}} \cdot DQO_{biomasa} \cdot \frac{1 g}{1000 mg} \quad (19)$$

Donde:

$$DQO_{biomasa} = 1,42 \text{ mg DQO/mg biomasa (DQO teórica)}$$

8.7.2 Ácidos grasos volátiles producidos

Mediante la cromatografía de gases para la detección de AGV, se obtienen las concentraciones de estos en mg/L para cada muestra tomada. Para poder utilizar estos datos en los balances se deben transformar a unidades que sean comparables con otros datos. Por eso se plantean 2 unidades equivalentes:

- Gramos obtenidos

Para esto se requiere de una conversión simple que se puede ver en la *ecuación (20)*.

$$AGV (g) = AGV_{i,f} \cdot \frac{1 g}{1000 mg} \cdot Volumen \text{ útil de la botella} \quad (20)$$

Donde:

AGV_i : concentración de un AGV específico en una muestra dada (mg/L)

- Concentración de DQO equivalentes a AGV

Primero, es necesario obtener las equivalencias de AGV a DQO. Estas, pueden calcularse con la ecuación de formación de cada ácido y se presentan en la Tabla 10. Con estos datos se aplica la ecuación (21), que permite obtener el equivalente a las concentraciones de AGV en unidades de DQO/L.

$$AGV (g DQO/L) = AGV_{i,f} \cdot Factor\ de\ conversi3n \cdot \frac{1\ g}{1000\ mg} \quad (21)$$

Donde el factor de conversi3n depende del 1cido graso vol1til y est1 en unidades de (mg DQO/mg AGV) (Tabla 6)

8.7.3 Aceite no hidrolizado

Dado a las limitaciones en la conversi3n anaerobia de corrientes lip1dicas, el c1lculo de la cantidad de aceite sin convertir es de vital importancia para los balances al sistema.

Por un lado, se tienen los s3lidos obtenidos a finalizar el ensayo mediante la determinaci3n anal1tica de SSV, como se explica en el apartado 4.3.1.1 Concentraci3n de s3lidos en suspensi3n totales (SST) y vol1tiles. Por otro lado, se considera la biomasa inicial (SSV inicial) y la formada mediante el crecimiento celular durante el ensayo, el cual se basa en el consumo de NT, como se explica en el apartado 3.4.2 Producci3n de biomasa.

L3gicamente, la biomasa obtenida en la primera parte (determinaci3n de SSV) es mayor, dado que considera gotas de aceite sin solubilizar y/o adherido al fango; en cambio, el segundo fue centrifugado y filtrado, libr1ndose de cualquier suciedad. Entonces, con la ecuaci3n (22) se pueden obtener los gramos de aceite (g) que quedan en la mezcla.

$$Aceite_{No\ hidrolizado} = [Biomasa_{Anal1tica} - (Biomasa_{Crecimiento} + Biomasa_{Inicial\ lodo})] \cdot Volumen\ 1til \cdot 1,42\ g\ DQO/g\ SSV \quad (22)$$

Donde:

Aceite_{No hidrolizado}: corresponde al aceite que queda en la botella (g DQO)

Biomasa_{Analítica}: biomasa obtenida de la analítica de sólidos suspendidos volátiles del apartado 4.3.1.1 Concentración de sólidos en suspensión totales (SST) y volátiles al lodo que quedó al final del experimento (g SSV/L)

Biomasa_{Crecimiento}: biomasa obtenida al realizar los cálculos del apartado 3.3.1 Producción de biomasa (g SSV/L)

Biomasa_{Inicial lodo}: biomasa obtenida de la analítica de sólidos suspendidos volátiles del apartado 4.3.1.1 Concentración de sólidos en suspensión totales (SST) y volátiles, realizada al lodo que se puso inicialmente en las botellas (g SSV/L)

8.7.4 Aceite hidrolizado a DOQ soluble

A partir de la Tabla 18, se conoce la cantidad teórica de aceite agregado a las botellas inicialmente. Así, restando de este valor inicial el aceite restante calculado en la ecuación anterior, se puede obtener, con la ecuación (23), el aceite convertido en unidades de gramos.

$$Aceite_{Convertido} = Aceite_{Inicial} - Aceite_{Restante} \quad (23)$$

Donde:

Aceite_{Convertido}: aceite hidrolizado a DQO soluble (g)

Aceite_{Inicial}: aceite introducido al inicio del experimento (g)

Además, si se multiplica por la equivalencia de gramos de DQO a gramos de aceite, se puede obtener el valor de aceite hidrolizado en unidades de DQO. Para esto se aplica la ecuación (24).

$$Aceite_{Convertido,DQO} = Aceite_{Convertido} \cdot 2,83 \text{ g DQO/g aceite} \quad (24)$$

Donde:

Aceite_{Convertido,DQO}: aceite hidrolizado a DQO soluble en unidades de DQO.

8.7.5 Cantidad de dióxido de carbono, metano e hidrógeno

Primero, se calcula el porcentaje de CO_2 o CH_4 a partir de las áreas obtenidas en los cromatogramas de biogás, según la ecuación (25).

$$\%m_i = \frac{A_i/f_i}{\sum A_i/f_i} \cdot 100 \quad (25)$$

Donde:

$\%m_i$: porcentaje molar

i: N_2 , CH_4 o CO_2

A: área ocupada por el gas

f: factor de respuesta que depende del gas

En la Tabla 22, a continuación, se puede ver una tabla de los factores.

Tabla 22. Factores de respuesta de los gases del cromatógrafo de biogás.

Gas	Factor
CO2	1
CH4	0,636
N2	1,049

Luego el porcentaje molar debe ser recalculado para considerar la presencia de hidrógeno. Esto se puede hacer según la ecuación (26).

$$\%M_i = \%m_i / (1 + \%n_{H_2}) \quad (26)$$

Donde:

$\%n_{H_2}$: se obtiene de la cromatografía de hidrógeno.

