



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTALES

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS POR
FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO A PARTIR
DE RESIDUOS RICOS EN GRASAS. IMPACTO
AMBIENTAL Y POSIBLES USOS**

Tesis presentada

por

Angélica María Santis Navarro

para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología Ambientales por
la Universidad Autónoma de Barcelona

Bellaterra, Octubre de 2013

TERESA GEA LEIVA profesora titular del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona y RAQUEL BARRENA GÓMEZ investigadora Postdoctoral del mismo centro.

CERTIFICAN:

Que la Ingeniera Industrial Angélica María Santis Navarro ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo con título “*Estudio de la producción de lipasas por fermentación en estado sólido a partir de residuos ricos en grasas. Impacto ambiental y posibles usos*” que se presenta en esta memoria, la cual constituye su Tesis para optar al Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Para su conocimiento y para los efectos que se consideren oportunos, presentamos al Instituto de Ciencia y Tecnología Ambientales y la Escuela de Posgrados de la Universidad Autónoma de Barcelona la mencionada tesis, firmando el presente certificado.

Bellaterra, Octubre de 2013

Dra. Teresa Gea Leiva

Dra. Raquel Barrena Gómez

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido posible gracias al apoyo de dos proyectos de investigación:

“Estudio de las emisiones de procesos de compostaje de distintos residuos orgánicos. Dinámicas de carbono y nitrógeno e influencia en la estabilidad del producto final y en la optimización del proceso” - CTM2009-14073-C02-01 (Ministerio de Educación y Ciencia) y *“Del residuo al producto: aplicación de la fermentación en estado sólido para la obtención de enzimas de interés (lipolíticas, proteolíticas y lignocelulósicas) a partir de residuos industriales orgánicos”* - WA2PRO del Plan Nacional I+D+i (Ministerio de Economía y Competitividad), igualmente quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Barcelona por concederme la beca PIF.

Agradezco la colaboración que recibí por el grupo de Lipasas de la Universidad Autónoma de Barcelona, pues los conocimientos transmitidos han sido de gran utilidad para que se pudiera llevar a cabo parte del trabajo recogido en ésta tesis. Quiero agradecer a diversas entidades como LIPSA, METROFANG y ECOPARC2, en especial a Ramón Bella, Eloi Montoliu y Jessica Sánchez por su ayuda para facilitarme los materiales que fueron la base para realizar la tesis.

Al Dr. Toni Sánchez por darme la oportunidad de pertenecer al GICOM, por mostrarme la luz en las charlas que tuvimos, e inspirar en mi mucha admiración. A las Dras. Raquel Barrena y Teresa Gea, por asesorarme, acompañarme, y por ser parte de la tripulación del gran barco que representa la tesis doctoral.

Quiero agradecer a las personas del GICOM que estuvieron día a día conmigo en esas largas jornadas de laboratorio, Juliana, Lucía, Rebeca, Caterina, Ana, László, David, Jorge, Belén, Michelle, Sergio. Agradezco a Ana su colaboración en los largos montajes de botellas!! uff que faena!!

También agradezco a las personas de otros laboratorios como Mabel, Milja, Wences. Agradezco a todos los laborantes y al personal de soporte de laboratorio, a Pili, Manuel, Rossi y especialmente a Margot, que me ha sacado de problemas de última hora y adicionalmente por convertirse en un buena amiga!!.

A mis compañeros de despacho, Carmen, Lara, Zul, Max, Laura, David, por los break que hacíamos, que en muchas ocasiones se volvieron charlas muy graciosas. A Carmen le agradezco por ayudarme a resolver muchas de las dudas que se me presentaron en el camino.

Quiero agradecer a las amigas que desde mi llegada se convirtieron en la compañía y soporte de todos los días, a Rossmery, Andrea, Mariangel, Laura y en especial a

Nelsy, quien se ha convertido en amiga, cómplice y confidente, y soporte durante estos últimos años, un beso para todas y gracias por permitirme conocerlas y ser parte de su vida,

por compartir alegrías, tristezas, triunfos, en todo este tiempo.

A mis amigos Miguel, Laura, Eve gracias por la amistad que me han brindado, por estar conmigo, por aconsejarme, por constituir las manos amigas en esta travesía. A Paula (Elviii), gracias por ser cómplice, amiga y mi despertador desde la distancia, un beso para ti peque.

Y bueno dejo para el final a las personas más importantes, a mi mamá quien me ha dado la vida y quién siempre ha estado allí para no dejarme desfallecer, gracias mami por ser tu, por fortalecerme en todo momento por todo y a mis hermanos por ser los mejores y estar conmigo incondicionalmente a pesar de la distancia, gracias por ser los mejores.

Quisiera agradecer a también a todas aquellas personas que de alguna u otra manera han puesto su granito de arena contribuyendo a mi formación.

GRACIAS A TODOS!!

RESUMEN

Las actividades agroindustriales han venido experimentando un inusitado y acelerado desarrollo. Una de las principales consecuencias de este desarrollo ha sido el aumento en la generación de los desechos sólidos provenientes de las mismas. Esto implica el origen de un problema tanto económico como ecológico por la acumulación de residuos. En la búsqueda de reducir estos impactos en el ambiente se han planteado estrategias que conllevan a obtener a partir de estos residuos, una serie de compuestos que resultan útiles por sus propiedades y ofrecen múltiples ventajas en diversos campos.

Una alternativa para el aprovechamiento de los residuos es la fermentación en estado sólido. Ésta se ha aplicado en diferentes áreas y se han obtenido productos interesantes, entre los que se pueden mencionar alimentos para animales, ácidos orgánicos, pesticidas, enzimas, entre otros. En lo que respecta a enzimas, se han producido lipasas por fermentación en estado sólido a partir de varios sustratos entre los que se incluyen salvados (trigo, arroz, soja, cebada), las tortas oleaginosas (soja, oliva, sésamo, babasú), y el bagazo (caña de azúcar).

En vista de lo anterior, esta investigación se enmarca en la obtención de lipasas con características novedosas a partir de los residuos provenientes de la industria de producción y refinado de aceites vegetales, aprovechando las herramientas que ofrece la biotecnología.

Para la producción de lipasas por fermentación en estado sólido, se evaluaron los diferentes elementos (sustratos, cosustrato, contenido de humedad, nutrientes) que facilitaron la formación del producto. Asimismo, soportados en técnicas utilizadas en el compostaje, las cuales se han utilizado con éxito en la fermentación en estado sólido, se valoraron diferentes parámetros como herramientas de seguimiento y optimización del proceso, tales como velocidades de degradación, de consumo de oxígeno (OUR), y el índice respirométrico dinámico (IRD). Estos parámetros ayudaron ofreciendo información acerca de la evolución del proceso, el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, la disponibilidad del sustrato, condiciones de operación, rendimientos, tiempos de producción, entre otras.

Una vez producida la lipasa, se determinaron procesos posteriores como su extracción, la medida de su actividad y la identificación de características como la termoestabilidad.

Obtenida la información de la lipasa, se prestó atención a la fermentación y su realización en reactores en diferentes escalas con el objetivo de evaluar el proceso con miras a la puesta en marcha de sistemas a gran escala. Así mismo, se estudió el impacto ambiental que se puede producir especialmente por emisiones gaseosas de compuestos orgánicos volátiles (COVs), metano (CH_4), amoníaco (NH_3) y óxido nitroso, (N_2O) durante este tipo de fermentaciones.

Para finalizar, se evaluó el potencial de la lipasa producida por fermentación en estado sólido (SSF), aplicándola en la mejora de procesos ambientales, como la digestión anaerobia de residuos con alto contenido de grasas, acelerando el proceso de degradación, y en consecuencia logrando que el proceso sea más ventajoso.

ABSTRACT

Agro-industrial activities have been experiencing an unusual and rapid development. One of the main consequences of this development has been the increase in the generation of solid waste. The accumulation of this waste is a problem both economically and ecologically. In seeking to reduce the impact of this waste on the environment, strategies have emerged for obtaining a series of compounds from these residues that have useful properties and offer many advantages in various fields.

An alternative use for the residues is solid state fermentation (SSF). This has been applied in different areas and interesting products have been obtained including animal feed, organic acids, pesticides, and enzymes, amongst others. With regard to enzymes, lipases have been produced by solid state fermentation from several substrates including bran (wheat, rice, soybean, barley), oil cake (soybean, olive, sesame, babassu) and bagasse (sugar cane).

In view of the above, this research focuses on the collection of lipases with novel features from vegetable oil-refining wastes, using the tools of biotechnology.

Various elements were evaluated that facilitated the production of lipases by solid state fermentation (substrates, co-substrate, moisture, and nutrients). Also, techniques based on those previously used in composting were used with success in solid state fermentation, and different parameters were evaluated as a means of monitoring and optimising the process, such as degradation rates of oxygen uptake (OUR), and dynamic respiration index (DRI). These parameters amongst others helped provide information about the evolution of the process, the growth and development of microorganisms, substrate availability, operating conditions, yields, and production times.

Once the lipase was produced, processes were established for its extraction, the measure of its activity and identification of features such as its thermostability.

Having obtained information on the lipase, attention was given to the fermentation, using reactors of different scales in order to evaluate the process with a view to the implementation of large-scale systems. Furthermore, the environmental impact that may occur during such fermentations was investigated, especially gaseous emissions of volatile organic compounds (VOCs), methane (CH₄), ammonia (NH₃) and nitrous oxide (N₂O).

Finally, the potential of the lipase produced by solid state fermentation (SSF) was assessed, applying it to the improvement of environmental processes such as anaerobic digestion of waste with high fat content accelerating the process of degradation, and thus making the process more advantageous.

1. INTRODUCCION.....	3
1.1 Fermentación en estado sólido.....	3
1.2 Aspectos bioquímicos e ingenieriles de la SSF	5
1.2.1 Temperatura.....	5
1.2.2 Aireación.....	5
1.2.3 Humedad.....	5
1.2.4 Tamaño de partícula.....	6
1.2.5 pH.....	6
1.2.6 Agitación.....	6
1.2.7 Diseño del reactor	7
1.3 Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido	8
1.4 Aplicaciones de la SSF	9
1.5 Producción de Enzimas	10
1.6 Lipasas.....	12
1.7 Producción de lipasas por SSF.....	13
1.8 Aplicación de las lipasas	17
1.8.1 Digestión Anaerobia	18
1.9 Resumen.....	20
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Planta piloto.....	29
3.1.1 Descripción de los reactores.....	30
3.1.2 Descripción del montaje experimental	32
3.2 Velocidad de consumo de oxígeno	33

3.3	Índices de respiración dinámica	34
3.3.1	Índice Respirométrico Dinámico	34
3.3.1.1	Preparación de las muestras	37
3.3.1.2	Caudal de aire aplicado para la determinación del IRD.....	37
3.3.2	Consumo Acumulado de Oxígeno	37
3.4	Métodos analíticos	38
3.4.1	Humedad (H) y materia seca (MS)	38
3.4.2	Materia orgánica (MO)	39
3.4.3	pH.....	39
3.4.4	Porosidad (<i>Air Filled Porosity, AFP</i>).....	40
3.4.5	Nitrógeno Total Kjeldhal.....	40
3.4.6	Nitrógeno Amoniacal.....	41
3.4.7	Contenido de Grasa	42
3.4.8	Ácidos Grasos de Cadena Larga (AGCL).....	43
3.5	Enzima	44
3.5.1	Determinación de la actividad lipolítica en muestras líquidas	44
3.5.2	Determinación de la actividad lipolítica en muestras sólidas	45
3.5.2	Cuantificación de proteínas.....	45
3.5.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	46
3.6	Toma de muestra y métodos analíticos para emisiones gaseosas.....	46
3.6.1	Análisis de amoníaco	46
3.6.2	Análisis de COVs, N ₂ O y CH ₄	46
3.6.2.1	Análisis de Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs)	47
3.6.2.2	Análisis de Metano.....	47

3.6.2.3	Análisis de Óxido Nitroso	48
3.6.3	Calibrado de los métodos cromatográficos	48
3.7	Parametros energéticos	48
3.8	Digestión Anaeróbica	49
3.8.1	Índices anaeróbicos	49
3.8.2	Ensayo anaeróbico	49
4.	ESTUDIO PRELIMINAR DEL PROCESO DE FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO (SSF) PARA LA PRODUCCION DE LIPASAS A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DE PRODUCCION Y REFINADO DE ACEITES VEGETALES.....	55
4.1	Introducción.....	55
4.2	Selección y validación del sistema de fermentación y definición de mezclas.....	55
4.3	Valoración de la SSF	62
4.4	Optimización del método de extracción de lipasas	63
4.4.1	Efecto del tampón.....	64
4.4.2	Efecto del tipo de tensoactivo.....	65
4.4.3	Efecto de la dosis del tampón, dosis de tensoactivo y velocidad de extracción y tiempo de extracción.	65
4.5	Extracciones enzimáticas a diferentes tiempos	69
4.6	Determinación de la actividad lipolítica intracelular	71
4.7	Extracciones sucesivas.....	73
4.8	Resumen.....	75
5.	ESTUDIO DE LA EXTRACCION Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS OBTENIDAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DE PRODUCCIÓN Y REFINADO DE ACEITES VEGETALES.	79
5.1	Introducción.....	79

5.2. Caracterización inicial.....	80
5.3 Experimentos SSF en reactores de 4.5 litros.....	81
5.4 Optimización de la extracción de la enzima y actividad lipolítica de los extractos	82
5.5 Actividad lipolítica en sólidos fermentados	85
5.6 Características de las lipasas. Estabilidad y peso molecular.....	87
5.7 Resumen.....	90
6. ESTUDIO DE LA CONSISTENCIA DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO EN REACTORES DE 4.5 LITROS.....	95
6.1 Introducción.....	95
6.2. Reproducibilidad de las fermentaciones en reducción de peso, materia seca, materia orgánica, grasa y pH.....	95
6.3 Índice respirométrico.....	104
6.4 Resumen.....	105
7. ESTUDIO DE LA FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO A DIFERENTES ESCALAS E IMPACTO AMBIENTAL DE LAS EMISIONES DEL PROCESO.	109
7.1 Introducción.....	109
7.2 Ensayos con diferentes escalas en la SSF.....	109
7.2.1 Reactor de 4.5 litros.....	111
7.2.2 Reactores 50 Litros.....	116
7.3 Emisiones e Impacto.....	125
7.3.1 Emisiones de Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs).....	127
7.3.2 Emisiones de CH ₄	128
7.3.3 Emisiones de NH ₃	130
7.3.4 Emisiones de N ₂ O	131
7.4 Resumen.....	132

8. USOS POTENCIALES DE LAS LIPASAS PRODUCIDAS POR SSF EN BIODEGRADACION DE LÍPIDOS. ESTUDIO PRELIMINAR.....	137
8.1 Introducción.....	137
8.2 Aplicaciones del catalizador en procesos aerobios	137
8.3 Aplicaciones del catalizador en procesos anaerobios	140
8.3.1 Efecto de la lipasa producida por SSF en digestión anaerobia de flotantes de EDAR.....	141
8.3.2 Efecto de la lipasa producida por SSF en digestión anaerobia de lodos de depuradora	144
8.4 Resumen.....	150
9. CONCLUSIONES.....	153
TRABAJO ACTUAL Y FUTURO.....	156
10. BIBLIOGRAFIA.....	159
11. ANEXOS.....	177
11.1 Calibrado cromatografía de gases para determinar AGCL.....	177
11.2 Calibrado de la actividad lipásica mediante el método colorimétrico.....	179
11.3 Calibrado actividad en muestras sólidas.....	180

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Fases dentro de un sistema SSF (Fuente Mitchell y col. 2011).....	4
Figura 1.2 Función de una enzima en una reacción (Fuente: Nicholls 2002)	11
Figura 1.3 Esquema general de la reacción de hidrólisis de triacilglicerol catalizada por lipasa.	12
Figura 3.1 Esquema de la planta piloto PP1. O ₂ : sensor de oxígeno T: sonda de temperatura. (Adaptado Puyuelo, 2012).....	29
Figura 3.2 Diagrama esquemático de la planta piloto PP2.....	30
Figura 3.3 Imágenes reactores 4.5 L ubicados en PP2.....	30
Figura 3.4 Imágenes reactores planta PP1	31
Figura 3.5 Imagen de la rejilla de los reactores planta PP1	31
Figura 3.6 Imagen de la tapa de los reactores de 50 L de volumen.....	32
Figura 3.7 Esquema experimental del respirómetro.....	35
Figura 3.8 Método colorimétrico de estimación de actividad lipásica. (1) 1.2-O-dialuril-rac-glicero-3-ácido glutárico-(6'-metilresorufina) éster, (2) ácido glutárico-(6'-metilresorufina) éster, (3) 1.2- O-dialuril-rac-glicerol, (4) ácido glutárico, (5) Metilresorufina	44
Figura 3.9 Imágenes de las botellas del ensayo anaeróbico.....	50
Figura 4.1 Fermentación en el reactor R1L de mezcla diatomea con lodo	58
Figura 4.2 Fermentación en el reactor R2C de mezcla diatomea con compost.....	58
Figura 4.3 Imagen del residuo de winterización	60
Figura 4.4 IRD para los reactores con cargas de grasa 10%, 20% y 30%.....	61
Figura 4.5 Evolución de la temperatura de los reactores R10, R20, R30	62
Figura 4.6 Efecto de la dosis	66
Figura 4.7 Efecto del tensoactivo	66
Figura 4.8 Efecto de la velocidad y el tiempo	67
Figura 4.9 Esquema de extracción.....	69
Figura 4.10 Efecto de la adición de azida sódica en la actividad	70
Figura 4.11 Esquema del ensayo de sonicación a diferentes tiempos.....	72
Figura 4.12 Modelos exponenciales de las extracciones: a la izquierda extracciones individuales a diferentes dosis y extracciones sucesivas	73
Figura 5.1 Evolución de la temperatura de los triplicados en la fermentación de la mezcla residuo de winterización y lodo fresco	81

Figura 5.2 Superficie de respuesta correspondiente a la fracción actividad lipolítica extraída de diferentes dosis de agente tampón y agente tensoactivo para muestras obtenidas en (a) día 6, (b) día 14, (c) día 27, (d) día 35.....	84
Figura 5.3 Superficie de respuesta correspondiente a la estabilidad de la lipasas para diferentes pH y temperaturas de las muestras obtenidas en (a) día 6, (b) día 14, (c) día 27, (d) día 35.	88
Figura 5.4 Imagen del gel teñido con plata para la prueba con lipasa comercial y adición del detergente	89
Figura 6.1 Ajuste de la reducción del peso en materia seca para las fermentaciones F6 y F7.....	100
Figura 6.2 Ajuste de la reducción del peso en materia orgánica para las fermentaciones F6 y F7	100
Figura 6.3 Ajuste de la reducción del peso en materia seca y grasa para la fermentación F3R1.	101
Figura 6.4 Evolución del pH en las fermentaciones F6 y F7	103
Figura 6.5 IRD _{24h} en fermentaciones con reactores de 4.5L	104
Figura 7.1 Evolución de la temperatura, nivel de oxígeno, caudal de aireación, OUR, pH, materia seca, materia orgánica, %grasa y actividad lipolítica durante la SSF del reactor SSF del reactor R3-4.5L.....	111
Figura 7.2 Ajuste de la reducción del peso en materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R3-4.5L	113
Figura 7.3 Perfil de AGCL durante la fermentación.....	115
Figura 7.4 Evolución de la temperatura, nivel de oxígeno, caudal de aireación, OUR, pH, materia seca, materia orgánica, %grasa y actividad lipolítica durante la SSF del reactor R1-50L.....	116
Figura 7.5 Evolución de la temperatura, nivel de oxígeno, caudal de aireación, OUR, pH, materia seca, materia orgánica, %grasa y actividad lipolítica durante la SSF del reactor R2-50L.....	117
Figura 7.6 Ajuste de la reducción del peso en materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R1-50L	119
Figura 7.7 Ajuste de la reducción del peso en materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R2-50L	120
Figura 7.8 Porosidad en los reactores R1-50L y R2-50L	121
Figura 8.1 Consumo acumulado a 4 días.....	139
Figura 8.2 Consumo acumulado a tiempo final	139
Figura 8.3 Evolución de la producción de biogás y ajuste con el modelo Gompertz para los diferentes ensayos.....	142

Figura 8.4 Evolución de la producción de biogás para las muestras de Lodos y lodo+catalizador termófilo y ajuste con el modelo Gompertz	147
Figura 11.1 Calibrado para cromatografía de gases de los ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1)	177
Figura 11.2 Calibrado para cromatografía de gases de los ácidos esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2).....	178
Figura 11.3 Calibrado de la actividad lipásica para muestras líquidas.....	179
Figura 11.4 Calibrado de la actividad lipásica para muestras sólidas	180

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Aplicaciones de la SSF	9
Tabla 1.2 Clasificación de las enzimas.....	11
Tabla 1.3 Sustratos usados por los distintos microorganismos para la producción de lipasas mediante SSF y actividad máxima reportada por distintos autores en la producción de lipasas	13
Tabla 1.4 Parámetros de fermentación	15
Tabla 1.5 Valores bibliográficos de actividad lipolítica obtenida mediante fermentación líquida	16
Tabla 1.6 Condiciones de extracción de las lipasas producidas por SSF	17
Tabla 1.7 Bioaumentación en digestión anaerobia.....	19
Tabla 3.1 Características para la cromatografía de COVs	47
Tabla 3.2 Características para la cromatografía de CH ₄	47
Tabla 3.3 Características para la cromatografía de N ₂ O	48
Tabla 4.1 Caracterización inicial de los sustratos.....	56
Tabla 4.2 Caracterización de los cosustratos y las mezclas usadas en la SSF.....	57
Tabla 4.3 Caracterización del residuo de winterización	60
Tabla 4.4 Caracterización inicial de las mezclas lodo+residuo de winterización (LB:RW) de los reactores R10, R20, R30.....	61
Tabla 4.5 Condiciones de extracción ensayadas	64
Tabla 4.6 Uso de dos diferentes tampones para la extracción.....	64
Tabla 4.7 Actividad lipolítica extraída bajo las diferentes condiciones testadas utilizando un 5% de Quartamin.....	68
Tabla 4.8 Actividad lipolítica en extracciones sucesivas	69
Tabla 4.9 Actividad lipolítica intracelular con sonicación de 5 min	71
Tabla 4.10 Actividad lipolítica intracelular a diferentes tiempos de sonicación	72
Tabla 4.11 Valor de la actividad acumulada máxima obtenida con el ajuste	74
Tabla 5.1 Características de la mezcla inicial.....	80
Tabla 5.2 Contenido de humedad y grasa durante la SSF del reactor R1	82
Tabla 5.3 Actividad extraíble total y en condiciones optimizadas.....	85
Tabla 5.4 Actividad enzimática en muestras sólidas	86
Tabla 6.1 Caracterización de los materiales para las mezclas de fermentaciones	96
Tabla 6.2 Fermentaciones realizadas y proporción en peso de las respectivas mezclas lodo+residuo de winterización (LB:RW)	96
Tabla 6.3 Reducción en peso (%) de las SSF en reactores de 4.5L	97

Tabla 6.4 Degradación de la materia seca (%) en F3, F6, F7	98
Tabla 6.5 Degradación de la materia orgánica en F4, F6, F7	98
Tabla 6.6 Parámetros cinéticos y bondad del ajuste para la degradación de la materia seca en las fermentaciones F6 y F7	101
Tabla 6.7 Parámetros cinéticos y bondad del ajuste para la degradación de la materia seca y grasa en la fermentación F3R1	102
Tabla 6.8 Actividad máxima de cada fermentación	103
Tabla 7.1 Caracterización de la mezcla a fermentar	110
Tabla 7.2 Reducción de la materia seca en el reactor R3-4.5 L.....	112
Tabla 7.3 Parámetros cinéticos y bondad del ajuste para la degradación de materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R3-4.5L.....	113
Tabla 7.4 Resultados analíticos de los reactores R1-50L y R2-50L.....	118
Tabla 7.5 Parámetros cinéticos y bondad del ajuste para la degradación de materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R1-50L.....	119
Tabla 7.6 Parámetros cinéticos y bondad del ajuste para la degradación de materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R2-50L.....	120
Tabla 7.7 Caracterización inicial de la mezcla y final de cada reactor.	125
Tabla 7.8 Comparación del proceso para cada reactor.....	127
Tabla 8.1 Caracterización inicial del sustrato	138
Tabla 8.2 Cantidad de oxígeno consumido real y teóricamente en 4 días y a tiempo último	140
Tabla 8.3 Caracterización inicial del inóculo, el lodo y el catalizador utilizado.....	141
Tabla 8.4 Resultados del ajuste con Gompertz para la primera serie de experimentos con flotantes	143
Tabla 8.5 Potenciales de biogás con el test GB ₂₁	144
Tabla 8.6 Caracterización del inóculo y el lodo para digestión anaerobia.....	144
Tabla 8.7 Producción de biogás obtenida durante los ensayos utilizando el biocatalizador obtenido en SSF.....	146
Tabla 8.8 Resultados del ajuste con Gompertz para los experimentos con lodos	148

ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición	Unidades
AFP	Air Filled Porosity	%
AGCL	Ácidos Grasos de Cadena Larga	mg g ⁻¹
AT _n	Consumo Acumulado de oxígeno en un tiempo n	mg O ₂ g ⁻¹ MO
b.s	base seca	
C/N	Relación de carbono a nitrógeno	
CH ₄	metano	mg
CO ₂	Dióxido de carbono	mg
COVs	Compuestos orgánicos volátiles	mg
CT	Compost Terrassa	
AD	Digestión anaerobia	
DN	Diatomea negra	
DB	Diatomea blanca	
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno	
DQO	Demanda Química de Oxígeno	
HCl	Ácido clorhídrico	mL
HRT	Tiempo de retención hidráulico	
IRD	Índice respirométrico dinámico	g O ₂ kg ⁻¹ MS ó MO h ⁻¹
LB	Lodo Besós	
MF	Materia fresca	
MO	Materia orgánica	%
MS	Materia seca	%
N ₂ O	Óxido nitroso	mg
NaOH	Hidróxido de Sodio	g
NH ₃	Amoníaco	mg
NTK	Nitrógeno Total Kjeldhal	%
N-NH ₄ ⁺	Nitrógeno Amoniacal	%
O ₂	Oxígeno	%
OUR	Oxygen Uptake Rate. Velocidad de consumo de oxígeno	gO ₂ kg ⁻¹ MS ó MO h ⁻¹
PP1	Planta piloto del GICOM	
PP2	Planta interior de la ETSE	
ppm	Partes por millón	

RIE _{CE}	Eficiencia del índice respirométrico en el consumo energético	(kJ[mg O ₂ g ⁻¹ MO h] ⁻¹)
RSU	Residuo sólido urbano	
RW	Residuo de Winterización	
sOUR	Velocidad específica de consumo de oxígeno	g O ₂ kg ⁻¹ MS ó MO h ⁻¹
SmF	Fermentación Líquida	
SSF	Solid State Fermentation – Fermentación en Estado Sólido	
ST	Sólidos Totales	%
U g ⁻¹ ds	Unidades de actividad por gramos de sólido seco	
UA	Unidades de actividad lipolítica	
UA g ⁻¹	Unidades de actividad por gramos de sólido húmedo	
p/p	Porcentaje peso/peso	%

CAPÍTULO 1.

1. INTRODUCCION

Día a día los desechos sólidos, producto de actividades industriales alrededor del mundo, aumentan de una manera vertiginosa. Este aumento hace que se plantee la necesidad de desarrollar estrategias de manejo que favorezcan la reducción de los problemas de contaminación ambiental (Cegarra y col. 2006; Smidt y Lechner 2005).

A pesar del problema que representan a nivel económico y ecológico por la acumulación, los residuos sólidos pueden ser el punto de partida para la generación de compuestos que resultan útiles por sus propiedades y porque ofrecen ventajas a nivel tecnológico y nutricional. Son materiales que pueden ser útiles en las industrias alimentaria, química y farmacéutica, pues son ricos en micronutrientes como vitaminas, oligoelementos carotenoides, polifenoles, etc.

En la mayoría de los casos, se requiere la aplicación de algunos pretratamientos y procedimientos de bioconversión para el uso inmediato y económicamente rentable de estos materiales. Esta opción de transformar desechos en nuevas materias primas, se perfila cada vez más como una buena alternativa para reducir el uso y contaminación por el petróleo, y permitir asimismo la obtención de compuestos que en principio serían económica y/o técnicamente inviables de obtener mediante síntesis química tradicional. Se perfila aquí el cambio de paradigma de “residuo” a “recurso” o a “producto”.

El compostaje como fermentación en estado sólido es un proceso establecido como una alternativa de bajo coste para solventar problemas de contaminación causados por la acumulación de los residuos. Sin embargo la fermentación en estado sólido, utilizando residuos agroindustriales para la obtención de productos con propiedades fisicoquímicas interesantes, es una gran alternativa en cuanto a la valorización de estos residuos.

1.1 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés Solid State Fermentation), se define como el proceso de fermentación que ocurre en ausencia o casi ausencia de agua libre, empleando un sustrato natural que actúa como fuente de carbono o energía; o un sustrato inerte utilizado como soporte sólido, que es necesario complementar con una solución que contiene los nutrientes necesarios (Pandey 2008).

En la figura 1.1 se pueden observar las fases dentro de un sistema de fermentación en estado sólido (Mitchell y col. 2011).

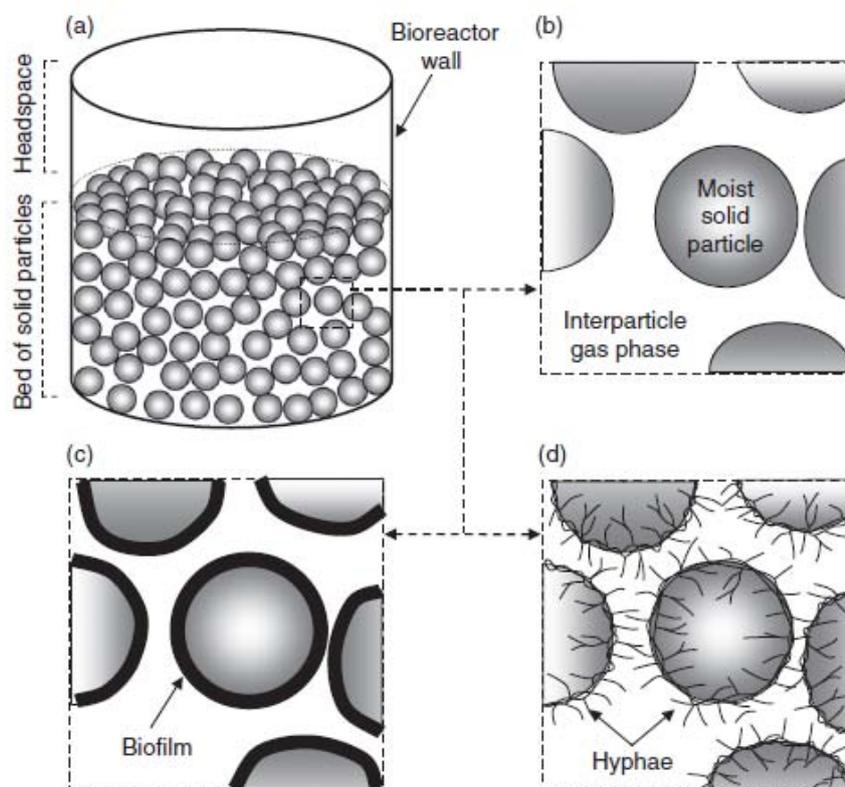


Figura 1.1 Fases dentro de un sistema SSF (Fuente Mitchell y col. 2011).

Como se observa en la figura 1.1 (imagen a), los bioreactores en SSF se componen de 3 partes: la primera corresponde al cuerpo del reactor, la segunda al espacio de la fase gas que está por encima del lecho (headspace) y la tercera es el lecho. A su vez en el lecho se encuentran tres fases (imagen b y c); una son las partículas del material sólido, la fase acuosa o biofilm y la fase gas entre las partículas. Si se analiza el sustrato en la microescala, es posible diferenciar las partículas individuales y el crecimiento de una biopelícula (imagen c) de organismos unicelulares (bacterias o levaduras) en las superficies de las partículas. Adicionalmente, se puede observar el crecimiento de una red de hifas de los hongos (imagen d) que crece a través de la superficie mientras que algunas hifas penetran en el sustrato y otras se extienden en los espacios entre las partículas. En ocasiones puede haber una cuarta fase fluida orgánica como aceites o hidrocarburos que forman parte de la matriz. Así pues, el proceso de fermentación en estado sólido se lleva a cabo en reactores multifásicos y

es por tanto un sistema complejo donde cobra especial relevancia los posibles problemas de transferencia de materia y energía.

1.2 Aspectos bioquímicos e ingenieriles de la SSF

Para el éxito de la SSF es necesario considerar las relaciones que existen entre la fisiología de los microorganismos y los factores físicoquímicos del proceso. Para ello se tienen en cuenta parámetros como la temperatura, la aireación, la humedad, el pH, la agitación, el tamaño de partícula, el diseño del reactor, etc. De ellos dependerá tanto el crecimiento del microorganismo como la formación del producto final. La influencia de estos parámetros se describe a continuación:

1.2.1 Temperatura

Dentro de los parámetros ambientales que influyen en la velocidad de crecimiento de la flora microbiana está la temperatura. En función de ésta, se determinan los cambios de la velocidad de crecimiento. Si la temperatura llega a un punto mínimo, por debajo de éste no habrá crecimiento celular. Por el contrario, si existen temperaturas mayores se dan incrementos lineales en la velocidad de crecimiento hasta que se llega al máximo, donde será la temperatura óptima. Si se da el caso de estar por encima de la temperatura óptima decaen las velocidades de crecimiento de manera brusca y se genera la muerte celular.

Es importante tener en cuenta que una gran cantidad de calor se genera durante la fermentación en estado sólido, y esta cantidad de calor es directamente proporcional a la actividad metabólica de los microorganismos (Pandey 2003).

1.2.2 Aireación

Dentro de las funciones que tiene la aireación en procesos de SSF, se encuentran: proporcionar oxígeno a los microorganismos y simultáneamente eliminar el dióxido de carbono, eliminar el calor del fermentador y distribuir tanto el vapor de agua como los metabolitos gaseosos y volátiles producidos (Graminha y col. 2008).

De esta manera, la aireación es un parámetro muy importante en la SSF, ya que el ambiente gaseoso puede afectar significativamente a la biomasa y a la producción enzimática (Raimbault 1998).

1.2.3 Humedad

Un factor crítico de los procesos en SSF es el contenido en humedad. El valor óptimo de contenido de humedad depende tanto del microorganismo como de la matriz sólida que se utiliza (Mamma y col. 2008). Haug (1993) recomienda que el contenido óptimo de humedad para una matriz orgánica se debe situar en rangos de 40-60%.

Porcentajes altos de humedad dan como resultado baja porosidad del sustrato que a su vez impide la penetración del oxígeno, mientras que un bajo contenido de humedad conduce a una mala difusión de los nutrientes que obstaculizará el crecimiento microbiano (Pandey 2003).

1.2.4 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula también se considera un factor importante, debido a que influye en la accesibilidad de los nutrientes para el organismo y afecta la porosidad de la matriz. El tamaño total de la partícula puede aumentar al inicio de la fermentación y luego disminuir al final. Esto es el resultado de fenómenos como el consumo de sustrato residual y la expansión de la biopelícula. Resumiendo, los cambios en el tamaño de partícula pueden ocurrir como resultado del avance del proceso (Mitchell y col. 2006) y comportar cambios de la porosidad.

1.2.5 pH

Es difícil supervisar y controlar el pH en los procesos de SSF, debido a la naturaleza de los materiales fermentados, por ser sólidos en ausencia de agua libre. A pesar de estas dificultades, se hace necesario tener la medida y control durante todo el proceso fermentativo, con el fin de poder prevenir la muerte de los microorganismos por valores que éstos no toleran. Adicionalmente, utilizar un pH adecuado durante procesos de SFF de hongos y levaduras, reduce o elimina los riesgos de contaminación bacteriana (Raimbault 1998).

Los valores óptimos de pH para que los microorganismos se desarrollen están entre 5 y 8, sin embargo la mayoría de los hongos se encuentran adaptados para trabajar en un rango más amplio.

1.2.6 Agitación

La agitación es un parámetro que garantiza la homogeneidad con respecto a las partículas y la humedad. Adicionalmente, promueve las transferencias de calor y materia, y la distribución uniforme de los nutrientes añadidos gradualmente durante el curso de la fermentación (Fujian y col. 2002).

Sin embargo, al realizar la agitación de un lecho que contiene partículas sólidas, que suelen tener un hongo filamentoso creciente en sus superficies, se pueden dañar las hifas del hongo (Mitchell y col. 2011), y por ende se plantean inconvenientes como daños ocasionados al micelio, reducción de la porosidad de los sustratos y afectar negativamente en la formación del producto. Además, la agitación de la matriz sólida supone un gasto energético adicional.

Por lo tanto, el uso de agitación en SSF es opcional según el balance de las ventajas e inconvenientes mencionados. Como se verá a continuación, existen varios tipos de reactores que no emplean agitación entre los comúnmente empleados para SSF.

1.2.7 Diseño del reactor

Un aspecto importante para tener en cuenta en el análisis de los bioreactores para elegir el diseño más conveniente, es la influencia de la transferencia de calor y masa dentro del bioreactor. La evaluación de esta influencia, se puede lograr a partir del análisis de los efectos sobre el tamaño y la forma de los espacios entre partículas una vez ha sido empacado el sustrato (Mitchell y col. 2000).

Para los procesos SSF se han utilizado varios tipos de reactores, y diferentes autores les han dado diversos nombres. Sin embargo, Mitchell y col. (2006), basados en las similitudes de diseño y operación, clasifican los bioreactores en grupos basados en la forma en que se mezclan y airean. La clasificación es la siguiente:

- Grupo I: son bioreactores en los que el lecho es estático, o mezclado con muy poca frecuencia (es decir, una o dos veces por día) y se hace circular aire alrededor del lecho, pero el aire no se suministra de manera forzada a través de él. Se conocen como "bioreactores tipo bandeja".
- Grupo II: son los bioreactores en los que el lecho es estático o mezclado con muy poca frecuencia (es decir, una vez por día) y se sopla aire forzosamente a través de él. Se les llama típicamente como "bioreactores de lecho empacado".
- Grupo III: son bioreactores en los que el lecho se mezcla continuamente o se mezcla de forma intermitente con una frecuencia de minutos a horas, y el aire se hace circular alrededor del lecho, pero no es suministrado forzosamente a través de él. Existen dos tipos de bioreactores que funcionan con este modo de operación, y usan diferentes mecanismos para lograr la agitación, son "bioreactores de tambor agitado" y "bioreactores de tambor giratorio".
- Grupo IV: son bioreactores en los que el lecho se agita y se sopla aire forzosamente a través del lecho. Este tipo de bioreactor típicamente puede funcionar en cualquiera de las dos formas, por lo que para identificarlos es útil dividirlos en dos subgrupos. Bioreactores grupo IVA se mezclan continuamente, mientras los bioreactores Grupo IVB, se mezclan de manera intermitente con intervalos de minutos a horas entre los periodos de mezcla. Varios diseños cumplen con estos criterios, tales como los de "Lechos gas-sólido fluidizado", el "tambor basculante" y varios "bioreactores aireado-agitados".

1.3 Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido

Algunas de las ventajas de la fermentación en estado sólido sobre la fermentación líquida, consideradas por varios autores son (Hölker y col. 2004; Botella y col. 2005; Couto y Sanromán 2006):

- La principal ventaja del proceso SSF sobre la fermentación líquida, es que los costes se reducen, debido a la baja exigencia de agua, que implica menos salida de agua y por ende menos requerimientos de procesamiento de aguas residuales.
- La SSF requiere menores inversiones de capital, dado que los sustratos utilizados son generalmente residuos agroindustriales. Los medios de fermentación son más simples, pues no requieren la adición de nutrientes complejos y vitaminas (ya contenidos en el residuo).
- Hay ausencia de formación de espuma, no se requiere antiespumante, y no hay pérdida de microorganismos durante la fermentación (no hay riesgo de lavado del reactor).
- El control de la contaminación es más fácil. La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras. Las exigencias de esterilidad son bajas.
- La aireación es más fácil. La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Baja demanda de energía para calentamiento.
- Mejor crecimiento de la biomasa y mayor productividad de la enzima.
- La simulación del medio natural conlleva a un mejor desempeño de los microorganismos cultivados.
- Permite la fermentación de sustratos sólidos insolubles en agua.
- Pueden emplearse esporas como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y manipulación en la preparación del inóculo.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

Entre las principales desventajas se encuentran:

- La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se puede controlar la temperatura del proceso.
- La naturaleza sólida del sustrato dificulta la medición de parámetros de la fermentación, tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.