$\%M_i$: porcentaje molar recalculado de los compuestos CH_4 o CO_2 .

Luego se debe calcular los gramos de DQO a los que equivalen al H_2 y al CH_4 . Considerando los factores de transformación de 16 g DQO/mol H_2 y 64 g DQO/mol CH_4 , se pueden obtener los gramos de DQO según las ecuaciones (27) y (28).

$$DQO_{H_2} = \frac{\%n_{H_2}}{\%gases\ DQO} \cdot 16 \frac{g\ DQO}{mol\ H_2} \cdot \frac{DQO_{gases}}{16\ g\ DQO/molH_2} \quad (27)$$

$$DQO_{CH_4} = \frac{\%n_{CH_4}}{\%gases\ DQO} \cdot 64 \frac{g\ DQO}{mol\ CH_4} \cdot \frac{DQO_{gases}}{64\ g\ DQO/molCH_4} \quad (28)$$

Donde:

$\%gases\ DQO$: corresponde a la suma de $\%n_{CH_4}$ y $\%n_{H_2}$.

DQO_{gases} : corresponde a los gramos de DQO calculado 3.3.7 Balance de masa.

8.7.6 Balance de masa

Para cerciorarse de que el ensayo fue llevado a cabo de manera correcta y tener más información del perfil de productos obtenidos, se realiza un balance de masa a todas las cantidades finales de compuestos presentes en las botellas de cada serie. Los balances fueron llevados a cabo en unidades equivalentes a DQO.

El balance de materia se presenta inicialmente en la *ecuación (29)* en unidades de gramos de DQO.

$$DQO_{inicial} = DQO_{soluble} + DQO_{biomasa} + DQO_{gases} + DQO_{no\ hidrolizada} \quad (29)$$

Aquí, la $DQO_{soluble}$ corresponde a AGV, otros productos (algunos identificados mediante HPLC) y sustrato no convertido, pero si hidrolizado.

Este valor de DQO soluble pero no transformado se puede calcular con la *ecuación (30)*.

$$DQO_{Soluble, no\ convertida} = DQO_{soluble} - (DQO_{AGV} + DQO_{HPLC}) \quad (30)$$

Así, la DQO que corresponde a los gases se puede calcular con la *ecuación (31)*.

$$DQO_{gases}(g\ DQO) = DQO_{inicial} - DQO_{no\ hidrolizada} - DQO_{soluble} - DQO_{biomasa} \quad (31)$$

Este parámetro puede ser calculado de esta forma sólo si toda la DQO soluble ha sido transformada a AGV o compuestos determinados.

Entonces, se tienen todos los parámetros para realizar el balance de masa. $DQO_{inicial}$ es la que se introdujo al inicio del ensayo. $DQO_{no\ hidrolizada}$ fue calculada en el apartado 3.3.4. Aceite no hidrolizado. $DQO_{soluble}$ se puede calcular mediante la analítica de 3.3.2.2 Demanda Química de oxígeno. $DQO_{biomasa}$ fue calculada en el apartado de 3.3.1 Producción de biomasa.

A continuación, se presenta la Figura 26, la cual es aclaratoria de lo que se espera balance.

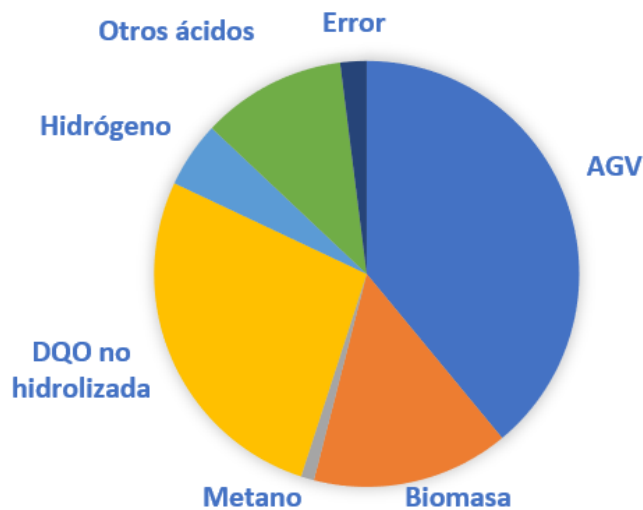


Figura 26. Balance de masa en unidades de g de DQO equivalentes, ejemplo aclaratorio.

8.7.7 Estimación de la composición de PHA teórico

A partir de la Tabla 1 se pueden realizar correlaciones para estimar la composición de PHB y PHV que se puede producir a partir de las corrientes de AGV obtenidas en este trabajo. Con estos datos se obtiene la Tabla 23.

Tabla 23. Valores calculados para realizar las correlaciones para la estimación teórica de la producción de PHA a partir de las corrientes de AGV de este trabajo.

	HB % mol	HV %mol	Par	Impar
Ácido acético	96	4	100	
Ácido propiónico	37	63		100
Mezcla 4	47	53	55	45
Mezcla 5	65	35	72	28
Mezcla 1	61	39	69	31
Mezcla 2	79	21	85	15
Mezcla 3	85	15	90	10

Graficando estos datos, se puede obtener las siguientes correlaciones (Figura 27 y Figura 28)

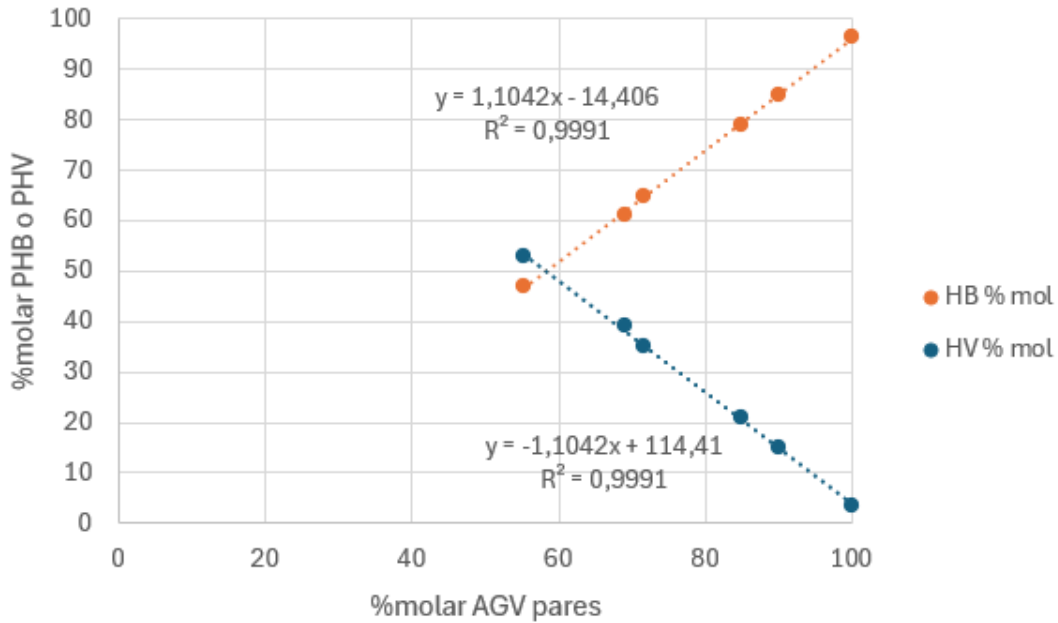


Figura 27. Correlación entre AGV de carbonos pares y producción de PHB y PHV.

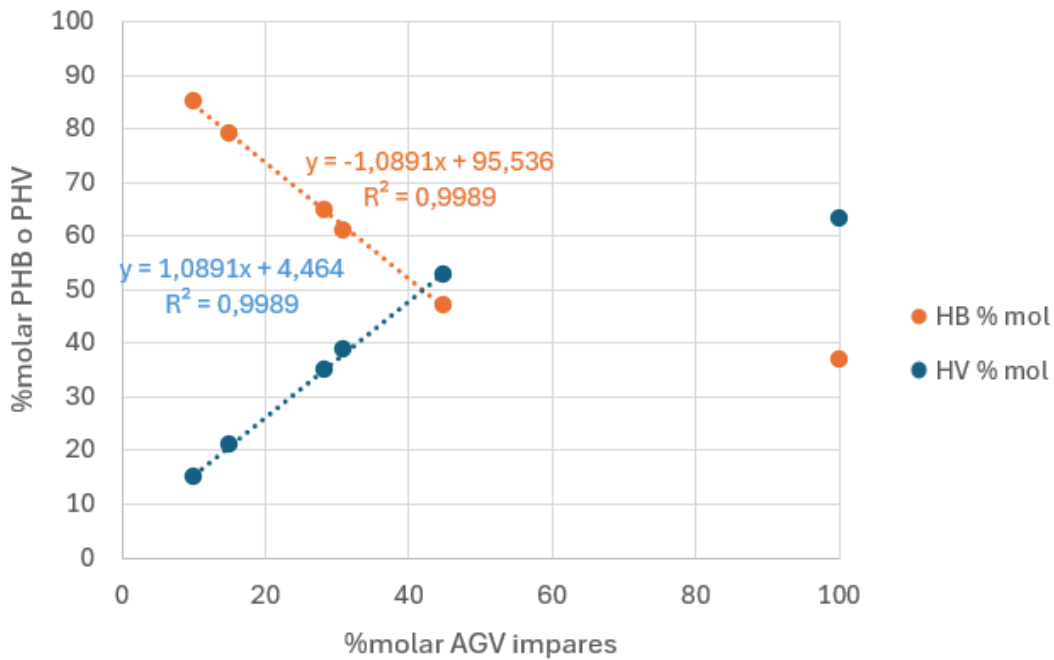


Figura 28. Correlación entre AGV de carbonos impares y producción de PHB y PHV.

Si bien es posible de crear a escala laboratorio, no se considera realista una corriente de aguas residuales con AGV sólo de carbono impar (siempre hay que considerar que el ácido acético es el primero en formarse y tiene la etapa de acetogénesis, por lo que se considera que siempre estará presente, aunque sea en baja cantidad). Por otra parte, este punto distorsiona las tendencias lineales

al crear un %HV máximo aparente dentro de la célula. Por eso, ese punto no se considera en la línea de tendencia utilizada para los cálculos, aunque se puede ver representado en la Figura 28.

Ya sea que se calcule a partir de los carbonos pares o impares, los porcentajes de PHB y PHV obtenidos deberían ser los mismos.

Para poder estimar los porcentajes de PHB y PHV que se pueden producir a partir de las corrientes generadas en este trabajo, se deben seguir la *ecuación (32)*.

$$\%Moles_j = \left(\frac{\%masa/masa_j}{Moles_{Totales}} \right) \cdot 100 \quad (32)$$

Donde:

j: corresponde al AGV de cada corriente.

Luego, simplemente se suman los %Moles_j de los AGV de carbonos par (acético y butírico) y los impares (propiónico y valérico) y se aplican las correlaciones.

8.8 Balance de materia

En el primer ensayo, no se pudo realizar la analítica de detección de hidrógeno, por lo que no se realizó el balance de masa. Como se puede ver en la Figura 29 y Figura 30, no se consideró necesario ilustrar un balance de la serie de blancos, debido a que, como no se agregó un sustrato que proporcionara alimento para el crecimiento de los microorganismos y la producción de AGV, no es interesante de analizar.