- El tiempo de fermentación es mayor, debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

1.4 Aplicaciones de la SSF

La fermentación en estado sólido se ha estudiado en la producción de alimentos, enzimas hidrolíticas, ácidos orgánicos, giberelinas, sabores y biopesticidas. La tabla 1.1 nos presenta las diferentes áreas, aplicaciones y productos obtenidos con la SSF (Pandey y col. 2000; Raghavarao y col. 2003).

Tabla 1.1 Aplicaciones de la SSF

Área	Aplicación	Ejemplos de productos
Controles Ambientales	Producción de compost y alimentos para animales a partir de residuos sólidos	Compostaje Forraje
	Bioremediación y biodegradación de compuestos peligrosos	Bioremediación por biodegradación de antrazina Bioremediación de residuos de cafeína
	Detoxificación biológica de residuos agro-industriales	Detoxificar residuos como: cáscaras de yuca, harina de canola, cáscara de café, pulpa de café, etc.
Procesos para obtener productos de alto valor añadido	Biotransformación de cultivos o residuos de cultivos	Biotransformación de la yuca y los residuos de la yuca para la mejora de la nutrición. Bioconversión de residuos de cultivos lignocelulósicos para enriquecer con proteínas la alimentación de los rumiantes
	Pulpeado biológico	Pulpeado biológico de virutas de madera sin la necesidad de tratamiento en autoclave o de enriquecimiento nutricional
	Producción de compuestos bioactivos	Producción de las micotoxinas, endotoxinas bacterianas, factores de crecimiento de las plantas, antibióticos, medicamentos inmunosupresores, alcaloides, etc.

	Producción de enzimas	Celulasa, b-glucosidasa, lacasa, xilanasa, proteasas, lipasas, glutaminasa
	Producción de ácidos orgánicos	Acido cítrico, acido fumárico, acido láctico, acido oxálico
	Producción de biopesticidas	Producción de <i>Beauberia bassiana</i> en el control biológico de las plagas de plátano, caña de azúcar, soja y café
	Producción de biocombustibles	Producción de etanol a partir de la pulpa de manzana, algarrobas, sorgo, almidon de arroz
	Producción de aromas	Aroma de piña Producción de 2.5-dimetilpirazina (2.5-DMP) y tetramethylprazine (TTMP)
	Producción de otros compuestos de interés	Otros diversos productos tales como ácido L-glutámico, pigmentos, carotenoides, xantano, goma, vitaminas, biosurfactantes, etc

1.5 Producción de Enzimas

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteíca. Las enzimas son los catalizadores de las reacciones en los sistemas biológicos, pues tienen la capacidad de acelerar reacciones químicas específicas. Las enzimas no se consumen durante la reacción y al final de ésta mantienen su forma original (Lehninger y col. 2005).

En la mayoría de procesos químicos celulares, se utilizan enzimas. Las enzimas se diferencian de otros catalizadores porque catalizan reacciones específicas, y su

actividad se puede ver afectada por factores ambientales como el pH, la temperatura, la presión y adicionalmente también se puede ver afectada por agentes operacionales como la aireación. En estas reacciones, las enzimas actúan sobre los sustratos, los cuales se convierten en moléculas diferentes que serán conocidas como productos.

La figura 1.2 permite tener una visión de la acción de una enzima en una reacción .

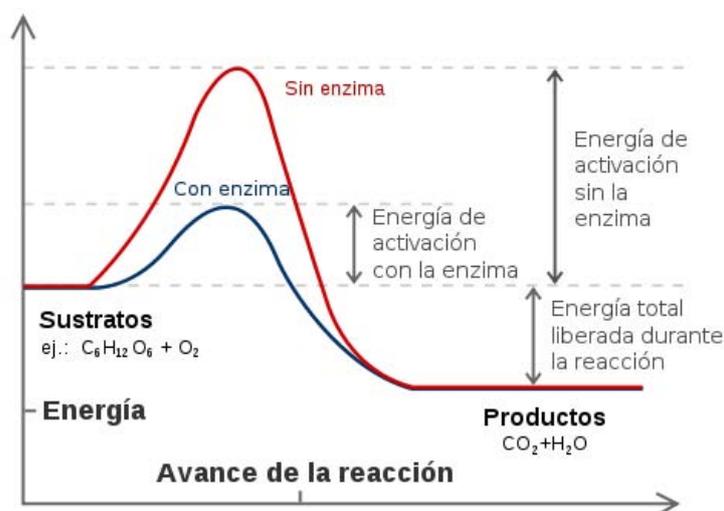


Figura 1.2 Función de una enzima en una reacción (Fuente: Nicholls 2002)

Las enzimas reciben sus nombres principalmente del sustrato o de la reacción química que catalizan. Hasta el momento, los científicos han identificado más de 5500 enzimas distintas (BRENDA 2013). La clasificación de estos biocatalizadores, de acuerdo con el tipo de reacción de transferencia, el grupo dador y el aceptor, se distribuyen en seis grupos principales tal y como se describe en la tabla 1.2.

Tabla 1.2 Clasificación de las enzimas

Código	Grupo	Función
EC1	Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de óxido-reducción
EC2	Transferasas	Transfieren grupos de una molécula a otra
EC3	Hidrolasas	Llevan a cabo reacciones de hidrólisis
EC4	Liasas	Se eliminan grupos para formar un enlace doble o se añaden a un doble enlace

EC5	Isomerasas	Transfieren grupos en el interior de la molécula para originar formas isoméricas
EC6	Ligasas	Catalizan la formación de un enlace entre dos moléculas de sustrato. Aporta siempre la hidrólisis de ATP

La fermentación en estado sólido (SSF) tiene gran potencial en cuanto a la producción de enzimas hidrolíticas se refiere (Pandey y col. 2000), debido a que es posible utilizar como materias primas residuos agroindustriales de composición bioquímica rica en un tipo de polímero concreto (por ejemplo aceites o celulosa) de modo que los microorganismos producirán la enzima hidrolítica correspondiente (por ejemplo: lipasas o celulasas) de forma masiva.

1.6 Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas, que presentan como función biológica principal catalizar la hidrólisis de los triacilgliceroles insolubles (ver figura 1.3) para generar ácidos grasos libres, mono y diacilgliceroles y glicerol (Nair y Bone 1987; Singh y col. 2006).

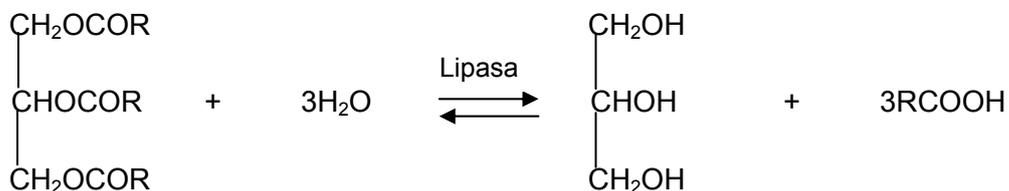


Figura 1.3 Esquema general de la reacción de hidrólisis de triacilglicerol catalizada por lipasa.

Las lipasas constituyen uno de los grupos más importantes de biocatalizadores que se pueden aplicar biotecnológicamente en la síntesis de biopolímeros, biodiesel, agroquímica, en la elaboración de detergentes, cosméticos y confitería. Adicionalmente se pueden usar para la producción de enantiómeros farmacéuticos usados en terapia médica de reemplazo, como en la administración de lipasa pancreática de cerdo para casos de insuficiencia pancreática exocrina (Schmid y Verger 1998).

Las lipasas se encuentran abundantemente en la naturaleza, en plantas, animales y microorganismos. Se encuentran en las mitocondrias para el caso de células

vegetales, (Sharma y col. 2001) y en el páncreas para el caso de los animales (Hasan y col. 2006).

Diversos factores influyen la producción de lipasas, entre los que se pueden encontrar el tipo y concentración de la fuente de carbono y de nitrógeno, el pH del cultivo, la temperatura de crecimiento y la concentración de oxígeno disuelto (Elibol y Ozer 2000).

En las fermentaciones con microorganismos previamente inoculados es importante la selección de la cepa adecuada para obtener una lipasa con una aplicación potencial. Las lipasas pueden ser producidas por bacterias, por levaduras y por hongos filamentosos. Las especies de microorganismos que se destacan para cada una son *Bacillus* (bacterias), *Candida* (levaduras) y *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum* y *Rhizomucor* (hongos).

1.7 Producción de lipasas por SSF

La producción de lipasa se ha reportado bajo diferentes condiciones de proceso (Godoy y col. 2011; Imandi y col. 2010; Silva y col. 2011; Colla y col. 2010). Varios estudios han utilizado residuos agroindustriales como sustratos para la producción de lipasas por SSF, en los que se incluyen salvados (trigo, arroz, soja, cebada), las tortas oleaginosas (soja, oliva, sésamo, babasú), y el bagazo (caña de azúcar). Adicionalmente, la mayoría de estos estudios se llevaron a cabo utilizando cultivos puros de microorganismos conocidos. La tabla 1.3 enumera algunos de los microorganismos, los sustratos utilizados y los valores de producción máxima reportados para la enzima lipolítica.

Tabla 1.3 Sustratos usados por los distintos microorganismos para la producción de lipasas mediante SSF y actividad máxima reportada por distintos autores en la producción de lipasas

Organismos	Sustratos	Producción Máxima	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	Torta de sésamo	363.6 U g ⁻¹ MS	(Kamini y col. 1998)
	Salvado de trigo	630 U g ⁻¹ MS	(Mahadik y col. 2002)
	Salvado de trigo y torta sésamo	384.4 U g ⁻¹ MS	(Mala y col. 2007)
	Torta de coco	745.7 U g ⁻¹ MS	(Edwinoliver y col. 2010)

	Harina de soja y cáscara de arroz	10.09 U g ⁻¹ MS **	(Colla y col. 2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	Torta de nuez	4.5 U g ⁻¹ MS	(Chaturvedi y col. 2010)
<i>Candida rugosa</i>	Torta de coco	25.81 U g ⁻¹ MS	(Benjamin y Pandey 1998)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Torta babasú	44.45 U g ⁻¹ MS **	(Silva y col. 2011)
<i>Penicillium restrictum</i>	Residuos aceite de babasú	27.8 U g ⁻¹ MS	(Palma y col. 2000)
	Torta babasú	30.3 U g ⁻¹ MS	(Gombert y col. 1999)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Torta babasú	26.4 U g ⁻¹ MS	(Cavalcanti y col. 2005)
		90 U g ⁻¹ MS	(Gutarra y col. 2009)
	Residuos aceite de ricino	80.24 U g ⁻¹ MS **	(Godoy y col. 2011)
<i>Penicillium sp.</i>	Salvado de soja	317 U g ⁻¹ MS	(Rigo y col. 2009)
	Harina de soja	83.70 U g ⁻¹ MS **	(Vardanega y col. 2010)
<i>Penicillium verrucosum</i>	Salvado de soja	40 U g ⁻¹ MS	(Kempka y col. 2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Torta de jatrofa	312.50 U g ⁻¹ MS **	(Mahanta y col. 2008)
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Torta de aceite de oliva y bagazo de caña	20.24 U g ⁻¹ MS	(Cordova y col. 1998)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Bagazo de caña de azúcar	826 U g ⁻¹ MS	(Rodriguez y col. 2006)
<i>Rhizopus oligosporous</i>	Harina de almendras	81.2 U g ⁻¹ MS	(Awan y col. 2003)
		42.48 U g ⁻¹ MS **	(Haq y col. 2002)

<i>Rhizopus oryzae</i>	Salvado de trigo	96.52 U g ⁻¹ MS	(Garlapati y Banerjee 2010)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Torta semillas de niger	26.42 U g ⁻¹ MS	(Imandi y col. 2010)
Mezcla de microorganismos	Lodos de depuradora y mezcla de grasas animales	40 U g ⁻¹ MS	(Gea y col. 2007a)

***Actividades recalculadas en unidades de actividad por gramo seco de sustrato a partir de los valores de materia seca reportados en cada estudio.*

En la tabla 1.4, se presentan parámetros de fermentación utilizados por diferentes autores.

Tabla 1.4 Parámetros de fermentación

Cantidad de sustrato	Rango de Temperatura	Escala	Tipo de Reactor	Referencia
4-10g	Mesófilo	Laboratorio	Erlenmeyer	(Chaturvedi y col. 2010; Imandi y col. 2010; Garlapati y Banerjee 2010)
10-20 g	Mesófilo	Laboratorio	Reactores (cónico, cilíndrico, tipo bandeja)	(Gutarra y col. 2009; Vardanega y col. 2010; Godoy y col. 2011; Silva y col. 2011)
3 kg	Mesófilo	Piloto	Bandejas de acero	(Edwinoliver y col. 2010)

Tal como se pudo observar en la tabla 1.4, la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha han realizado sus experimentos a escala laboratorio y con pequeñas cantidades de sustrato. Pocos son los estudios que reportan sus experimentos a

escala piloto y la referencia de trabajos a gran escala son muy pocas.

Los trabajos se han llevado en diferentes tipos de reactores, y no se ha establecido uno como el ideal para realizar los procesos fermentativos. En vista de esto, se hace necesario intentar ampliar los conocimientos en experiencias que tiendan al escalado del proceso.

Adicionalmente, se observa que los experimentos se realizaron a temperaturas mesófilas, sin embargo aunque son pocos los casos, se reporta uno donde se produce una lipasa termófila con una actividad de 90 U g⁻¹MS a 50 °C (Gutarra y col. 2009).

La tabla 1.3, reporta las actividades lipolíticas máximas producidas en SSF. Para tener una idea de las cantidades de lipasa que se producen en las fermentaciones líquidas, en la tabla 1.5 se presentan los valores reportados por algunos autores.

Tabla 1.5 Valores bibliográficos de actividad lipolítica obtenida mediante fermentación líquida

Organismos	Producción Máxima	Referencia
<i>Candida rugosa</i>	3.8 UA ml ⁻¹	(Rajendran y col. 2008)
<i>Rhizopus oryzae</i>	298 UA ml ⁻¹	(Resina y col. 2009)
<i>Rhizopus oryzae</i>	713 UA ml ⁻¹	(Surribas y col. 2007)
<i>Rhizopus chinensis</i>	14 UA ml ⁻¹	(Teng y Xu 2008)

Si se contrasta los niveles de producción entre un método de fermentación y el otro, los valores son bastante variables. Sin embargo, realizar una comparación entre los dos métodos no es sencillo, porque intervienen factores como el método de extracción y análisis de la actividad enzimática.

La tabla 1.6 reporta las condiciones de extracción de la enzima, utilizadas por algunos autores. Es importante señalar que algunos autores reportan la adición de surfactantes a las soluciones extractoras. La presencia de surfactantes puede alterar la permeabilidad celular aumentando la secreción de la proteína, o también puede facilitar el contacto entre enzima y sustrato (Beys da Silva y col. 2005).

Tabla 1.6 Condiciones de extracción de las lipasas producidas por SSF

Solución de extracción	Concentración (mM)	pH	Velocidad (rpm)	Temperatura (°C)	Tiempo	Referencias
Tampón Fosfato	50-100	7	150-200	35-37	20-30 min	(Colla y col. 2010; Rigo y col. 2009; Silva y col. 2011; Edwinoliver y col. 2010; Godoy y col. 2011; Gutarra y col. 2009)
Tampón Tris HCl	100-400	8	200	37	20-30 min	(Mahanta y col. 2008; Gea y col. 2007a)
Agua destilada			150	30	15 min - 1 h	(Benjamin y Pandey 1997; Imandi y col. 2010)

1.8 Aplicación de las lipasas

El potencial que aportan las enzimas lipolíticas en procesos biotecnológicos, ha ganado gran atención en las últimas décadas (Benjamin y Pandey 1998). Se han encontrado diversas aplicaciones en las industrias, como la industria del aceite, farmacéutica, agroquímica y de componentes aromáticos.

En el sector farmacéutico se ha utilizado exitosamente en una gran cantidad de reacciones de interés industrial (Sánchez y col. 2000; López y col. 2002; Shin y col. 2005; Gotor-Fernández y col. 2006; Hasan y col. 2006; Won y col. 2006; Naik y col. 2010; Tecelão y col. 2012).

Otros ejemplos de aplicaciones de las lipasas son: la producción de biodiesel (Da Rós y col. 2010), el uso como aditivos para detergentes (Contesini y col. 2010), en la construcción de biosensores (Hasan y col. 2006) y en la producción de biosurfactantes para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Dossat y col. 2002; Plou y col. 2002).

De las lipasas producidas por SSF se puede mencionar que los sólidos fermentados se han utilizado como biocatalizadores inmovilizados naturalmente, en liofilizado para reacciones de síntesis (Martínez-Ruiz y col. 2008; Hernández-Rodríguez y col. 2009), para producir ésteres de biodiesel (Salum y col. 2010) o en forma seca (Hellner y col. 2010). Este enfoque puede conducir a costes más bajos, ya que los sólidos fermentados son razonablemente más baratos de producir y su uso evita la recuperación de la enzima y los siguientes pasos de inmovilización que se requieren para las lipasas producidas por fermentación sumergida.

También se han utilizado lipasas producidas por SSF para bioremediar desechos de aceite de cocina (Kumar y col. 2012); y para retirar esteres de forbol (compuesto cancerígeno) de la torta de jatrofa para poderla usar como alimento animal (Godoy y col. 2012).

Una aplicación mas reciente de las lipasas producidas por SSF, es su uso en el pretratamiento de efluentes con altos contenidos en grasa previo a procesos ambientales de digestión anaerobia (Rosa y col. 2009; Damasceno y col. 2012).

1.8.1 Digestión Anaerobia

La digestión anaeróbica (AD) es un proceso biológico a través donde se descompone materia orgánica por una variedad de microorganismos anaeróbicos en ausencia de oxígeno. El producto final de AD incluye biogás (60-70% de metano) y un residuo orgánico rico en nitrógeno. Esta tecnología se ha aplicado con éxito en el tratamiento de desechos agrícolas, residuos de alimentos, y lodos de aguas residuales debido a su capacidad de reducir la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de los flujos de residuos y la producción de biogás como energía renovable (Li y col. 2011).

En el proceso de AD intervienen numerosas enzimas como amilasas, proteasas, celulasas, queratinasas y lipasas (Tahezadeh y Karimi 2008). La fermentación anaerobia incluye grandes cantidades de reacciones químicas, bioquímicas y microbiológicas asociadas al metabolismo de numerosos microorganismos. Por lo tanto requiere de macro y micronutrientes, en proporciones adecuadas para atender las necesidades de los microorganismos.

Los biocatalizadores provenientes de la SSF pueden ser empleados para facilitar la eficiencia de la eliminación de materia orgánica en las etapas del tratamiento biológico, produciendo un efluente final de alta calidad (Rosa y col. 2009).

Esta técnica de suplemento de la AD con la enzima inmovilizada en el biocatalizador se conoce como bioaumentación. La bioaumentación es la adición de la enzima específica para un sistema con el fin de corregir o mejorar un proceso o actividad deseada (Schauer-Gimenez y col. 2010).

La bioaumentación es una técnica que puede emplearse en varias aplicaciones, incluyendo bioremediación del suelo y las aguas subterráneas, tratamiento de aguas residuales, y la digestión anaerobia de residuos sólidos agrícolas, industriales y municipales.

La tabla 1.7 resume algunos estudios previos que han investigado la bioaumentación en procesos de digestión anaerobia.

Tabla 1.7 Bioaumentación en digestión anaerobia.

Objetivo	Sustrato	Bioaumento / microorganismo	Beneficios	Referencia
Mejorar la puesta en marcha del reactor	Efluente farmacéutico	Lodo anaeróbico obtenido de planta de tratamiento de efluentes antibióticos	Disminución del tiempo de inicio e incremento en la eliminación de DQO	(Saravanane y col. 2001)
Control de olor	Biosólidos anaeróbicos	Producto comercial que contiene cepas seleccionadas de <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , y <i>Actinomyces</i>	Aumento de 29% en la producción de CH ₄ , reducción de la generación de compuestos orgánicos de sulfuro	(Duran y col. 2006)
Mejorar la eficiencia de la digestión	Forraje ensilado de remolacha	Compost: metanógenos hidrogenotróficos	HRT de 2-4 veces más corto y aumento del 6% en la producción de biogás	(Neumann y Scherer 2011)
Mejorar la	Residuos de	Bacteria Lipolítica:	Aumento del	(Cirne y col.

hidrólisis de los lípidos	restaurante, ricos en lípidos	<i>Clostridium lundense</i>	24% en la tasa de producción de CH ₄	2006)
Mejorar la hidrólisis de la gallinaza	Gallinaza	Bacterias celulolíticas: <i>C. cellulolyticum</i> , <i>C. thermocellum</i> <i>C. saccharlyticus</i>	Hasta 74% de aumento en la solubilización del sustrato, Aumento del 15% en la producción de CH ₄	(Costa y col. 2012)
Degradación de biofibras	Estiércol de bovino	Bacterias celulolíticas: <i>Caldicellusiruptor</i> y <i>Dictyoglomus</i>	Aumento del rendimiento de CH ₄	(Nielsen y col. 2007)
Degradación de xilosa	Polvo de xilosa	Bacterias hemicelulolíticas	Aumento del 53% en la producción de CH ₄	(Weiß y col. 2010)

1.9 Resumen

El crecimiento acelerado de las industrias ha favorecido los problemas de contaminación ambiental producto de sus actividades. En la búsqueda de soluciones, se han desarrollado estrategias donde se le da una utilidad a los residuos sólidos. Para conseguirlo se ha recurrido a pretratamientos y bioconversiones para lograr aprovechar estos residuos (recursos).

Dentro de las estrategias de transformación de los residuos, tenemos el compostaje que como fermentación en estado sólido, además de ser muy conocido, es una alternativa económica para reducir la contaminación.

La fermentación en estado sólido es el punto de partida para el aprovechamiento de residuos agroindustriales, a partir del cual se generan nuevos compuestos con interesantes propiedades.

Para que la SSF se lleve a cabo exitosamente se hace necesario tener en cuenta una serie de parámetros que incidirán en el crecimiento del microorganismo y en la formación del producto deseado. Dentro de esos parámetros tenemos: la temperatura, la aireación, la humedad, el tamaño de partícula, el pH, la agitación, el diseño del reactor, entre otros.

De la SSF se han estudiado diversas aplicaciones, entre las que se puede mencionar la producción de alimentos, biopesticidas, enzimas hidrolíticas, etc. En lo concerniente a la producción de enzimas hidrolíticas (lipasas, celulasas), la SSF ofrece la posibilidad de utilizar los residuos agroindustriales como materia prima para la producción de las mismas.

Las lipasas se han producido por SSF usando residuos agroindustriales como sustratos entre los que se encuentran: salvados de cereales como la cebada y el trigo, tortas oleaginosas como la soja, el olivo y el sésamo. La mayoría de estudios realizados con los residuos agroindustriales se han realizado a escala laboratorio, con cepas puras inoculadas y en pequeñas cantidades de sustrato.

Las enzimas lipolíticas producidas por SSF, se han utilizado en reacciones de síntesis para producir biodiesel, y para bioremediar desechos de aceite de cocina, entre otras aplicaciones.

CAPÍTULO 2.

2. OBJETIVOS

En el Grupo de Compostaje de Residuos Sólidos Orgánicos de la UAB se ha investigado en la recuperación y valorización de residuos sólidos a través del tratamiento biológico, especialmente para el compostaje, mediante el uso de técnicas respirométricas y de bioreactores. Adicionalmente, ha trabajado en bioremediación de suelos contaminados y digestión anaerobia.

Con esta experiencia se decide ir un paso más allá y explorar nuevas formas de recuperación, aprovechando herramientas que ofrece la biotecnología para producir productos valiosos que pudieran utilizarse para cualquier aplicación.

Por tanto, el objetivo principal del grupo con esta nueva línea de trabajo es estudiar la valorización de residuos orgánicos industriales mediante la obtención de biocompuestos de alto valor añadido. Concretamente en esta primera tesis, en residuos provenientes de la industria de producción y refinado de aceites vegetales para producir lipasas.

Para alcanzar este objetivo general se propuso cumplir los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollar un proceso de fermentación en estado sólido para la producción de lipasas a partir de residuos provenientes de la industria de producción y refinado de aceites vegetales.
- Definir y optimizar una metodología para la extracción de las lipasas obtenidas en la fermentación.
- Caracterizar las enzimas extraídas en términos de temperatura y pH óptimos, peso molecular, punto isoelectrico y estabilidad.
- Estudiar la fermentación en estado sólido (SSF) comparando reactores a diferentes escalas.
- Analizar el impacto ambiental por las emisiones del proceso de SSF del residuo proveniente de la industria de producción y refinado de aceites vegetales.

25 | OBJETIVOS

- Evaluar el uso de sólidos fermentados como biocatalizadores en procesos de digestión anaeróbica.

CAPÍTULO 3.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se detallan el montaje experimental y los métodos analíticos utilizados en los experimentos presentados en esta tesis. Los métodos que fueron utilizados exclusivamente en algún experimento se detallan en el capítulo correspondiente.

3.1 Planta piloto

Los experimentos se llevaron a cabo en dos plantas pilotos ubicadas en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona. Por una parte, la planta piloto del GICOM (PP1), situada en la zona exterior del edificio de la Escuela de Ingeniería, que consta de una superficie útil de 15 m². En ella se dispone de 2 reactores principales con un volumen útil de 50 L (R1-50L y R2-50L) acondicionados para la monitorización de diferentes variables como temperatura, concentración de oxígeno, entre otras. Por otra parte, la planta (PP2) ubicada en el interior del edificio de la Escuela, en la que se dispone de 12 reactores de 4.5 L. Los reactores de las dos plantas han sido validados para su uso en compostaje, todos poseen un modelo de flujo hidrodinámico equivalente (modelo flujo pistón), y se encuentran acondicionados y listos para ser monitorizados (Puyuelo, 2012). En las figuras 3.1 y 3.2 se muestra un esquema de cada una de las plantas piloto.

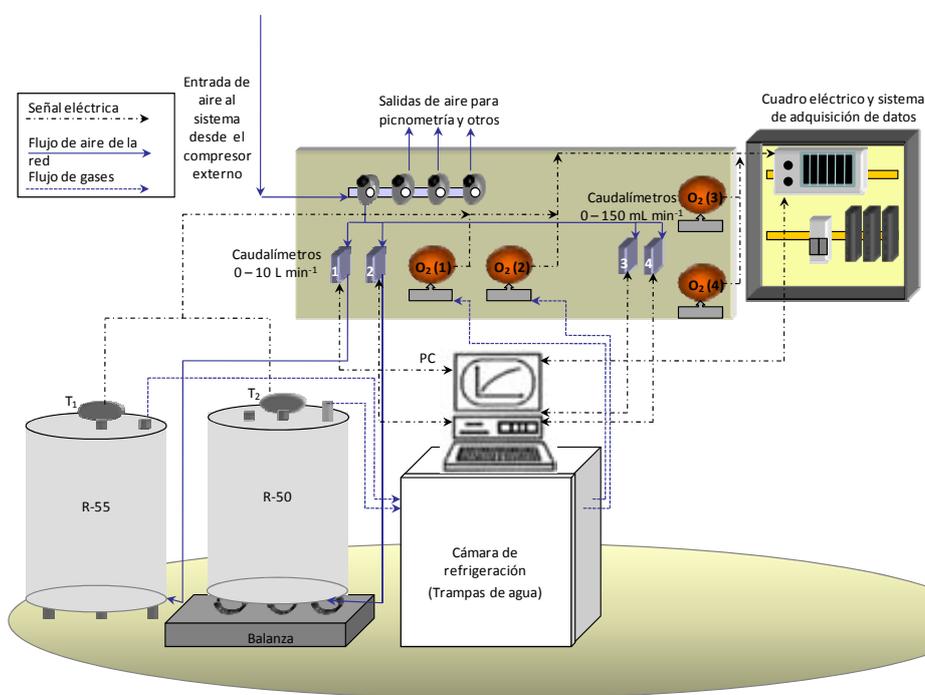


Figura 3.1 Esquema de la planta piloto PP1. O₂: sensor de oxígeno T: sonda de temperatura. (Adaptado Puyuelo, 2012)

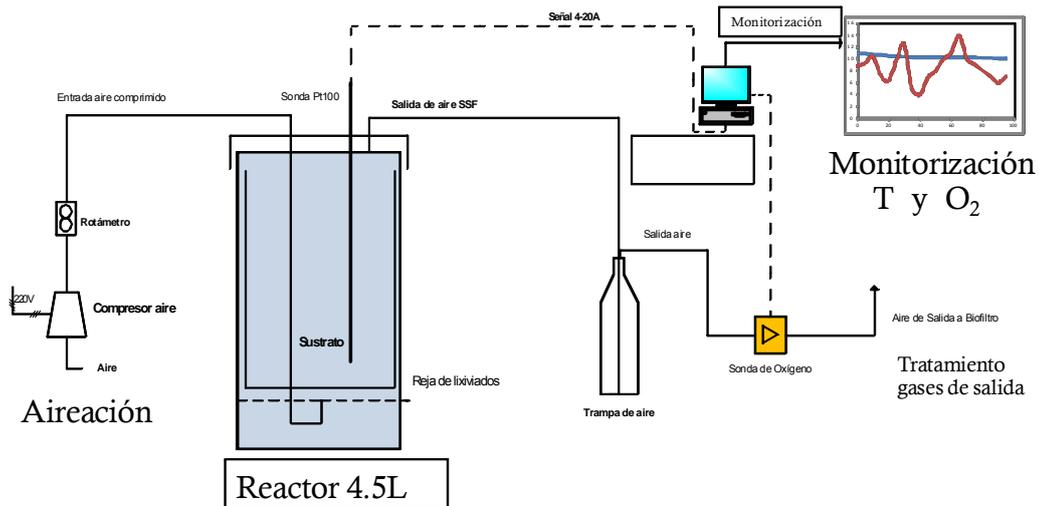


Figura 3.2 Diagrama esquemático de la planta piloto PP2

3.1.1 Descripción de los reactores

Los reactores ubicados en la PP2, validados previamente en pruebas de compostabilidad (Gea, 2001), son vasos Dewar de vidrio de 4.5 L, acondicionados con un tubo de plástico insertado hasta la cámara creada con una rejilla en el fondo del vaso (figura 3.3 A). Esta rejilla sirve como cámara de distribución de aire, para separar el material del lixiviado que se pueda producir durante el proceso y como soporte del material. El tubo de plástico sirve para suministrar el aire dentro del reactor. El reactor dispone de una tapa con dos orificios: uno por donde pasa la sonda de temperatura y el otro por donde está conectado el tubo de aireación (figura 3.3 B).



Figura 3.3 Imágenes reactores 4.5 L ubicados en PP2

Los reactores de 50 L de la planta PP1, R1-50L y R2-50L (figura 3.4), tienen una geometría cilíndrica y sus superficies laterales están aisladas con lana de vidrio y espuma de poliuretano, respectivamente. El reactor R1-50 L es el reactor-picnómetro,

compostador que permite hacer medidas de AFP in-situ, y está diseñado para trabajar a una presión hasta de 4 bar (Ruggieri, 2008).



Figura 3.4 Imágenes reactores planta PP1

El interior de los reactores está preparado con una rejilla perforada, para separar el material de una cámara de distribución de aire y recogida de lixiviados (figura 3.5).

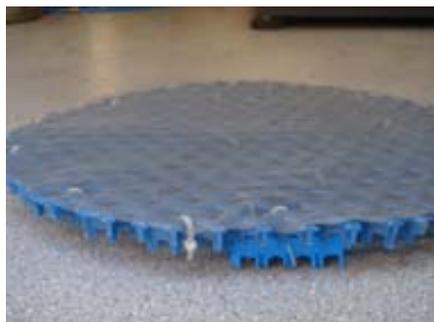


Figura 3.5 Imagen de la rejilla de los reactores planta PP1

En la figura 3.6 se muestran la parte superior de los reactores R1-50L y R2-50L, en ellas se dispone de dos orificios: uno para insertar la sonda de temperatura en el centro, y el segundo para registrar los gases salientes del proceso (figura 3.6 A y 3.6 B). El reactor R1-50L (figura 3.6 A), dispone de un tercer orificio que tiene instalada

una válvula de seguridad para evitar posibles sobrepresiones derivadas de la medida de AFPin-situ. En la parte inferior de los reactores se sitúan dos orificios: uno para la entrada de aire y el otro para la recolección de los lixiviados generados durante el proceso.

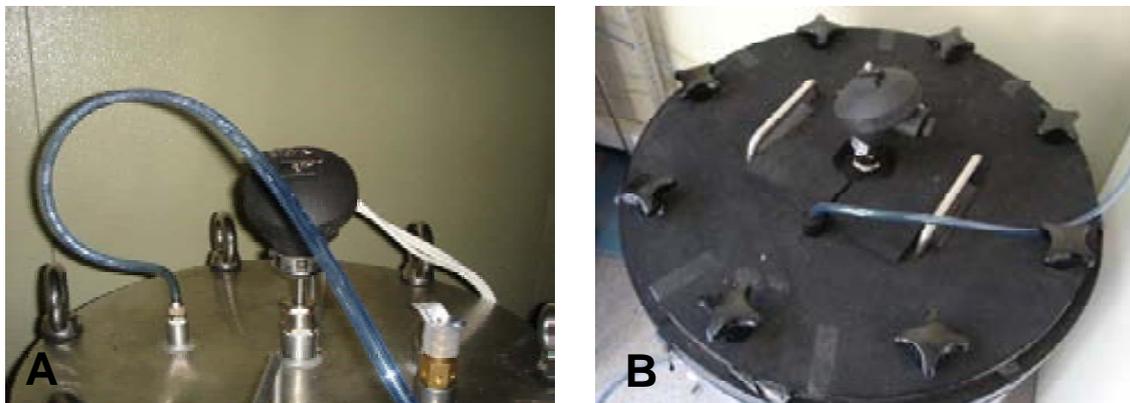


Figura 3.6 Imagen de la tapa de los reactores de 50 L de volumen

3.1.2 Descripción del montaje experimental

El aire en la planta piloto PP1, se suministraba mediante un compresor (Decibar 30 Worthington®, SNX 30/100) situado en el exterior de la planta. La salida de aire del compresor está regulada por un manoreductor que garantiza el suministro de aire al sistema con una presión de 400 KPa. En el esquema experimental de la planta piloto PP1 (figura 3.1) se puede ver que el suministro de aire se divide en cuatro salidas independientes, cada una de ellas reguladas de nuevo por un manoreductor, permitiendo así alimentar los diferentes sistemas experimentales de la planta a la presión conveniente. Una de las salidas de aire proporciona el flujo de entrada de aire a los reactores. Entre el manoreductor de las tomas de aire y el orificio de entrada a los reactores, se sitúan dos caudalímetros másicos montados en paralelo (Bronkhorst, The Netherlands), con los que se puede regular el caudal de aireación de ambos reactores de manera independiente. El rango de caudal en el que trabajan estos caudalímetros es de 0 a 10 L min⁻¹.

Para proteger los sensores de los gases de salida del reactor, los tubos se pasan a través de una cámara de refrigeración a 4°C donde se sitúan una serie de trampas de agua para eliminar condensados y luego los gases pasan por el sensor de O₂ (Xgard 501/265/S, Crowcon, Inglaterra). Una vez han pasado por los sensores, los gases son conducidos a la parte exterior de la planta piloto PP1.

En el caso de los reactores de 4.5 L (PP2), el aire suministrado proviene de la red general de aire comprimido del edificio. La presión del aire de entrada es de 2 bares

regulada por un manoreductor y el caudal se regula mediante una serie de rotámetros (mod. 2100 Tecfluid, España) de diferentes rangos de trabajo (0-300, 0-500, 0-1 NmL min⁻¹).

Las sondas de temperatura (Pt-100, SR-NOH-Desin, Spain) se introducen en la parte central de las tapas de los reactores para medir la evolución de temperatura del proceso.

Todos los sensores y las sondas de temperatura en la planta PP1 están conectados a un hardware de adquisición de datos (cDAQ-9171, National Instruments, USA) y están conectados al ordenador y controlados mediante el software LabView 8.6 (National Instruments, USA).

En la planta piloto PP2, se dispone de un adquisidor de datos modular (Desin, módulos MAC 3506, 3522, 3540 y 3580) que permite mediante su software (Proasis®Das-Win 2.1, Desin, Spain) realizar la adquisición de datos del seguimiento de temperatura y oxígeno de los reactores.

Todas las conexiones para la distribución de gases en ambas plantas se realizaron con tubo de polipropileno de 6-8 mm de diámetro.

3.2 Velocidad de consumo de oxígeno

La actividad biológica del proceso se monitoriza calculando la velocidad de consumo de oxígeno (OUR según las siglas en inglés de Oxygen Uptake Rate): La OUR se calcula utilizando los datos de temperatura, oxígeno, y caudal de entrada, adquiridos durante el proceso, según la ecuación 3.1

$$\text{OUR} = F(0.209 - O_2) \frac{P \times 32 \times 60}{R \times T} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Donde:

OUR: Velocidad de consumo de oxígeno expresada en gO₂ h⁻¹

F: Caudal másico aplicado (L min⁻¹)

0.209: Fracción molar de oxígeno en el aire (mol de O₂ o mol⁻¹)

P: Presión del sistema (101325 Pa)

32: Peso molecular del oxígeno (g mol⁻¹)

60: Factor de conversión de tiempo

R: Constante de los gases ideales (8310 Pa L K⁻¹ mol⁻¹)

T: Temperatura a la que se mide el caudal (K)

O₂: Fracción molar de oxígeno de la salida o del interior del reactor en función del comportamiento hidrodinámico del sistema. Para un sistema de flujo pistón, ésta fracción molar ha de ser calculada según la media logarítmica entre la entrada y la salida (Puyuelo, 2012).

La medida de la actividad biológica también puede ser expresada en términos específicos (sOUR). Para expresar la sOUR se aplica la ecuación 3.2

$$sOUR = \frac{OUR}{M \times MS (\times MO)} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Donde

sOUR: Velocidad de consumo de oxígeno por unidad de MS o de MO expresada en gO₂ h⁻¹ kg⁻¹ MS (o MO)

OUR: Velocidad de consumo de oxígeno expresada en gO₂ h⁻¹

M: Masa total de residuo (Kg)

MS: Fracción de materia seca del residuo (Kg MS Kg⁻¹ M)

MO: Fracción de materia orgánica en base seca (Kg MO Kg⁻¹ MS)

3.3 Índices de respiración dinámica

Durante los ensayos respirométricos se recogen datos con los que se pueden construir los índices de respiración dinámica. Estos índices se dividen en dos categorías: el Índice respirométrico Dinámico (IRD) y el consumo acumulado de oxígeno (ATn) (Ponsá y col. 2010).

3.3.1 Índice Respirométrico Dinámico

El Índice respirométrico dinámico (IRD) mide la diferencia de concentración de oxígeno (mL L⁻¹) de un caudal de aire a la entrada y a la salida de un reactor, basado en la metodología propuesta por Adani y col. (2006). La medida se obtiene utilizando un

respirómetro desarrollado por Ponsá y col. (2010) y Pognani y col. (2011). El esquema del respirómetro utilizado se muestra en la figura 3.7.

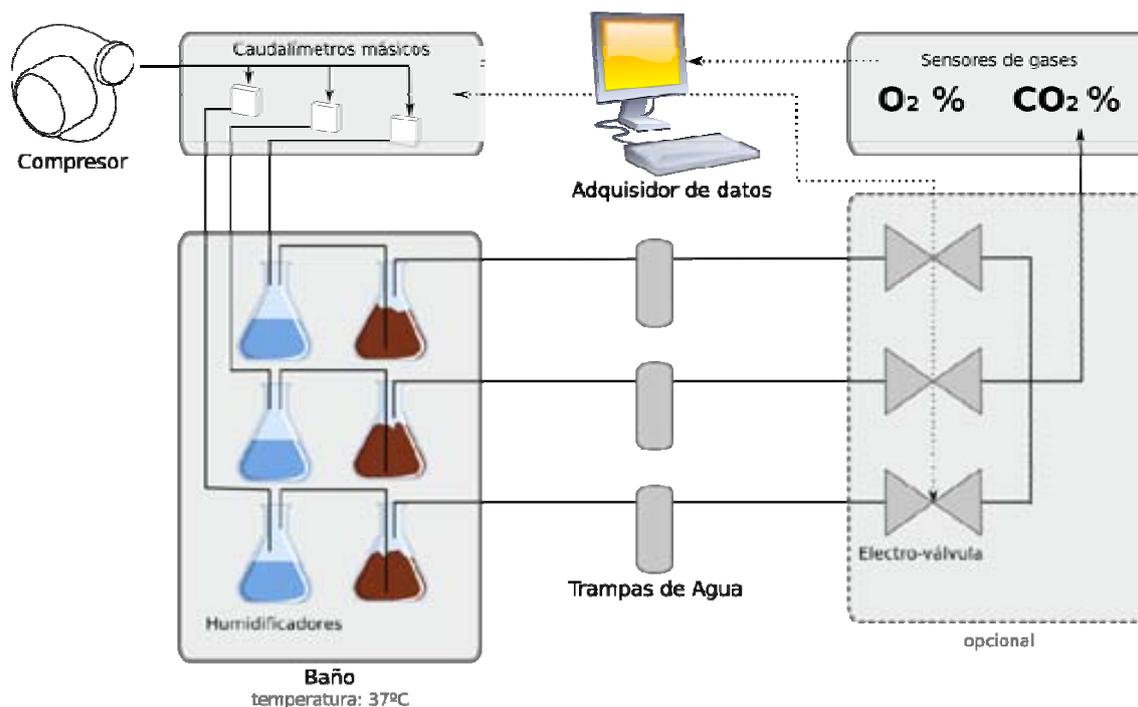


Figura 3.7 Esquema experimental del respirómetro

El montaje está adaptado para que el sistema pueda analizar 12 muestras a la vez, y está dividido en 4 líneas. En cada línea se analizan 3 muestras independientes. El ensayo respirométrico se lleva a cabo en un erlenmeyer de 500 ml, donde se introduce una malla en la parte inferior para permitir la circulación de aire por debajo y a través de la muestra sólida. Para realizar la prueba se introducen 100 gramos de la muestra en el erlenmeyer y se incuban en un baño a 37°C (Ponsá, 2010).

Para evitar el secado de la muestra durante la prueba se introduce aire saturado de humedad en el erlenmeyer, a través de un caudalímetro máscico (Bronkhorst, Hitec, Holanda). Con el fin de garantizar las condiciones aeróbicas durante el ensayo, la concentración de oxígeno en los gases de salida se debe mantener superior al 10%.

Los gases de salida del erlenmeyer son conducidos a los sensores de oxígeno y dióxido de carbono. Los sensores y el caudalímetro de cada una de las 4 líneas, están conectados a un sistema de adquisición de datos equipado con el Software (Indusoft Web Studio, versión 2008, USA). Finalmente, el IRD se calcula a partir de la ecuación 3.3:

$$\text{IRD}_t = \frac{Q \times \Delta O_2 \times 32 \times 60 \times 1000^a}{1000^b \times 22.4 \times M O} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

Donde:

IRD_t : Índice respirométrico dinámico expresado en $\text{gO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$ (ó MO) h^{-1}

Q: Caudal de aire (L h^{-1}) medido en condiciones normales (1 atm 273 K)

ΔO_2 : Diferencia de concentración de oxígeno entre la entrada y la salida del reactor (mL L^{-1})

32: Peso molecular del oxígeno (g mol^{-1})

60: Factor de conversión de tiempo

1000^a : Factor de conversión de masa

1000^b : Factor de conversión de volumen

El resultado se expresará como media de los triplicados en $\text{gO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$ (ó MO) h^{-1}

En base al intervalo de tiempo considerado se obtienen diferentes formas de expresar el índice:

IRD_{max} : Índice respirométrico máximo obtenido

$\text{IRD}_{1\text{h}}$: Media de los diferentes índices respirométricos dinámicos obtenidos durante 1 hora de máxima actividad

$\text{IRD}_{24\text{h}}$: Media de los diferentes índices respirométricos dinámicos obtenidos durante las 24 horas de máxima actividad

Para efectos de los ensayos realizados durante la tesis los valores del índice respirométrico dinámico corresponden al $\text{IRD}_{24\text{h}}$.

La clasificación de los índices basados en las características intrínsecas de los materiales, la existencia de una etapa de tratamiento previo o almacenamiento, y la historia de la muestra, se definen en Ponsá y col. (2010).

3.3.1.1 Preparación de las muestras

Algunas muestras requieren de un acondicionamiento previo antes de ser analizadas, para evitar problemas debido a la alta o baja humedad, porosidad reducida o a la heterogeneidad de la muestra. Para solucionar estos problemas se realiza un acondicionamiento a las muestras sin alterar las propiedades químicas y biológicas de las mismas. Entre los pretratamientos que se pueden aplicar se pueden mencionar: (i) para las muestras con alta humedad y baja porosidad se agrega un material inerte, que sea capaz de absorber el exceso de humedad y a su vez dar estructura al material, como son las muestras de lodos; (ii) para el caso de muestras con bajo contenido de humedad, se añade agua hasta llegar al porcentaje óptimo de humedad (50-60%); (iii) para el caso de muestras heterogéneas, se procede a la trituración de las mismas para homogenizar el tamaño de la muestra a tamaños entre 10 y 15 mm, tal y como se detalla en Ponsá y col. (2010).

3.3.1.2 Caudal de aire aplicado para la determinación del IRD

El caudal de aire es ajustado en función de la tipología y/o procedencia de la muestra. Por ello, para muestras de final de proceso, el caudal de aire que se aplicará está en el rango de 10 a 12 mL min⁻¹, para muestras procedentes de etapas intermedias de un tratamiento biológico de 12 a 20 mL min⁻¹ y para muestras frescas a las que no se les ha aplicado un tratamiento, se aplica un caudal de aire de 20 a 35 mL min⁻¹.

Los diferentes rangos de caudal mencionados anteriormente son utilizados para evitar problemas con las muestras, como por ejemplo en residuos poco estables, donde se reduce la posibilidad de limitaciones en el análisis por déficit de oxígeno, y en las estables evitan el exceso de éste.

3.3.2 Consumo Acumulado de Oxígeno

Este índice se utiliza para calcular el consumo de oxígeno de una muestra durante un período de tiempo determinado, normalmente 4 días. Sería el equivalente de la medida DBO₅ ampliamente utilizada en el campo de las aguas residuales. El índice determina la estabilidad biológica de compost u otros materiales orgánicos.

El consumo acumulado de oxígeno en n días (AT_n) se calcula según la ecuación 3.4

$$AT_n = \int_{t_1}^{t_1+n} DRI_t \cdot dt \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Donde

t_l : es el tiempo cuando finaliza la fase de latencia. La fase de latencia termina cuando la tasa de consumo de oxígeno llega al 25% de la tasa máxima de absorción calculado como el promedio de tres horas.

Teniendo en cuenta los intervalos de tiempos considerado para calcular los consumos tenemos:

AT_4 : consumo de oxígeno acumulado en cuatro días (después de la fase de latencia).

AT_{24h} : consumo de oxígeno acumulado en las veinticuatro horas de máxima actividad, es decir, el período de veinticuatro horas cuando se calcula DRI_{24h} .

AT_U : consumo de oxígeno acumulado total hasta que no se detecta ningún consumo importante de oxígeno.

El AT_4 y el IRD_{24h} son parámetros complementarios, mientras el primero ofrece información acerca del contenido total de materia orgánica biodegradable el segundo proporciona información de lo rápida o lentamente que se degrada.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Humedad (H) y materia seca (MS)

El contenido de humedad y materia seca de las muestras trabajadas en la tesis se determinó utilizando el método estandarizado de secado de la muestra a 105°C durante un periodo de 24 horas (U.S. Department of Agriculture and U.S. Composting Council 2001).

El procedimiento se detalla a continuación:

- Pesar de 5 a 10 g aproximadamente de la muestra húmeda (P_0), en un crisol previamente tarado (T) en una balanza de precisión (± 0.01 g).
- Secar la muestra en la estufa a 105°C durante al menos 18 horas. Sacar la muestra de la estufa, dejar enfriar en el desecador y pesar (P_f).
- Determinar el porcentaje de humedad (%H) y el porcentaje de materia seca (%MS) según las ecuaciones 3.5 y 3.6:

$$\%H = \frac{(P_0 - P_f)}{(P_0 - T)} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

$$\%MS=100-\%H \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

3.4.2 Materia orgánica (MO)

La determinación del porcentaje de materia orgánica total se realizó por gravimetría indirecta, en la que se midió la pérdida de peso a causa de la combustión de la materia orgánica, a temperaturas entre 470 y 560 °C, siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

- Introducir las cápsulas de porcelana (de 20 mL de capacidad) en la mufla a 550°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, sacar las cápsulas y dejar enfriar sobre una superficie adecuada durante unos minutos. A continuación, introducir las cápsulas en el desecador y dejar que se enfríen completamente antes de tararlas (T).
- Pesar en una balanza analítica (con precisión ± 0.0001 g) aproximadamente 1.5 g de muestra seca y molida dentro de la cápsula de porcelana previamente tarada (P_0).
- Introducir la muestra en la mufla y realizar una rampa de temperatura hasta que se alcancen los 550°C. Permitir la combustión de la muestra a 550°C durante 2h y entonces lentamente disminuir la temperatura a 200°C.
- Retirar las muestras de cenizas de la mufla, dejarlas enfriar brevemente sobre una superficie adecuada e introducir las cápsulas en el desecador. Cuando se extraen, se dejan enfriar. Una vez completamente frías, se pesan en una balanza analítica con precisión de ± 0.0001 g (P_f).
- Determinar la cantidad de materia orgánica (%MO) de la muestra según indica la ecuación 3.7:

$$\%MO = \frac{(P_0 - P_f)}{(P_0 - T)} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

3.4.3 pH

El valor del pH de la muestra se determinó usando un extracto acuoso de muestra fresca. Para obtener el extracto acuoso, las proporciones en peso muestra/agua destilada más comúnmente utilizadas son 1/5 y 1/25. En este caso de estudio se utilizó una relación 1/5.

3.4.4 Porosidad (*Air Filled Porosity, AFP*)

El FAS (Free Air Space), o AFP (Air filled porosity), se define como la fracción de volumen de aire disponible respecto al volumen total. La determinación del AFP se llevó a cabo mediante el método de picnometría de aire para muestras voluminosas desarrollado por Ruggieri y col. (2012).

El picnómetro de aire consiste en una cámara que contiene aire a una presión conocida; una cámara donde se introduce un volumen conocido de muestra a presión atmosférica, y una válvula de aire que conecta ambas cámaras. Tras cerrar el sistema herméticamente, el aire comprimido de la cámara de aire pasa a la cámara de muestra mediante la apertura de las válvulas de conexión entre ellas. Un presostato acoplado a la cámara de aire registra la medida de presión antes y después de abrir la cámara de aire. A partir de la ley de los gases ideales de Boyle-Mariotte se obtiene la relación de presión-AFP que existe entre los dos registros de presión.

3.4.5 Nitrógeno Total Kjeldhal

Para la determinación del contenido de nitrógeno Kjeldhal de la muestra se siguió el procedimiento descrito a continuación:

Preparación de la muestra

- Pesar con precisión de 0.01g entre 0.360-1.500g de muestra seca y triturada. Hacer un pequeño paquete con papel de fumar sin la cola e introducirlo en un tubo de digestión.
- Añadir 20mL de ácido sulfúrico.
- Añadir una pastilla de catalizador y un trozo de piedra porosa.
- Hacer una prueba un blanco sin muestra, añadiendo en el papel de fumar los 20mL de ácido y el catalizador.

Digestión

Digerir las muestras a 420°C durante 1.5h en un bloque digestor (Selecta Bloc Digest 6), conectado al sistema de extracción de gases y a la bomba de vacío.

Destilación de la muestra

Abrir el grifo de agua de recirculación. Preparar un erlenmeyer con 100ml de ácido bórico al 4% y unas gotas de indicador mixto. Colocarlo en el equipo para la recogida del destilado.

Adecuar el tiempo de destilación. Se aconseja que sea al menos de 10 minutos para poder recoger 150 ml de destilado. A continuación se ha de añadir NaOH (35%) en exceso, manualmente con el “reagent 2” de la unidad de destilación K-355(Büchi) hasta que la muestra adquiera un color azul oscuro/negro. A medida que el nitrógeno se vaya fijando en la solución de ácido bórico, dicha solución adquirirá un color verdoso.

Valoración

El destilado recogido se valora con HCl hasta el virado completo de transparente a rosa. Anotar el volumen gastado de ácido.

Cálculos:

Para calcular el contenido de nitrógeno Kjeldhal de la muestra usamos la ecuación 3.8:

$$\text{NTK(\%)} = 100 \left[\frac{(V_1 - V_0) \times N \times 0.014}{P} \right] \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

Donde:

V_1 = Volumen ácido clorhídrico usado en la titulación (mL)

V_0 = Volumen de ácido clorhídrico consumido en la valoración del blanco (mL)

N = Normalidad del ácido estándar

P = Peso de la muestra (g)

3.4.6 Nitrógeno Amoniacal

Para la determinación del nitrógeno soluble se siguió el procedimiento descrito a continuación:

Preparación de la muestra

- Preparar un extracto acuoso en proporciones muestra/agua destilada de 1/5
- Traspasar una alícuota de 10 ml de este extracto al tubo de digestión

Destilación

Abrir el grifo de agua de recirculación. Preparar un erlenmeyer con 100ml de ácido bórico al 4% y unas gotas de indicador mixto. Colocarlo en el equipo para la recogida del destilado.

Adecuar el tiempo de destilación. Se aconseja que sea al menos de 10 minutos para poder recoger 150 ml de destilado. A continuación se ha de añadir una solución de NaOH (35%) en exceso, manualmente con el “reagent 2” de la unidad de destilación K-355 (Büchi).

Valoración

El destilado recogido se valora con HCl. Se valora hasta el virado completo de transparente a rosa. Anotar el volumen gastado de ácido.

Cálculos:

Para calcular el nitrógeno soluble en la muestra usamos la ecuación 3.9:

$$\text{N-NH}_4^+ \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \left[\frac{(V_1 - V_0) \times N \times 0.014 \times V_{\text{ag}}}{P \times 10} \right] \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

Donde

V_1 = Volumen ácido clorhídrico usado en la titulación (mL)

V_0 = Volumen de ácido clorhídrico consumido en la valoración del blanco (mL)

V_{ag} = Volumen de agua utilizado para hacer el extracto (mL)

N = Normalidad del ácido estándar

P = Peso de la muestra (g)

3.4.7 Contenido de Grasa

El contenido de grasa, se midió por el método 9071B (U.S. Environmental Protection Agency 1998). El análisis se hace introduciendo la mezcla en un cartucho de celulosa que drena libremente durante la duración del periodo de extracción. La extracción se realizó durante 4 horas con muestra en base seca, usando la Unidad de Extracción Soxhlet E-812/816 (Büchi), con n-hexano como disolvente ($\geq 95\%$ de pureza, Sigma Aldrich).

El procedimiento se detalla a continuación:

- Pesar 10 g de la muestra y mezclar con 10 g de sulfato de sodio anhidro (Panreac), se introducen mezclados en un cartucho de celulosa (M).
- Colocar el cartucho de celulosa dentro del compartimento portacartuchos del equipo.

- Pesar en una balanza analítica (con precisión ± 0.0001 g) los vasos de extracción previamente tarados (P_0).
- Adicionar el n-hexano en cada vaso de extracción, y colocarlos en los compartimentos del equipo.
- Iniciar la extracción. Pasado el tiempo de extracción, retirar del compartimento, dejar secar y pesar los vasos (P_f).
- Determinar el porcentaje de grasa (%G) según la ecuación 3.10:

$$\%G = \frac{(P_f - P_0)}{(M \times 0.5)} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

3.4.8 Ácidos Grasos de Cadena Larga (AGCL)

El método que se ha utilizado para determinar los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) es una adaptación del método que describe Neves y col. (2009). Para muestras líquidas se tomaron 2 mL de muestra en viales de vidrio, se les añadió 1.5 mL de la solución IS (1000 mg L^{-1}) y 1.5 de agua ultrapura; posteriormente se les añadieron 2 mL de Diclorometano(DCM), se agitaron con vórtex para promover el contacto entre las dos fases. Tras la digestión por espacio de 1 h, se centrifugó y se recogió 1 mL de la fase orgánica para ser analizada. Para muestras sólidas, se transfiere aproximadamente 100 mg a los viales de vidrio y luego se sigue el mismo protocolo que para las muestras líquidas. La determinación de los AGCL se hace mediante cromatografía de gases usando un cromatógrafo Agilent Technologies 6890N (Network GC System, Madrid, España) equipado con el software (Empodera 2, Waters Asociaste Inc., Milford, USA). El cromatógrafo estaba provisto de una columna HP-INNOWAX 30m x 0.32mm x 0.25 μm film (Agilent Technologies), con un detector de ionización de flama (FID). Se utilizó Helio como gas portador a 1.8 mL min^{-1} . La temperatura del inyector era de 220°C , la temperatura del horno inicial era de 150°C , con rampa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 250°C , y la temperatura del detector: 250°C . El volumen de inyección era de $2 \mu\text{L}$ y el tiempo de análisis de 20 minutos.

El sistema se calibró con estándares de diferentes AGCL (Anexo 11.1), incluyendo ácido láurico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico y linoleico (Sigma, España) en intervalos de $25\text{-}1000 \text{ mg L}^{-1}$.

3.5 Enzima

3.5.1 Determinación de la actividad lipolítica en muestras líquidas

La actividad lipolítica en extractos líquidos se midió como se describe en Resina y col. (2004), según un método colorimétrico, en el que se hace uso de un kit comercial (lipase colorimetric assay Roche kit 11821792). Este método, presentado en la figura 3.8 esquematiza la reacción enzimática para la formación de metilresorufina, a partir de la hidrólisis del éster cromático 1.2-O-dialuril-rac-glicero-3-ácido glutárico – (6'-metilresorufina). La actividad lipásica es directamente proporcional a la intensidad del colorante rojo formado en la reacción, por tanto el seguimiento de la absorbancia de la mezcla de ensayo con el tiempo, permite determinar la actividad lipolítica.

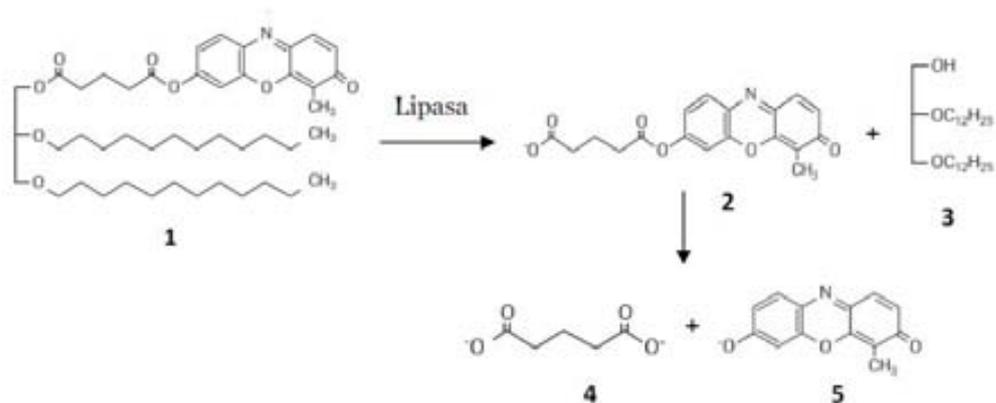


Figura 3.8 Método colorimétrico de estimación de actividad lipásica. (1) 1.2-O-dialuril-rac-glicero-3-ácido glutárico-(6'-metilresorufina) éster, (2) ácido glutárico-(6'-metilresorufina) éster, (3) 1.2- O-dialuril-rac-glicerol, (4) ácido glutárico, (5) Metilresorufina

La mezcla de ensayo se realizó en cubetas de 1.5 mL (Brand GMBH, Wertheim, Germany). Dentro de la cubeta, se mezclan en el siguiente orden: 500 μ L de tampón Tris-HCl (200 mM) + CaCl_2 (5 mM), pH=7.25, con 500 μ L de muestra y 300 μ L de sustrato (lipasa Roche). Una vez mezclados dentro de la cubeta y teniendo cuidado que no se formen espumas (para no perder actividad), se llevan al espectrofotómetro Cary 300 a 30°C y 580 nm, para obtener la medida de la absorbancia con el tiempo.

El valor de la pendiente de la recta de absorbancia frente al tiempo está directamente relacionada con las unidades de actividad por mililitro de muestra (Anexo 11.2).

3.5.2 Determinación de la actividad lipolítica en muestras sólidas

La actividad de la lipasa en muestras sólidas se determinó como describe Hernández-Rodríguez y col. (2009). El procedimiento se describe a continuación:

- Preparación emulsión
 - 20 g de aceite de oliva
 - 100 mL Tris-HCl 100 mM pH 8.0 + CaCl₂ 10 mM
 - 0.25% (w/v) alcohol polivinil
 - 0.3% (w/v) goma arábica
- Se emulsiona por 10 min a 10000 rpm
- Comienza la reacción al añadir 3 mL de emulsión por 40 mg de biocatalizador
- Incubación a 45°C x 15 min
- Detener la actividad enzimática añadiendo 0.6 mL de HCl 6M
- Ácidos grasos extraídos en 3 mL de heptano se agitan en vórtex por 30 s
- Se centrifuga a 9800 g por 10 min a 4°C
- Se toman 2.5 mL de la fase orgánica + 0.5 mL de acetato de piridina (50 g L⁻¹ pH 6.1), vórtex por 30 s
- Se mide la absorbancia a 715 nm

Para determinar el valor de la actividad se confeccionó una curva de calibrado con ácido oleico a diferentes concentraciones (Anexo 11.3).

Para ambos métodos, una unidad de actividad lipolítica (UA) se define como la cantidad de lipasa necesaria para hidrolizar 1 micromol de enlace éster por minuto bajo las condiciones del ensayo descritas y se hace referencia a la cantidad de sustrato sólido usado para la obtención de la muestra de extracto, tanto en húmedo (UA g⁻¹) o en seco (UA g⁻¹ de MS).

3.5.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas en muestra líquidas se realizó como describe Bradford (1976), usando el Bradford Reagent (Sigma Aldrich). Éste método se basa, en la reacción de los aminoácidos aromáticos con el colorante Coomassie G-250,

generándose un complejo que se determina colorimétricamente; este puede medirse a 595 nm mediante un espectrofotómetro (Miltiskan FC, Thermo Scientific Walthman, USA). Para determinar la cantidad de proteínas, se confeccionó una curva de calibrado con concentraciones conocidas de proteína de albúmina de suero bovino.

3.5.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), se realizó en un Mini Protean Tetra System (Biorad, CA, USA). Antes de realizar la carga en el gel, las muestras se incuban con el tampón reductor (Tris-HCl 125mM pH6.8, SDS 4% w/v, azul de bromofenol 10% w/v y 2-β-mercaptoetanol 10% v/v) a 98°C durante 15 min con el objetivo de asegurar la desnaturalización de la proteína. Es importante añadir que el volumen máximo de muestra aplicado fue de 15 µl. El marcador de peso molecular utilizado, fue el Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad, CA, USA). El gel se carga con la muestra y en los extremos de este se añaden los marcadores. Una vez realizada la electroforesis, los geles se han teñido de dos formas: con una solución coloidal de Coomassie G250 ó con tinción de plata, para visualizar la proteína y determinar su peso molecular.

3.6 Toma de muestra y métodos analíticos para emisiones gaseosas

Las metodologías para la toma y análisis de las emisiones gaseosas de los experimentos realizados en la PP1, fueron desarrolladas y puestas a punto por Cadena (2009) y Colón y col. (2012).

3.6.1 Análisis de amoníaco

Las emisiones de amoníaco se realizaron utilizando un sensor industrial de amoniaco (Industrial Scientific) con un rango de detección de 100 a 1200 ppm_v. La medida se realizó acoplado directamente el sensor a las conducciones de salida de gases de los reactores.

3.6.2 Análisis de COVs, N₂O y CH₄

Las muestras para la medida de las emisiones, fueron obtenidas de las salidas de gas de los reactores, se recogieron y conservaron muestras en bolsas Tedlar© de 1 L de capacidad, previamente purgadas con nitrógeno puro. Luego fueron analizadas por cromatografía de gases con un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N Network GC System, Madrid, España) equipado con el software (Empodera 2, Waters Asociaste Inc., Milford, USA).

3.6.2.1 Análisis de Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs)

La cuantificación se llevó a cabo sobre el conjunto de COVs presentes en las emisiones gaseosas (incluyendo el metano), sin identificar ni cuantificar cada componente por separado. Los resultados se expresaban como $\text{mg C}_{\text{totales}} \text{m}^{-3}$.

Las características de la cromatografía se detallan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Características para la cromatografía de COVs

Detector	Ionización de llama (FID)
Columna	Capilar Tracsil TRB-1, 2m x 0.53mm x 30 μm film (Teknokroma)
Gas portador	N ₂ a 1.5 psi y splitless
Temperatura Horno	Isoterma 200°C
Temperatura inyector	250°C
Temperatura detector	250°C
Volumen de muestra	250 μL
Detalles de inyección	Manual
Tiempo de ensayo	0.5 minutos

3.6.2.2 Análisis de Metano

Los resultados del análisis de metano, se expresaron en partes por millón volumétricas (ppm_v).

Las características de la cromatografía para el CH₄ se presentan en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Características para la cromatografía de CH₄

Detector	Ionización de llama (FID)
Columna	Semicapilar HP-PLOT Q 30m x 0.53mm x 40 μm film (Agilent)
Post columna	Trampa de partículas, 2m N° 5181-3352 (Agilent)
Gas portador	N ₂ a 4 psi y split 1.2
Temperatura Horno	Isoterma 60°C
Temperatura inyector	240°C
Temperatura detector	250°C
Volumen de muestra	500 μL
Detalles de inyección	Manual
Tiempo de ensayo	4 minutos

3.6.2.3 Análisis de Óxido Nitroso

Los resultados del análisis de óxido nitroso, se expresaron en partes por millón volumétricas (ppm_v).

Las características de la cromatografía se presentan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Características para la cromatografía de N₂O

Detector	Captura de electrones (ECD)
Columna	Semicapilar HP-PLOT Q 30m x 0.53mm x 40µm film (Agilent)
Post columna	Trampa de partículas, 2m N° 5181-3352 (Agilent)
Gas portador	N ₂ a 4 psi y split 1.2
Temperatura Horno	Isoterma 60°C
Temperatura inyector	120°C
Temperatura detector	345°C
Volumen de muestra	500 µL
Detalles de inyección	Manual
Tiempo de ensayo	4 minutos

3.6.3 Calibrado de los métodos cromatográficos

Los calibrados de los métodos se hicieron utilizando un gas patrón. Los gases patrón utilizados fueron: para el calibrado de los COVs, hexano (líquido) (Spigno y col. 2003) y metano y óxido nitroso de pureza 4.5 (pureza superior a 99.95%) para sus respectivos calibrados.

El calibrado se obtuvo mediante la inyección en el cromatógrafo de diferentes volúmenes de una solución madre del respectivo gas patrón.

3.7 Parámetros energéticos

Para estimar el impacto de las fermentaciones en términos energéticos, se determina el consumo energético asociado al compresor que suministra el aire de entrada al sistema en la planta PP1. La determinación de la energía consumida se obtiene a partir del volumen total de aire suministrado durante cada experimento. Para ello se utiliza un factor de conversión de 396 kJ m⁻³ con el fin de transformar los m³ de aire suministrado a energía consumida por el compresor. La unidad funcional para poder calcular este consumo se conoce como RIE (Respiration Index Efficiency)(Colón y col. 2012). Cuando el RIE es calculado en unidades específicas se conoce como RIE_{CE}, ya que incluye la eficiencia del proceso (tiene en cuenta la estabilización de la muestra

medida con el IRD) respecto al caudal suministrado. Para el cálculo del RIE_{CE} se utiliza la ecuación 3.11

$$RIE_{CE} = \frac{\text{Consumo energético}}{IRD_{24h, \text{ inicial}} - IRD_{24h, \text{ final}}} \quad (\text{Ecuación 3.11})$$

Donde:

RIE_{CE} : eficiencia del índice respirométrico respecto al consumo energético expresado en $\text{kJ} [\text{mgO}_2 \text{g}^{-1} \text{MO h}^{-1}]^{-1}$

$IRD_{24h, \text{ inicial(final)}}$: Índice respirométrico dinámico durante las 24 horas de máxima actividad inicial (final) expresado en $\text{mgO}_2 \text{g}^{-1} \text{MO h}^{-1}$

3.8 Digestión Anaeróbica

3.8.1 Índices anaeróbicos

Para determinar la biodegradabilidad de los residuos orgánicos en condiciones anaeróbicas se determinan los índices anaeróbicos, a través de los cuales se mide la producción de biogás y metano en tiempos determinados.

El procedimiento utilizado para analizar el biogás y el potencial de producción de metano de las muestras es una adaptación del procedimiento descrito por el Instituto Alemán de Normalización (Federal Government of Germany 2001).

El procedimiento estándar alemán proporciona el parámetro GB_{21} , expresado como litros en condiciones normales de biogás (temperatura: 273K y la presión 1.01325 Bar) producido por kg de sólido total (NL kg ST^{-1}) durante 21 días. Durante la prueba, la producción de biogás fue monitoreada a diferentes tiempos y el test fue finalizado cuando no se observaba una producción significativa de biogás. Para obtener la producción bioquímica de metano (BMP) se analiza la composición de biogás por cromatografía de gases (cromatógrafo Perkin-Elmer AutoSystem XL) con un detector de conductividad térmica y usando una columna Hayyeseq 3m 1/8" 100/120.

3.8.2 Ensayo anaeróbico

El ensayo se llevó a cabo en botellas de aluminio selladas, de 1 litro de volumen que fueron utilizadas como reactores anaeróbicos (figura 3.9).



Figura 3.9 Imágenes de las botellas del ensayo anaeróbico

Para obtener la biodegradabilidad de las muestras anaeróbicas se requiere el uso de un inóculo anaerobio. El inóculo anaerobio, que nunca puede ser congelado, se debe mantener a 37°C durante dos semanas para eliminar la materia orgánica fácilmente biodegradable restante. Se utilizó una proporción de inóculo/muestra en base en seca de 4/1. Esta proporción se utiliza cuando se tienen sustratos frescos, ricos materia orgánica no degradada (Ponsá 2010) .

La mezcla se realiza directamente en las botellas mediante la adición de las cantidades correspondientes de inóculo y de la muestra para obtener finalmente 600 ml de mezcla y alrededor de 400 ml de espacio de cabeza (en función de la densidad aparente de la mezcla) en las botellas. Las botellas se incubaron en una cámara de temperatura controlada a 37±1°C. Para garantizar las condiciones anaeróbicas, previamente a cada experimento, el espacio de cabeza en las botellas se purgó con gas N₂ para eliminar el O₂. Para la determinación de la presión de biogás, las botellas tenían una válvula de bola que se puede conectar a un manómetro de presión digital (SMC modelo ZSE30, Japón).

La densidad aparente de la mezcla se determinó previamente con el fin de calcular con exactitud el volumen del espacio de cabeza de cada botella, que se supone constante a lo largo del experimento. Durante la prueba, el biogás se midió y se purgó una vez al día para evitar la acumulación de sobrepresión. Al mismo tiempo, las botellas se agitaron para homogenizar la mezcla. A la par de todos los experimentos se utiliza una muestra llamada blanco que contiene solo el inóculo, para tener una medida cuantitativa de la materia orgánica presente en el medio de inoculación.

Las muestras se realizan con un mínimo de dos repeticiones. Sin embargo, se realizan triplicados generalmente, ya que en algunos casos se observan desviaciones mayores al 20% en los duplicados.

Para determinar GB_n y BMP_n se sigue el procedimiento descrito a continuación:

1) Para el cálculo del volumen de biogás o de metano producido a 37° C y 1 atm en cada experimento se utiliza la ecuación 3.12:

$$V_{37^{\circ}\text{C},n} = \frac{\left[B - \left(\frac{W}{BDW} \right) \sum_{i=0}^n P_i \right]}{P_{\text{atm}}} \quad (\text{Ecuación 3.12})$$

Donde:

$V_{37^{\circ}\text{C}, n}$: volumen de biogás (o metano) producido en una botella después de n días (L)

B: volumen de trabajo de la botella (L)

W: peso húmedo total de la mezcla introducida en la botella (kg)

BD_w : densidad en húmedo de la mezcla (kg L^{-1})

P_i : presión medida después de la liberación de presión (bar)

n: días de haber empezado el experimento

P_{atm} : es la presión atmosférica (1.032502 bar)

2) Para el cálculo del volumen neto de biogás (o metano) producido después de restar el biogás (o metano) producidos por el blanco se utiliza la ecuación 3.13

$$V_{\text{neto } 37^{\circ}\text{C},n} = (V_{37^{\circ}\text{C},n}) - \left[\frac{\left(\sum_{i=0}^n V_{37^{\circ}\text{Cinoc. } i} \right)}{3} \right] \times S_{\text{inoc.}} \quad (\text{Ecuación 3.13})$$

Donde:

$V_{\text{neto } 37^{\circ}\text{C}, n}$: volumen neto de biogás (o metano) producido en una botella de la muestra después de n días (L)

$V_{37^{\circ}\text{Cinoc. } i}$: volumen de biogás (o metano) producido por cada triplicado del blanco después de n días (L)

$W_{\text{inoc. } i}$: peso húmedo total del inóculo introducido inicialmente en cada triplicado del blanco (g)

$S_{\text{inoc.}}$: peso húmedo del inóculo utilizado al hacer la mezcla inicial: inóculo (g)

3) La producción de biogás durante n días (GB_n) y el potencial de metano biológico durante n días (BMP_n) se determinó utilizando la ecuación 3.14.

$$GB_n(BMP_n) = \left[\left(\frac{V_{\text{neto } 37^\circ\text{C},n}}{Z} \right) \times \frac{273.15}{310.15} \right] \quad (\text{Ecuación 3.14})$$

Donde:

GB_n : volumen neto de biogás producido por la muestra de residuo después de n días (NL biogás Kg^{-1} ST)

BMP_n : volumen neto de metano producido por la muestra de residuo después de n días (NL metano kg^{-1} ST)

$V_{\text{neto } 37^\circ\text{C}, n}$: volumen neto de biogás (o metano) producido en una botella de la muestra después de n días (L);

Z: cantidad de ST de la muestra inicialmente cargada en el reactor (kg ST).

CAPÍTULO 4.

4. ESTUDIO PRELIMINAR DEL PROCESO DE FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO (SSF) PARA LA PRODUCCION DE LIPASAS A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DE PRODUCCION Y REFINADO DE ACEITES VEGETALES

4.1 Introducción

Durante un proceso de fermentación, se hace necesario que todas las etapas que lo conforman se encuentren acopladas para lograr que el proceso sea óptimo. La sinergia que debe existir entre procesos previos y posteriores de cada etapa es de vital importancia. Esta sincronización permite reducir en gran medida tiempos en el proceso lo que se traduce en menores costes en la fermentación.

Con la optimización de la fermentación, se pretende elegir los elementos que facilitarán la formación de productos y harán que se maximice su producción. Para tal efecto, se tendrán en cuenta variables que inciden sobre el microorganismo y el proceso, entre las que se puede mencionar los diferentes nutrientes que favorecerán el crecimiento y desarrollo del microorganismo, la disponibilidad del sustrato, condiciones de operación, rendimientos y tiempos de producción.

En este capítulo, se pretende evaluar a partir de la información recopilada en la literatura, el sistema más apropiado para realizar la fermentación en SSF con el objetivo de producir lipasas termófilas. Asimismo, definir las mezclas del residuo con alto contenido de materia grasa se analizarán durante todo el desarrollo de la tesis. Adicionalmente, se fijarán las condiciones utilizadas para la extracción de las enzimas y los métodos desarrollados para la medida de su actividad.

4.2 Selección y validación del sistema de fermentación y definición de mezclas

Si se quiere lograr maximizar la velocidad de formación y rendimiento del producto obtenido en la fermentación, es importante definir el sustrato y cosustrato a emplear, de manera que se favorezca el desarrollo de los microorganismos y que la materia orgánica biodegradable sea accesible. Para determinar el sustrato y cosustrato, se tuvieron en cuenta factores que serían importantes durante la actividad biológica como por ejemplo el nivel de humedad, que puede ser un factor crítico en la respiración y en el crecimiento microbiano; así como el aporte que ofrece el cosustrato para compensar las deficiencias que puede presentar el residuo a tratar.

Como el objetivo principal es la producción de lipasas termoestables en SSF, el sustrato que se eligió para la fermentación fue un residuo rico en grasa. El residuo con el que inicialmente se trabajó eran tierras diatomeas procedentes de la filtración de

aceites que se obtuvieron de la planta de compostaje de Terrassa. La planta gestiona dos tipos de diatomeas: la diatomea blanca (DB) y la diatomea negra (DN). La caracterización de los sustratos se presenta en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Caracterización inicial de los sustratos

Parámetro	Diatomea	Diatomea
	Blanca	Negra
Humedad (%)	10.08	1.53
Materia Orgánica (% b.s)	73.27	29.79
NTK (% b.s)	0	0
TOC (% b.s)	56.40	24.04
Grasas (%b.s)	59.06	22.82
Capacidad de Retención Hídrica (%b.h)	15.09	52.71

b.s= base seca b.h= base húmeda

Se destaca en la tabla 4.1, la carencia de nitrógeno en las dos diatomeas caracterizadas. Una vez se realizó la caracterización de los dos sustratos, se eligió la diatomea negra para los experimentos iniciales, puesto que casi toda la fracción orgánica es grasa y por poseer mejor capacidad de retención hídrica que facilitaría la mezcla con el cosustrato.

Elegida la diatomea negra, el siguiente paso fue seleccionar el cosustrato que serviría como complemento del residuo rico en grasa. El uso de un cosustrato ayuda al desarrollo de la fermentación, debido al efecto sinérgico de los microorganismos presentes y al aporte de nutrientes que se encontraban ausentes o en baja concentración en el sustrato. Un claro ejemplo de esto sería el nitrógeno, y su incidencia en la C/N inicial, pues si la relación C/N no es adecuada podría afectar el proceso de degradación biológica (Ruggieri y col. 2008; Puyuelo y col. 2011) .

Los cosustratos que se estudiaron fueron: un lodo no digerido de depuradora procedente de la depuradora del Besós (LB) y un compost de la planta de compostaje de Terrassa (CT). Se escogieron estos cosustratos por su abundante generación y por lo tanto disponibilidad y como inóculo para la fermentación por su alto contenido en microorganismos.

Definidos el sustrato y los cosustratos, para estudiar la fermentación se utilizaron bioreactores simulando condiciones adiabáticas. Los reactores utilizados tienen un volumen de 4.5 L y han sido descritos en el apartado 3.1.1. La fermentación en reactores se realizó durante 8 días y cada reactor contenía 2.5 Kg de la mezcla. La diatomea utilizada durante las fermentaciones fue la caracterizada previamente en la tabla 4.1 (diatomea negra). Las mezclas de fermentación eran Diatomea-Lodo (DLB) y Diatomea Compost (DCT) con un 25% en peso (p/p) de sustrato. Los reactores se denotaron como R1L (Reactor mezcla diatomea-lodo) y R2C (Reactor mezcla diatomea-compost). La humedad de la mezcla fue ajustada al rango comprendido entre 40-60%, recomendado por Haug (1993). Sin embargo, en algunas ocasiones por la hidrofobicidad propia del residuo graso, la mezcla de fermentación quedaba por debajo del rango mencionado y para corregir esta condición se recurría al riego. Para la fermentación se adicionó material estructurante en una proporción 1:1 (v/v). Este agente estructurante, crea una estructura porosa y una distribución homogénea en el interior de la mezcla, permitiendo una difusión eficiente del oxígeno (Gea y col. 2007b). Es importante mencionar que a partir de esta primera prueba todas las mezclas de reactores trabajadas incluyeron material estructurante en la proporción antes mencionada. El material estructurante estaba compuesto por palet de madera triturado de un diámetro de 5mm aproximadamente, que facilitó la porosidad de la mezcla. Las porosidades de las mezclas de lodo y compost de los reactores, fueron de 52.3% y 49.3% respectivamente. La caracterización tanto de los cosustratos y las mezclas usadas para la fermentación se presentan en la tabla 4.2.

Tabla 4.2 Caracterización de los cosustratos y las mezclas usadas en la SSF.

Parámetro	Lodo	Compost	Diatomea	Diatomea +Lodo	Diatomea +Compost
Humedad (%)	81.51	52.11	1.53	38.05	30.25
Materia Orgánica (%b.s)	62.41	67.90	29.79	36.11	40.97
NTK (%b.s)	4.06	1.47	0	0.67	0.48
TOC (%b.s)	49.33	47.96	24.04	31.28	32.09
C/N	12.17	32.63		46.69	66.85
% Grasa	n.a	n.a	22.82	12.90	10.33

n.a: no analizada

Los dos reactores fueron aireados con un caudal inicial de 0.5 L min^{-1} , el cual fue ajustado manualmente y monitorizado durante todo el periodo de fermentación para asegurar condiciones aerobias pero evitando caudales muy elevados para no enfriar el reactor. El comportamiento de cada uno de los reactores, se observa en las figuras 4.1 y 4.2. Las discontinuidades en los gráficos corresponden a los momentos de toma de las muestras.