Al realizar los balances de masa se debe considerar que pueden formarse compuestos no deseados, imprevistos o que no son detectados por los equipos y métodos utilizados. Entre estos, al realizar la analítica de HPLC, se encuentran en ácido oxálico y el ácido fumárico. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que haya más y sería de gran interés para próximas investigaciones el poder buscar la presencia de estos. Además, el ácido palmítico, el cual tampoco puede ser detectado en los métodos de los equipos utilizados, suele formarse durante la hidrólisis del ácido oleico y posiblemente forma parte de los compuestos denominados como “desconocidos”. Dado que se tiene un análisis de triacilglicéridos del aceite utilizado en el ensayo (Tabla 15) y ninguno de esos AGCL se puede detectar mediante los métodos de cromatografía utilizados, se tiene la Tabla 13,

donde se presentan los compuestos que se cree que pueden formar parte de los “desconocidos”. En futuras investigaciones, se sugiere realizar una analítica que permita detectar su presencia.

En el caso del aceite y el ácido oleico, el crecimiento de la biomasa se tuvo que estimar con una relación teórica a partir de la glucosa, dado que en las fechas en las que terminaron esos ensayos los microorganismos estaban muertos o muriendo, por lo que se liberó nitrógeno al medio lo que genera un “crecimiento negativo”.

Esta relación corresponde a 0,12 g DQO (biomasa de crecimiento)/g DQO (AGV formados).

A continuación, se tiene el balance de materia del segundo ensayo (Figura 29)

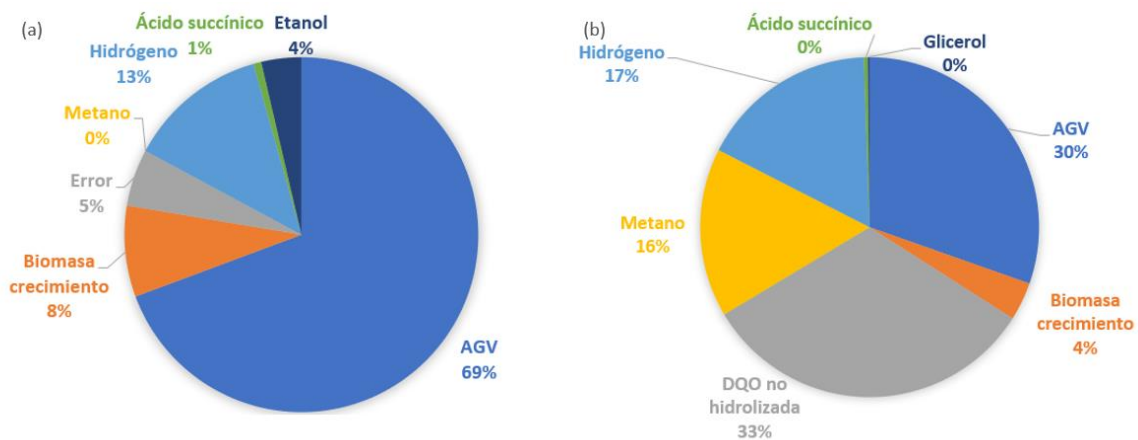


Figura 29. Balance de masa del segundo ensayo. (a) serie glucosa, (b) serie aceite.

Por otra parte, durante el ensayo 2, las botellas de glucosa tuvieron que ser despresurizadas varias veces e incluso tuvieron que dejarse pinchadas durante un fin de semana completo con fines de seguridad. Esto provocó que la cantidad de moles producidos sea difícil de determinar, por eso se realizó el cálculo a partir de la ecuación (31).

En el caso del ensayo 3, no toda la DQO soluble se convirtió en AGV ni se pudo identificar todos los compuestos, como se puede ver en la Figura 30. Los compuestos no determinados se calcularon en base a la DQO soluble final según la ecuación (33).

$$DQO_{No\ determinada}(g\ DQO) = DQO_{soluble} - DQO_{HPLC} - DQO_{AGV} \quad (33)$$

En este caso, los compuestos desconocidos no se considera que correspondan a gases y no se aplica la ecuación (31), sino que para calcular los gases se calculó el total de gases formados a partir de

las presiones y el volumen aplicando la Ley de los Gases Ideales para despejar los moles (*ecuación (34)*).

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T \quad (34)$$

Donde:

n : moles totales formados

P : sobrepresión acumulada en unidades de atmósferas

V : volumen de espacio de cabecera usado por el gas en unidades de litros

R : constante de la Ley de los Gases Ideales ($0,082 \text{ L} \cdot \text{atm}/(\text{mol} \cdot \text{K})$)

T : temperatura de operación (303,15 K)

Luego se aplican las ecuaciones (25) y (26) y se multiplica por los factores de conversión 16 g DQO/mol H_2 y 64 g DQO/mol CH_4 para obtener sus equivalencias a DQO/L.

El parámetro que más destaca, luego de la cantidad de AGV producidos, es la cantidad de $\text{DQO}_{\text{No hidrolizada}}$ que se obtuvo en el segundo ensayo. Esto puede deberse a la gran cantidad de aceite y ácido oleico que estaba en forma de flóculos en la superficie o estaba pegado a las paredes. Esto generó que el balance de las botellas que contenían aceite fuera complejo y posiblemente contenga mucho error, dada la forma en que se tuvo que estimar la biomasa, además de que la DQO correspondiente a los gases se estimó como lo que restaba, por lo que está afectada por todo el error que pueda tener el resto de las analíticas.