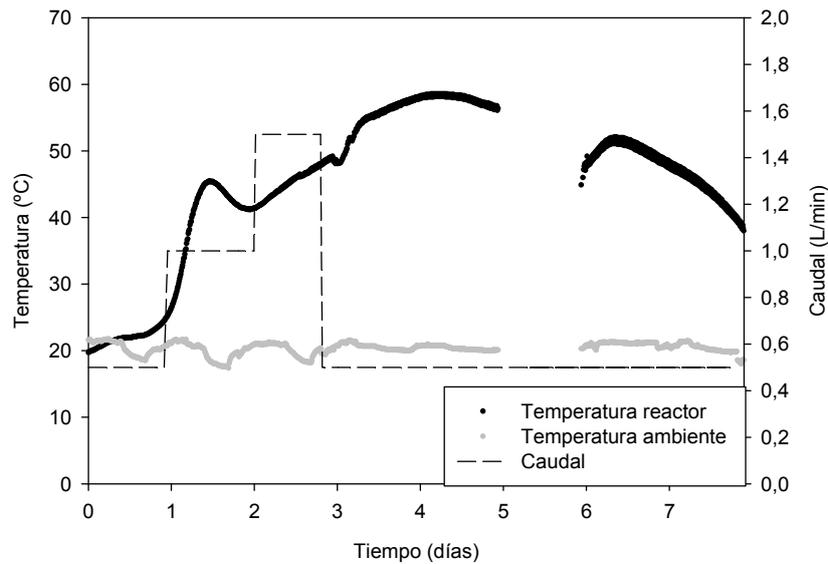


Figura 4.1 Fermentación en el reactor R1L de mezcla diatomea con iodo

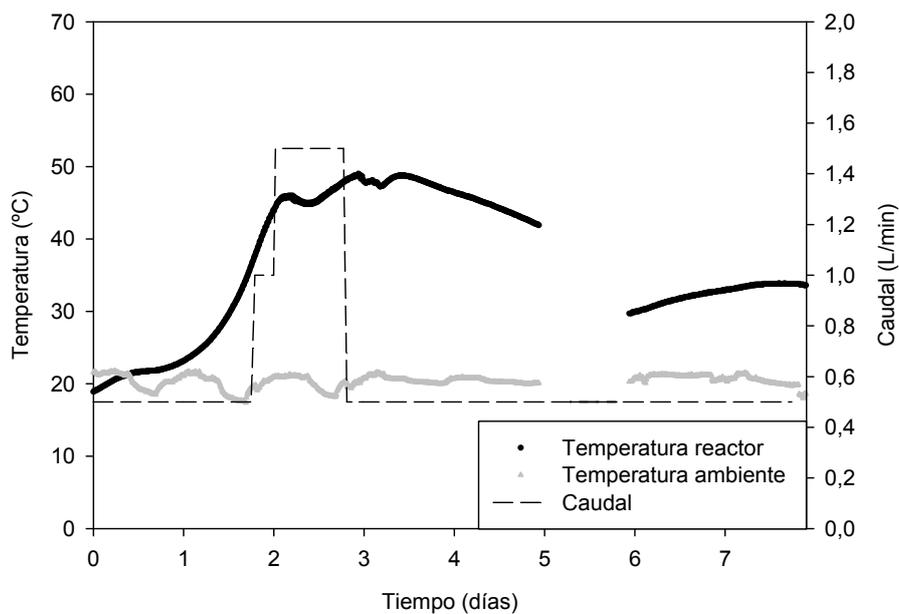


Figura 4.2 Fermentación en el reactor R2C de mezcla diatomea con compost

En el arranque de los dos procesos se observa una fase de latencia que seguramente esté relacionada con la aclimatación de los microorganismos procedentes del compost y el lodo al nuevo sustrato, con un alto contenido en grasa. Es importante señalar que esta fase de latencia es inferior en el caso de la mezcla con lodo, que puede deberse a una mayor variabilidad de microorganismos y mejor adaptación, así como al inicio de degradación de otras formas de materia orgánica más biodegradables que contiene el lodo. La C/N también puede influir, ya que era superior a 35 y podría ralentizar el inicio del proceso. Los dos reactores perfilan su comportamiento hacia el rango termófilo y se observó que el reactor R1L que tenía como cosustrato el lodo, alcanzaba mayores temperaturas y se mantenía en este rango por más tiempo que el reactor R2C. Este comportamiento que mantuvo el R1L más tiempo en termófilo, se debió a la alta actividad biológica durante el proceso por la influencia que tiene la composición bioquímica del lodo (Ruggieri y col. 2008b) que presenta un mayor contenido de nitrógeno que compensa las carencias que puede presentar el residuo graso. Adicionalmente, el lodo presenta mayor cantidad de materia orgánica biodegradable comparada con el compost que es un material estabilizado. La toma de muestra para cada reactor se realizó el día 5, como se observa en la discontinuidad de las figuras 4.1 y 4.2.

La actividad enzimática en el momento del muestreo (día 5 de proceso), reportó que la actividad de la mezcla con lodo, era más alta que la de la mezcla con compost.

Viendo los resultados obtenidos durante la prueba y teniendo en cuenta que la enzima que se pretende producir es una lipasa termoestable, se decidió utilizar como cosustrato el lodo para todas las pruebas.

Ya definidos el sustrato y cosustrato, el siguiente paso era determinar la cantidad de sustrato que debían tener las muestras. En subsiguientes experimentos, se produjeron inconvenientes para la obtención del residuo graso en la planta de tratamiento, entre las que se puede mencionar las diferencias significativas en la composición de la diatomea.

Para asegurar el suministro y la máxima homogeneidad con el tiempo, se decidió contactar con una empresa dedicada al refinado de aceites LIPSA (Lípidos Santiga), que produce cantidades considerables de residuos con alto contenido de aceites, entre otros. LIPSA produce tierras diatomeas de filtración de aceites análogas a las descritas anteriormente. Además, LIPSA produce en gran cantidad el que se conoce como residuo de Winterización (RW). Este residuo consiste en tierras de filtración que se obtienen tras someter el aceite a un enfriamiento rápido hasta 5°C durante 24 h y

una vez se ha realizado este proceso especial de cristalización se eliminan las ceras por filtrado. LIPSA mostró especial interés en encontrar una alternativa de gestión de este residuo de modo que se seleccionó para los siguientes experimentos.

Para tener una idea de la estructura del residuo, en la figura 4.3 se presenta una imagen y en la tabla 4.3 su caracterización (rango de valores obtenidos a lo largo de la realización de esta tesis).



Figura 4.3 Imagen del residuo de winterización

Tabla 4.3 Caracterización del residuo de winterización

Parámetro	Rango
Humedad (%)	0-3
Materia orgánica (% b.s)	67-75
NTK (% b.s)	0
Grasa (% b.s)	49-75
pH	5-7
TOC (%b.s)	37-42

Para la definición de la cantidad de sustrato se realizó una prueba con el residuo suministrado por LIPSA, y el cosustrato previamente seleccionado (Lodo Besós, LB).

Se diseñaron las mezclas para alcanzar un contenido de grasa de 10, 20 y 30%. Se estudiaron hasta un máximo del 30% de contenido de grasa basado en estudios previos. Según estudios previos realizados en el grupo de investigación, es necesario mantener el contenido en grasa por debajo del 30% para lograr un buen rendimiento de biodegradación y evitar elevados tiempo de retención, hecho especialmente importante si se piensa en procesos a gran escala (Gea y col. 2007a).

La tabla 4.4 presenta la caracterización de las mezclas para los tres reactores con las diferentes cantidades de grasa utilizando la nomenclatura R10, R20 y R30, según la cantidad de grasa que contienen.

Tabla 4.4 Caracterización inicial de las mezclas lodo+residuo de winterización (LB:RW) de los reactores R10, R20, R30

Reactor	Humedad (%)	Materia Orgánica (%)	AFP (%)	Proporción mezcla (LB:RW) (p/p)
R10 (10% grasa)	67.27	77.35	68.66	1:0.10
R20 (20% grasa)	60.81	77.51	67.91	1:0.27
R30 (30% grasa)	50.59	76.12	70.21	1:0.60

Como se observa en la tabla 4.4, los valores iniciales de porosidad superan el 60%, del límite superior del rango recomendado. Sin embargo, a pesar de ser elevados, es posible iniciar con estos valores de AFP dada la composición bioquímica y el potencial calorífico de la mezcla tratada (Ruggieri y col. 2008b). La fermentación se llevó a cabo durante 15 días y los reactores contenían 2.5 Kg aproximadamente de mezcla. A la par de la fermentación, como caracterización del potencial inicial de biodegradación de la mezcla, se realizó una respirometría para las diferentes cargas de grasa de los reactores. Con el uso de la respirometría, se obtuvo una medida precisa de la actividad microbiana del material y su potencial de fermentación (Barrena et al, 2006). La respirometría para cada mezcla con los diferentes contenidos de grasa se hizo por duplicado. Los resultados de la pruebas se presentan en la figura 4.4.

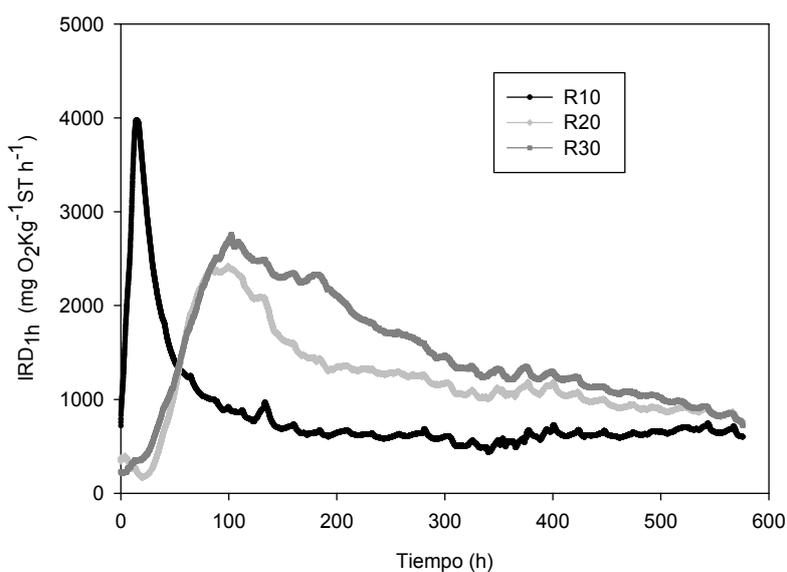


Figura 4.4 IRD para los reactores con cargas de grasa 10%, 20% y 30%

A partir de los resultados del índice respirométrico se pudo concluir que las mezclas eran moderadamente biodegradables. Los índices se encontraban en el rango de 2 a 5 $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ (Ponsá y col. 2010), por lo tanto bajo las condiciones ensayadas las muestras podrían generar unos resultados óptimos en términos de degradación de la materia orgánica. Se observa en la figura 4.4 que las áreas bajo la curva de IRD son más grandes a mayor contenido de grasa lo cual implica mayor consumo de oxígeno. Adicionalmente, es importante mencionar la existencia al inicio de un periodo de latencia en el caso de los reactores R20 y R30, que puede estar asociado a la aclimatación de los microorganismos a la presencia de la grasa. Este comportamiento es análogo al descrito en las primera pruebas de fermentación de tierra diatomea (figuras 4.1 y 4.2).

4.3 Valoración de la SSF

Se llevó a cabo la fermentación en los reactores de 4.5L durante 14 días. Los perfiles de temperatura de los tres reactores monitorizados se muestran en la figura 4.4. El rango termófilo se alcanzó en los tres reactores estudiados y para las mezclas R20 y R30 se mantuvo prácticamente durante casi todo el tiempo de estudio. En cambio para la mezcla R10 se observó una disminución de la temperatura después de 11 días de proceso, que puede estar asociada al agotamiento del sustrato puesto que es la mezcla con menor contenido de grasa.

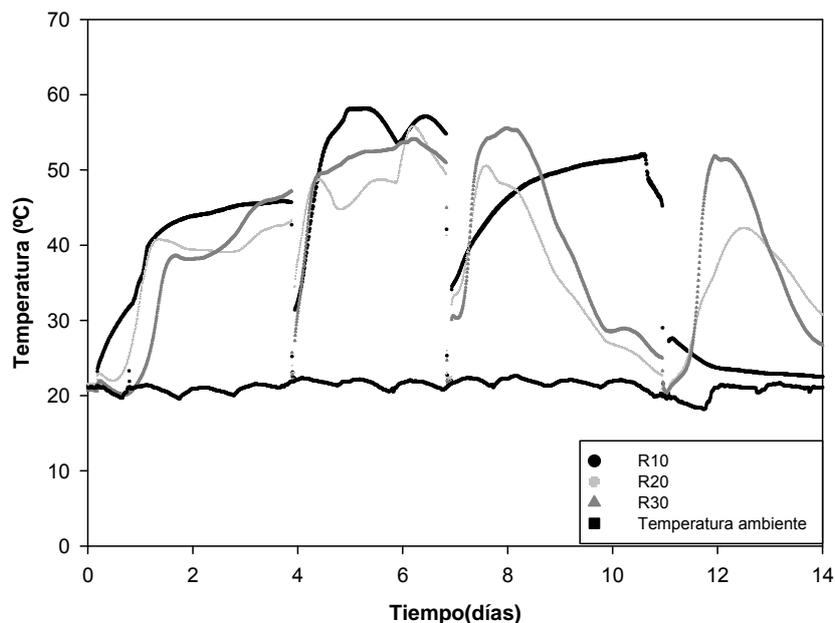


Figura 4.5 Evolución de la temperatura de los reactores R10, R20, R30

Durante el ensayo, se realizaron toma de muestra a los tres reactores, los días 4, 7 y 11.

Es importante señalar que se obtuvieron diferentes tiempos de arranque de proceso (fase de latencia), de la misma forma como se pudo observar cuando se determinaron los índices respirométricos. La fase de latencia fue mayor a mayor contenido en grasa: 5, 17 y 24 horas correspondientes a los reactores R10, R20 y R30 respectivamente.

Se realizó un control manual del contenido en humedad en los reactores R20 y R30 el día 11. Gracias al riego, los porcentajes de humedad del R20 y R30, se ajustaron a un rango adecuado, aumentando un 9 y un 14% respectivamente. Es importante tener en cuenta que si el contenido de humedad no está en los rangos óptimos recomendados por autores como Haug (1993), la actividad microbiológica puede detenerse y si es muy elevado se dan condiciones anóxicas, por el desplazamiento del aire en los espacios libres causado por el agua (Soto y Meléndez 2003).

Una vez el contenido de humedad se llevó al óptimo, hubo una reactivación de la actividad biológica que pudo corroborarse con el ascenso de las temperaturas (figura 4.5).

Durante esta parte del estudio, se pudo ver la utilidad que tiene para el proceso de fermentación el uso de bioreactores, provistos de sistemas de monitoreo y control continuo. Gracias al control de los parámetros, es posible determinar la dinámica que puede tener la matriz fermentada en cuanto a estructura, humedad y disponibilidad de oxígeno.

4.4 Optimización del método de extracción de lipasas

Dentro de los aspectos importantes del desarrollo de una SSF, se encuentra la extracción del producto (Pandey 2003). Para determinar si durante la fermentación se conseguía el objetivo de producir lipasas, se realizó el estudio de la metodología para obtener un extracto rico en enzima, ya que el proceso de extracción además de permitir obtener la enzima, es un paso fundamental en la investigación sobre la caracterización bioquímica de la misma. Para ello, se buscó un sistema de extracción sencillo, rápido y eficiente que no generara acciones tendientes a disminuir o inhibir la actividad de la enzima producida, y que adicionalmente sirviera para ser utilizado en los posteriores estudios de producción. En la literatura se describen diversas metodologías para la extracción y se probaron las mencionadas en la tabla 4.5.

Tabla 4.5 Condiciones de extracción ensayadas

Parámetro	Condición 1	Condición 2
Tampón	Fosfato (100 mM, pH 7.0)	Tris- HCl (100 mM pH 8.0)
Dosis de tampón (mL g ⁻¹)	5	10
Velocidad (rpm)	150	100
Tiempo (min)	30	15
Tensoactivo ¹	sin	con

¹(Quartamin: dosis a probar 1, 2.5 y 5%, Tween 80 al 5%)

En cuanto al tipo de agitación para efectuar la extracción, se llevó por medio de agitación orbital a 37°C, debido a la disponibilidad que se tenía en el laboratorio.

La extracción se realizó después de obtener una muestra representativa del sólido fermentado. A continuación se detalla el análisis de las diferentes condiciones testadas.

4.4.1 Efecto del tampón

El estudio del efecto del tampón sobre la extracción de las lipasas, usando las dos soluciones de extracción mencionadas anteriormente, se presenta en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Uso de dos diferentes tampones para la extracción

Tampón	Actividad en la mezcla (UA ml⁻¹)	
	Diatomea + Compost	Diatomea + Lodo
Fosfato	n.d	n.d
Tris- HCl	0.0236	0.0510
Fosfato + Tampón método ¹	n.d	n.d
Tris HCl + Tampón método ¹	n.d	n.d

¹ Tampón del método colorimétrico descrito en 3.5.1.1. n.d: No determinada, por estar fuera de rango, o por aparición de precipitado. UAml⁻¹: unidades de actividad por mililitro

Repetidamente, en las muestras que se utilizó la solución extractora fosfato, se desarrolló un precipitado, una vez se iba a medir la actividad enzimática por el test colorimétrico definido en el apartado 3.5.1.1. Por tanto se descartó el uso de ésta

solución tampón para la extracción. Los resultados obtenidos en adelante para la extracción son realizados con el tampón Tris-HCl 100 mM pH 8.0.

4.4.2 Efecto del tipo de tensoactivo

Al realizar los experimentos se probó la extracción con y sin la adición de un agente tensoactivo, y se observó que las muestras presentaban actividad sólo en las extracciones que tenían la presencia del tensoactivo. La adición de detergentes durante la extracción estimuló la actividad de la enzima, pues según lo expuesto por Pathak y Sanwal (1998), generan un efecto surfactante que es capaz de romper todo tipo de estructura y como consecuencia extraer mayor cantidad de proteína. Esto se debe a que los detergentes influyen en la actividad lipolítica debido a la similitud con los sustratos naturales de una lipasa, pues tienen la capacidad de formar agregados y pueden influir sobre sus propiedades catalíticas y estructurales (Mogensen y col. 2005).

Se probó la adición de agentes tensoactivos como fue el Quartamin (Solución de cloruro de cetiltrimetilamonio), ó el Tween 80, para determinar cual podría facilitar la extracción de la enzima, pues dependiendo del detergente utilizado varía la interacción detergente-lipasa (Mogensen y col. 2005) y su activación o desactivación puede estar relacionada con la naturaleza y concentración del surfactante (Delorme y col. 2011). En experiencias preliminares usando el Tween 80, no se detectó actividad lipolítica alguna y por tanto se descartó su utilización, mientras que con el Quartamin los resultados eran positivos.

Con lo anterior, se decidió utilizar el Quatarmin como agente tensoactivo para la extracción.

4.4.3 Efecto de la dosis del tampón, dosis de tensoactivo y velocidad de extracción y tiempo de extracción.

En la figura 4.6 se presentan los resultados del estudio del efecto de la dosis tampón-sólido para la extracción. Se observó que la actividad es mayor en un 95% cuando la dosis es de 10 mL g⁻¹, sin tener en cuenta la velocidad en la que se realiza. Por tanto, se descartó la dosis de 5 mL g⁻¹ para realizar la extracción, ya que, se pretendía obtener extracto crudo con la mayor cantidad de actividad enzimática.

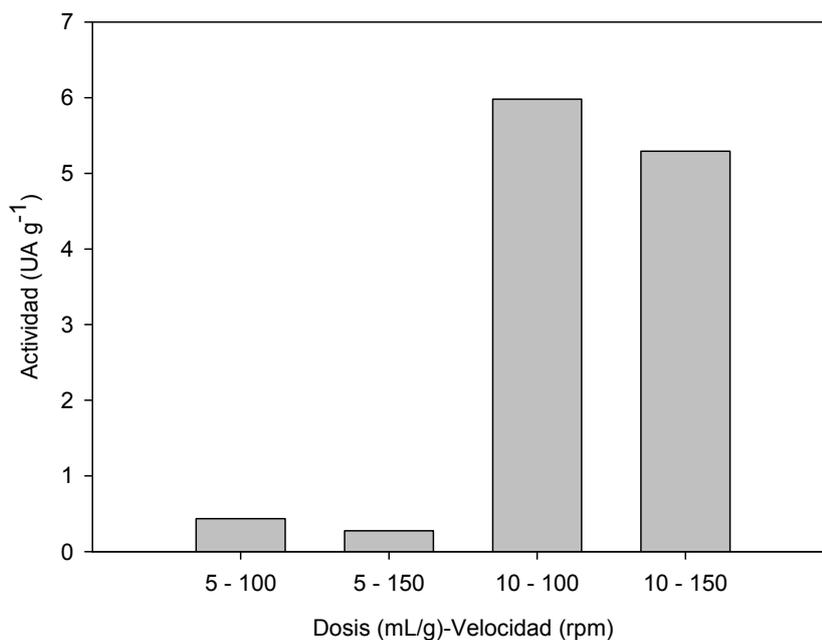


Figura 4.6 Efecto de la dosis

Descartada la dosis de 5 mL g⁻¹, se procedió a determinar el resto de parámetros a partir de muestras con dosis de 10 mL g⁻¹.

Los resultados obtenidos para el efecto producido por la dosis del tensoactivo, se observan en la figura 4.7.

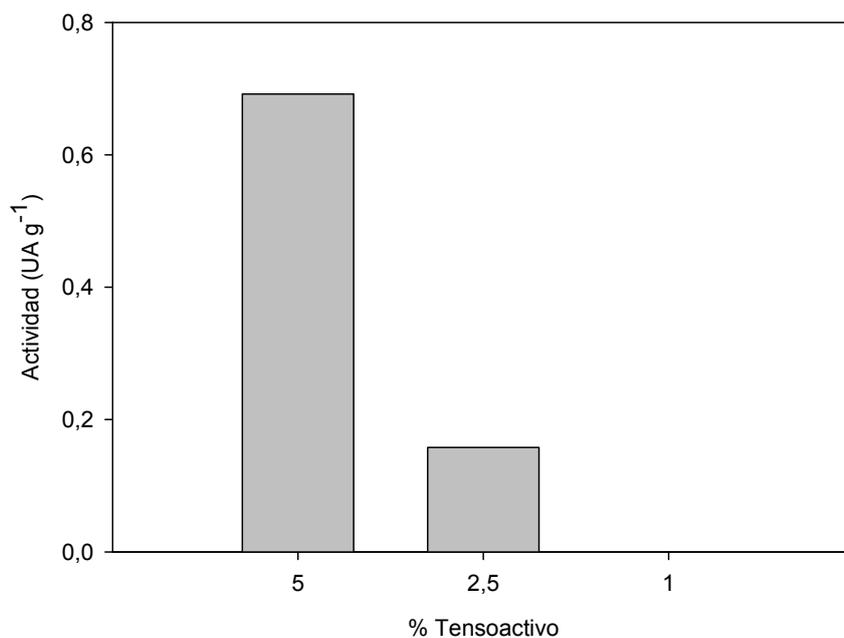


Figura 4.7 Efecto del tensoactivo

Los tensoactivos afectan en gran medida la actividad y la inhibición de las enzimas (Delorme y col. 2011), sin embargo el efecto varía dependiendo de la enzima y el tensoactivo utilizado (Aloulou y col. 2007). Como se mencionó previamente, el tensoactivo utilizado en este trabajo fue el Quartamin; se pudo observar un ascenso en la actividad cuando se incrementó la concentración del tensoactivo en la muestra. En la figura 4.7, se observa que la dosis más alta utilizada (5%) reportó mayor contenido de actividad lipolítica. Esto posiblemente es debido a que los tensoactivos catiónicos como el Quartamin, cuando se utilizan en mayores concentraciones, pueden producir cambios conformacionales en las proteínas, que facilitan la accesibilidad al sitio activo dando lugar a la activación de la misma (Delorme y col. 2011).

En lo que se refiere a la velocidad y el tiempo necesario para realizar la extracción, se presentan los resultados en la figura 4.8

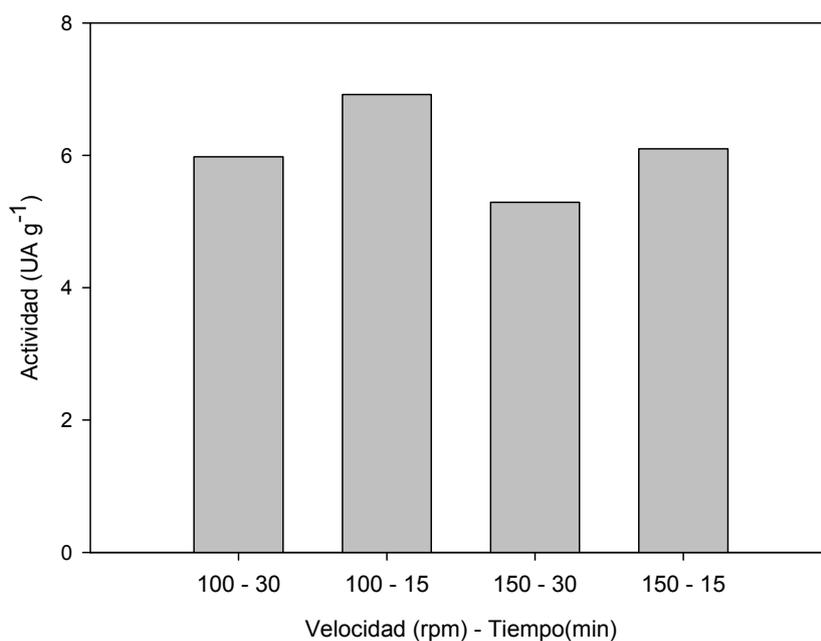


Figura 4.8 Efecto de la velocidad y el tiempo

Si bien, el efecto no es muy claro, la tendencia de la extracción presentó mayores valores de actividad cuando la velocidad es 100 rpm. Los valores de actividad relacionados con el tiempo de extracción no fueron notables cuando ésta se realizó durante 15 min. No obstante al momento de comparar las interacciones entre velocidades y tiempo, los valores de actividades presentaron diferencias de 13.6%

para 100 rpm y 13.2% para 150 rpm. Estas diferencias no son significativas y no dieron claridad en las condiciones a elegir, por tanto se realizó una nueva prueba para esta optimización.

En la nueva prueba, se mantuvo la dosis del tensoactivo (5%), pues ya había sido optimizado. Se incluyó una variante en cuanto al valor de la dosis del tampón, pues en vista de los resultados obtenidos con las dosis de 5 y 10 mL g⁻¹ aún no se tenía la certeza que se había logrado extraer toda la enzima, para ello se probó una nueva dosis de 15 mL g⁻¹. La velocidad y el tiempo de extracción continuaron siendo las previamente estudiadas. La información que se derivó de las pruebas de las diferentes condiciones se presenta en la tabla 4.7.

Tabla 4.7 Actividad lipolítica extraída bajo las diferentes condiciones testadas utilizando un 5% de Quartamin

Muestra	Dosis (mL g⁻¹)	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	Actividad (UA g⁻¹MH)
1	10	150	30	6.1
2	10	150	30	6.0
3	15	150	30	9.0
4	15	150	30	9.8
5	15	100	30	12.0
6	15	100	30	8.6
7	15	100	15	7.8
8	15	100	15	8.8

A partir de los datos reportados en la tabla 4.7 se obtuvieron las condiciones de extracción óptima en relación con la máxima actividad lipolítica. Sin embargo se hace necesario optimizar el límite de rango estudiado y abordar un estudio más sistemático a través de un diseño experimental como se explicará en el siguiente capítulo y así poder establecer con claridad la dosis y la cantidad de tensoactivo más adecuadas. La

figura 4.9 nos presenta el esquema de extracción definido hasta esta etapa del estudio.

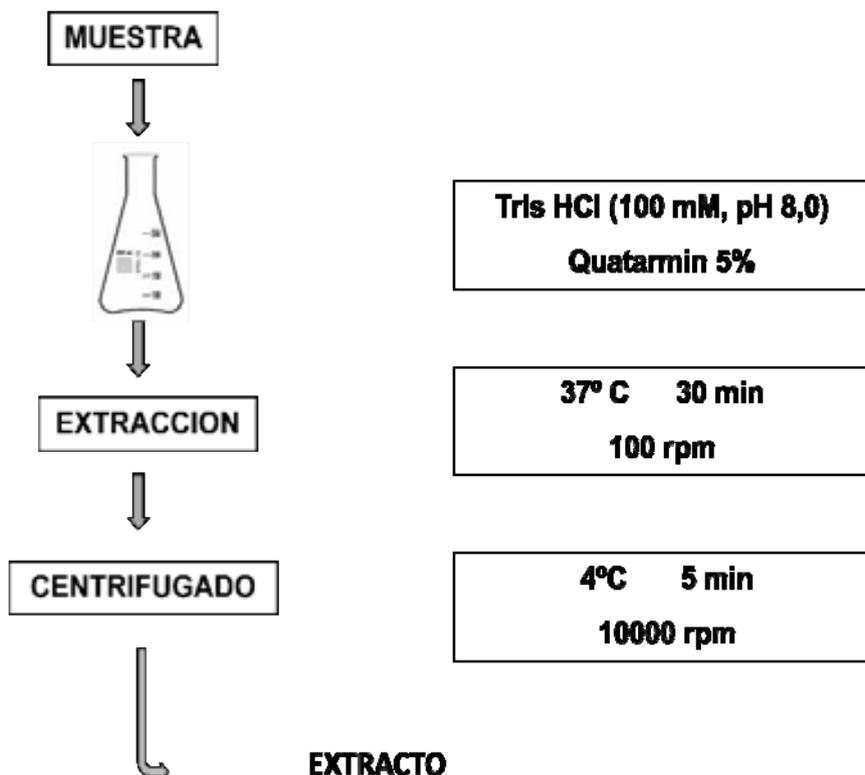


Figura 4.9 Esquema de extracción

4.5 Extracciones enzimáticas a diferentes tiempos

Definido el método de extracción, y retomando los resultados provenientes de las diferentes dosis, aun no se tenía la certeza si por medio de la extracción se lograba extraer la totalidad de la enzima. Para comprobarlo se efectuaron dos extracciones sucesivas de las muestras de los reactores R10, R20 y R30. Los resultados de la prueba se presentan en la tabla 4.8

Tabla 4.8 Actividad lipolítica en extracciones sucesivas

Reactor	Actividad del Extracto (UA g ⁻¹)	
	1°	2°
R10	4.2±0.4	9.4±0.2
R20	3.7±0.7	12.3±0.8
R30	1.1±0.4	5.9±0.1

Se observa que en todos los casos la actividad detectada en el segundo extracto es superior a la del primer extracto. Para explicar este comportamiento se plantean dos

hipótesis. Por una parte es posible que la segunda extracción de enzima se vea favorecida tras el lavado de otros compuestos solubles con la primera extracción. Por otra, se podría pensar que el resultado obtenido tras la segunda extracción corresponda a lipasa intracelular que los microorganismos excretan al medio en condiciones de agitación que favorece la disponibilidad de grasa.

Para determinar la manera de extraer la enzima en su totalidad y verificar el rendimiento de la extracción, se realizó un nuevo ensayo. En este ensayo, para comprobar la extracción total de la enzima, se adicionó azida sódica al 10% p/p inhibiendo el desarrollo de los microorganismos excretores de enzimas: Adicionalmente, se realizaron sobre una misma muestra ensayos sucesivos de extracción a diferentes tiempos. Los tiempos de ensayo fueron: 30 min, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 77.5 y 96 horas.

La figura 4.10 permite observar las extracciones sucesivas, en muestras con azida sódica (CA) y muestras sin azida (S).

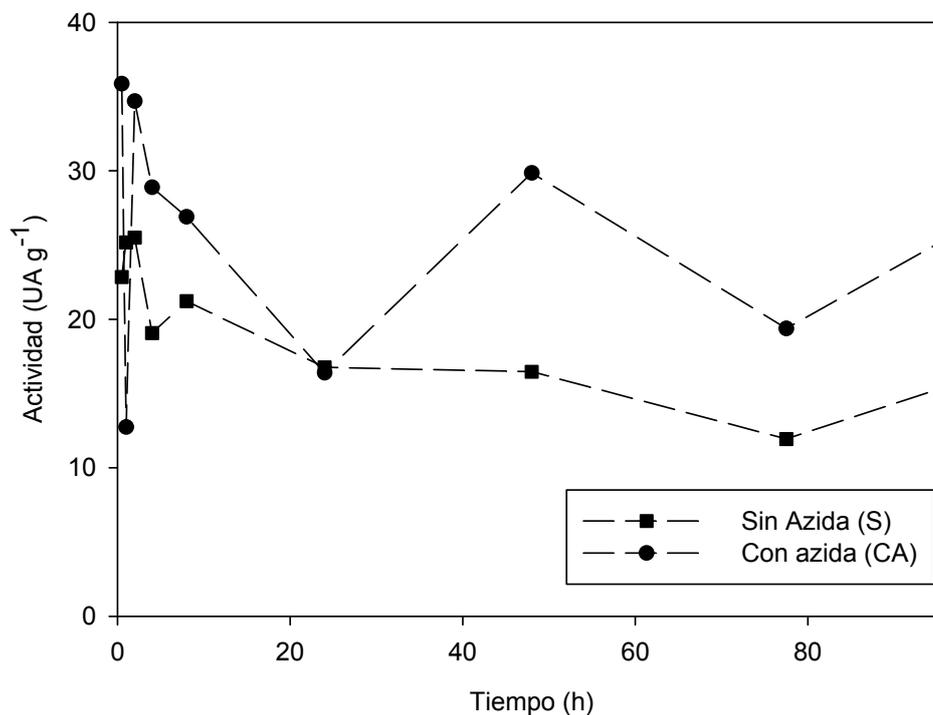


Figura 4.10 Efecto de la adición de azida sódica en la actividad

Se observa que al inicio, la muestra sin azida(S) incrementó su actividad, pero al momento de llegar a las 4 horas presentó disminución de la actividad que se extendió a lo largo del tiempo. Se esperaría que en la muestra sin azida(S), aumentara la actividad con el tiempo de incubación, hasta el punto donde la transformación del

sustrato disminuyera. Pero la tendencia observada fue diferente a lo esperado y este comportamiento podría ser indicio de la inactivación de la enzima. Por otra parte, la muestra con azida (CA) durante la primera hora desciende su actividad, pero a partir de las 2 horas y hasta el final de la prueba su actividad se incrementa, por encima de la muestra que no contiene el biocida.

El adicionar la azida a las muestras no descarta que sea posible extraer toda la actividad en una extracción. Al contrario, se ha observado que para algunas enzimas, el uso de biocidas como la azida sódica hace que la actividad experimente un notable incremento respecto al control (Giménez 1984). Mientras que para algunos microorganismos la azida inhibe su desarrollo para otros no. El fenómeno se puede dar en el caso en que el biocida sea utilizado por algunas clases de microorganismos como fuente de nutrición y la proliferación microbiana conduzca a un aumento de la actividad enzimática extracelular.

En vista que con la extracción en el tiempo aún se seguía obteniendo actividad, se procedió a estudiar la actividad lipolítica intracelular.

4.6 Determinación de la actividad lipolítica intracelular

Para verificar que la totalidad de la enzima se había extraído, se ensayó la desintegración de la membrana celular por medio de sonicación. Para ello se hace necesaria la definición de un protocolo que garantice un buen control de la sonicación, para conseguir una liberación sin problemas de todos los productos intracelulares. Se probó la realización de la sonicación, teniendo en cuenta los ensayos descritos por autores como Nabarlatz y col. (2010).

Inicialmente se experimentó realizando dos lavados previos a la sonicación en muestras con y sin azida. El tiempo de sonicación fue de 5 min. Los resultados de este ensayo se presentan en la tabla 4.9

Tabla 4.9 Actividad lipolítica intracelular con sonicación de 5 min

Lavados	Muestra sin azida (UA g⁻¹)	Muestra con azida (UA g⁻¹)
1	15.5 ± 0.1	25.4 ± 1.0
2	30.7 ± 2.2	33.9 ± 1.4
Sonicación (5 min)	10.6 ± 0.5	9.6 ± 0.8

Realizado el ensayo, la actividad obtenida tras la sonicación es baja comparada con la obtenida en los lavados previos. Sin embargo, no se tiene la certeza que la enzima

haya sido liberada totalmente al medio. Se practicó un nuevo ensayo, con sonicación a diferentes tiempos, lavados previos y sin contar con la adición de la azida sódica.

El esquema del ensayo se presenta en la figura 4.11

MUESTRA		1	2	3
				
1ª Extracción				
2ª Extracción				
Sonicación	Dosis	5 mL g ⁻¹	5 mL g ⁻¹	-
	Tiempo Sonicación	1 min	5 min	0 min
	Actividad Lipolítica	Intracelular	Intracelular	-
3ª Extracción	Dosis	10 mLg ⁻¹	10 mLg ⁻¹	15 mLg ⁻¹
	Actividad Lipolítica esperad	Intracelular	Intracelular	Extracelular

Figura 4.11 Esquema del ensayo de sonicación a diferentes tiempos

Los resultados de la prueba de sonicación obtenidos, para determinar la actividad intracelular se presentan en la tabla 4.10.

Tabla 4.10 Actividad lipolítica intracelular a diferentes tiempos de sonicación

Extracciones / sonicaciones	Actividad de las muestras (UA g ⁻¹)		
	1	2	3
	Sonicación 1min	Sonicación 5 min	Sin sonicar
Extracción 1	9.3± 0.8	11.6± 0.9	9.3± 0.2
Extracción 2	13.1± 0.9	16.3± 0.3	15.0± 1.2
Sonicación	5.2± 0.0	5.2± 0.0	
Extracción 3	11.9± 0.3	13.1± 1.0	14.3± 0.2

Como se puede observar en la tabla 4.10, después de realizada la sonicación, no se consiguen mayores rendimientos en cuanto a la actividad obtenida en la extracción 3 y tampoco existe diferencia en cuanto al tiempo de sonicación. Además, si se compara la extracción 3 de las muestras 1 y 2, con la de la muestra sin sonicar, las diferencias observadas tampoco parecen significativamente diferentes. Adicionalmente, la extracción después de la sonicación volvió a evidenciar que la enzima aún no había sido completamente extraída.

En vista que la sonicación tampoco despejó la duda acerca de la extracción total de la enzima, se procedió a realizar un nuevo ensayo. En este nuevo ensayo se determinó el rendimiento de la actividad a partir de extracciones sucesivas.

4.7 Extracciones sucesivas

Para la prueba de extracciones sucesivas se partía de la dosis definida en los anteriores experimentos (15 mL g^{-1}) hasta alcanzar el punto donde no se detectara actividad. Esta información se comparó con los rendimientos de extracciones individuales a 3 dosis distintas de tampón ($15, 45$ y 90 mL g^{-1}).

La figura 4.12 presenta los resultados obtenidos durante la prueba en el caso de las extracciones sucesivas para verificar el rendimiento.

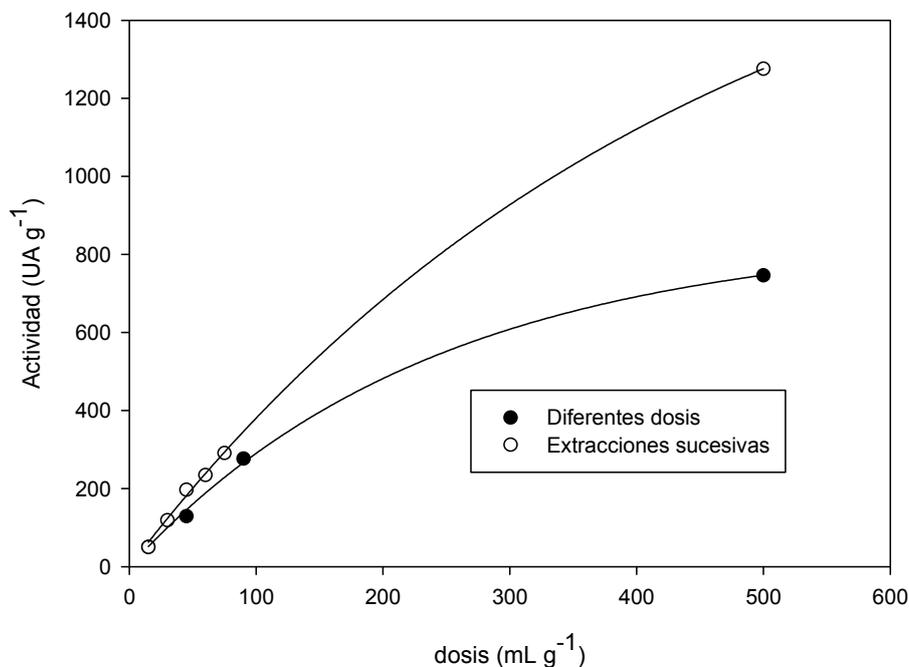


Figura 4.12 Modelos exponenciales de las extracciones: a la izquierda extracciones individuales a diferentes dosis y extracciones sucesivas

Como se ha observado en la figura 4.12, si se compara las extracciones individuales con las sucesivas, es notable el incremento en la actividad a medida que se efectuaron los diferentes lavados a la dosis de 15 mL g^{-1} . Una hipótesis que se pueden plantear para explicar esta situación, está relacionada con la remoción de compuestos solubles presentes en el caldo de extracción que impiden la exposición al medio de la enzima.

La figura 4.12 presenta el modelo de decaimiento exponencial aplicado a la actividad extraída obedece a la ecuación 4.1,

$$A(d) = A_0 \times (1 - e^{-kd}) \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

donde

$A(d)$: Actividad en función de la dosis UA g^{-1})

A_0 : Actividad inicial (UA g^{-1})

K : constante

d : valor de la dosis (mL g^{-1})

La tabla 4.11 presenta las máximas actividades obtenidas de la aplicación del modelo ajuste y las respectivas bondades.

Tabla 4.11 Valor de la actividad acumulada máxima obtenida con el ajuste

Extracción	Actividad ($\text{UA g}^{-1}_{\text{max}}$)	R^2
Individual	854	0.998
Sucesivas	1912	0.989

Al observar los resultados obtenidos del ajuste, las dosis a emplear para obtener las actividades máximas tendrían que ser muy grandes. Esto conllevaría a que la extracción fuera inviable por el elevado coste en tiempo y en recursos para hacerla.

Los resultados de este capítulo muestran que el método de extracción empleando tensoactivos no es completamente eficiente y se necesita una nueva alternativa para poder aprovechar al máximo la lipasa producida. Por tanto, se decidió medir la actividad en la muestra sólida y valorar la acción de utilizar el sólido fermentado como biocatalizador inmovilizado como lo propone Hernández-Rodríguez y col. (2009a)

4.8 Resumen

En el capítulo se estudió la optimización de la fermentación, dado que es importante elegir las variables que pueden incidir sobre el microorganismo y el proceso, y que por ende ayudarán a maximizar la velocidad de formación y rendimiento del producto.

Se definieron el sustrato y cosustrato que tendrían un efecto sinérgico para la producción de lipasas termoestables en SSF.

El uso del cosustrato ayuda al desarrollo de la fermentación, por el aporte de nutrientes que se encontraban ausentes o en baja concentración en el sustrato, el cual es un material con alto contenido en grasa. Como cosustrato se eligió un lodo no digerido de depuradora.

La fermentación se llevó en reactores provistos de sistemas de monitoreo y control continuo, los cuales fueron aireados para asegurar condiciones aerobias

Para definir la cantidad de material que se fermentaría se probaron mezclas hasta con un máximo del 30% de contenido de grasa.

Se estableció una metodología para la extracción del producto, puesto que el objetivo de además de obtener un extracto rico en enzima, era buscar un sistema de extracción sencillo, rápido y eficiente que no generara acciones tendientes a disminuir o inhibir la actividad de la enzima producida. Para ello se probaron diferentes parámetros que definirían las condiciones de ensayo, estos se basaron en metodologías obtenidas de la revisión bibliográfica. Los parámetros que se estudiaron fueron el tipo de tampón, la dosis de tampón, la velocidad y tiempo de extracción y la adición y dosis de agentes surfactantes.

Una vez definido el método de extracción, y después de probar diferentes dosis, no se tenía la certeza si por medio de la extracción se lograba extraer la totalidad de la enzima. En consecuencia, para verificar el rendimiento de la extracción y comprobar que se extraían todas las enzimas, se adicionó un biocida para inhibir el desarrollo de los microorganismos excretores de enzimas.

También se probaron sonicaciones para la extracción de la actividad lipolítica intracelular, y se evidenció que la enzima aún no había sido completamente extraída.

Adicionalmente, se comprobó el rendimiento de la actividad a partir de extracciones sucesivas hasta alcanzar el punto donde no se detectara actividad.

CAPÍTULO 5.

5. ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS OBTENIDAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DE PRODUCCIÓN Y REFINADO DE ACEITES VEGETALES.

Los resultados que se presentan en este capítulo están publicados como: Santis-Navarro, A., Gea, T., Barrena, R., Sánchez, A., 2011. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. *Bioresource Technology* 102, 10080–10084.

5.1 Introducción

En este capítulo se presenta un estudio detallado de la fermentación en estado sólido del residuo de winterización con lodo como cosustrato para la producción de lipasas y la caracterización preliminar de la misma.

Los residuos sólidos de la industria de producción de aceites vegetales se han utilizado ampliamente en fermentaciones sólidas para la producción de enzimas industriales, antibióticos, bioplaguicidas, vitaminas y otras sustancias bioquímicas, ya que son excelentes sustratos para el crecimiento microbiano, pues suministran los nutrientes esenciales para el desarrollo de ellos (Ramachandran y col. 2007). Adicionalmente, este tipo de residuos son abundantes en países productores de aceites vegetales como son los mediterráneos.

Estudios previos realizados por (Colla y col. 2010), comparan estadísticamente la producción de lipasa en SmF y SSF, observando que con la fermentación en estado sólido las productividades de la lipasa son mayores que en la fermentación líquida.

La caracterización de una lipasa puede determinar su idoneidad para el uso en diferentes entornos e industrias. Los parámetros fisicoquímicos influyen en el rendimiento de la lipasa, por lo cual, deben ser optimizados para obtener buenos rendimientos de las enzimas a través de técnicas estadísticas entre las que se pueden mencionar RSM, ANOVA y EVOP. Estas técnicas han sido investigadas por varios autores para lograr producciones rentables y altos rendimientos de lipasa (Açikel y col. 2010; Kumar y col. 2011). El rendimiento de las enzimas extracelulares está significativamente influido por las condiciones fisicoquímicas. El efecto de varios factores como el pH, la temperatura, el efecto de iones metálicos, disolventes

orgánicos, detergentes/tensoactivos y otros inhibidores, pueden potenciar o suprimir la actividad y estabilidad de la lipasa tanto cruda como purificada.

El objetivo principal de este capítulo es la producción de lipasas simulando condiciones adiabáticas reales de procesos a gran escala, optimizar la extracción, caracterizar la lipasa obtenida y así poder evaluar el uso de sólidos fermentados como biocatalizadores.

5.2. Caracterización inicial.

Para la producción de lipasas por SSF se utilizaron como sustrato el residuo de winterización (RW) proporcionado por la industria de refinación de aceites vegetales LIPSA (Lípidos Santiga S.A., Barcelona), y como cosustrato el lodo centrifugado (LB) proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales del Besos (Metrofang).

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en reactores Dewar de 4.5L ubicados en el montaje de la PP2, conteniendo cada uno 2.5 kg de la mezcla de fermentación con un contenido del 20% de grasa. Los reactores fueron denotados como R1, R2, R3. Las proporciones de los componentes de la mezcla para los tres reactores fueron 1:0.2 (p/p) de LB: RW. Adicionalmente, se añadió a la mezcla LB y RW, palet triturado como agente estructurante en una relación de 1:1 (v/v), con el fin de proporcionar porosidad adecuada para mantener las condiciones aeróbicas.

La humedad de la mezcla se ajustó en un rango entre 40 y 60%, según lo recomendado por Haug (1993), para ello se añadió agua antes de comenzar el proceso de fermentación.

El contenido de oxígeno en los gases de salida, se midió diariamente con un detector de oxígeno. Conforme a estas lecturas la velocidad de flujo de aireación y la frecuencia se ajustaron manualmente para asegurar condiciones aeróbicas (contenido de oxígeno por encima del 10-12%). Las principales características de la mezcla se detallan en la tabla 5.1

Tabla 5.1 Características de la mezcla inicial

Parámetro	Humedad	Materia seca (%)	Materia Orgánica (%b.s)	Grasa (%b.s)
Mezcla de fermentación	49.9	50.1	79.6	19.7

b.s= base seca

5.3 Experimentos SSF en reactores de 4.5 litros

Los experimentos de SSF se llevaron a cabo durante 35 días, y se recogieron muestras los días, 6, 14, 27 y 35. Como se había mencionado previamente, se hicieron replicados de la mezcla de fermentación y los reactores fueron denominados como R1, R2, R3. En el día 6, cuando los reactores habían alcanzado el rango termófilo, se hizo muestreo y se desmontó uno de los reactores (R2). Las otras dos réplicas continuaron el proceso, sin embargo una de ellas, presentó problemas en el sistema de aireación y por tanto no subió la temperatura en el reactor (R3). La réplica (R1) que continuó la fermentación sin problemas, estuvo en condiciones termófilas durante 20 días como se pudo observar en la figura 5.1. La presencia de esta larga fase termófila se atribuyó al elevado potencial energético que hay en las grasas (Gea y col. 2007a).

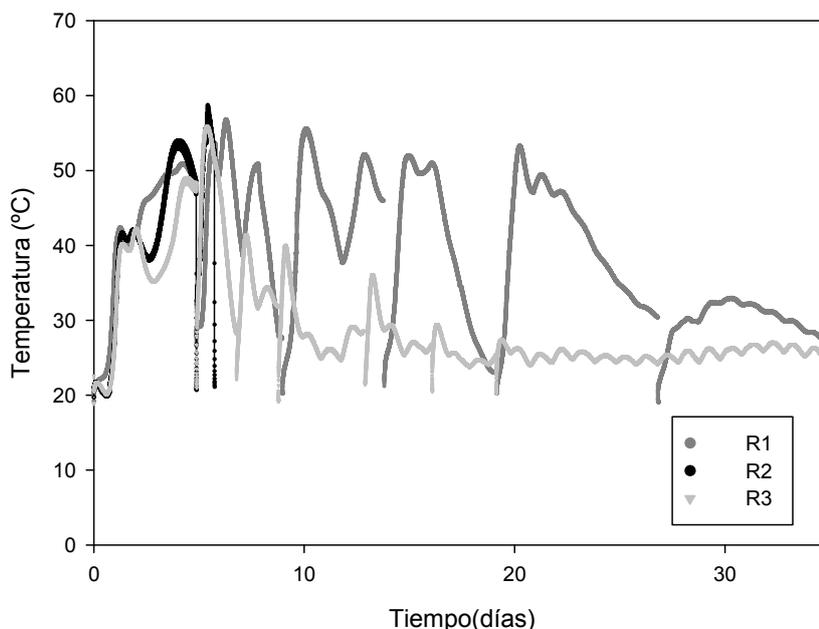


Figura 5.1 Evolución de la temperatura de los triplicados en la fermentación de la mezcla residuo de winterización y lodo fresco

Durante cada toma de muestra, el contenido del reactor se mezcló bien con el fin de obtener muestras homogéneas y representativas.

Es importante señalar que durante algunos días de la fermentación, los reactores fueron homogenizados y se les adicionó agua. La razón de esta adición, obedeció a que durante el proceso se dio la evaporación de agua y la desecación del sustrato como resultado de la aeración forzada aplicada al reactor. También se debe tener en

cuenta el tipo de residuo que constituía la muestra, el cual se caracteriza por ser un residuo hidrofóbico, que tiende a repeler o eliminar el agua. La desecación del sustrato puede contribuir a una baja presencia de agua y por ende una actividad microbiana pobre (Weber y col. 2002).

En lo que se refiere a la homogenización efectuada, el haberla realizado de manera intermitente pudo dar un equilibrio entre el efecto perjudicial del mezclado sobre las hifas del hongo que crece en la mezcla, es así que cuando se tiene bajos contenidos de humedad y presencia de grasas, se hace necesario la agitación por el crecimiento incontrolado de hongos filamentosos. Si no se realiza la homogenización los hongos acarrearían taponamientos en los poros de la matriz alterando el proceso (Ruggieri 2008). La evolución del contenido de grasa y la humedad del reactor R1, se observan en la tabla 5.2.

Tabla 5.2 Contenido de humedad y grasa durante la SSF del reactor R1

Día	Humedad (%)	Contenido grasa (% b.s)
0	50	20
6	40	16
14	36	5
27	49	6
35	49	5

Los valores de la degradación de lípidos durante toda la fermentación fueron del 75%, similares a los reportados por Baeta-Hall y col. (2005). Adicionalmente, se observó una reducción importante en el contenido de grasa en los primeros 15 días; después de ese momento no ocurrió una degradación significativa de la grasa, resultando al final de la fermentación un contenido de grasa de alrededor de 5%, que podía corresponder a material lipídico difícil de biodegradar (Gea y col. 2007a).

5.4 Optimización de la extracción de la enzima y actividad lipolítica de los extractos

En cada muestreo, una vez la masa entera del reactor SSF era homogenizada se tomaron 150 g para realizar todas las analíticas necesarias para el seguimiento.

En el capítulo anterior se presenta un estudio preliminar de las condiciones de extracción más favorables. Para confirmar las observaciones realizadas y teniendo en cuenta las posibles interacciones entre las variables estudiadas, se decidió realizar un estudio sistemático mediante la metodología del diseño de experimentos. Para ello se ensayaron diferentes dosis de tampón y agente tensoactivo, mediante un diseño experimental factorial completo aplicado en las cuatro muestras de proceso obtenidas en el reactor R1. Éste, consistió en 15 experimentos (12 experimentos y tres repeticiones en el punto central para la validación estadística). Las dosis que se probaron para la relación tampón/sustrato sólido fueron: 15, 90, 200 y 500 mL g⁻¹ y los porcentajes de tensoactivo en el extracto acuoso fueron del 2%, 6% y 10% (v/v). Se utilizaron dos gramos de la muestra fermentada para cada condición del diseño experimental.

La extracción se realizó como se describió en la figura 4.8 del capítulo 4. Es importante, señalar que antes de cada extracción la muestra se lavó con tampón Tris-HCl (15 mL g⁻¹) sin agente tensoactivo para eliminar los compuestos solubles. Previamente se comprobó que en este primer lavado no se detectó actividad lipolítica.

Los resultados de la extracción, obtenidos con las diferentes condiciones especificadas en el diseño experimental, fueron ajustados a diferentes modelos matemáticos. Se partió de una expresión polinómica lineal y se fueron añadiendo términos cuadráticos y de interacción, mientras se observaba la evolución del coeficiente de regresión hasta que se alcanzara un valor donde las diferencias en la bondad del ajuste fueran mínimas (López y col. 2004). Para la optimización de la función polinómica propuesta, y poder obtener las condiciones óptimas de la extracción, se maximizó la función obtenida utilizando la herramienta Solver de Excel. La prueba estadística que se usó fue el análisis de la varianza (ANOVA).

Para las cuatro muestras analizadas, el mejor ajuste a partir del diseño experimental fue una función polinómica de segundo orden de acuerdo a las ecuaciones 5.1-5.4:

$$Y_6 = 0.0217 + 0.0181x_1 - 0.0063x_2 - 0.0004x_1^2 - 0.0016x_2^2 - 0.0059x_1x_2 \text{ (Ecuación 5.1)}$$

$$Y_{14} = 0.7398 + 0.6284x_1 - 0.2027x_2 - 0.0340x_1^2 - 0.0522x_2^2 - 0.1808x_1x_2 \text{ (Ecuación 5.2)}$$

$$Y_{27} = 0.0317 + 0.0293x_1 - 0.0090x_2 + 0.0007x_1^2 - 0.0016x_2^2 - 0.0085x_1x_2 \text{ (Ecuación 5.3)}$$

$$Y_{35} = 0.0172 + 0.0159x_1 - 0.0047x_2 + 0.0004x_1^2 - 0.0010x_2^2 - 0.0043x_1x_2 \text{ (Ecuación 5.4)}$$

Donde: Y representa la fracción de la actividad lipolítica obtenida sobre la actividad total extractable (función objetivo); x_1 es la dosis tampón (mg L⁻¹) y x_2 es el porcentaje de tensoactivo añadido (%). Tanto x_1 y x_2 son valores normalizados. La actividad total

extraíble se estimó mediante extracciones sucesivas a partir de una muestra sólida hasta que no se detectó ninguna actividad. La figura 5.2 muestra la superficie de respuesta obtenida de las ecuaciones anteriores para las cuatro muestras consideradas (obsérvese que la escala en el eje vertical es diferente en cada caso).

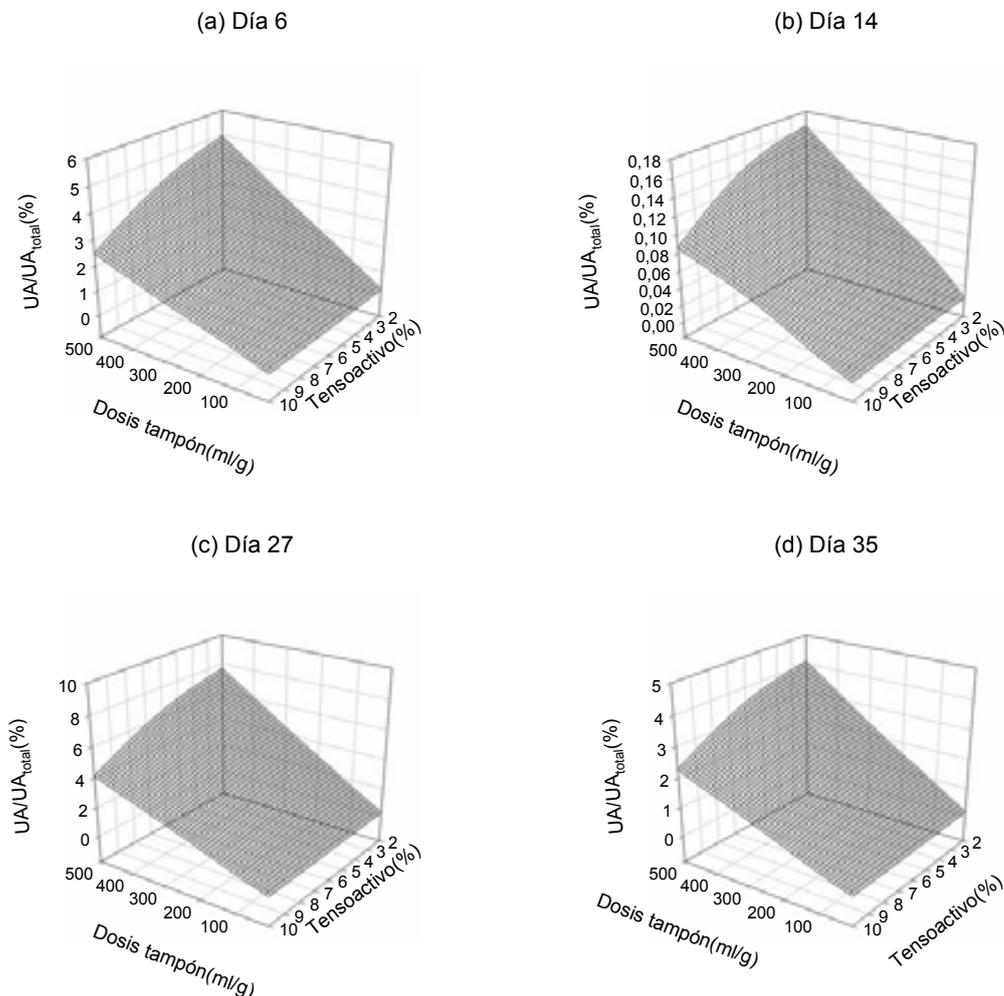


Figura 5.2 Superficie de respuesta correspondiente a la fracción actividad lipolítica extraída de diferentes dosis de agente tampón y agente tensoactivo para muestras obtenidas en (a) día 6, (b) día 14, (c) día 27, (d) día 35

De la figura 5.2 y el coeficiente de los valores encontrados en las ecuaciones 5.1-5.4, se puede concluir que la dosis de tampón tiene un efecto positivo sobre el rendimiento de extracción de la enzima, mientras que el efecto opuesto se observó para la fracción de agente tensoactivo (signo de x_1 y x_2 en los coeficientes polinómicos). El efecto de la dosis de tampón en el rendimiento de la extracción fue más importante que la dosis de tensoactivo, como se indica por el valor del coeficiente de x_1 , que es aproximadamente tres veces mayor que el de x_2 .

Los valores óptimos para la extracción fueron de 500 mL g⁻¹ de dosis de tampón y 2% de tensoactivo.

La tabla 5.3 nos muestra la actividad extraíble total y la actividad del extracto en condiciones optimizadas.

Tabla 5.3 Actividad extraíble total y en condiciones optimizadas

Día	Actividad extraíble total		Actividad enzimática en extracto a condiciones optimizadas	
	UA _{total} g ⁻¹	UA _{total} g ⁻¹ MS	UA g ⁻¹	UA UA _{total} ⁻¹ (%)
6	1051	1752	52.0	5.0
14	31550	49113	51.3	0.2
27	698	1371	53.4	7.7
35	1259	2478	51.5	4.1

Como se muestra en la tabla 5.3, sólo se recuperaron pequeños porcentajes de actividad incluso en condiciones optimizadas. Además, el valor de actividad detectado para los diferentes días de proceso es parecido, independientemente de la actividad extraíble total, lo que podría indicar cierta saturación del extracto. Sin embargo, se decidió no extender el intervalo de estudio porque el uso de dosis superiores a 500 ml g⁻¹ no sería económicamente viable a escala industrial.

Los valores de actividad estuvieron alrededor de 50 UA g⁻¹ en condiciones de extracción óptimas, y por tanto implica que se encuentran en el rango inferior de los valores reportados en la literatura (Hernández-Rodríguez y col. 2009). Sin embargo, la actividad extraíble total estaba en el rango superior y el valor para la muestra del día 14 fue mayor que los reportados previamente. La actividad lipolítica mostró un valor máximo el día 14, coincidiendo con el período máximo de degradación de grasa (tabla 5.2). Después de 13 días, la actividad disminuyó considerablemente (día 27), y esto se atribuyó al consumo total de grasas biodegradables (Gea y col. 2007a).

5.5 Actividad lipolítica en sólidos fermentados

Como se mencionó en el capítulo anterior, debido a que el método de extracción no era completamente eficiente, se decidió medir la actividad lipolítica directamente en el sólido, para evitar los problemas con la extracción de las lipasas, y pensando en las

posibilidades de aplicar directamente el sólido con la enzima inmovilizada. El método empleado se describe en el apartado 3.5.1.2, y dicho método se aplicó para determinar la actividad de las muestras sólidas tanto húmedas como secadas mediante aireación forzada. Para obtener las muestras secas mediante aireación forzada, se tomó aproximadamente 1 g de muestra y esta fue sometida a un proceso de secado durante 24 horas con el aire comprimido suministrado por la red a un caudal de 0.5 L min^{-1} . Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5.4.

Tabla 5.4 Actividad enzimática en muestras sólidas

Día	Actividad enzimática en muestras sólidas	
	Húmeda (UA g ⁻¹ MS)	Secada con aireación forzada (UA g ⁻¹ MS)
6	25.56	5.58
14	28.98	7.81
27	21.10	41.41
35	10.78	40.12

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la actividad lipolítica en las muestras húmedas y secas con aireación forzada. Las muestras húmedas obtenidas al comienzo del proceso mostraron mayor actividad que las muestras húmedas tomadas en tiempo posteriores, mientras que se observó un comportamiento contrario para las muestras secas.

Los niveles de actividad lipolítica obtenidos a partir de sólidos fermentados se encuentran dentro de los rangos reportados en SSF, sin embargo es importante tener en cuenta al comparar resultados con otros trabajos publicados que normalmente la actividad de la enzima se obtiene con una cepa pura, mientras que en este trabajo los consorcios microbianos utilizados probablemente han producido una mezcla de diferentes lipasas con potencial de catálisis diferente. Adicionalmente, las unidades de actividad lipolítica notificadas en la literatura se obtienen con métodos muy diversos, y con frecuencia no son directamente comparables.

Si bien la actividad de los extractos acuosos fue mayor que la actividad en las muestras sólidas, es necesario tener varios aspectos en cuenta en la elección del método de análisis. Por una parte, queda claro que la extracción de la lipasa no es sencilla, puede resultar muy costosa y además no es eficiente. Por otra, el método en sólido no presenta un valor muy elevado en comparación con el líquido, aunque no son estrictamente comparables, resultaría más ventajoso utilizar directamente el sólido como biocatalizador en los procesos donde sean aplicables este tipo de lipasas. De este forma, y viendo el potencial de la actividad extraíble total con la extracción líquida, se utilizaría la mayor cantidad de lipasa producida.

5.6 Características de las lipasas. Estabilidad y peso molecular

Para la caracterización de las lipasas, se determinaron los efectos del pH y la temperatura en la estabilidad de la enzima. Al igual que en la optimización de la extracción, se analizó mediante un diseño experimental de 15 experimentos (12 experimentos y tres repeticiones en el punto central para la validación estadística). Las temperaturas se fijaron en 30, 45, 60 y 75° C y el pH a 5.0, 7.0 y 9.0. La función objetivo que se usó fue la actividad lipolítica residual (RA), se refirió a la actividad inicial de los extractos después de una hora de incubación. Los tampones usados para la incubación de los pH seleccionados fueron: Tris-HCl 1 M, pH 9.0; Tris-HCl 1 M, pH 7.0; ácido acético-acetato de sodio 1 M, pH 5.0. Las incubaciones de las muestras se llevaron a cabo en baños fijados a las diferentes temperaturas del diseño experimental.

El mejor ajuste para la actividad residual experimental, se obtuvo para un modelo de segundo orden polinomial, para las cuatro muestras analizadas. Las ecuaciones obtenidas en este caso fueron:

$$RA_6 = 0.0940 + 0.2700T + 0.0735pH - 0.2357T^2 - 0.0695pH^2 - 0.0339TpH \quad (\text{Ecuación 5.5})$$

$$RA_{14} = 1.0015 + 0.3408T + 0.0965pH - 0.3299T^2 - 0.0942pH^2 - 0.0554TpH \quad (\text{Ecuación 5.6})$$

$$RA_{27} = 0.9070 + 0.3063T + 0.0925pH - 0.2709T^2 - 0.0189pH^2 - 0.0518TpH \quad (\text{Ecuación 5.7})$$

$$RA_{35} = 0.9579 + 0.2078T + 0.0968pH - 0.2657T^2 - 0.0838pH^2 + 0.0192TpH \quad (\text{Ecuación 5.8})$$

Para estas ecuaciones los coeficientes de regresión (R^2) de RA_6 , RA_{14} , RA_{27} , RA_{35} y fueron 0.87, 0.80, 0.86 y 0.77, respectivamente. En general, se observó que había una buena correlación sin diferencias estadísticamente significativas, entre el valor estimado y el valor real de acuerdo con la prueba F del diseño experimental. La figura 5.3 muestra la superficie de respuesta obtenida para las ecuaciones 5.5-5.8.

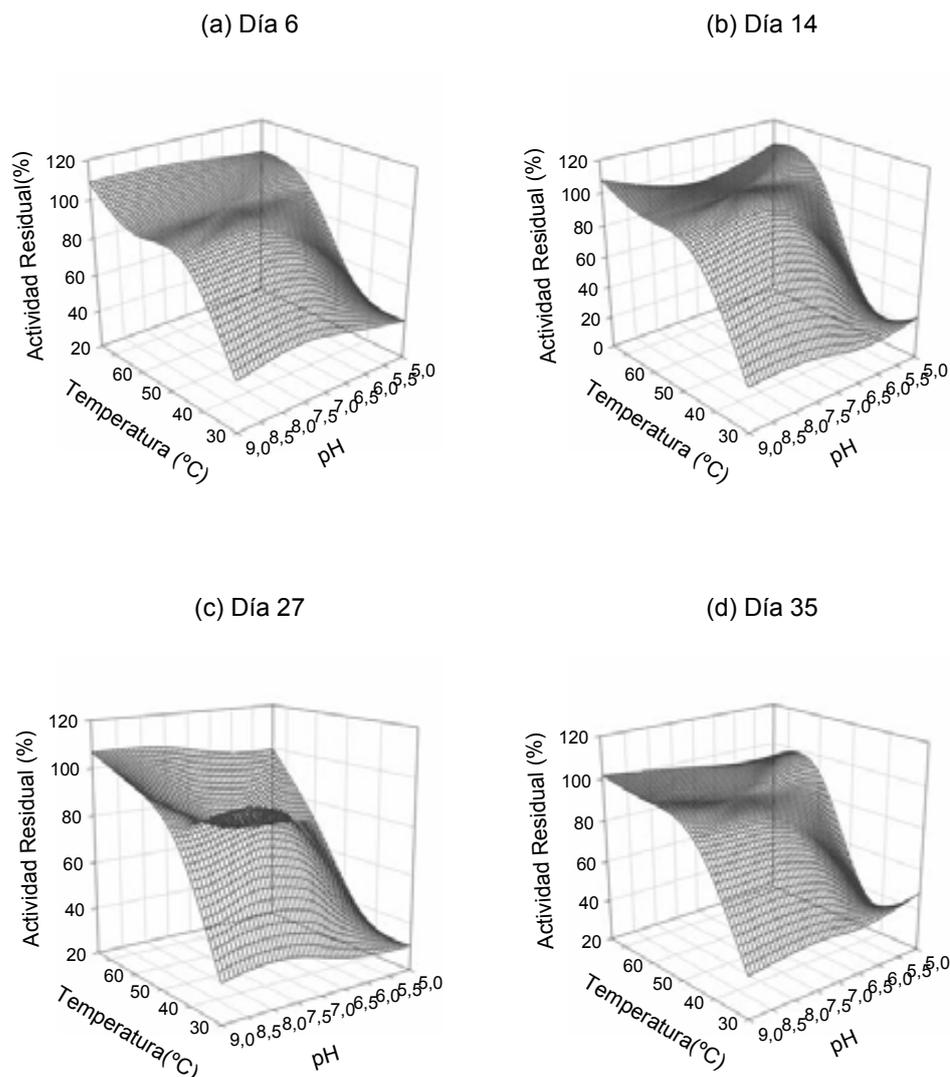


Figura 5.3 Superficie de respuesta correspondiente a la estabilidad de la lipasas para diferentes pH y temperaturas de las muestras obtenidas en (a) día 6, (b) día 14, (c) día 27, (d) día 35.

La actividad lipolítica fue más sensible a la temperatura (T) que al pH. Sin embargo el signo positivo en el valor del pH en la ecuación indica que también afecta la actividad de manera positiva aunque en menor proporción (los valores de los coeficientes de la T son más altos que los de pH). Los coeficientes indican que valores altos de T y pH tienen un efecto positivo sobre la actividad residual. La actividad lipolítica (figura 5.3) fue notablemente estimulada por la temperatura en el rango termofílico que indica una reactivación de la lipasa.

Para las cuatro muestras analizadas, la estabilidad óptima se observó a temperaturas en el rango termofílico (61-65 ° C) y el pH alcalino (7.7-9.0).

Adicionalmente a la prueba de estabilidad de las enzimas, se realizó la electroforesis con geles de poliacrilamida para poder determinar el peso molecular de la lipasa. Para

ello se comparaba la lipasa obtenida con proteínas con peso molecular conocido que sirvieron de referencia. La técnica utilizada fue la electroforesis desnaturizante, donde por medio de la aplicación de calor se hizo perder la estructura tridimensional de la enzima y con ello se facilitó su separación.

Previo a la realización de la electroforesis, se comprobó si las muestras tenían actividad lipolítica, y luego se procedió a analizar las muestras en el gel. Una vez realizada la electroforesis se realizaron las tinciones de los geles con Coomassie y con plata.

Desafortunadamente, no se pudo lograr la identificación del peso molecular de la enzima, pues cuando se introducían las muestras, éstas no permanecían dentro del pocillo del gel. Adicionalmente, las que permanecían dentro del pocillo, no mostraban ninguna señal en el gel. Al observar esta situación se pensó que la presencia del tensoactivo impedía la entrada de la enzima al gel. Sin embargo, para comprobar esta hipótesis se realizó una prueba con una lipasa comercial añadiendo y sin añadir Quatarmin. En la figura 5.4, se presenta la imagen del gel empleado en la prueba de la electroforesis con la lipasa comercial.



Figura 5.4 Imagen del gel teñido con plata para la prueba con lipasa comercial y adición del detergente

En el carril marcado con el número uno, se ha pinchado el marcador de peso molecular. En el número dos se pudo observar la banda de la lipasa comercial diluida en tampón Tris-HCl pH 8.0, en el carril tres se diluyó la lipasa comercial en el detergente y no se observa ninguna banda. En el carril cuatro la lipasa se diluyó en la

lipasas en la solución tampón Tris-HCl + detergente, y se observa una banda leve, la cual es menos intensa que la del carril número dos. Una vez terminada la prueba, se pudo comprobar la hipótesis planteada, y se intentará buscar en futuras investigaciones una forma de lograr la identificación de la enzima como podría ser a través de técnicas de cromatografía líquida (FPLC).

5.7 Resumen

Durante el capítulo se realizó un estudio de la producción de lipasas en procesos de SSF, se optimizó la extracción y se caracterizó el producto obtenido.

La fermentación se llevó a cabo por triplicado, y se analizaron los parámetros de: temperatura, humedad y contenido de grasa. La máxima degradación de grasa observada fue del 75%, correspondiente a los primeros quince días de proceso. Durante cada obtención de muestra, se realizó una homogenización del reactor y en algunas ocasiones se adicionó agua al mismo; debido a que se presentó evaporación de agua y desecación del sustrato. Esto último se debió a la aeración forzada aplicada durante la digestión, además por la naturaleza hidrófoba del residuo que tiende a repeler o eliminar el agua.

Se realizó la optimización de las condiciones más favorables de extracción por medio de un diseño experimental factorial, donde se estudió la dosis de tampón y del agente tensoactivo. Los resultados de la extracción se ajustaron a una función polinómica de segundo orden, donde se obtuvieron valores óptimos para la extracción de 500 mL g⁻¹ de dosis de tampón y 2% de tensoactivo.

La actividad lipolítica mostró un valor máximo el día 14, coincidiendo con el período máximo de degradación de grasa. Si bien, el método de extracción no era completamente eficiente, se decidió medir la actividad lipolítica directamente en el sólido. La medida de actividad se probó en muestras sólidas, tanto húmedas como secadas mediante aireación forzada.

Los niveles de actividad lipolítica obtenidos a partir de sólidos fermentados se encuentran dentro de los rangos reportados en SSF, para actividad de enzimas obtenidas con cepas puras. Si bien es cierto, que el método en sólido no presenta un valor muy elevado en comparación con el líquido, estos valores no son estrictamente comparables debido a la naturaleza de cada una. Se observó que resultaría más ventajoso utilizar directamente el sólido como biocatalizador en los procesos donde sean aplicables este tipo de lipasas.

En la caracterización de las lipasas, se analizaron los efectos del pH y de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima a través del diseño experimental. Para las cuatro muestras analizadas, la estabilidad óptima se observó en temperaturas bajo el rango termofílico (61-65 ° C) y el pH alcalino (7.7-9.0).

Finalmente, se realizó la electroforesis con geles de poliacrilamida para poder determinar el peso molecular de la lipasa obtenida. No obstante, no se pudo lograr su identificación por problemas al introducir las muestras en el gel.

CAPÍTULO 6.

6. ESTUDIO DE LA CONSISTENCIA DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO EN REACTORES DE 4.5 LITROS

6.1 Introducción

En los capítulos previos se han determinado algunos aspectos que son importantes para la fermentación y la producción de la lipasa. En concreto, se han determinado aspectos tales como el sustrato y cosustrato, la definición de cantidad de sustrato en la mezcla, la técnica de extracción, la medida de la actividad enzimática y la caracterización del producto obtenido. Es trascendental ahondar un poco más en lo que concierne a fermentaciones en reactores de 4.5 litros y a su repetitividad.

Conocer los valores de algunos parámetros como la velocidad de degradación de la mezcla de fermentación, el pH, la cantidad de grasa, entre otros, permitirá tener una idea de la reproducibilidad de las fermentaciones, pues se tendrá información de la evolución y de los fenómenos que se llevan a cabo durante el proceso fermentativo, con lo que se facilitará el control del mismo y permitirá determinar la viabilidad del proceso con miras al escalado.

El objetivo principal de este capítulo es estudiar la reproducibilidad de las fermentaciones en reactores de 4.5 litros, y así obtener la información que podrá ser usada como referencia para futuras fermentaciones.

Se han analizado en profundidad las diferentes fermentaciones realizadas durante el trabajo experimental de esta tesis con el objetivo de estudiar su repetitividad y validar su uso en la producción de enzimas lipolíticas.

6.2. Reproducibilidad de las fermentaciones en reducción de peso, materia seca, materia orgánica, grasa y pH.

Es importante analizar el comportamiento de las diferentes variables durante la fermentación, ya que estas pueden determinar si el proceso fermentativo se lleva a cabo de la manera que se necesita para la formación del producto buscado. En la tabla 6.1 se muestran los rangos de valores para los diferentes materiales utilizados en las fermentaciones. Como se puede observar, existe cierta variabilidad en los parámetros determinados que son inherentes a la naturaleza de los residuos utilizados.

Tabla 6.1 Caracterización de los materiales para las mezclas de fermentaciones

Parámetro	Lodo	Residuo Winterización
Humedad (%)	67-72	0-3
Materia Orgánica (% b.s)	74-84	67-75
NTK (% b.s)	1-4	0
Grasas (%b.s)	13-16	34-75

b.s= base seca

Las mezclas se realizaron teniendo en cuenta las propiedades de los residuos en cada fermentación independientemente con el objetivo de tener aproximadamente el mismo contenido en grasa. Las proporciones de las mezclas (LB:RW) con un 20% de grasa, y las fermentaciones realizadas se resumen en la tabla 6.2.

Tabla 6.2 Fermentaciones realizadas y proporción en peso de las respectivas mezclas lodo+residuo de winterización (LB:RW)

Fermentación y reactor	Cantidad de grasa en la mezcla	Proporción mezcla (LB:RW)
F1R1	10%	1:0.10
F1R2	20%	1:0.27
F1R3	30%	1:0.60
F2R1	10%	1:0.08
F2R2	20%	1:0.22
F3R1 / F3R2 / F3R3	20%	1:0.20
F4R1 / F4R2	20%	1:0.10
F5R1 / F5R2	20%	1:0.19
F6R1 / F6R2 / F6R3	20%	1:0.18
F7R1	20%	1:0.48

F=Fermentación R= N° de reactor

Al observar las proporciones de las fermentaciones con el mismo contenido de grasa, se encontraron algunas variaciones que obedecieron a la heterogeneidad de los materiales que conforman la mezcla de partida. Estas variaciones en los residuos de partida podrían estar sujetas a problemas en los procesos de los emisores del residuo o la época del año, entre otras.

Las reducciones en peso para las fermentaciones F3, F6 y F7, se presentan en la tabla 6.3.

Tabla 6.3 Reducción en peso (%) de las SSF en reactores de 4.5L

Día de proceso	F3	F6	F7
7	18.3±2.6	8.7±2.0	21.6
15	29.9±0.5	17.5±6.0	29.6
21	37.5±4.2	25.1±5.3	41.2
28	38.8	30.6±6.7	52.6
35	49.4	34.3±6.9	
44		38.4±5.4	

De dicho grupo de fermentaciones, se destaca la reducción en la F7 del 53% de la masa total para un periodo de fermentación de 28 días. Adicionalmente, se observa que para todas las fermentaciones se produce el mismo comportamiento en lo referido a una reducción importante en el peso durante los primeros 15 días.

La información que se encuentra en la tabla 6.4 nos permite afirmar que la mayor degradación se realiza en los primeros quince días de proceso, y a partir de allí hasta el final del proceso los valores en la reducción empiezan a disminuir lentamente, lo que podría ser signo del agotamiento del material a biodegradar por los microorganismos.

Tabla 6.4 Degradación de la materia seca (%) en F3, F6, F7

Día de proceso	F3	F6	F7
7	9.8 ±4.3	33.0 ±2.0	35.8
15	21.3± 16.3	35.9 ±7.6	49.8
21	32.3 ±0.3	42.9 ±7.3	54.0
28	37.8	41.9 ±6.4	62.7
35	48.7	43.5 ±2.7	
44		45.7 ±3.5	

En cuanto a la reducción en la materia orgánica, los datos se presentan en la tabla 6.5.