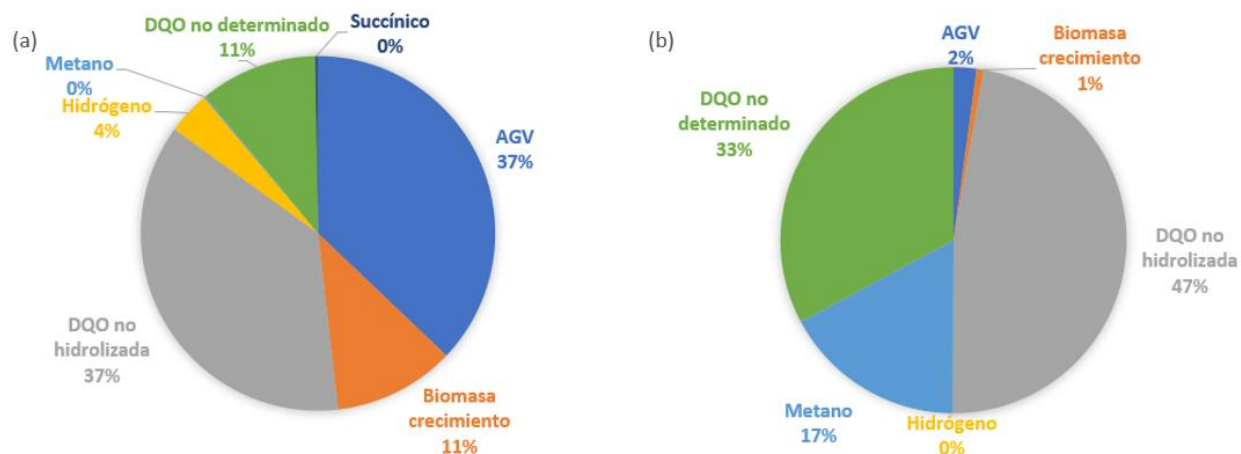


Figura 30. Balance de masa del tercer ensayo. (a) Ácido oleico, (b) Aceite (1,87 g DQO/L)

Un análisis más detallado de cada parte del balance se presenta en los siguientes apartados y no se explica ahora con objetivo de no repetir, además de poder entrar en detalles como el efecto del pH, el inóculo, el sustrato, además de DQO soluble alcanzada, AGV obtenidos y otros parámetros de interés.

8.9 Ratios

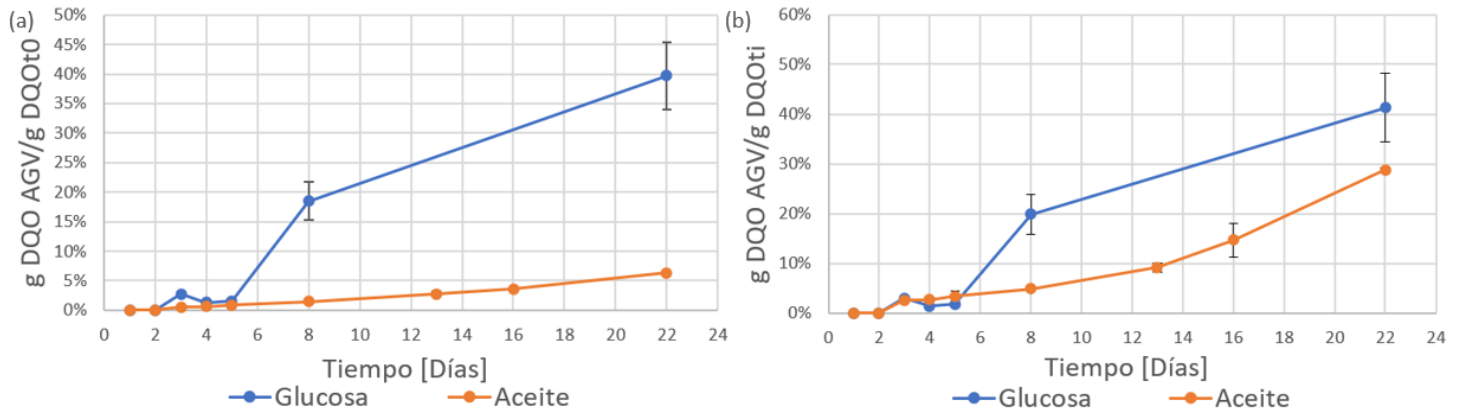


Figura 31. Ratios calculados en el primer ensayo. (a) Ratio 1, (b) Ratio 1.

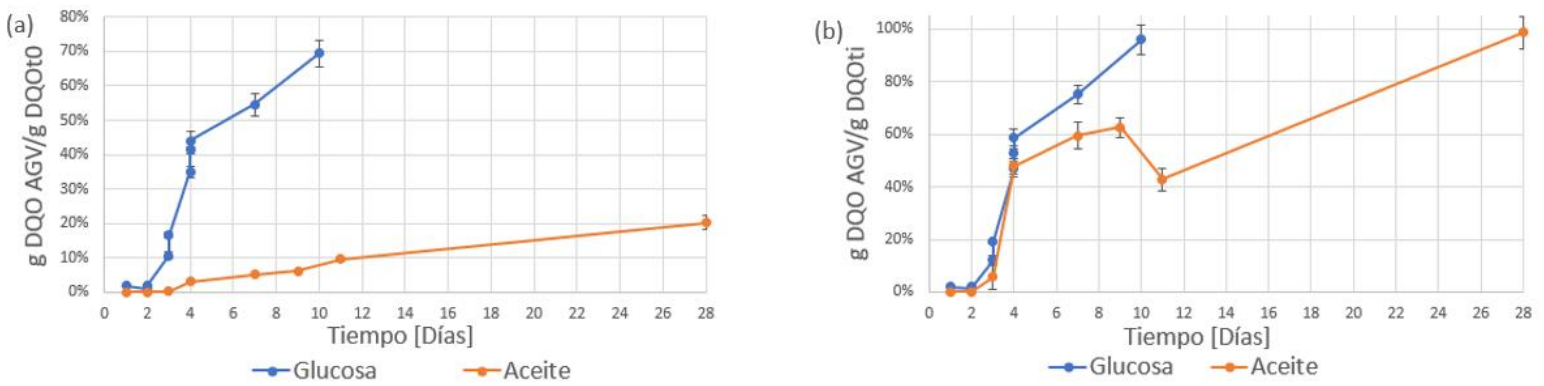


Figura 32. Ratios calculados en el segundo ensayo. (a) Ratio 1, (b) Ratio 1.