Tabla 6.5 Degradación de la materia orgánica en F4, F6, F7

Día de proceso	F6	F7
7	37.4 ±3.0	38.5
15	40.9 ±7.0	49.8
21	48.1 ±5.4	53.5
28	49.2 ±6.8	62.7
35	50.8 ±5.3	
44	51.0 ±3.4	

Las temperaturas termófilas alcanzadas durante la fermentación gracias al contenido energético del sustrato tratado permiten visualizar la degradación por parte de los microorganismos. El rango de la materia orgánica a la finalización de las fermentaciones se encontró entre un 51 y un 63%, partiendo de una mezcla inicial con un contenido del 84%. Es importante resaltar que la concentración inicial del sustrato puede condicionar el crecimiento de la microbiota que formará el producto de la fermentación.

Debido a las variaciones procedentes del material de partida, se escogió un modelo para facilitar la comprensión de la cinética del proceso de fermentación.

Se propuso un modelo cinético considerando dos fracciones de materia para cada caso (materia seca, orgánica y grasa): una fracción “inerte” o no degradable en las condiciones de proceso; y una fracción degradable que seguiría una cinética de primer orden. La ecuación 6.1 muestra la expresión correspondiente:

$$W = W_i + W_{D0}e^{-k_D t} \quad (\text{Ecuación 6.1})$$

Dónde:

W: Gramos de mezcla fermentada, en materia seca (materia orgánica ó grasa)

W_i : Gramos de fracción inerte en la mezcla inicial, en materia seca (materia orgánica ó grasa)

W_{D0} : Gramos de fracción degradable en la mezcla inicial, en materia seca (materia orgánica ó grasa)

k_D : constante cinética de degradación (días^{-1})

t: tiempo (días)

Las fracciones de materia inerte y degradable se calcularon respectivamente dividiendo W_i y W_{D0} entre la masa total inicial.

Una vez obtenidos los parámetros cinéticos, se pudo estimar una velocidad inicial de degradación de la fracción degradable r_D (gramos día^{-1}) a partir del producto de W_{D0} y su constante cinética k_D siguiendo el modelo de primer orden de la ecuación 6.2.

$$r_{D0} = k_D \cdot W_{D0} \quad (\text{Ecuación 6.2})$$

Las figuras 6.1 y 6.2 presentan el ajuste cinético a la reducción en materia seca y materia húmeda para las fermentaciones F6 y F7. Los datos del ajuste se presentan en la tabla 6.6.

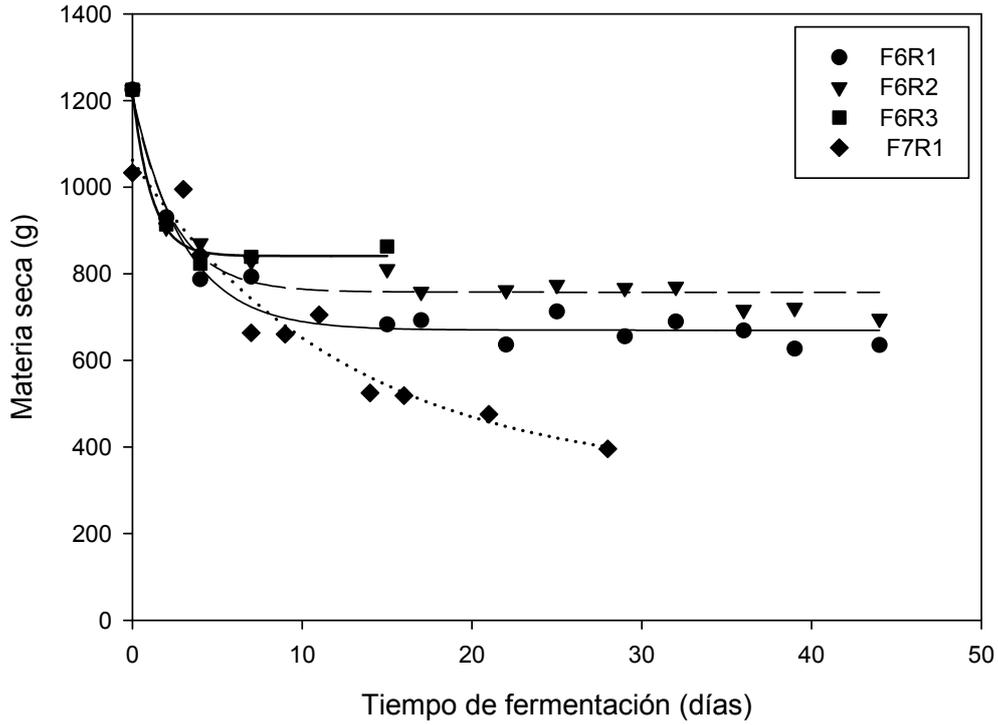


Figura 6.1 Ajuste de la reducción del peso en materia seca para las fermentaciones F6 y F7

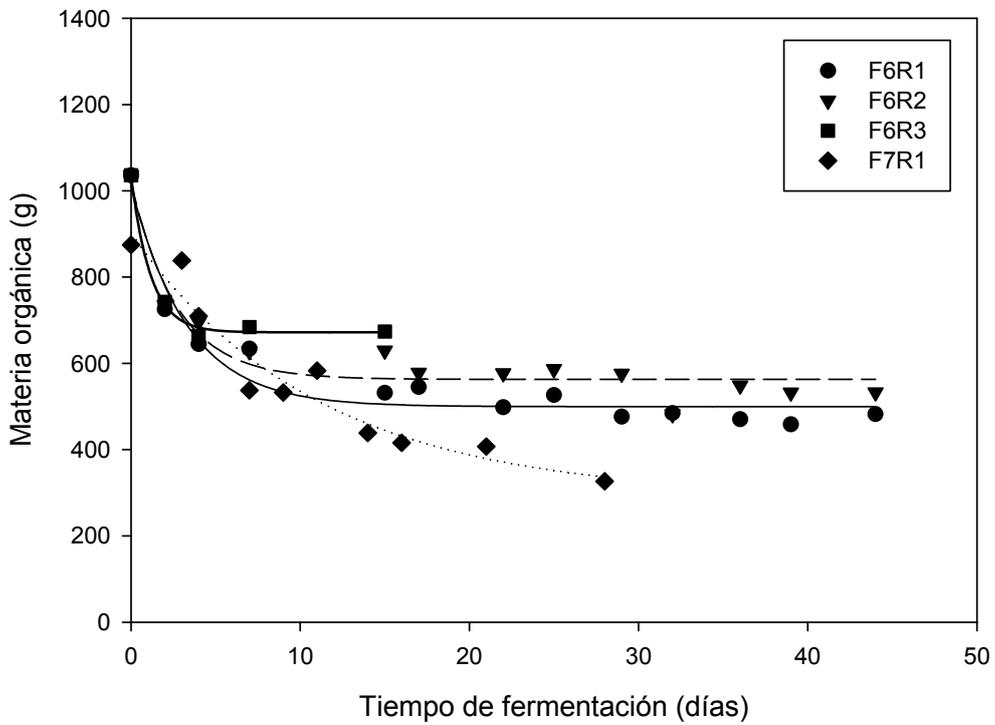


Figura 6.2 Ajuste de la reducción del peso en materia orgánica para las fermentaciones F6 y F7

Tabla 6.6 Parámetros cinéticos y bondad del ajuste para la degradación de la materia seca en las fermentaciones F6 y F7

Fermentación	Fracción inerte	Fracción degradable	Constante cinética k_D (días ⁻¹)	Velocidad inicial r_{D0} *	R ²
Materia seca					
F6R1	55%	45%	0.3307	0.148	0.9599
F6R2	62%	38%	0.4217	0.158	0.9312
F6R3	69%	31%	0.9003	0.283	0.9874
F7R1	30%	70%	0.0812	0.056	0.9435
Materia Orgánica					
F6R1	49%	51%	0.3018	0.153	0.9488
F6R2	55%	45%	0.3673	0.165	0.9242
F6R3	65%	35%	0.8657	0.304	0.9944
F7R1	32%	68%	0.0913	0.062	0.935

* r_{D0} se expresa en g MS_D g⁻¹MS d⁻¹ y en g MO_D g⁻¹ MO d⁻¹.

La figura 6.3 y la tabla 6.7 muestran el ajuste cinético y los parámetros obtenidos para la reducción en materia seca y contenido en grasa de la fermentación F3R1.

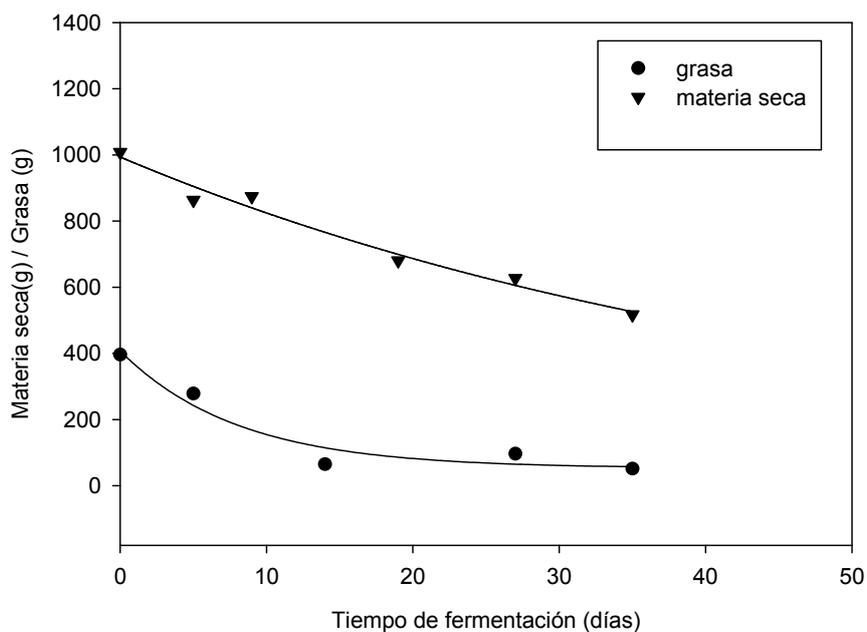


Figura 6.3 Ajuste de la reducción del peso en materia seca y grasa para la fermentación F3R1.

Tabla 6.7 Parámetros cinéticos y bondad del ajuste para la degradación de la materia seca y grasa en la fermentación F3R1

Fermentación	Fracción inerte	Fracción degradable	Constante cinética k_D (días ⁻¹)	Velocidad inicial r_{D0} *	R ²
<i>Materia seca</i>	8%	92%	0.0204	0.019	0.9759
<i>Grasa</i>	13%	87%	0.1249	0.109	0.9475

* r_{D0} se expresa en $g\ MS_D\ g^{-1}MS\ d^{-1}$ y en $g\ grasa\ degradable\ g^{-1}\ grasa\ d^{-1}$.

Según la evaluación de los valores de fermentación, la reducción en el contenido de grasa durante la fermentación fue de un 75%, y corresponde a una velocidad de degradación de 0.10 días⁻¹. Adicionalmente, si se observa la figura 6.3, la mayor reducción del contenido de grasa, se dio durante los primeros quince días de proceso. Se observa que el punto final donde no se degrada más grasa corresponde al momento donde las temperaturas del reactor están en el descenso indicando que el proceso se está terminando y además puede corresponder a una fracción recalcitrante de sustancias lipídicas difíciles de degradar presente en el lodo (Gea y col. 2007a).

En fermentaciones en estado sólido, el pH es una variable difícil de controlar, pues no hay instrumentos que puedan medir y corregir el pH durante el proceso fermentativo (Manpreet y col. 2005). Para las fermentaciones realizadas el pH inicial se ubicó entre 6.0 y 7.3, mientras que al final de las fermentaciones se encontró en el rango de 6.9 a 8.5 (figura 6.4). Se observa en una de las fermentaciones que el pH arranca con un valor de 7.3 y sufre fluctuaciones durante todo el proceso hasta que se estabiliza al final en un pH 7.0. Las caídas observadas que representan acidificación del medio en la curva de evolución del pH, se pueden atribuir a la producción de ácidos, especialmente de cadena larga como el oleico, presentes en el sustrato fermentado. Es importante tener en cuenta que además de parámetros como la humedad y la temperatura, los valores del pH pueden dar indicios de la evolución del proceso, ya que valores extremos de éste pueden condicionar la presencia de la microbiota, y la cinética del proceso (Barrena 2006).

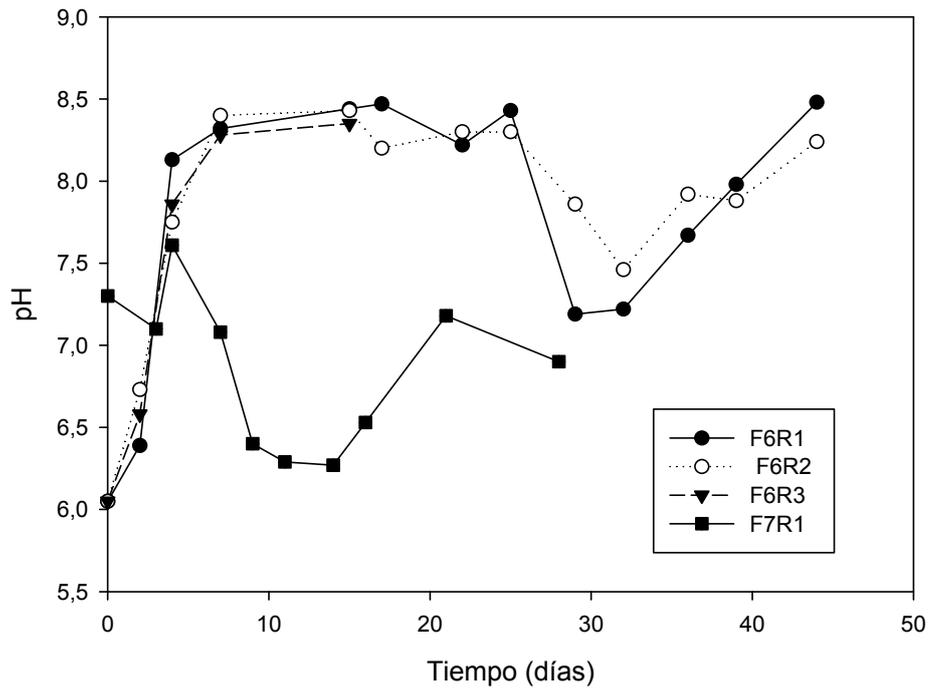


Figura 6.4 Evolución del pH en las fermentaciones F6 y F7

En la tabla 6.8, se presentan los valores de actividad máxima encontrados en cada una de las fermentaciones. Es importante mencionar que los valores máximos de actividad se dan durante los primeros quince días de proceso, al igual que las reducciones máximas en contenidos de materia orgánica y grasa de cada fermentación.

Tabla 6.8 Actividad máxima de cada fermentación

Fermentación	Día máxima actividad	Actividad (UA g ⁻¹ MS)
F3	14	29.0
F4	16	17.5
F5	11	41.2
F6	4	98.5
F7	9	99.7

Los datos reportados de máxima actividad reportados en la F6 y F7 se encuentran en el orden de los reportados por Garlapati y Banerjee (2010) y Gutarra y col. (2009) presentados en la tabla 1.3; con la diferencia que estas actividades han sido obtenidas de fermentaciones con microorganismos específicos y con métodos diferentes de extracción. También se puede mencionar que los valores de actividad de F6 y F7 que son los más altos dentro del grupo de fermentaciones y corresponden a donde se reportaron mayores degradaciones en la materia orgánica (tabla 6.8) y por consiguiente estarían relacionados con la mayor degradación en el contenido de grasa de las mezclas.

6.3 Índice respirométrico

En la figura 6.5, se muestran las curvas de IRD_{24h} obtenidas con el fin de conocer la actividad de las mezclas de fermentación que contienen 20% en grasa. La evolución de los índices respirométricos de las fermentaciones realizadas indicaron que prácticamente todas la mezclas de fermentación eran moderadamente biodegradables debido a que los valores hallados se encontraban en el rango de 2 a 5 $mg\ O_2\ g^{-1}MS\ h^{-1}$ establecido en Ponsá y col. (2010). Los valores de los índices se ubicaron entre 2.4 ± 0.1 y $6.0 \pm 1.2\ mgO_2\ g^{-1}MS\ h^{-1}$. Este rango puede estar asociado a las variaciones que son producto de la heterogeneidad de cada uno de los materiales que conforman la mezcla de partida.

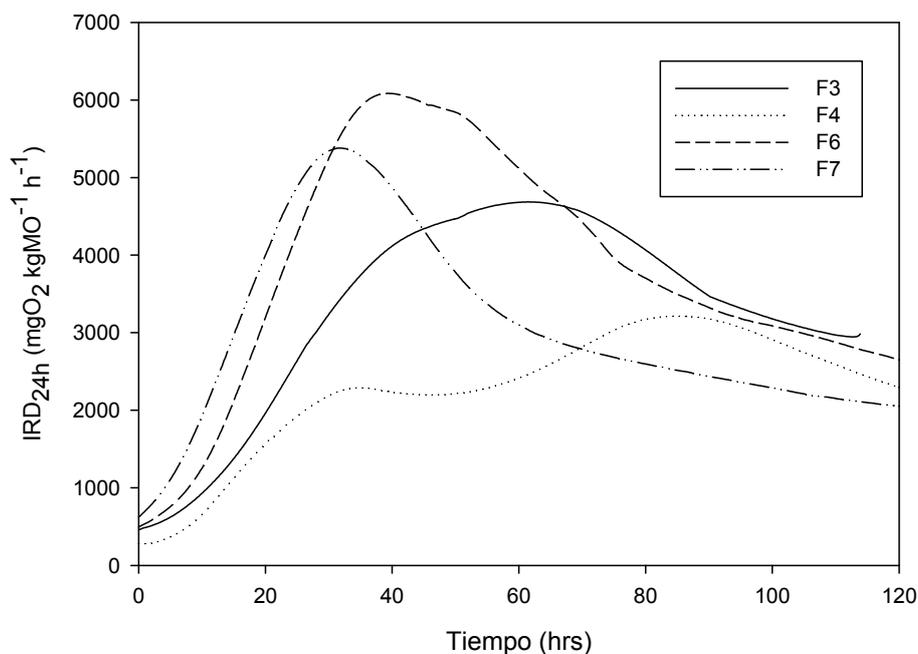


Figura 6.5 IRD_{24h} en fermentaciones con reactores de 4.5L

6.4 Resumen

En el capítulo se analizó la importancia de observar el comportamiento de variables como: peso, materia seca, materia orgánica, pH, entre otras; para lograr una correcta determinación de la eficiencia del proceso en cuanto a la formación del producto deseado. Se estudiaron cinéticas de primer orden, las cuales permitieron analizar la evolución y control de la fermentación.

A partir de los resultados obtenidos, se estableció que bajo nuestras condiciones de proceso, los primeros quince días son cruciales para la fermentación, pues durante ellos se realizan las degradaciones más representativas en cuanto a materia seca, materia orgánica y el contenido de grasa. Adicionalmente, se determinaron las velocidades de degradación para cada una de estas variables. También, se pudo observar que después de los 15 primeros días, las velocidades de degradación disminuían lentamente, lo cual pudiera ser causado por el agotamiento del material biodegradable disponible para los microorganismos.

Durante este periodo, se reportaron reducciones máximas en el contenido de grasa, cercanas al 75%; igualmente, se observó un ligero aumento en el pH durante todo el proceso, pues este comenzaba en valores un poco ácidos y al final se estabilizaba en valores cercanos a la neutralidad.

La máxima actividad reportada se dio en los primeros quince días y se obtuvieron valores próximos a $100 \text{ UA g}^{-1}\text{MS}$, esto concuerda a los rangos reportados bibliográficamente para fermentaciones con cepas específicas.

La información obtenida a partir de las respirometrías, permitió conocer el potencial de biodegradabilidad de la mezcla de fermentación que se utilizó para la producción de las enzimas y ubicó las mezclas como moderadamente biodegradables según la clasificación reportada por Ponsá y col. (2010).

CAPÍTULO 7.

7. ESTUDIO DE LA FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO A DIFERENTES ESCALAS E IMPACTO AMBIENTAL DE LAS EMISIONES DEL PROCESO.

Los resultados que se presentan en este capítulo están divididos en dos bloques. En el primero se trabajó el proceso de SSF del residuo proveniente de la industria de producción y refinado de aceites vegetales (RW) y lodos de depuradoras para el estudio en reactores de dos escalas diferentes: 4.5 y 50L. En el segundo bloque se analizaron las emisiones del proceso de SSF y su respectivo impacto ambiental según se determinaron en los reactores de 50L.

7.1 Introducción

Los bioprocesos se llevan a cabo de diferentes formas según sus escalas de laboratorio, piloto, y manufactura. Al referirse al escalado se puede decir que éste constituye el proceso para diseñar, poner en marcha y operar económicamente un sistema a gran escala basándose al menos en parte en los resultados de experimentos con equipamiento a una escala más pequeña.

El tema del escalado ha recibido especial atención en bioreactores de fermentación sumergida, y desafortunadamente los conocimientos al respecto son de poca utilidad para la SSF, debido a que los fenómenos que lo limitan son diferentes.

Otro punto a considerar es la amplia variedad de matrices utilizadas en SSF que varían en términos de composición, tamaño, resistencia mecánica, porosidad y capacidad de retención de agua. Todos estos factores pueden afectar tanto el diseño del reactor como la estrategia de control para los parámetros (Durand 2003).

El objetivo principal de este capítulo es evaluar la SSF en diferentes escalas usando reactores previamente validados, y estudiar el impacto ambiental producto de dicha fermentación.

7.2 Ensayos con diferentes escalas en la SSF

Para estudiar el proceso de SSF en diferentes escalas, se realizaron experimentos con recipientes de volúmenes de 4.5 (R3-4.5L) y 50 litros (R1-50L y R2-50L). Se escogieron estos dos tipos de reactores, porque ambos han sido validados previamente para su uso en compostaje (Gea 2001; Puyuelo 2012). Presentan una geometría análoga (cilíndricos) y poseen un modelo de flujo hidrodinámico equivalente

(modelo flujo pistón). El análisis hidrodinámico de los reactores fue realizado en estudios anteriores, tal y como se describe en Puyuelo (2012).

En las fermentaciones con el reactor R3-4.5L se aplicó un caudal de aire constante de 160 mL min^{-1} y se midió y registró en continuo la temperatura y el porcentaje de oxígeno en los gases de salida. En cambio, para el caso de los reactores R1-50L y R2-50L, el proceso se llevó a cabo en el montaje de la planta piloto PP1 tal como se describe en el capítulo 3.1 de Materiales y Métodos, utilizando una estrategia de control de aireación basada en la medida de la OUR.

Según los estudios previos la mezcla de lodo y residuo de winterización debería contener el 20% en grasa (aportada por el residuo de winterización). A esta mezcla se añadió palet triturado como material estructurante en una relación volumétrica (1:1). Debido a problemas con el equipo de análisis soxhlet se subestimó el contenido en grasa del RW y por tanto el contenido en grasa inicial resultó superior al deseado. Desafortunadamente este error se detectó al final del experimento.

Las proporciones de la mezcla de fermentación usada en esta sección fue 1:2.5 (w/w) de Lodo: Residuo de Winterización. La caracterización de la mezcla inicial se presenta en la tabla 7.1:

Tabla 7.1 Caracterización de la mezcla a fermentar

Parámetro	Valor
Humedad (%)	31.16
Materia seca(%)	68.84
Materia orgánica (% b.s)	79.29
Grasa (%b.s)	36.96
pH	6.49
Densidad (kg L^{-1})	0.48
NTK (% b.s)	1.07
C/N	41.31

7.2.1 Reactor de 4.5 litros

Como en los experimentos anteriores, al realizar cada uno de los muestreos se homogenizó el reactor para obtener una muestra representativa del material de todo el reactor. Una vez concluido cada uno de los muestreos, se adicionó agua para garantizar la humedad de la mezcla, por la importancia de esta variable ambiental para el crecimiento de los microorganismos y debido a que las grasas tienen una naturaleza hidrófoba (Gea y col. 2007a).

Previo a la exposición de los resultados, se aclara que las discontinuidades en los gráficos corresponden a los momentos del muestreo y a algunos problemas de recopilación de datos que se presentaron en los equipos de seguimiento.

En la figura 7.1, se observa que la humedad de la mezcla estuvo por encima del 40% durante toda la fermentación. Es importante señalar que al inicio del proceso se contó con una humedad un poco más baja, que fue corregida con el riego. Teniendo en cuenta la afirmación de Haug (1993), si el contenido de humedad es extremadamente bajo (menos de 20%) el proceso de degradación podría detenerse o incluso, no comenzar; por tanto, para no tener más adelante durante el proceso problemas que implicaran paradas del mismo, se repitieron las adiciones de agua a la matriz, durante todas las recogidas de muestra.

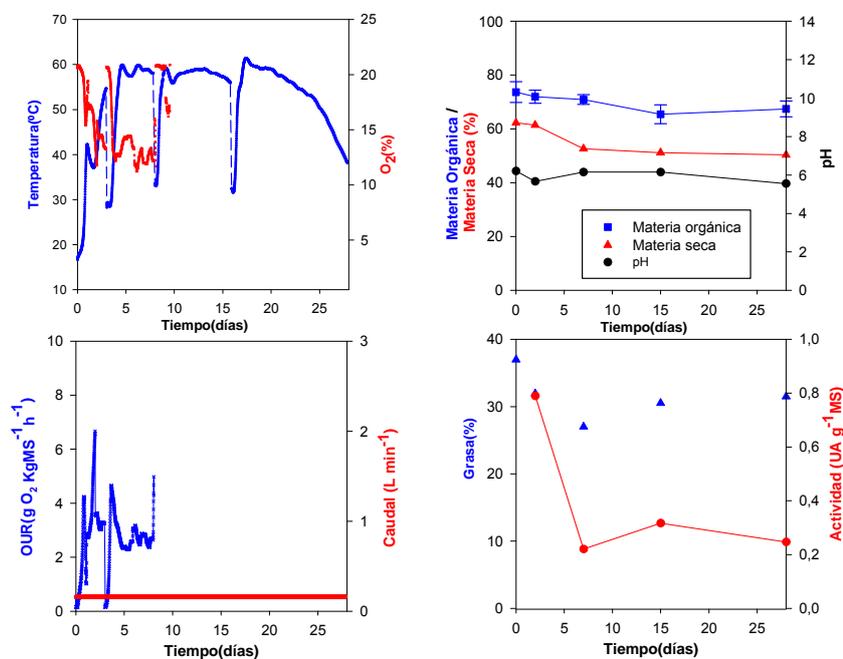


Figura 7.1 Evolución de la temperatura, nivel de oxígeno, caudal de aireación, OUR, pH, materia seca, materia orgánica, %grasa y actividad lipolítica durante la SSF del reactor SSF del reactor R3-4.5L

En la tabla 7.2, se puede observar la reducción en la materia seca de la mezcla del reactor que fue del 34%. Gea y col. (2007a), reportan reducciones del 39.0 y 36.9% en un proceso similar de co-compostaje de lodos y mezclas de grasas animales, donde las mezclas tenían un 30 y 50 % de contenido de grasa. Al comparar con la literatura, y con el avance de los días, se puede decir que el proceso tuvo limitaciones pasado el día 7, que podrían estar asociadas a la cantidad de grasa en la matriz. La reducción total durante el proceso de la materia orgánica fue del 39%. En el capítulo 6, se reporta que a los 15 días de proceso fermentativo, las degradaciones en la materia orgánica se encontraban en un rango de degradación de 40-50%. Al comparar la reducción del ensayo con las obtenidas en el capítulo 6 y además, al observar la evolución de la materia orgánica (ver figura 7.1), se sigue confirmando que el proceso presentó inconvenientes que afectaron la dinámica de degradación.

Tabla 7.2 Reducción de la materia seca en el reactor R3-4.5 L

Día	MS (g)	% Reducción
0	1325.7	0.0
2	1261.7	4.8
7	951.6	28.2
15	926.4	30.1
28	875.5	34.0

La figura 7.2 presenta la evolución en peso de la materia seca, la materia orgánica y la grasa junto con el ajuste al modelo cinético descrito en el capítulo 6 (ecuación 6.1). Los parámetros del modelo se presentan en la Tabla 7.3.

Tal y como se observa en las figuras 7.1 y 7.2, hasta el día 7 hubo una importante degradación de las grasas (38%). A partir de ese día se observó una ralentización en el proceso y que indicaría que el proceso de degradación se detuvo. Una de las razones por la que podría haberse parado el proceso o disminuido la actividad biológica, fue la carencia de nitrógeno que se produciría en la matriz, por la excesiva cantidad de grasa aún presente. Pues como se observa en la tabla 7.1 el contenido de nitrógeno era muy bajo y consecuentemente la C/N era superior a 35 lo cual limitaba el crecimiento microbiano. Además, otra de las razones por las que se podrían haber causado las limitaciones fue la acumulación de ácidos grasos.

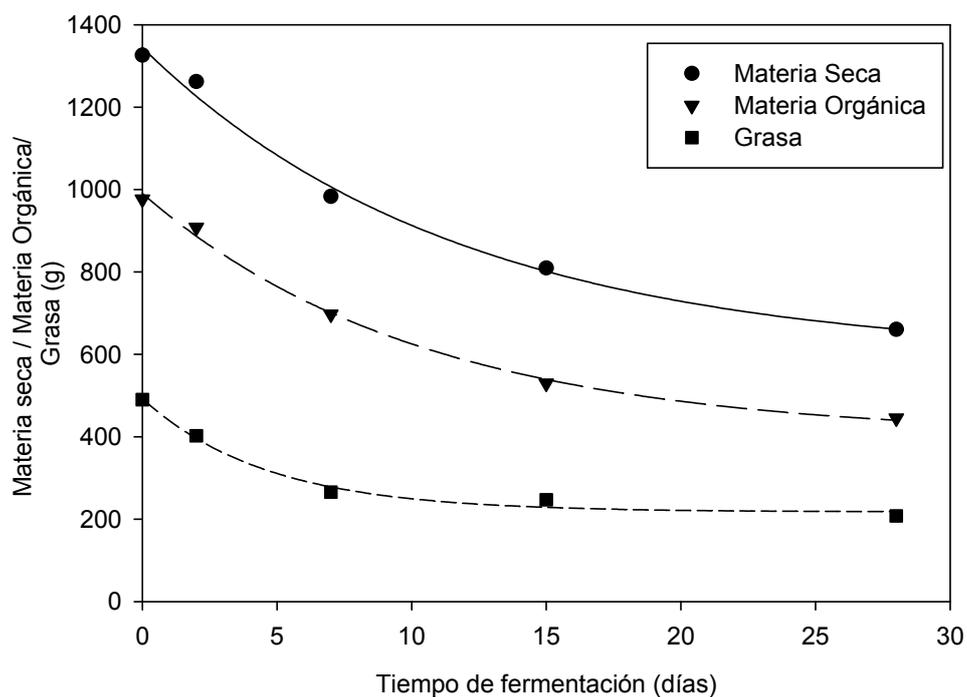


Figura 7.2 Ajuste de la reducción del peso en materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R3-4.5L

Tabla 7.3 Parámetros cinéticos y bondad del ajuste para la degradación de materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R3-4.5L

Fermentación	Fracción inerte	Fracción degradable	Constante cinética k_D (días ⁻¹)	Velocidad inicial r_{D0} (g día ⁻¹)	R^2
<i>Materia seca</i>	44%	56%	0.0852	0.048	0.9933
<i>Materia orgánica</i>	40%	60%	0.0964	0.057	0.9964
<i>Grasa</i>	44%	56%	0.2172	0.121	0.9882

Tal como se observa en la figura 7.2 la degradación de la materia seca y orgánica fue paulatina a lo largo de la fermentación mientras que la degradación de grasas fue más rápida al inicio (mayor constante cinética y velocidad inicial, tabla 7.3), quedando una fracción del 44% de grasa sin degradar en este proceso.

Las constantes cinéticas y las velocidades iniciales obtenidas para MS y MO son inferiores a las estimadas en el capítulo 6 para las fermentaciones F6 y similares a las estimadas para F7, todas usando el mismo tipo de reactor.

Al seguir la evolución de la temperatura, se pudo apreciar que dentro de este reactor se alcanzó el rango termófilo. El primer pico termófilo se apreció transcurridos tres días desde el inicio del proceso de fermentación, con una temperatura de 54.7°C. Se evidenció la actividad biológica presente en la mezcla, pues en la medida que los microorganismos se van desarrollando, éstos van captando el sustrato y liberando energía en forma de calor. También se observó que se mantuvieron temperaturas superiores a 50°C durante 20 días de los 28 que duró el proceso. Se podría pensar que la duración de los 20 días en termófilo se debe sólo a la actividad biológica, pero dado que el proceso presentó ralentización después del día 7, la permanencia en termófilo podría atribuirse a la inercia térmica del proceso (Gea y col. 2007a), pues la matriz rica en grasa posee una capacidad de retención de calor superior a otros materiales orgánicos.

La OUR presentada en la figura 7.1 permitió leer que durante los primeros 7 días del proceso los valores se encontraban por encima de 2.0 gO₂ Kg⁻¹MSh⁻¹. Cabe mencionar que durante el proceso, después del día 7, no se tiene información de la OUR, por inconvenientes con el sensor de oxígeno. Pese a la falta de información de la OUR, al seguir la temperatura y al tener en cuenta los demás parámetros medidos (materia seca, grasa, pH) se puede decir que hubo un cambio en la actividad biológica pasado el día 7.

Durante el experimento, se determinó la actividad lipolítica (figura 7.1), que denota la existencia de organismos que aceleran la degradación de grasas. La actividad más alta se presentó en el primer pico termófilo al inicio del proceso con un valor de 0.79 UA g⁻¹MS. Si se compara el valor obtenido, con el reportado en el experimento del capítulo 5 (41.41UA g⁻¹MS), la actividad es demasiado baja y podría obedecer a la cantidad de grasa inicial presente en la mezcla (36.96%), que puede provocar alguna interferencia en el análisis.

Por otra parte, el exceso en la cantidad de grasa inicial, más la deficiente degradación suscitaría que el pH se ubicara en valores ácidos, como se aprecia en la figura 7.1, por una acumulación de ácidos grasos de cadena larga en el medio. La acidificación que sufrió la mezcla, se puede relacionar con la digestión realizada por bacterias y hongos que liberan ácidos orgánicos como el oleico y linoleico (Graefe 1983), tal como se puede observar en la figura 7.3.

Una evidencia de la presencia de actividad lipolítica en matrices de fermentación sólida es la acumulación de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) (Gea y col. 2007a). Tal y como se aprecia en la figura 7.3 en el proceso de fermentación se da una acumulación de ACGL durante los primeros 15 días del proceso, especialmente de ácido linoleico. Se alcanzó una concentración de 50 mg de AGCL por gramo, concentración menor a la reportada por Gea y col. (2007a) en experimentos con 50 % de contenido de grasa. La acumulación de AGCL, el consecuente pH ácido y la baja degradación de la materia orgánica siguen confirmando la existencia de limitaciones en el proceso y explican la disminución de la actividad enzimática.

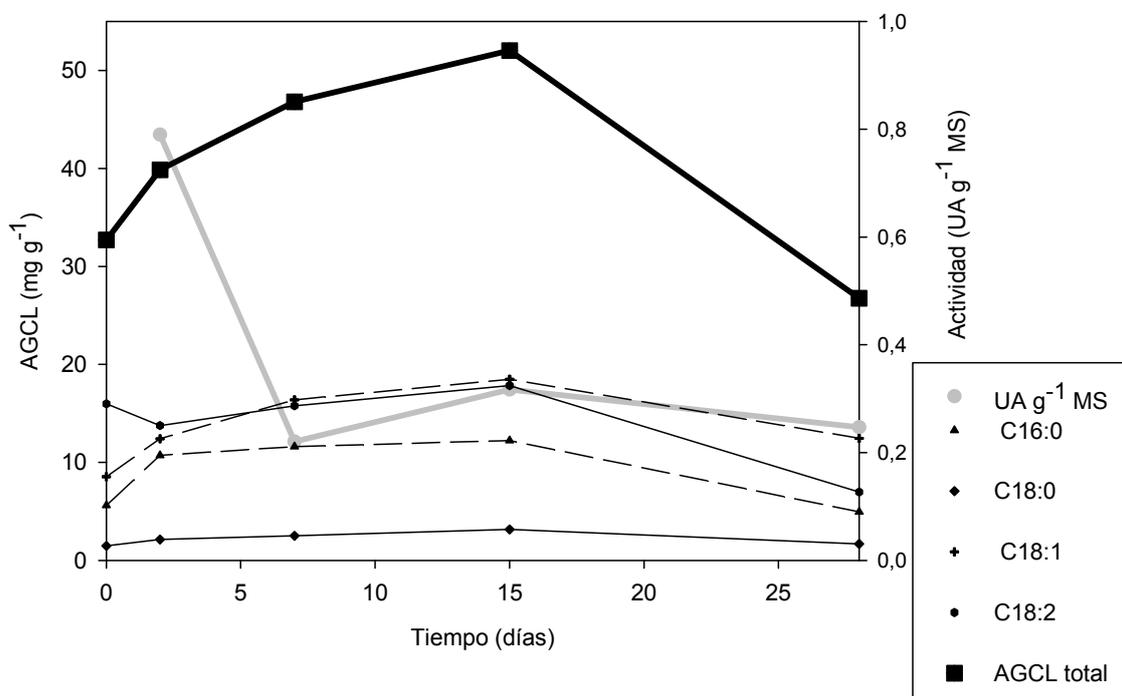


Figura 7.3 Perfil de AGCL durante la fermentación

En los reactores para fermentación sólida, las condiciones de diseño como el aislamiento, garantizan que se puedan alcanzar los rangos de temperatura para que se efectuara la degradación. En las fermentaciones para obtener lipasas a partir de residuos grasos, es recomendable trabajar con contenidos máximos de grasa de un 30% (Gea y col. 2007a), pues además de lograr altas reducciones en el contenido de la grasa, se pueden evitar inconvenientes por limitaciones del proceso o largos periodos de degradación.

7.2.2 Reactores 50 Litros

Las fermentaciones en los reactores de 50 L se llevaron a cabo durante 49 días, y la mezcla que se utilizó en estos dos reactores es igual a la usada en el R3-4.5L. En las figuras 7.4 y 7.5 se representan los resultados de la evolución de la temperatura, nivel de oxígeno, OUR, caudal de aireación, materia seca, materia orgánica, pH, porcentaje de grasa y actividad lipolítica medidos durante la fermentación de R1-50L y R2-50L, respectivamente.

Las reducciones en materia orgánica para las fermentaciones fueron de 58.5% y 48.8% para R1-50L y R2-50L, respectivamente. En materia seca, las reducciones fueron de 56.1% para R1-50L y 44.6% para R2-50L. El valor de reducción fue bastante significativo comparado con la reducción reportada por (Gea y col. 2007a) de un 39.0% para un reactor de 4.5 L que contenía 30% de grasa. Sin embargo, si los resultados obtenidos en los reactores de 50L se comparan con el R3-4.5L, la degradación en éste último, es más baja.

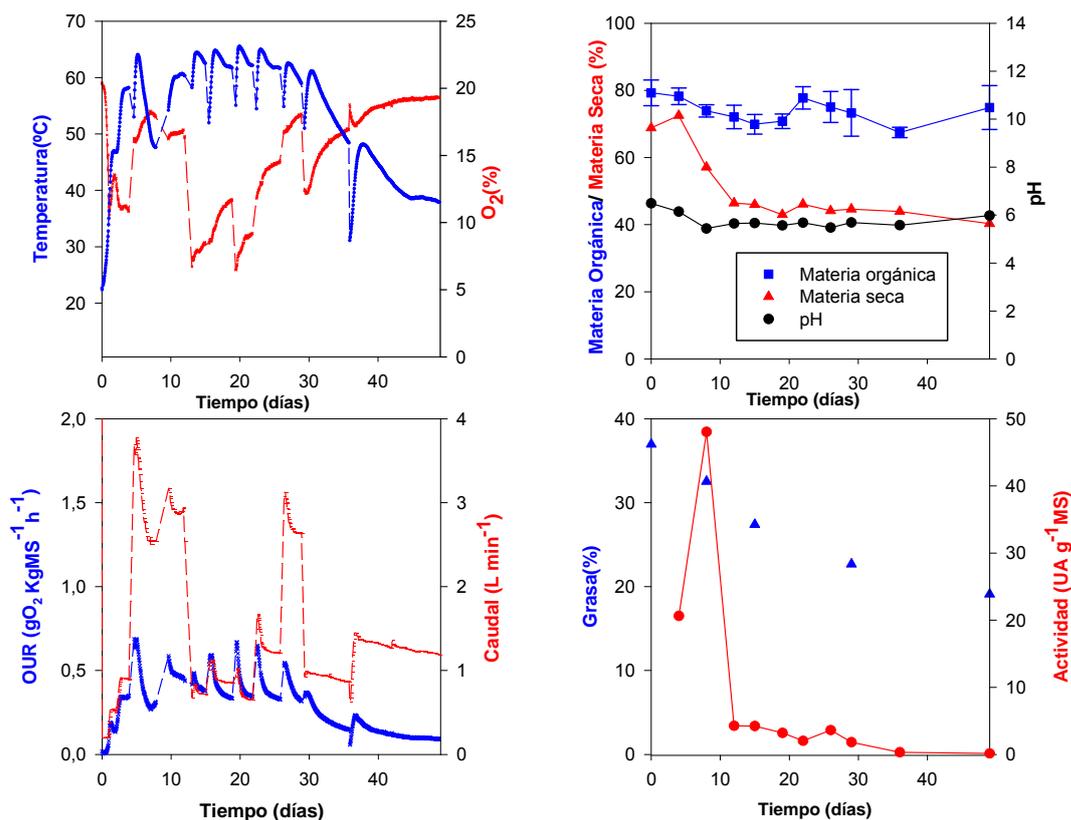


Figura 7.4 Evolución de la temperatura, nivel de oxígeno, caudal de aireación, OUR, pH, materia seca, materia orgánica, %grasa y actividad lipolítica durante la SSF del reactor R1-50L

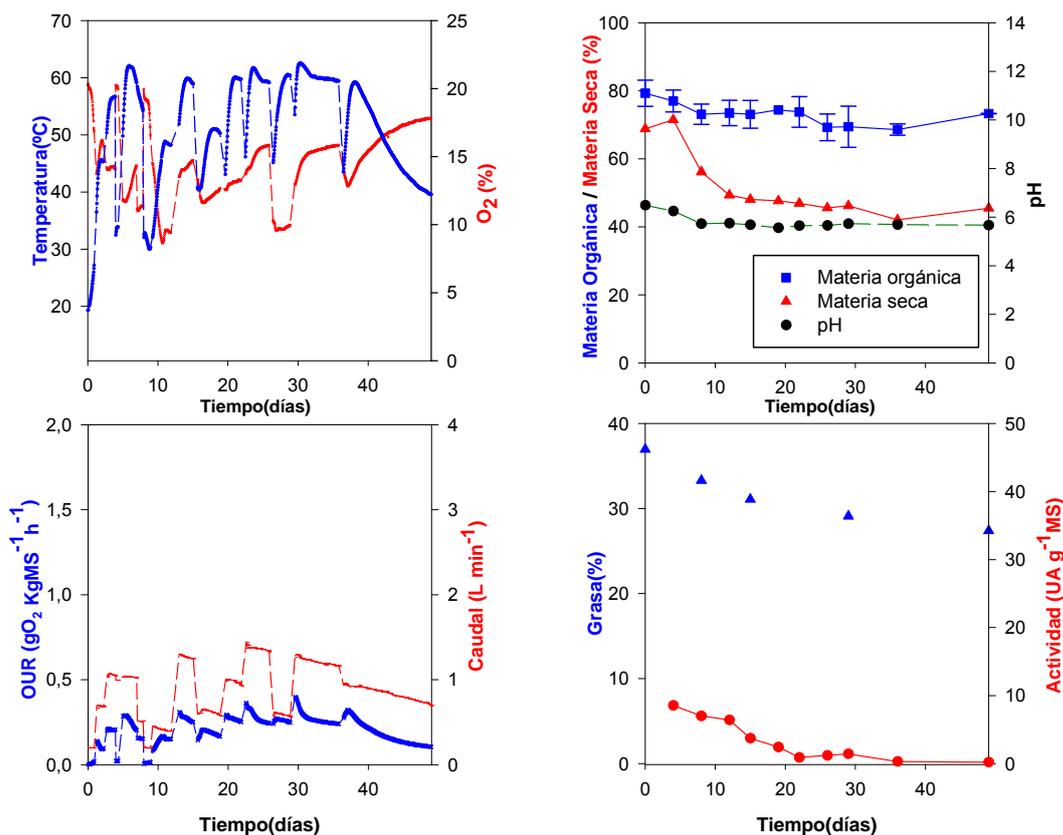


Figura 7.5 Evolución de la temperatura, nivel de oxígeno, caudal de aireación, OUR, pH, materia seca, materia orgánica, %grasa y actividad lipolítica durante la SSF del reactor R2-50L.

En lo que al pH se refiere, según Casco (2008) generalmente, este comienza a caer en el inicio del proceso, como consecuencia de la actividad de las bacterias que descomponen el material carbonoso complejo a ácidos orgánicos intermedios y a medida que el proceso avanza, aumenta gradualmente hasta valores constantes que oscilarán entre 6.5-8.5 dependiendo del material. Como se mencionó anteriormente, los descensos en el pH pueden obedecer a la degradación realizada por bacterias y hongos al liberar ácidos orgánicos tales como ácido acético, palmítico, esteárico, oleico, linoleico. Para el caso en particular de los dos reactores, el proceso fermentativo permaneció en valores ácidos, condición que se pudo atribuir a la cantidad de grasa presente en la matriz de fermentación y por consiguiente a las altas concentraciones de ácido oleico y linoleico como se pueden apreciar en la figura 7.6.

El seguimiento analítico del experimento nos proporciona una idea del funcionamiento del proceso, éste se presenta en la tabla 7.4.

Tabla 7.4 Resultados analíticos de los reactores R1-50L y R2-50L

Reactor	Día	Volumen real (L)	Peso húmedo (Kg)	Grasa (%)	Reducción de grasa (%)
R1-50L	0	50.00	19.27	36.96	0.0
	8	42.87	16.68	32.53	23.8
	15	43.89	17.05	27.40	34.4
	29	41.35	16.12	22.69	48.6
	49	36.77	14.46	19.10	61.2
R2-50L	0	55.00	23.60	36.96	0.0
	8	44.95	22.70	33.30	13.3
	15	44.95	22.15	31.08	21.1
	29	41.81	21.00	29.10	30.0
	49	36.15	19.80	27.38	37.9

La degradación total de las grasas fue del 61.2% y 37.9% para R1-50L y R2-50L, respectivamente, presentando una diferencia notable ambos reactores. Si se compara con el R3-4.5L, a pesar de la parada que sufrió el proceso en este reactor, la degradación de la grasa hasta el día 7 fue mejor que toda la reducción del proceso del reactor R2-50L. Por otro lado, la degradación en el reactor R1-50L fue inferior al 74% y el 85%, obtenidos en el estudio realizado en reactores de 4.5 L citado en el capítulo 6 y en lo reportado por Gea y col. (2007a), respectivamente.

La evolución en masa de materia seca, orgánica y grasa y el ajuste cinético se presenta en la figura 7.6 y tabla 7.5 para el reactor R1 y en la figura 7.7 y tabla 7.6 para el reactor R2.

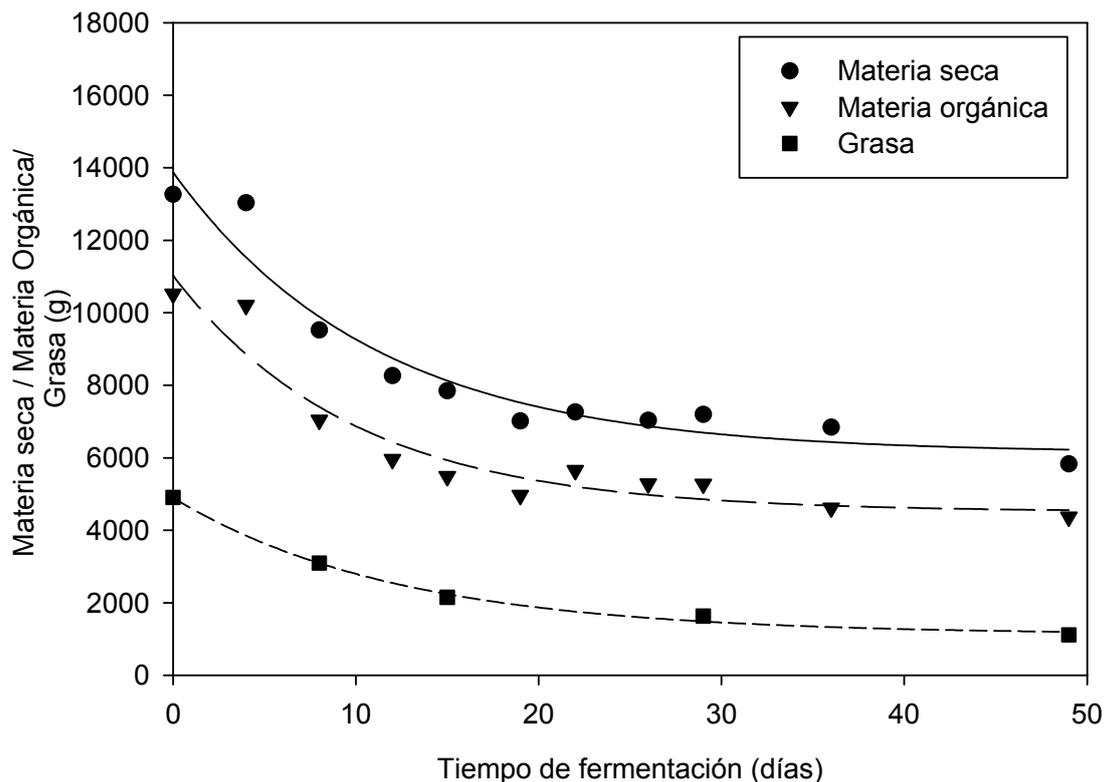


Figura 7.6 Ajuste de la reducción del peso en materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R1-50L

Tabla 7.5 Parámetros cinéticos y bondad del ajuste para la degradación de materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R1-50L

Fermentación	Fracción inerte	Fracción degradable	Constante cinética k_D (días ⁻¹)	Velocidad inicial r_{D0} (g día ⁻¹)	R ²
Materia seca	44%	56%	0.0905	0.051	0.9362
Materia orgánica	41%	59%	0.1018	0.060	0.9242
Grasa	23%	77%	0.0816	0.063	0.9958

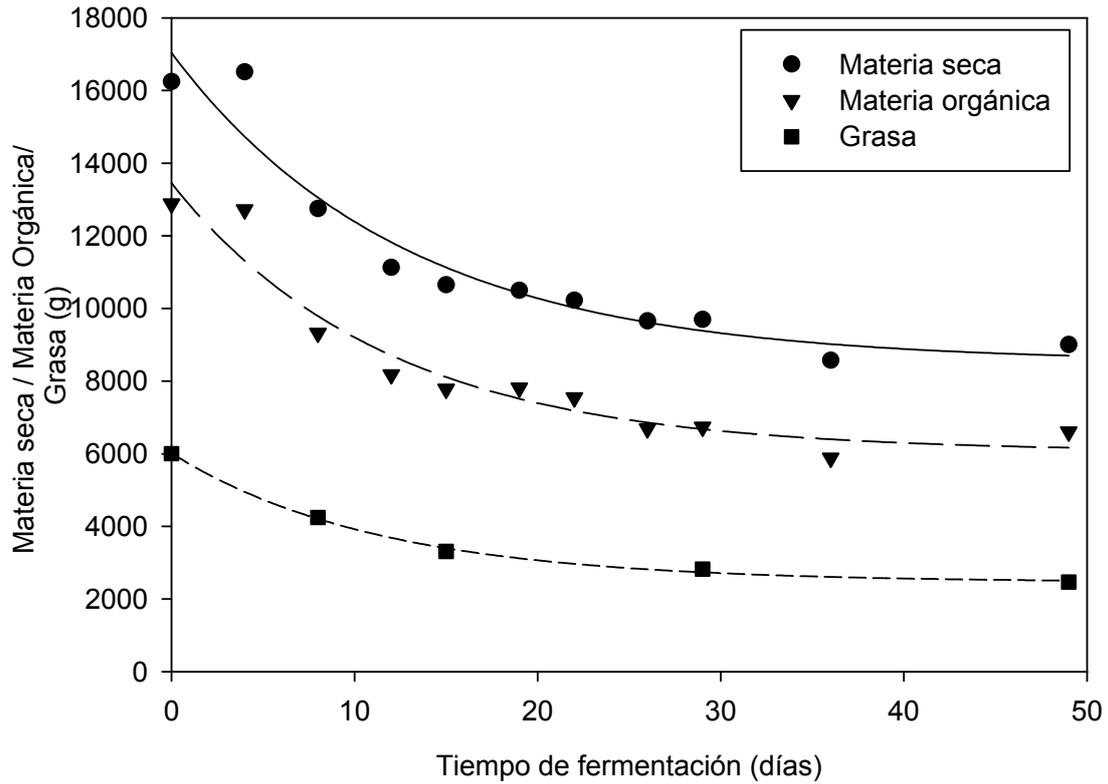


Figura 7.7 Ajuste de la reducción del peso en materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R2-50L

Tabla 7.6 Parámetros cinéticos y bondad del ajuste para la degradación de materia seca, materia orgánica y grasa para la fermentación en el reactor R2-50L

Fermentación	Fracción inerte	Fracción degradable	Constante cinética k_D (días ⁻¹)	Velocidad inicial r_{D0} (g día ⁻¹)	R ²
Materia seca	50%	50%	0.0789	0.039	0.9317
Materia orgánica	45%	55%	0.0855	0.047	0.9358
Grasa	41%	59%	0.089	0.053	0.9976

En el reactor R1 se obtuvo una mayor fracción de materia biodegradable, mayor constante cinética y mayor velocidad inicial que en el R2, con valores similares a los presentados anteriormente para el R3 (tabla 7.3).

El contenido de humedad óptimo para una matriz orgánica se debe situar en rangos de 40-60% (Haug 1993), pero esto puede variar dependiendo de la naturaleza del

material. Richard y col. (2006) indicaron que el contenido de humedad óptimo para una biodegradación debía estar entre 50-70%, dependiendo del tipo, la composición del material y la etapa del proceso. Durante la fermentación el perfil de humedad para los dos reactores se mantuvo en rangos entre 40-60%. A pesar de la baja humedad al inicio del proceso, corregida por medio del riego, los reactores continuaron su actividad biológica.

Una humedad alta acompañada de una inadecuada porosidad origina la disminución de transferencia de oxígeno, siendo éste insuficiente para la demanda metabólica y reduciéndose por tanto la actividad microbiana aeróbica. Este hecho puede provocar la aparición de malos olores, la generación de lixiviados y la pérdida de nutrientes. El seguimiento de la porosidad de la matriz en los reactores, medida como Air-Filled Porosity (AFP) durante la fermentación se presenta en la figura 7.8.

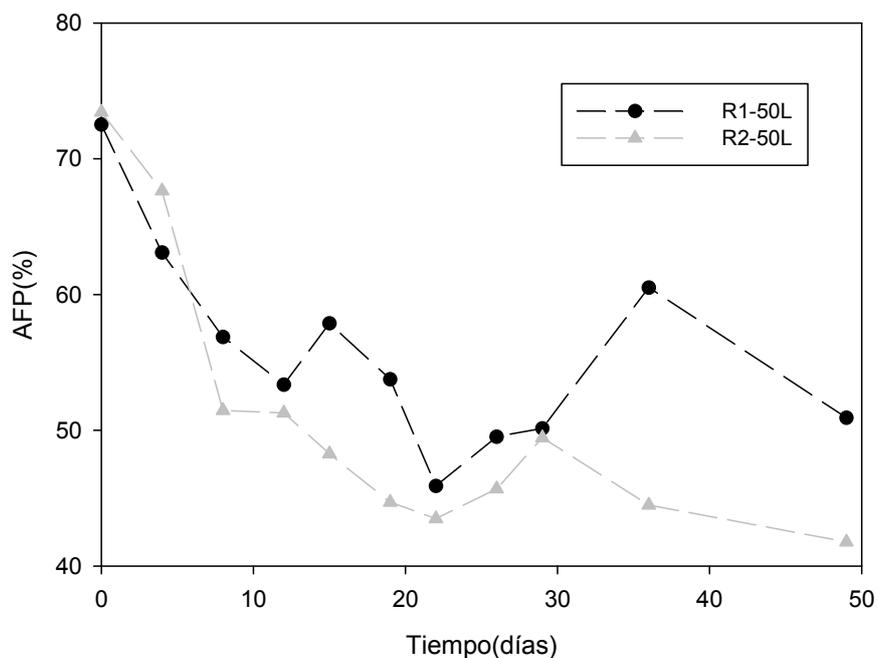


Figura 7.8 Porosidad en los reactores R1-50L y R2-50L

Los valores de porosidad a lo largo del proceso estuvieron en el rango óptimo de 30-60% sugeridos por Annan y White (1998). Se observó que al iniciar la fermentación, los valores de AFP estuvieron por encima del rango. Es posible utilizar valores iniciales más altos, los cuales pueden depender de la composición bioquímica, el potencial de calor de los residuos a tratar, y la resistencia mecánica de la mezcla (Ruggieri 2008).

Durante la fermentación en los dos reactores se pudo observar una disminución de la porosidad debido a la degradación y compactación del material, seguida de una

estabilización o incluso un ligero incremento causada por la biodegradación de materia orgánica (Ruggieri 2008). Como se discutió en el capítulo 5, es habitual observar un crecimiento masivo de hongos filamentosos en las matrices ricas en grasa. Este fenómeno también contribuye a la reducción de la porosidad, pues la homogenización manual de la matriz en cada muestreo contribuye a minimizar este impacto. Los volteos realizados durante los muestreos, evitaban la formación de aglomerados por acción de los hongos. Según Ruggieri (2008), el hecho de evitar la floración excesiva de hongos permitiría evitar la formación de aglomerados y por ende la acumulación de AGCL que podría generar una inhibición microbiana.

La variación mostrada en los análisis que se efectuaron durante los 49 días de proceso, muestran que la mezcla de residuos sufrió una reducción en peso del 25.0% para el R1-50L y 16.1% para el R2-50L. En cuanto al volumen el cambio fue de 26.5% y 34.7% para R1-50L y R2-50L respectivamente. La alta reducción en el volumen de R2-50L, nos indica que no se debió al proceso de degradación como tal, sino a la compactación sufrida en algún punto por la matriz, tal como pudo observarse visualmente durante el experimento. Esta afirmación se pudo corroborar al confrontar el 48.8% de degradación en la MO de R2-50L con el 58.8% de R1-50L.

En ambas figuras (Fig. 7.4 y Fig. 7.5) se observa que ambos reactores alcanzan con facilidad el rango termófilo y se mantuvieron así durante gran parte del tiempo que duraron las fermentaciones. Ambos reactores alcanzan su primer pico termófilo del proceso el día 4, las temperaturas para ese día son 58.3 y 56.7 °C respectivamente. Una vez alcanzado el rango termófilo, se realiza el primer muestreo. Durante cada muestreo se realizó el mezclado del material y en ocasiones puntuales se hicieron adiciones de agua, las cuales estaban sujetas a la necesidad de la matriz.

Una vez pasada la toma de muestras, los reactores volvían a repuntar en su temperatura y alcanzaban el rango termófilo, como se puede observar en las figuras 7.4 y 7.5. Cabe destacar que no existe agitación mecánica dentro de estos reactores, por lo cual la mezcla se agita manualmente y el contenido de los reactores se saca y se vuelve a cargar dentro de los mismos.

En este tipo de reactores, los gradientes de temperatura que aparecen de la parte inferior a la parte superior son inevitables (Durand 2003) y para mantener una homogeneidad de la matriz, el volteo es la mejor opción; adicionalmente, gracias al volteo durante el muestreo, se favoreció factores que contribuyen al desarrollo de la microbiota, como la homogenización de nutrientes restantes, la humedad, la porosidad del material (Baeta-Hall y col. 2005).

Durante todo el proceso fermentativo, las temperaturas más altas observadas fueron de 65.6 °C para el reactor R1-50L y 62.5°C para el reactor R2-50L. Dichos picos fueron los días 20 y 30, respectivamente.

La OUR es un parámetro que refleja la actividad biológica del sistema y está directamente relacionada con la temperatura del proceso. Al inicio de la fermentación se pudo ver que cuando se produjeron los primeros aumentos en la OUR coinciden con los aumentos de temperatura, los cuales estaban asociados al desarrollo microbiológico.

Los caudales máximos aplicados por el controlador de OUR, durante el proceso fueron 3.8 y 1.4 L min⁻¹ para R1-50L y R2-50L respectivamente. Se observó la variación de la OUR máxima calculada a partir de las medidas experimentales, que para esta fermentación fue de 0.68 gO₂ Kg⁻¹MSh⁻¹ para R1-50L y 0.40 gO₂ Kg⁻¹MSh⁻¹ para R2-50L. En experimentos usando los mismos reactores de 50 litros con FORM, realizados por Puyuelo y col. (2010), los valores de la OUR máxima se encuentran en un rango entre 1.1 y 1.5 gO₂ Kg⁻¹MSh⁻¹. Si se compara este rango, con los resultados obtenidos en los reactores R1-50L y R2-50L, éstos son muy bajos y pueden señalar que la actividad microbiana ha disminuido o se ha visto inhibida y por eso se explica la baja actividad enzimática detectada, a pesar de que las temperaturas registradas durante el proceso apunten a que la actividad aumenta. Este comportamiento se puede explicar por la inercia térmica presente en la matriz fermentada (Barrena y col. 2006).

Respecto a la actividad enzimática del proceso, al inicio del experimento (figuras 7.4 y 7.5), se presentaron los picos más altos con valores de 48.04 UA g⁻¹MS para el R1-50L y 8.6 UA g⁻¹MS para el R2-50L. Tras este primer pico la actividad enzimática bajó de manera muy rápida, aun cuando el proceso no había avanzado demasiado. Investigaciones realizadas por Kourtev y col. (2002) mencionan que en un comportamiento normal en un proceso de degradación de materia orgánica, la actividad enzimática se iniciaría con un aumento debido a la gran concentración de sustrato presente, con el paso del tiempo disminuiría, con la reducción de concentración de sustrato y los productos de la reacción van siendo consumidos por los microorganismos, con lo que la actividad enzimática tiende a disminuir. En el caso de los reactores de 50L, esta disminución tan rápida en la actividad, evidenciada con los resultados de la OUR, pudo atribuirse a la interferencia causada por la acumulación de AGCL, que conlleva a la acidificación de la mezcla, limitando el desarrollo del proceso. La figura 7.9 presenta el perfil de AGCL para los dos reactores. Se observa que para R1-50L, al inicio del proceso se acumulan, pero luego se van

degradando, mientras que en el R2-50L la acumulación persiste la mayor parte del proceso. Adicionalmente, se puede mencionar que los valores alcanzados son similares a los alcanzados en el R3-4.5L.

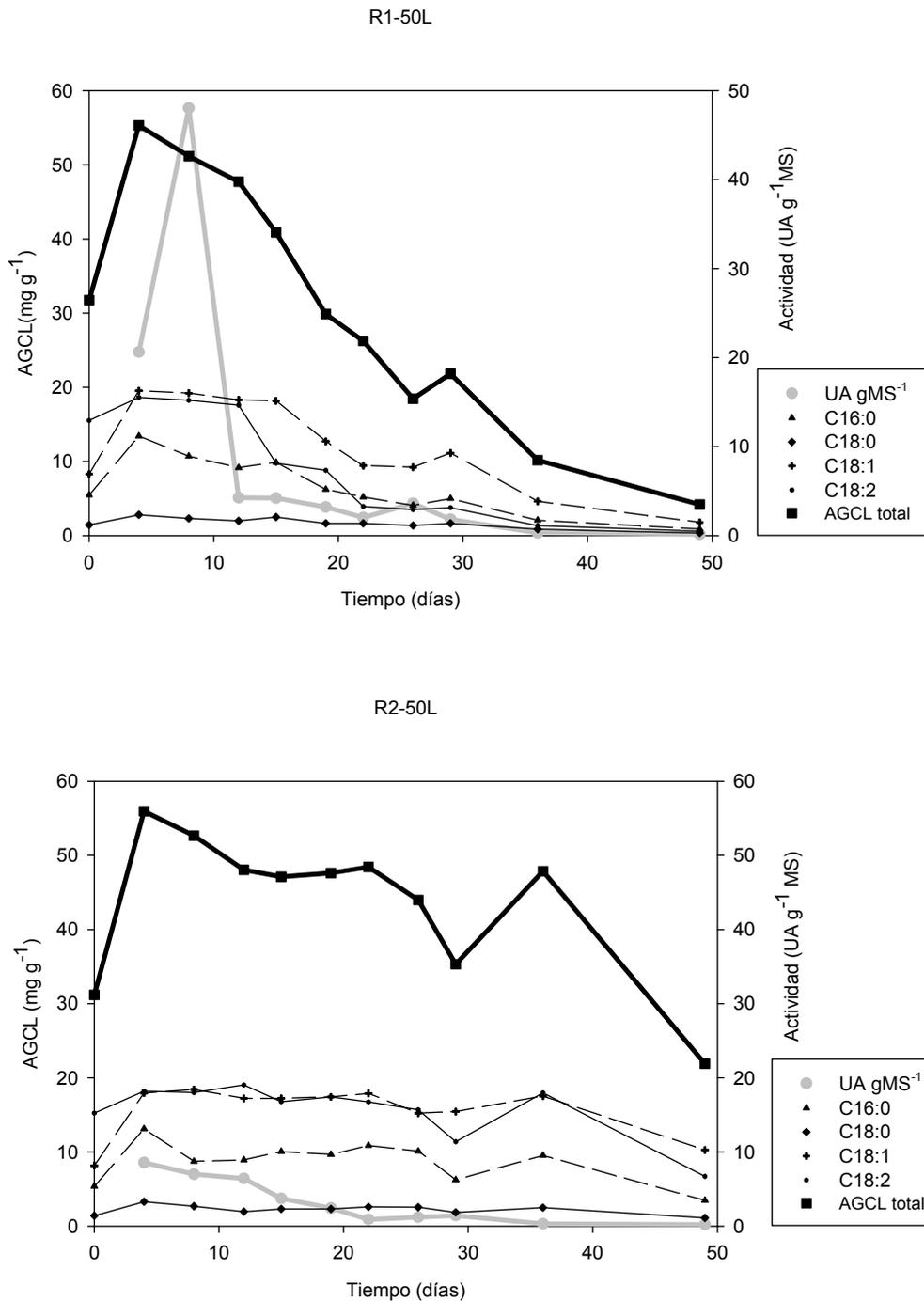


Figura 7.9 Perfil de AGCL durante la fermentación en SSF de los reactores R1-50L y R2-50L

Se puede mencionar también que pese al volteo que se realizó durante cada muestreo de los reactores, esto no fue suficiente para contrarrestar el efecto inhibitor que causó

la acumulación de los AGCL, especialmente del ácido linoleico en el crecimiento de las bacterias (Van Nieuwenhove y col. 2007).

7.3 Emisiones e Impacto

Las muestras para la medida de las emisiones fueron obtenidas de las salidas de gases de los reactores R1-50L y R2-50L, mencionados en el apartado anterior.

Para el estudio de las emisiones se tomaron muestras en bolsas Tedlar® de 1 L de capacidad y luego fueron analizadas por cromatografía de gases. Los procedimientos analíticos para la cuantificación de los Compuestos Orgánicos Volátiles, N₂O, CH₄ y NH₃ usados en esta etapa experimental se encuentran detallados en el apartado 3.6.

Las muestras fueron recolectadas y analizadas en colaboración con Caterina Maulini, miembro del grupo GICOM, quién está realizando su tesis doctoral en estudios de emisiones gaseosas en compostaje y SSF.

Para la realización de esta fase del estudio, la tabla 7.7 presenta las características de la mezcla inicial y de las obtenidas al final de los experimentos en cada reactor.

Tabla 7.7 Caracterización inicial de la mezcla y final de cada reactor.

Material	Reactor	MS(%S.M.H)	MO(%S.M.S)
Inicial		68.8 ± 4.0	79.3 ± 3.8
Final	R1- 50 L	40.3 ± 1.6	74.9 ± 6.5
	R2-50 L	45.5 ± 0.0	73.3 ± 0.0

%S.M: H: porcentaje sobre materia húmeda %S.M.S: porcentaje sobre materia seca

Si bien la mezcla de partida comenzó con una humedad un poco baja, ésta fue corregida con el riego que se realizó, al realizar el primer muestreo. A partir de ese momento los valores de humedad se ubicaron en los rangos recomendados del 40 al 60%.

La mezcla de partida, tiene un índice respirométrico de $2.42 \pm 0.31 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1}\text{MO h}^{-1}$, y un AT₄ de $185.75 \pm 20.07 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1}\text{MO}$. La figura 7.10 presenta el perfil respirométrico de la mezcla inicial.

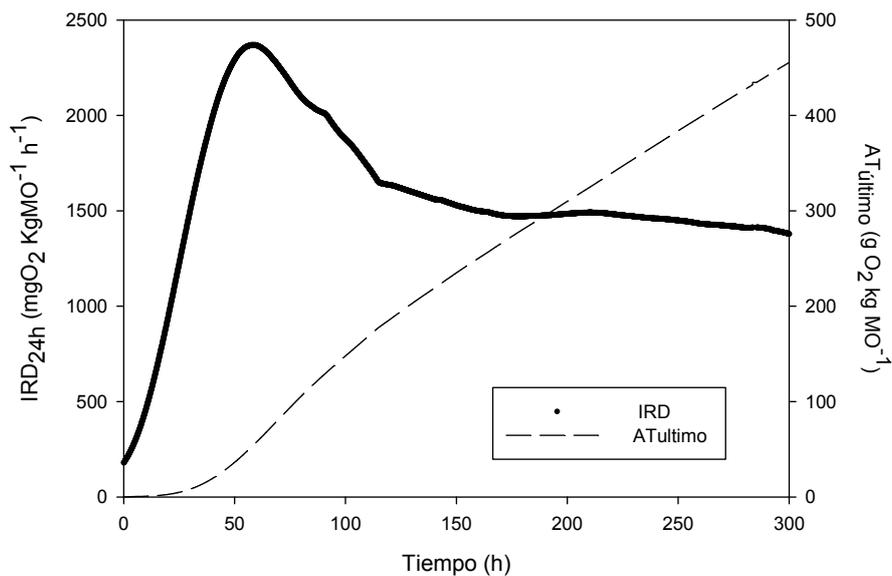


Figura 7.10 Perfil respirométrico de la mezcla inicial

Se puede observar que el potencial de biodegradación es diferente de las mezclas realizadas en las otras fermentaciones. En este caso, se observa un consumo de oxígeno muy elevado durante todo el ensayo que corresponde a la elevada cantidad de grasa que contiene la mezcla.

De forma habitual, durante la realización de estudios de impacto ambiental no se tiene en cuenta la eficiencia del proceso. No obstante, aquí ha sido evaluada a través del RIE descrito en el párrafo 3.7, que se ha creado como unidad para medir el impacto ambiental producido y la energía consumida en estabilizar los residuos en una unidad de IRD. En la tabla 7.8, además del RIE, se presentan diversos parámetros que permitieron evaluar la eficiencia de la fermentación y establecer una comparativa entre los reactores.

Se analizó la estabilidad de los dos reactores teniendo en cuenta el índice respirométrico del material (al inicio y al final del proceso), se pudo observar que al finalizar se obtiene un producto de fermentación estable. También, comparando los resultados de la tabla, se observa que el consumo energético fue superior en el primer reactor. Así mismo, la tasa de consumo también fue mayor, y el índice respirométrico al final del proceso fue menor. Esto indica que la degradación aerobia es mayor para el reactor R1-50L.

Si bien es cierto que el consumo energético del reactor R1-50L es más alto que el de R2-50L, la degradación ocurrida en éste, compensa un poco la situación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la reducción del IRD alcanzado no refleja completamente su rendimiento real (Colón et al. 2012), pues se podría tener un consumo energético bajo, pero el producto final no sería bueno.

Al comparar los valores de RIE_{CE} obtenidos durante el experimento y los obtenidos por Puyuelo (2012) en un ensayo realizado en los mismos reactores, donde los valores reportados estaban en un rango de 3.9×10^3 y 9.2×10^4 $\text{kJ} [\text{mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{MO h}^{-1}]^{-1}$, se puede decir que el proceso no fue tan eficiente por la carga ambiental que representa desde el punto de vista de las necesidades energéticas, que se traduce en un aumento del RIE_{CE} .

Tabla 7.8 Comparación del proceso para cada reactor.

Reactor	Consumo Energético (kJ)	OUR_{max} ($\text{gO}_2 \text{ h}^{-1}$)	AT_u (g O_2)	IRD _{24h} final ($\text{mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{MO h}^{-1}$)	RIE_{CE} (kJ $[\text{mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{MO h}^{-1}]^{-1}$)
R1-50 L	4.03E+04	8.4	4031	0.42 ± 0.02	2.01E+04
R2-50L	2.43E+04	7.9	2908	1.06 ± 0.03	1.79E+04

7.3.1 Emisiones de Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs)

La figura 7.11 muestra la evolución acumulada de las emisiones de COVs durante el periodo de fermentación para los dos reactores.

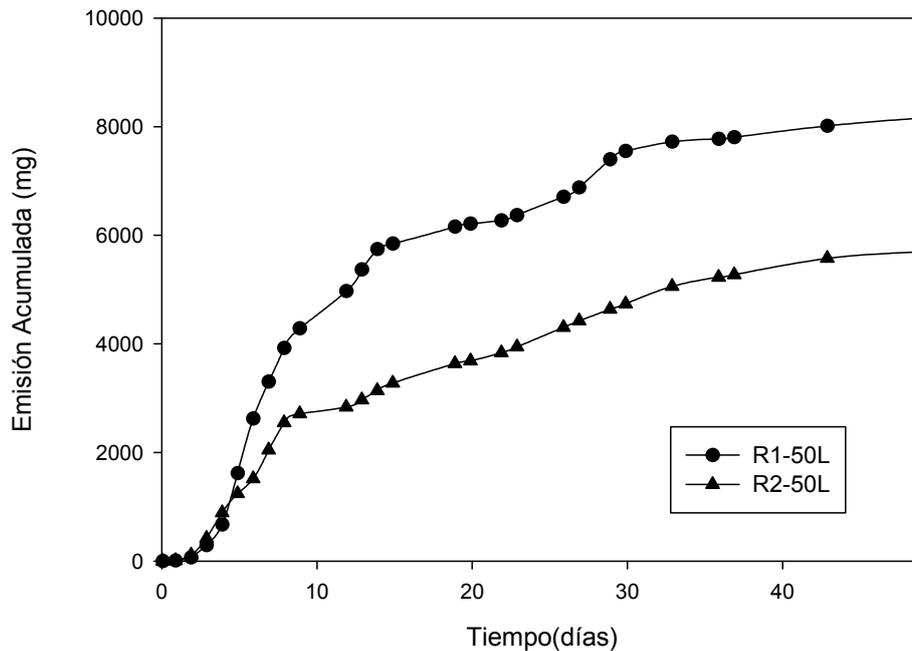


Figura 7.11 Emisiones acumuladas de COVs durante la fermentación en SSF de los reactores R1-50L y R2-50L

Por lo que se observó, se presentaron emisiones de este tipo durante todo el proceso para los dos reactores. Cabe mencionar que los valores más altos de las mismas se presentaron durante los primeros 10 días de proceso.

Este comportamiento indica que los COVs están aparentemente fijados a la matriz sólida y son liberados tras el calentamiento durante el proceso (Komilis y col. 2004). Las emisiones de COVs fueron de $615 \text{ mg kg}^{-1}\text{MS}$ (R1-50L) y $351 \text{ mg kg}^{-1}\text{MS}$ (R2-50L), y superan significativamente a las emisiones obtenidas en experimentos de compostaje de RSU por Komilis y col. (2004) que se encontraban en un rango de 0.3 y $6.5 \text{ mg kg}^{-1}\text{MS}$. La presencia de estas emisiones también podrían atribuirse a las fluctuaciones en el caudal de aireación conforme avanza el proceso de fermentación (Pagans 2007). No se identificaron de manera individual los COVs.

7.3.2 Emisiones de CH_4

Las emisiones de metano de los dos reactores se presentan en la figura 7.12. En estudios realizados por Hao y col. (2001), se reportó que a temperaturas por encima de $40\text{-}50^\circ\text{C}$, las concentraciones de CH_4 y NH_3 son altas, mientras que cuando cae por debajo de 45°C , aparece el N_2O . De este hecho, se parte para afirmar que existen relaciones inversas con respecto a la descomposición química de CH_4 y N_2O , de

manera que al encontrar zonas con altas concentraciones de CH_4 siempre corresponderá a bajas concentraciones de N_2O (Cuhls 2001).

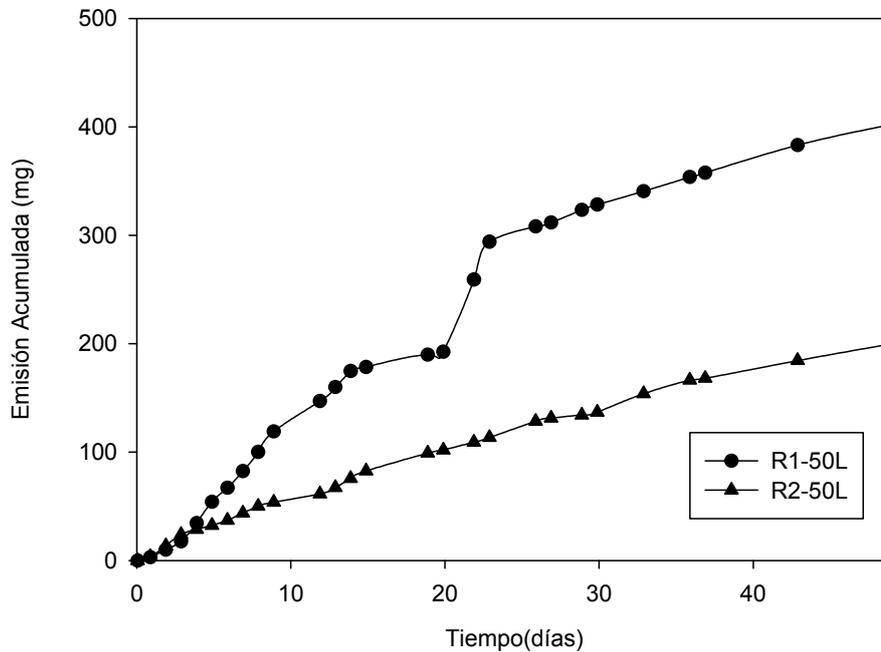


Figura 7.12 Emisiones acumuladas de CH_4 durante la fermentación en SSF de los reactores R1-50L y R2-50L

Observando el perfil acumulado de CH_4 se puede mencionar que se emitió CH_4 al inicio del proceso con la aparición de los primeros puntos termófilos. Al comparar los valores emitidos por los reactores ($21 \text{ gCH}_4 \text{ MgMF}^{-1}$ para R1-50L y $8 \text{ gCH}_4 \text{ MgMF}^{-1}$ para R2-50L), con los expuestos por Amlinger y col. (2008) para pilas de residuos biológicos que incluyen residuos de cocina ($293 \text{ gCH}_4 \text{ MgMF}^{-1}$), compostador de jardín ($2185 \text{ gCH}_4 \text{ MgMF}^{-1}$) y pilas de estiércol ($1354 \text{ gCH}_4 \text{ MgMF}^{-1}$) se observó que lo emitido por los reactores es insignificante, esto se puede explicar por la porosidad de la mezcla de los reactores durante todo el proceso.

Se observó que hacia el día 20 de la fermentación, hubo un considerable aumento en la emisión de R1-50L, que coincide con el momento donde hubo la humedad más alta en todo el proceso (57%). Esta condición, junto con los descensos en la porosidad que iban sucediendo a lo largo del proceso, contribuyeron a la aparición de espacios o zonas donde podía existir deficiencia de oxígeno y producirse anaerobiosis, que permitiría que las bacterias metanogénicas produjeran metano (Sommer y Møller 2000). Adicionalmente, se observa que la pendiente del perfil de emisión se suaviza al final del proceso. Esto se interpretó como la reducción de las emisiones, puesto que

para este momento la actividad había disminuido y la temperatura estaba en la etapa de descenso.