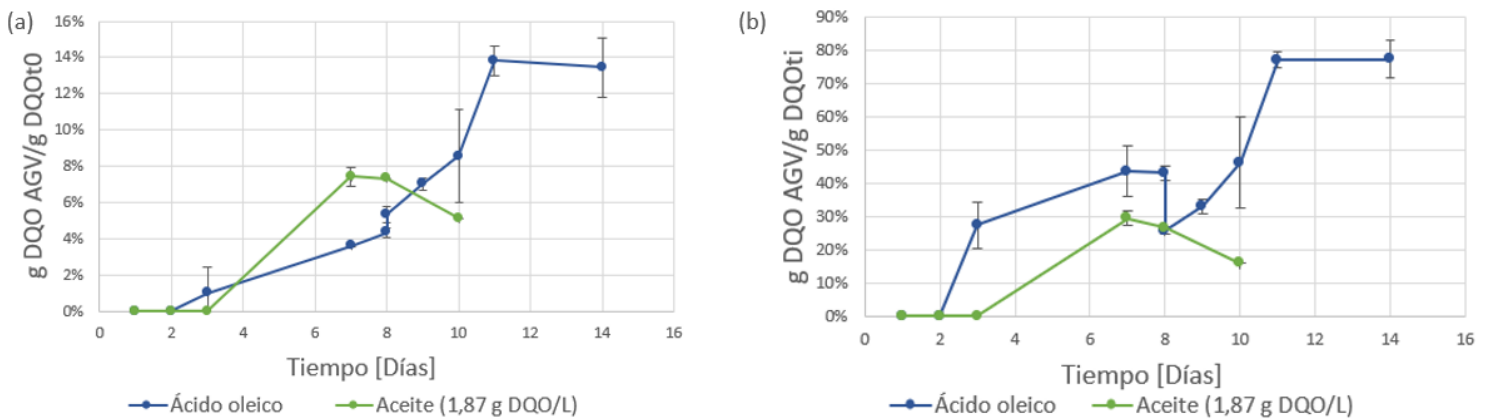


Figura 33. Ratios calculados en el tercer ensayo. (a) Ratio 1, (b) Ratio 1.

8.10 Fotografías de las botellas

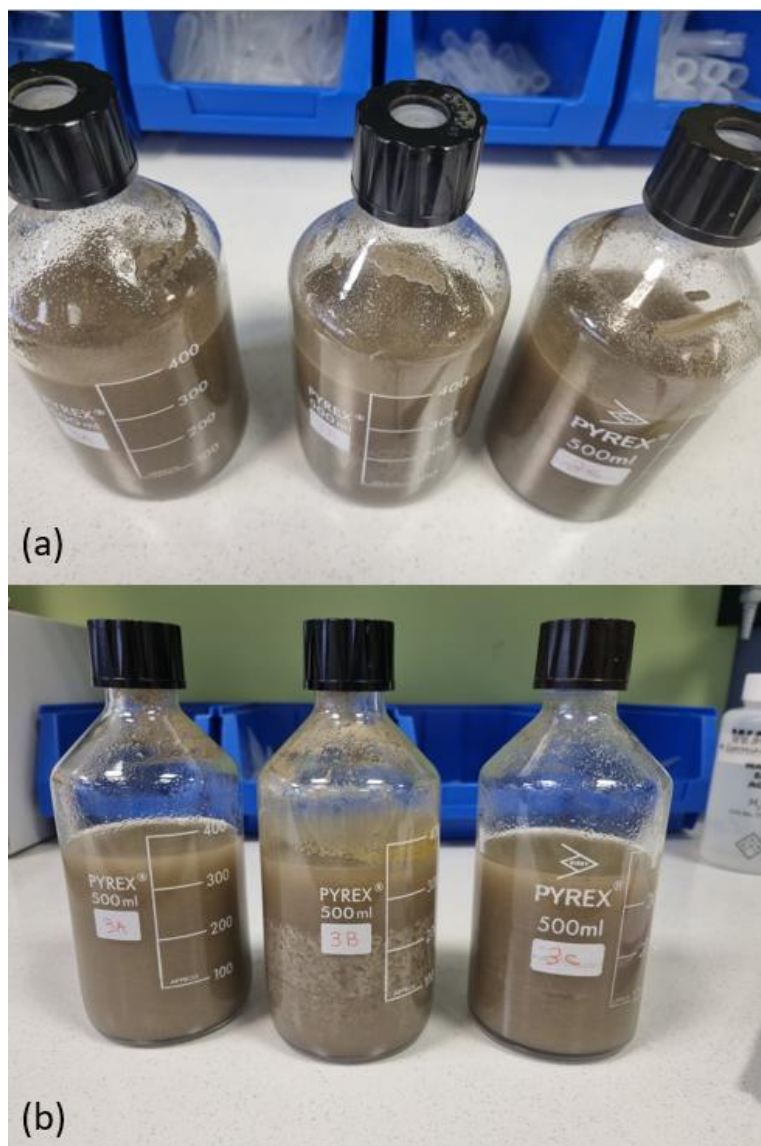


Figura 34. Fotografías de las botellas de la serie de aceite del segundo ensayo. De izquierda a derecha: 3A, 3B, 3C. (a) 19 de diciembre 2023, (b) 8 de enero de 2024.

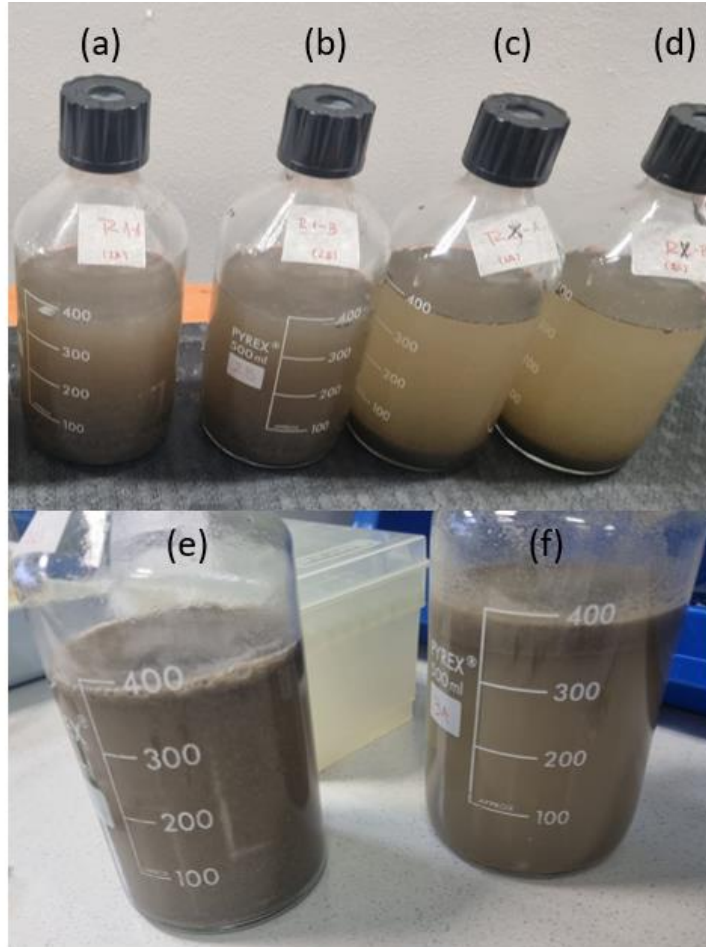


Figura 35. Fotografías de las botellas de la serie de aceite y ácido oleico del tercer ensayo. Arriba: (a) y (b) Aceite (1,87 g DQO/L). (c) y (d) Aceite (0,75 g DQO/L). Abajo: (e) y (f) ácido oleico. 18 de enero de 2024

8.11 Análisis de DQO soluble

- Primer ensayo

A continuación, en la Figura 36 se pueden ver los AGV totales formados en cada serie y la DQO soluble disponible.

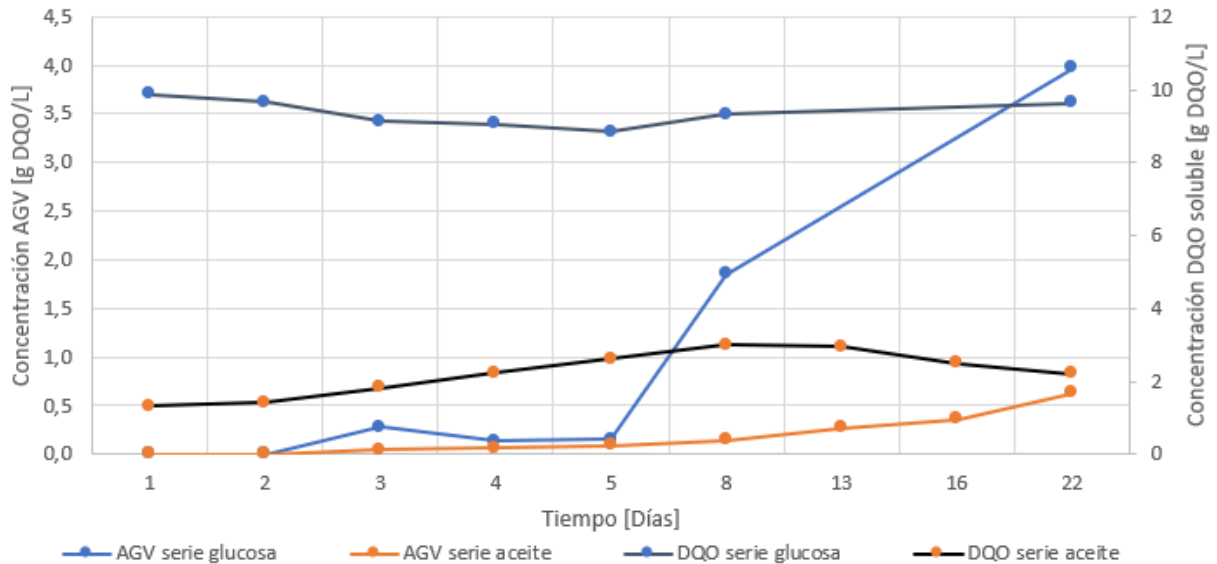


Figura 36. AGV acumulados y DQO soluble en unidades de DQO/L durante el primer ensayo.

En la serie de glucosa se alcanzó un total de 3,970 g DQO/L de AGV y en la serie de aceite, sólo 0,633 g DQO/L de AGV.

Además, en la Figura 36 se observa que, para el caso del ensayo con glucosa, inicialmente hay un ligero consumo de los AGV presentes en el medio y que no fue hasta entre el día 5 y 8 cuando la concentración de AGV aumenta significativamente. Entre los días 8 y 22, no hubo incremento en la sobrepresión, como se puede ver en la Figura 20, anexo 8.6.2. Por lo tanto, la producción de AGV durante este período se debe potencialmente a reacciones de fermentación secundarias en las que metabolitos intermediarios como etanol, ácido láctico u otros son convertidos a AGV.

Por otra parte, las botellas en las que se ha empleado aceite residual como sustrato presentan un incremento de AGV sostenido en el tiempo, sugiriendo, de acuerdo con Holohan et al., 2022 que hay una limitación cinética por la superficie disponible en el proceso y que el máximo no se ha alcanzado. La diferencia entre la DQO soluble experimental y la DQO determinada a partir de las concentraciones de AGV es un indicativo de la presencia de sustrato sin convertir y otros productos

no identificados. Dado que se realizó un HPLC, se sabe que los productos desconocidos no son etanol, ácido succínico, fórmico ácido láctico ni glicerol como podría esperarse de la hidrólisis de un aceite.

- Segundo ensayo

A continuación, para comparar con el primer ensayo, se presenta la Figura 37 con la cantidad acumulada de AGV en unidades de DQO/L equivalentes, para poder tener un total obtenido. Como se puede apreciar, la concentración de AGV obtenidos en las botellas de glucosa (6,93 g DQO/L) logró casi duplicarse en comparación con la Figura 36. En el caso del aceite, el resultado final de AGV acumulados logró casi cuadruplicarse (2,38 g DQO/L). En el día 9 de experimento, a mediodía, luego de tomar la primera muestra de ese día, se inyectó 1 g de DQO/L como glucosa para estimular la hidrólisis suministrando DQO soluble que pueda ser fácilmente utilizada y por tanto los microorganismos tengan una fuente de energía para la producción de enzimas hidrolíticas.

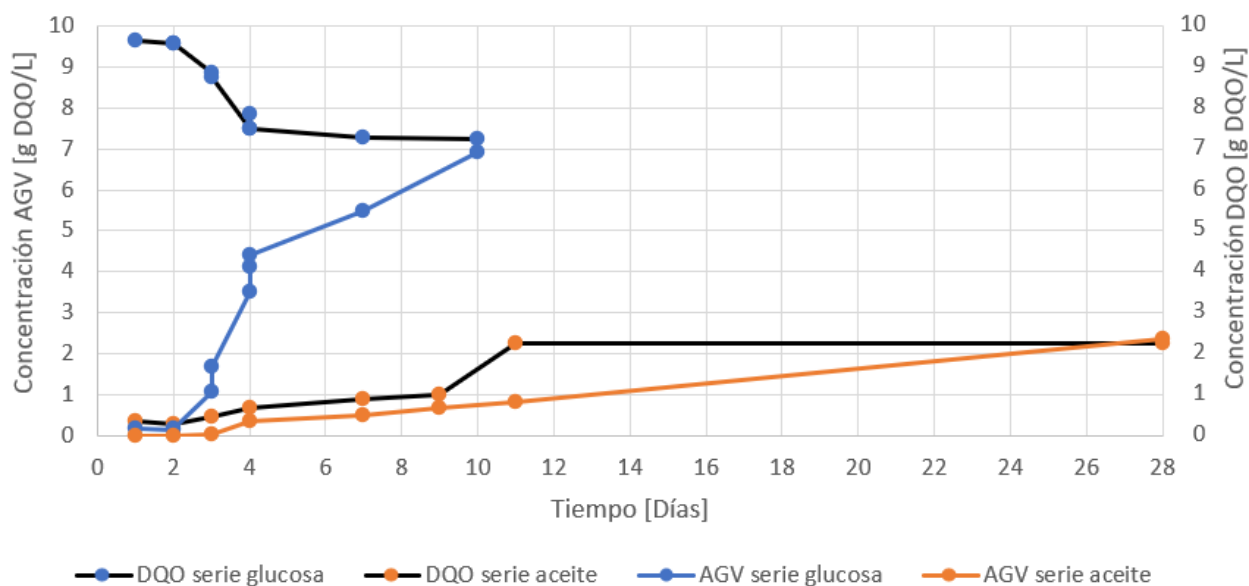


Figura 37. AGV acumulados y DQO soluble en unidades de DQO/L durante el segundo ensayo.

- Tercer ensayo

En la Figura 38 se ve que la DQO soluble descende entre el día 1 y 2, posiblemente debido a un error por trabajar con concentraciones demasiado bajas.

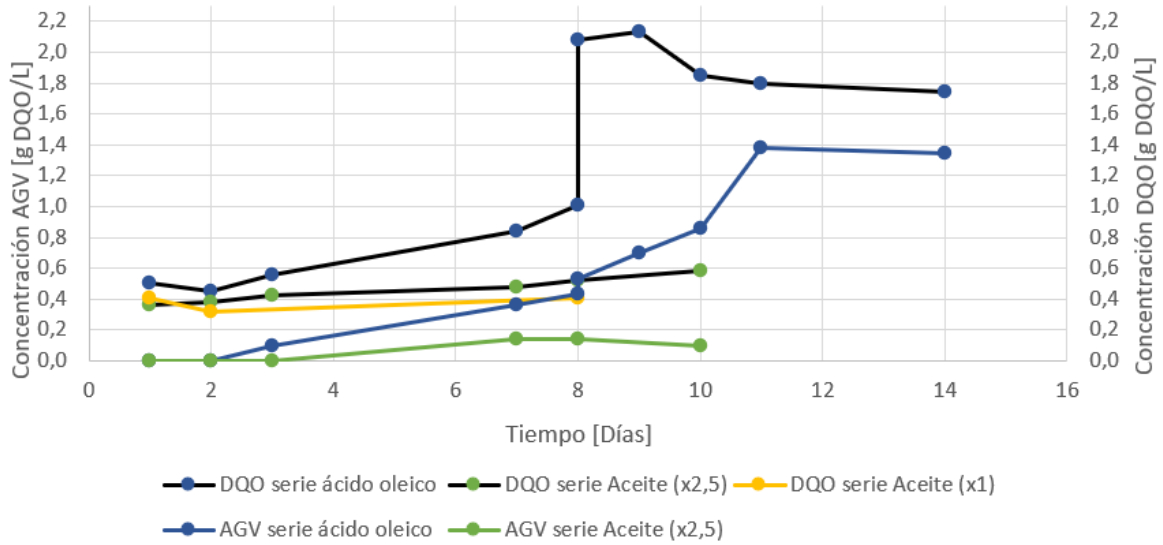


Figura 38. AGV acumulados y DQO soluble en unidades de DQO/L en el tercer ensayo.

En la Figura 38 se puede ver que la DQO soluble aumenta cada día, esto debido a que el aceite se estaba hidrolizando y solubilizando a la vez que se formaban AGV. La hidrólisis se puede evidenciar al comparar la concentración de glicerol presente el día 2 (10,49 mg/L) con la del día 4 en la cual ya no hay glicerol.