7.3.3 Emisiones de NH_3

La pérdida de N en las fermentaciones sólidas se da por la emisión gaseosa de compuestos como NH_3 , N_2O , N_2 , y NO_x . De estas emisiones, la que predomina es la del NH_3 (Yu y Huang 2009). Las pérdidas acumuladas de amoníaco para los dos reactores de 50L se muestran en la figura 7.13.

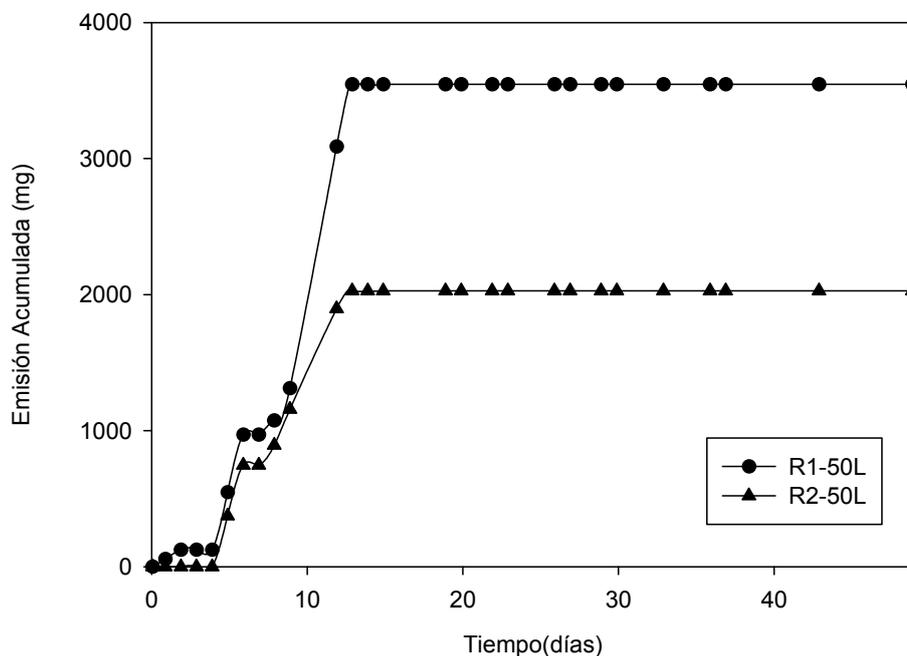


Figura 7.13 Emisiones acumuladas de NH_3 durante la fermentación en SSF de los reactores R1-50L y R2-50L

Las emisiones de amoníaco, se producen durante los primeros 12 días del proceso fermentativo. Durante este periodo de tiempo se producen los mayores picos de concentración, que podrían atribuirse a momentos donde el caudal era máximo, y producía arrastre de este compuesto. Esto se puede corroborar con los resultados presentados por Jiang y col. (2011), donde mencionan el efecto de una elevada aireación. Por otra parte, el pH del proceso también tiene un efecto sobre las emisiones de amoníaco, durante el experimento los reactores mantuvieron valores por debajo de 7, lo que se traduce en que la emisión de este compuesto no se vea reflejada en la fermentación, pues teniendo en cuenta lo expuesto por Valzano y col.

(2001), donde se afirma que si el pH se encuentra por encima de 7.5 se producen conversiones rápidas del amonio soluble (NH_4^+) en amoníaco (NH_3). Además hay que tener presente que la mezcla fermentada tiene una relación C/N elevada, hecho que habrá influido también en la baja pérdida de nitrógeno que se ha dado durante el proceso.

Al final de la fermentación, el total de NH_3 perdido para R1-50 y R2-50L, fue de 3.5 g y 2.0 g, respectivamente, la diferencia entre los dos reactores fue de 0.9%. Este valor representa una pequeña diferencia en comparación con la cantidad total de N, de la mezcla inicial de cada reactor, es decir 202 g y 205 g para R1-50L y R2-50L. La pérdida de N en forma de amoníaco representó el 1.7% y el 0.8% del N total para R1-50L y R2-50L, respectivamente.

7.3.4 Emisiones de N_2O

En la figura 7.14 se muestran las emisiones acumuladas de N_2O durante el periodo de fermentación para los dos reactores.

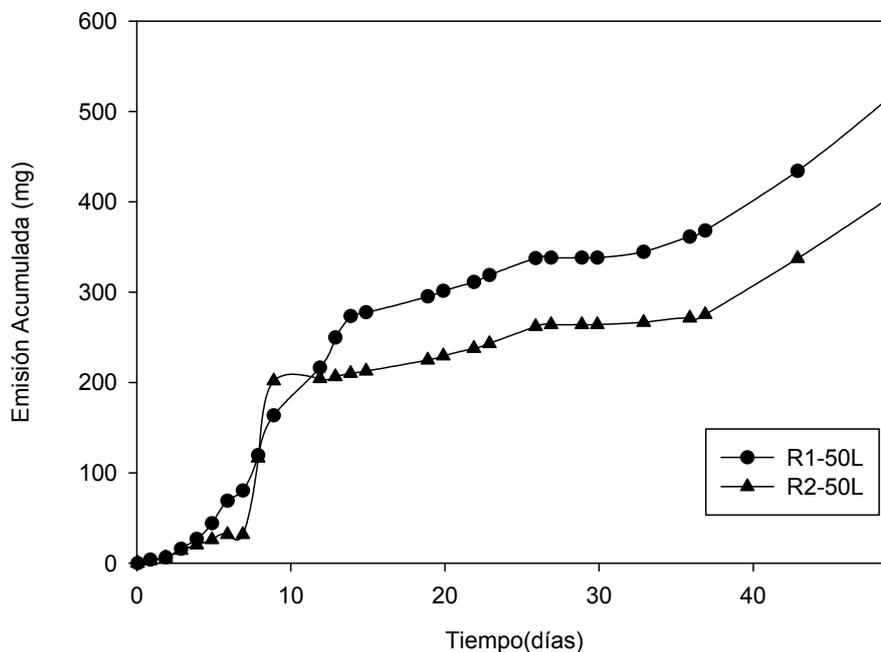


Figura 7.14 Emisiones acumuladas de N_2O durante la fermentación en SSF de los reactores R1-50L y R2-50L

Las emisiones de N_2O en fermentaciones sólidas, resultan básicamente de los procesos de nitrificación y desnitrificación. Cuando se agotan las fuentes de carbono fácilmente disponibles, se activa la desnitrificación. Esto conlleva a que se limiten los

donantes de hidrógeno requeridos para la desnitrificación y por ende se causa desnitrificación incompleta y la emisión de N_2O en condiciones limitadas de oxígeno (Tsutsui y col. 2013).

Como se observa en la figura 7.14, las concentraciones de óxido nitroso aumentaban con el avance de la fermentación y esta condición podría estar influida por el contenido de carbono disponible durante el proceso (Paul 2008). Las emisiones totales de los reactores fueron de 27 y 17 $gN_2O MgMF^{-1}$ para R1-50L y R2-50L, respectivamente. Dichos valores son considerablemente bajos a los descritos en el estudio reportado por Amlinger y col. (2008), donde se reporta los valores obtenidos para estiércol (163 $gN_2O MgMF^{-1}$), residuos de cocina (52 $gN_2O MgMF^{-1}$) y compostador de jardín (972 $gN_2O MgMF^{-1}$).

Adicionalmente, en el estudio realizado por Hellmann (1995), menciona que cuando la temperatura es demasiado alta, no se produce N_2O , porque las bacterias nitrificantes no pueden crecer bajo esta condición.

Estudios realizados por Schenk y col. (1997) reportan durante el comienzo de la fase termófila el máximo de emisión del N_2O . Si bien es cierto que los reactores estuvieron casi todo el tiempo de fermentación en termófilo, los valores más altos de la producción de N_2O se dieron en momentos donde la temperatura hacia la transición de mesófilo al termófilo y viceversa. Estas condiciones se presentaron al inicio del proceso, el día 9 y a partir del día 36, confirmando lo expuesto por He y col. (2000), que menciona que el N_2O puede producirse al inicio del proceso de fermentación y durante la fase de maduración.

7.4 Resumen

En el capítulo se estudió la fermentación en estado sólido en diferentes escalas y el impacto ambiental producto de la fermentación. Para ello se utilizaron reactores con volúmenes de 4.5 y 50 litros. Se usaron estos reactores en particular, pues su uso en compostaje había sido validado previamente.

Por problemas de análisis con el equipo soxhlet, las fermentaciones se llevaron a cabo con mezclas con contenido de grasa superior al recomendado en capítulos anteriores.

Las variables que se siguieron durante los ensayos fueron: temperatura, OUR, pH, materia seca, materia orgánica, cantidad de grasa, actividad lipolítica y porosidad.

Se observaron algunas limitaciones en los procesos fermentativos probablemente debido a la cantidad de grasa presente en la matriz.

En el reactor de 4.5 L, se observó una ralentización del proceso, aproximadamente a partir del día 7 de fermentación, esto podría explicarse debido a la carencia de nitrógeno en la matriz causada por la excesiva cantidad de grasa, por otro lado, la liberación y acumulación de AGCL favorecieron a mantener un pH ácido en el reactor; ambos factores fueron cruciales para la limitaciones que se produjeron.

Si bien es cierto que el proceso sufrió ralentización, las temperaturas eran altas, esta condición pudo ser causada debido a la inercia térmica de la matriz rica en grasa, que tiene la capacidad de retener calor.

Para los reactores de 50 litros, las reducciones en la cantidad de materia seca estuvieron por encima del 45%, y resultaron más altas en comparación con experimentos que tenían una cantidad de grasa similar. Asimismo, el pH permaneció en valores ácidos, esta condición se da cuando la cantidad de grasa es alta y ocurre la liberación de ácidos orgánicos que hacen descender el pH.

Pese a la ralentización del proceso, la reducción de grasa observada en el reactor de 4.5 litros fue mejor que la reportada en los reactores de 50 L.

La porosidad en los reactores de 50 L se mantuvo en niveles adecuados, se realizaron volteos para evitar la formación de aglomerados y por ende acumulación de AGCL. Adicionalmente, con el volteo se procuró que no haya gradientes de temperatura en la matriz, y también se favoreció la homogenización de nutrientes restantes, la humedad, y la porosidad del material.

Se presentaron valores bajos de la OUR, lo cual señalaba que la actividad microbiana había disminuido o se había visto inhibida, y con ello se explica la baja actividad enzimática reportada.

En cuanto al impacto ambiental, tanto el consumo energético como la tasa de consumo fueron altos, mientras que el índice respirométrico al final del proceso fue menor. El valor del RIE_{CE} fue alto, y teniendo en cuenta lo previamente mencionado se observa que el proceso no fue tan eficiente por la carga ambiental que representa desde el punto de vista de la estabilización lograda y los requisitos energéticos.

Las emisiones gaseosas de COVs reportadas fueron altas los primeros 10 días de proceso. Se emitió CH_4 al inicio de la digestión con la aparición de los primeros puntos termófilos; las emisiones de amoníaco, se produjeron durante los primeros 12 días del

proceso, por su parte, las emisiones de N_2O se observaron especialmente en los momentos donde la temperatura hacía la transición de mesófilo al termófilo y viceversa.

CAPÍTULO 8.

8. USOS POTENCIALES DE LAS LIPASAS PRODUCIDAS POR SSF EN BIODEGRADACION DE LÍPIDOS. ESTUDIO PRELIMINAR

8.1 Introducción

Como se ha visto en los capítulos anteriores, al realizar procesos de fermentación en estado sólido se obtienen sólidos fermentados con actividad enzimática. Estos sólidos se pueden considerar biocatalizadores con un uso potencial en la mejora de procesos ambientales. La aplicación de estos catalizadores puede incorporar ventajas, en lo que se refiere a la aceleración de los procesos de degradación biológica y en consecuencia a un mayor grado de estabilización de los residuos en un menor tiempo.

Entre las aplicaciones que podrían dársele a las lipasas obtenidas por SSF, se podría mencionar el tratamiento de aguas residuales con un alto contenido en grasas como la de las industrias lácteas, mataderos, refinerías de aceite vegetal, entre otras. Otro tratamiento posible sería su aplicación en digestión o codigestión anaerobia de residuos ricos en grasas donde la adición de lipasas permitiría tratar cargas más elevadas de residuo y obtener rendimientos más elevados de producción de biogás.

El objetivo de este capítulo, es evaluar el potencial de las lipasas obtenidas por SSF en la hidrólisis de compuestos lipídicos tanto en procesos aerobios como anaerobios.

8.2 Aplicaciones del catalizador en procesos aerobios

En primer lugar, para tener una primera idea del potencial del catalizador en tratamientos aerobios como el compostaje, se procedió a aplicarlo en un test respirométrico. Para ello se seleccionó un residuo rico en grasa (flotante) procedente del proceso de desarenado y desengrasado de una EDAR de una empresa de panadería y bollería industrial (Panrico S.A).

Se realizaron diferentes test respirométricos, donde se evaluó el potencial de biodegradabilidad del flotante. El catalizador obtenido es producto de la fermentación en estado sólido de la mezcla residuo de winterización y un lodo sin digerir deshidratado, descritos en el apartado 4.2. La mezcla de catalizador y flotante tenía una relación 1:3. Para el test respirométrico del flotante se utilizó un estructurante inerte que consiste en tiras de bayeta en trozos pequeños (25x10mm) en relación peso húmedo 1:10 (bayeta: muestra) (Ponsá 2010). Se adicionó este material por la baja porosidad y la alta humedad del material.

Las características del residuo a tratar, así como las del catalizador del proceso SSF y la mezcla, en proporción 1:3 p/p (flotante: catalizador) se presentan en la tabla 8.1.

Tabla 8.1 Caracterización inicial del sustrato

Parámetro	Flotante	Catalizador	Mezcla (flotante+catalizador)
Humedad (%)	77.35	51.28	59.65
Materia Orgánica (%)	94.77	75.77	80.49
Grasas (%)	48.30	-	-
Actividad (UA g ⁻¹ MS)	-	17.5	-

El test respirométrico está estandarizado para utilizar la misma cantidad de muestras, y por este motivo, y dado el bajo contenido en materia seca del flotante, se utilizaron cantidades totales diferentes de flotante en los experimentos. En la mezcla catalizador y flotantes, se utilizaron aproximadamente 5 g de materia orgánica de flotante, mientras que en la respirometría del flotante se utilizó 31 g de materia orgánica. Por este motivo, comparar las velocidades máximas de consumo de oxígeno de los diferentes ensayos es complicado. Sin embargo, sí es comparable el consumo acumulado de oxígeno en el tiempo, en este caso la opción para poder hacerlo fue mediante la evaluación de los consumos acumulados a 4 días (AT_4) y a tiempo final de ensayo ($AT_{\text{último}}$). Se ha utilizado este indicador a 4 días ya que es el habitual en respirometría para muestras sólidas (Ponsá y col. 2010; Barrena y col. 2011). En las figuras 8.1 y 8.2 se presentan los gráficos de consumo acumulado tanto para 4 días como para el tiempo final de análisis que fue de aproximadamente 15 días. Para comparar mejor los resultados en las figuras 8.1 y 8.2 se han utilizado dos escalas diferentes en los ejes, una para el catalizador y la mezcla catalizador+flotante, y la otra para el flotante solamente.

En primer lugar, resulta evidente que hay una diferencia importante en el arranque de los test respirométricos. Se observa una fase de latencia superior en la respirometría de flotantes, ya que al ser un residuo rico en grasas se hace más difícil de degradar, y por ende causa el retardo en la actividad biológica y es necesario un periodo de aclimatación para los microorganismos. En cambio la fase de latencia para la mezcla catalizador y flotantes es prácticamente nula, por lo que la adición del catalizador tiene

un efecto positivo en este sentido, aunque podría deberse tanto por la acción de las lipasas como por hecho de aportar microorganismos adaptados a la degradación de grasas con el catalizador.

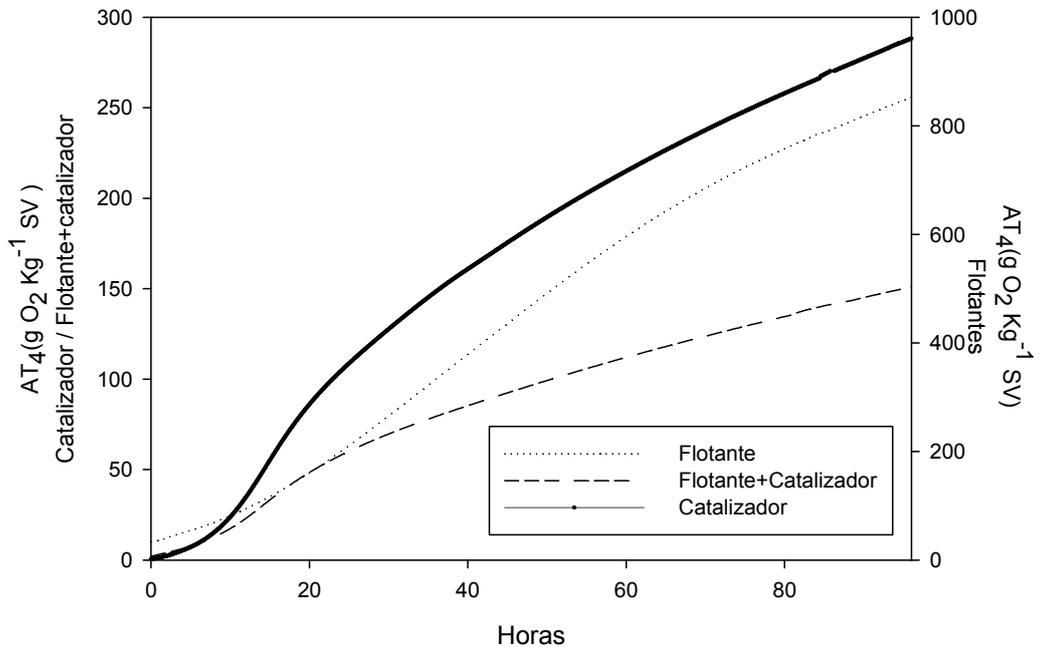


Figura 8.1 Consumo acumulado a 4 días

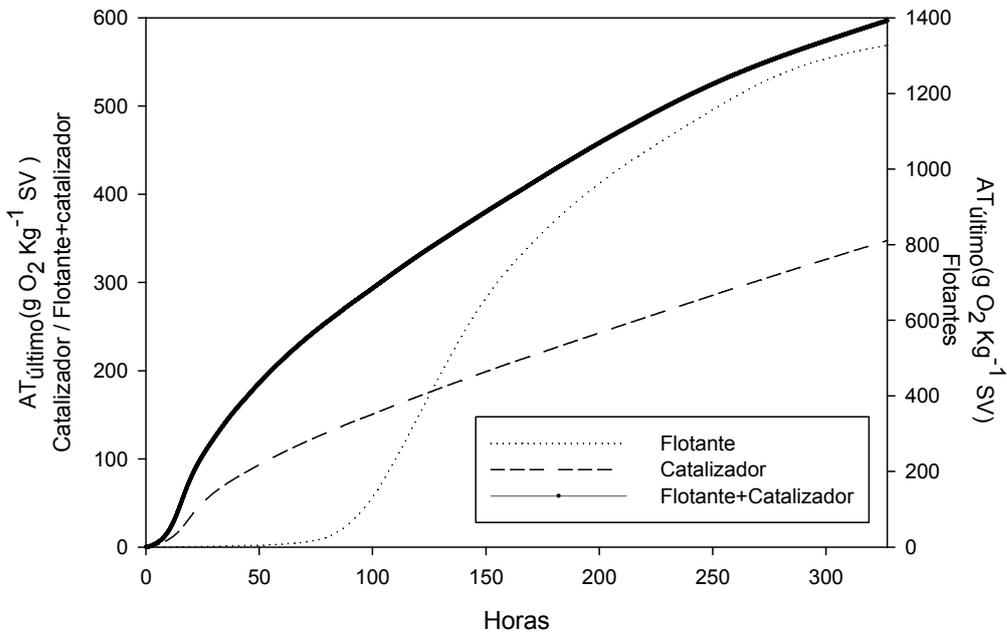


Figura 8.2 Consumo acumulado a tiempo final

A partir de los valores obtenidos para el AT_4 y el $AT_{\text{último}}$ puede calcularse el oxígeno consumido teóricamente de cada uno de los substratos, según la cantidad presente en la muestra catalizador + flotante. De esta forma, se puede calcular el valor de consumo de oxígeno teórico de la mezcla flotante+catalizador sin tener en cuenta el posible efecto de las enzimas lipolíticas. En la Tabla 8.2 se muestran los g de oxígeno consumidos teóricamente según las respirometrías del flotante y el catalizador únicamente y los g de oxígeno reales obtenidos en la respirometría flotante+catalizador

Tabla 8.2 Cantidad de oxígeno consumido real y teóricamente en 4 días y a tiempo último

	g O₂ consumidos en 4 días	g O₂ consumidos a tiempo último
Teóricos	6.6	11.5
Reales	8.0	16.5

Si se comparan los valores obtenidos experimentalmente con el valor teórico, se observa un incremento en el consumo de oxígeno que podría estar relacionado con el efecto de las lipasas. El consumo teórico de oxígeno de los flotantes y el catalizador es inferior al obtenido experimentalmente, lo que indica que se ha producido una degradación superior a la esperada teóricamente y que podría estar relacionada con una aceleración de la hidrólisis de las grasas presentes en la mezcla.

Aunque sería necesaria más investigación en esta línea, los resultados obtenidos parecen indicar que la adición del catalizador podría ser una combinación favorable en el tratamiento de residuos grasos, pues ayudaría a maximizar la actividad biológica, lo que se traduciría en una estabilización más rápida del residuo. Sin embargo, para confirmar los resultados sería importante realizar las respirometrías con la misma cantidad de flotante y en escalas mayores.

8.3 Aplicaciones del catalizador en procesos anaerobios

Para evaluar el efecto de la enzima lipolítica producida por SSF, se hicieron pruebas en digestión anaerobia en discontinuo siguiendo una modificación del protocolo GB21 (Ponsá 2010) tal como se describe en la sección 3.7 de esta tesis. Se utilizaron dos tipos de substratos con un contenido en grasa elevado. Por una parte los flotantes utilizados en los experimentos aerobios descritos en la sección anterior; y por otra se optó por emplear un residuo generado más ampliamente como sería un lodo de

EDAR, que aunque no tan elevado, contiene un porcentaje en grasa nada despreciable (Long y col. 2012).

8.3.1 Efecto de la lipasa producida por SSF en digestión anaerobia de flotantes de EDAR.

Para esta serie de ensayos el inóculo procedía de un digester anaerobio que trata fracción orgánica de residuos municipales del Ecoparc II de Montcada i Reixac, Barcelona, mientras el flotante es el descrito en el apartado 8.2.

Durante la primera serie de ensayos se utilizó un catalizador estable, denominado de esta manera pues corresponde al catalizador obtenido al final de la fermentación (E). La relación para la digestión fue 1:4 inóculo: muestra (base seca) descrita en el apartado 3.7.2. El tratamiento que se le dio al inóculo anaeróbico, las botellas que se utilizaron como reactores y el procedimiento para el análisis del biogás, se describen en el apartado 3.7. La caracterización del inóculo, el flotante y los catalizadores usados se presenta en la tabla 8.3.

Tabla 8.3 Caracterización inicial del inóculo, el lodo y el catalizador utilizado

Parámetro	Inóculo	Lodo	Catalizador estable
Humedad (%)	98.59	97.94	51.28
Materia Orgánica	64.74	79.12	75.77
Actividad (UA g ⁻¹)			17.5

Debido a la información previamente analizada en el proceso aerobio, se realizó un ajuste para determinar la tasa máxima de producción de metano y la fase de latencia del proceso usando la ecuación 8.1 que corresponde al modelo de Gompertz modificado (Ponsá y col. 2011).

$$M = P \times e \left\{ -e \left[\frac{R_{\max} \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Ecuación 8.1})$$

Donde

M: Producción acumulada de biogás (L_{biogás} kg⁻¹ SV)

P: Potencial máximo de biogás (L_{biogás} kg⁻¹ SV)

T: tiempo (días)

R_{max} : Velocidad máxima de producción de biogás ($L_{biogás} \text{ kg}^{-1} \text{ SV día}^{-1}$)

λ : fase de latencia (días)

Los resultados del test de biogás y el ajuste realizado para el ensayo con flotantes usando el modelo de Gompertz se presentan en la figura 8.3.

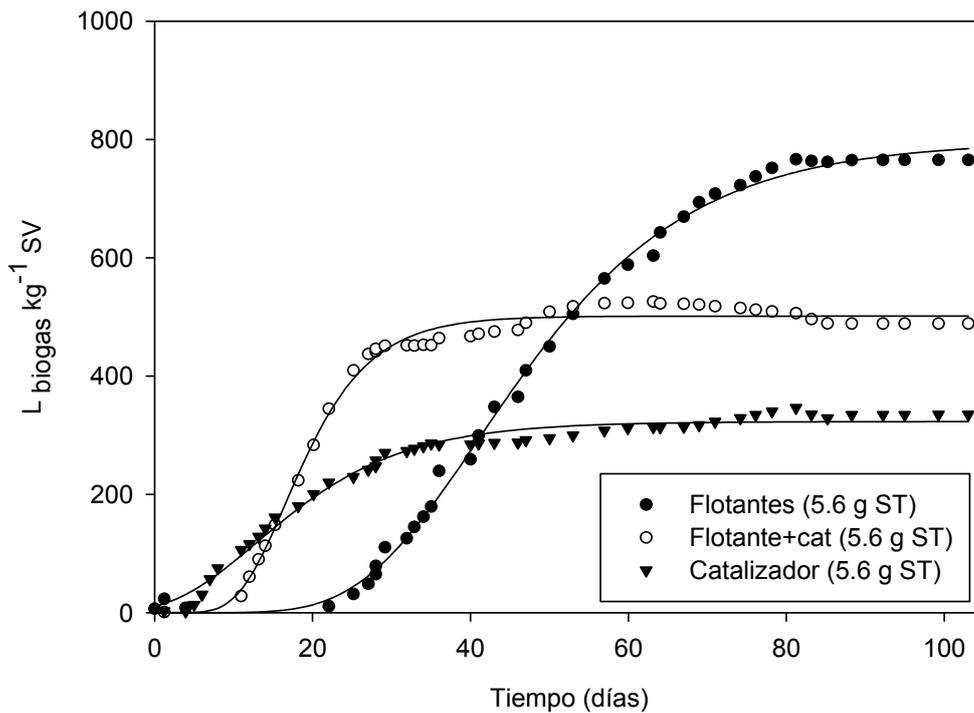


Figura 8.3 Evolución de la producción de biogás y ajuste con el modelo Gompertz para los diferentes ensayos

Es importante mencionar que las curvas en el gráfico representan los mismos gramos en sólidos totales para cada ensayo (5.6 g ST), sin embargo la cantidad de flotantes en el ensayo que corresponde a la mezcla flotante+catalizador son menores al ensayo que solo tiene flotantes, razón por la que se observa la marcada diferencia en la producción de biogás.

En la figura 8.3, se observa el mismo periodo de aclimatación de los microorganismos que durante el proceso aerobio. Indudablemente la gran cantidad de grasa presente en la muestra de flotantes, hace que el proceso de digestión exhiba una fase de latencia importante. Sin embargo, de la misma forma que en el proceso aerobio, se observa la influencia positiva del catalizador en la disminución de esta fase. En este sentido, sería necesario descartar los posibles efectos causados por: 1) la sinergia de

la mezcla flotante+catalizador que podría ser considerada una codigestión de ambos materiales, 2) el efecto de bioaumentación por los microorganismos presentes en el sólido fermentado o, 3) el efecto bioestimulante por el uso del sólido fermentado que podría estar adicionando nutrientes que conseguirían ayudar o estimular la digestión.

A pesar del largo tiempo de arranque, los resultados obtenidos a continuación muestran que el proceso se desarrolla con normalidad, y con una producción de biogás importante que dura hasta los 80 días de ensayo. También es interesante resaltar como entre el día 40 y 80, la curva de la mezcla flotante+catalizador presenta un cambio en la tendencia. Esto podría obedecer a la presencia de compuestos difíciles de degradar, seguramente presentes en el catalizador. Pasado este periodo, vuelve a presentar la asíntota que indica la finalización.

En la tabla 8.4 se muestran los resultados del ajuste Gompertz para las curvas de producción de biogás del test realizado.

Tabla 8.4 Resultados del ajuste con Gompertz para la primera serie de experimentos con flotantes

Variable	Flotante	Flotante + Catalizador
Potencial máximo de biogás P ($L_{\text{biogás}} \text{ kg}^{-1} \text{ SV}$)	796.7 ± 7.5	501.3 ± 3.2
Velocidad máxima de producción de biogás R_{max} ($L_{\text{biogás}} \text{ kg}^{-1} \text{ SV día}^{-1}$)	19.7 ± 0.5	30.8 ± 1.3
Fase de latencia λ (días)	26.1 ± 0.4	10.6 ± 0.4
R^2	0.998	0.994

Es interesante observar como la velocidad máxima de producción de biogás es más elevada en la mezcla flotante y catalizador, hecho que podría estar relacionado con la acción del catalizador al hidrolizar los lípidos (Donoso-Bravo y Fdz-Polanco, 2013). Además, se observa una reducción importante en la fase de latencia para la mezcla con flotantes que es de 11 días, mientras que para el flotante es de 26 días.

En la tabla 8.5 se muestra el resultado del test GB21, expresado tanto en L de biogás por Kg de SV del ensayo, como haciéndolo exclusivamente sobre la cantidad de flotante estudiada para poder comparar los resultados.

Tabla 8.5 Potenciales de biogás con el test GB₂₁

Muestra	L biogás kg ⁻¹ SV)	L biogás kg ⁻¹ SV flotante)	Cantidad de flotante g ST	Cantidad de catalizador g ST
Flotante	565.0 ± 24.8	565.0 ± 24.8	5.16	
Flotante+ Catalizador	451.4 ± 6.3	621.8 ± 11.9	2.58	2.58
Catalizador	241.8 ± 15.6	-		5.16

Los resultados indican que la producción de biogás es mayor cuando el flotante se digiere junto con el catalizador, adicionalmente teniendo en cuenta la información de la tabla 8.4, donde se observa que la mezcla flotante+catalizador presenta una mayor velocidad de degradación, y una disminución en la fase de latencia, esto puede deberse a que existe un efecto positivo de la digestión relacionado con la acción de las lipasas.

8.3.2 Efecto de la lipasa producida por SSF en digestión anaerobia de lodos de depuradora

Los largos tiempos de ensayo obtenidos en los experimentos con flotantes, plantearon la opción de aplicar un catalizador en lodos de estación depuradora de aguas residuales (EDAR), que contienen grasa aunque en menor cantidad que los flotantes, pero donde la digestión anaerobia está ampliamente implantada y estudiada.

Para la primera y segunda serie, el inóculo anaerobio y el lodo (L) utilizados para la digestión se recogieron de la EDAR de Sabadell. Adicionalmente, durante la primera serie se utilizaron dos catalizadores, denominados termófilo y estable, mientras que en la segunda serie solo se utilizó el catalizador termófilo. La caracterización del lodo, el inóculo y de los catalizadores se presenta en la tabla 8.6.

Tabla 8.6 Caracterización del inóculo y el lodo para digestión anaerobia

Parámetro	Inóculo	Lodo	Catalizador termófilo	Catalizador estable
Humedad (%)	98.59	97.94	55.89	50.02
Materia Orgánica	64.74	79.12	78.07	75.92
Actividad (UAg ⁻¹ MS)			65.3	32.3

En primer lugar, además de aplicar directamente el catalizador en los ensayos de digestión anaerobia se planteó la posibilidad de utilizar el catalizador en un pretratamiento enzimático, con el objetivo de aumentar la velocidad de la hidrólisis del proceso, y por ende mejorando la digestión (Yang y col. 2010). Para ello, se realizaron incubaciones del residuo a tratar así como del residuo más el catalizador estable (E) y termófilo (T). Para diferenciar las muestras que se les había aplicado el pretratamiento, de las que no, se le adicionó a los nombres de las mezclas la letra P (pretratamiento). Adicionalmente, durante la prueba se analizó la variación en el ratio inóculo: muestra para las botellas correspondientes a los catalizadores. En estos casos los ratios fueron 1:6 y 1:5 para el catalizador termófilo (T) y catalizador estable (E), respectivamente. A la nomenclatura para cada una de estas modificaciones se les agregó la letra R.

Con el fin de aportar más claridad acerca de los componentes del experimento y de facilitar la comprensión de la tabla 8.7 que muestra los resultados de producción de biogás durante la digestión, se hace una breve descripción de cada uno de los ensayos con su respectiva denominación:

- Lodo sin pretratar (L): Lodo proveniente de EDAR que no ha sido sometido a ningún pretratamiento de hidrólisis antes del ensayo.
- Lodo pretratado (LP): Lodo que ha sido sometido a una prehidrólisis antes de la digestión.
- Lodo + catalizador termófilo, sin pretratar (LT): mezcla del lodo con el catalizador termófilo sin la hidrólisis previa a la digestión.
- Lodo + catalizador termófilo, pretratado (LTP): mezcla del lodo con el catalizador termófilo pasada la hidrólisis previa a la digestión.
- Lodo + catalizador estable, sin pretratar (LE): mezcla del lodo con el catalizador estable sin la hidrólisis previa.
- Lodo + catalizador estable pretratado (LEP): mezcla del lodo con el catalizador estable una vez efectuado el tratamiento de prehidrólisis.
- Catalizador termófilo (T): Catalizador denominado de esta manera pues es obtenido en el primer punto termófilo de la SSF.
- Catalizador termófilo con ratio modificado (TR): catalizador termófilo al que se le ha modificado el ratio inóculo: muestra definido para la digestión.

- Catalizador estable (E): catalizador obtenido al final de la SSF.
- Catalizador estable con ratio modificado (ER): catalizador estable con el ratio definido para el test modificado.

La prueba estadística que se utilizó para la comparación de las diferentes mezclas fue ANOVA. Los resultados durante la prueba ANOVA indicaron que existían diferencias significativas entre los grupos analizados. Para poder hacer una comparación entre las parejas de resultados, se utilizó el método Holm-Siday. El nivel de confianza fue del 95%. Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo con Sigmaplot 11.

Los resultados de producción de biogás durante el ensayo se presentan en la tabla 8.7

Tabla 8.7 Producción de biogás obtenida durante los ensayos utilizando el biocatalizador obtenido en SSF

Mezcla	Nomenclatura	L biogas kg ⁻¹ ST alimentado	L biogas L ⁻¹ reactor	L biogas kg ST ⁻¹ Lodo
Lodo sin pretratar	L	202 ^{a,d}	0.58 ^{g,h}	202 ^m
Lodo pretratado	LP	232 ^{a,c}	0.67 ^{g,k}	232 ^{m,o}
Lodo + catalizador termófilo, sin pretratar	LT	282 ^c	0.84 ⁱ	484 ⁿ
Lodo + catalizador termófilo, pretratado	LTP	263 ^c	0.79 ^{i,k}	422 ^{n,o}
Lodo + catalizador estable, sin pretratar	LE	138 ^e	0.41 ^j	383 ^{m,n,o}
Lodo + catalizador estable pretratado	LEP	157 ^{a,d,e}	0.47 ^{h,j}	455 ⁿ
Catalizador termófilo	T	262 ^c	0.75 ^{i,k}	-
Catalizador termófilo con ratio modificado	TR	197 ^{a,d}	0.41 ^j	-
Catalizador estable	E	29 ^b	0.08 ^l	-
Catalizador estable con ratio modificado	ER	47 ^b	0.10 ^l	-

Los valores seguidos con superíndices diferentes (a-o) son estadísticamente diferentes. Se han comparado los valores de cada columna entre sí. No se han comparado los valores entre columnas.

Cuando se quiere optimizar procesos de digestión anaerobia, la realización de pretratamientos, como romper por medio de calor la membrana y los enlaces de la célula para lograr solubilizar los componentes de la células resultan una buena opción (Appels y col. 2008). Al observar la tabla 8.7, el realizar un pretratamiento enzimático antes de la digestión, no representó diferencias significativas en la producción de biogás por sólido total alimentado, como es el caso de los pares de botellas que contenían sólo lodo y las que tenían la mezcla de lodo y catalizador. Por tanto, se descarta la realización del pretratamiento.

Por otra parte, si se analizan los rendimientos encontrados para el biogás por kg de lodo alimentado, las producciones de las mezclas con los catalizadores termófilo y estable, representan más del 50% que el control. Esto implica que la acción del catalizador en la producción es positiva.

Los resultados del test de biogás y el ajuste realizado para el ensayo de las muestras de lodo y de la mezcla lodo con catalizador termófilo, se presentan en la figura 8.4, y los resultados producto del ajuste de Gompertz para estos experimentos se presentan en la tabla 8.8.

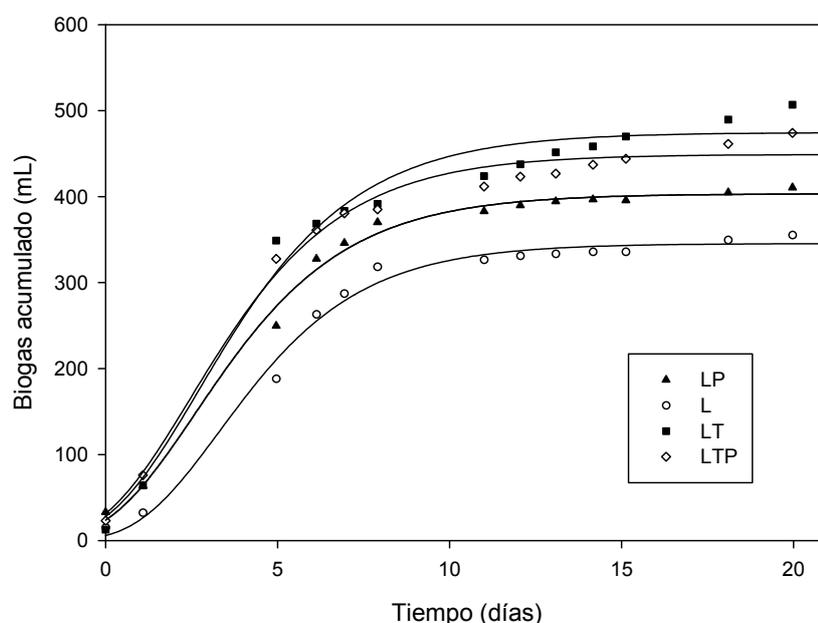


Figura 8.4 Evolución de la producción de biogás para las muestras de Lodos y lodo+catalizador termófilo y ajuste con el modelo Gompertz

Soportados en la figura 8.4 y en la tabla 8.8, se podría afirmar que la población microbiana de las mezclas no necesitaba una etapa de aclimatación previo, pues la etapa de latencia que presentan los ensayos no es muy larga como para que diera indicio de alguna inhibición durante el proceso. Adicionalmente, los resultados del ajuste en la tabla 8.8, vuelven a poner de manifiesto que el pretratamiento no tiene efecto en los resultados, tal y como se aprecia al comparar los valores de P , R_{max} y λ . Sin embargo se constata un efecto positivo de la presencia del catalizador obteniéndose mayores velocidades máximas de producción y potencial máximo de biogás. Este efecto podría ser debido a las lipasas contenidas en el catalizador. Sin embargo, también podría ser el efecto resultante de la sinergia de la mezcla lodo – sólidos fermentados en un proceso de codigestión.

Tabla 8.8 Resultados del ajuste con Gompertz para los experimentos con lodos

Variable	Lodo pretratado	Lodo sin pretratar	Lodo + catalizador termófilo, sin pretratar	Lodo + catalizador termófilo, pretratado
Potencial máximo de biogás P ($L_{biogás} \text{ kg}^{-1} \text{ SV}$)	403.4± 4.1	345.5± 4.6	474.7± 9.9	449.2± 6.7
Velocidad máxima de producción de biogás R_{max} ($L_{biogás} \text{ kg}^{-1} \text{ SV día}^{-1}$)	59.1± 3.0	53.9± 4.2	67.3± 6.8	65.7±4.8
Fase de latencia λ (días)	0.1 ± 0.2	1.0± 0.3	0.1± 0.4	-
R^2	0.994	0.992	0.979	0.988

Para asegurar que el efecto positivo observado en la producción de biogás se debía exclusivamente a la acción de las lipasas del sólido catalizado se planificó otro experimento donde el objetivo era comparar el catalizador con y sin enzima activa.

En esta serie, los ensayos se realizaron bajo las siguientes condiciones: desnaturalizando el catalizador, sin la realización del pretratamiento previo y con el catalizador termófilo (T). Éste había sido conservado en congelador y en ese momento presentó una actividad enzimática inferior que en el momento de realizar el otro experimento, 33.49 UAg^{-1}MS frente a los 65 UAg^{-1}MS iniciales. El catalizador se desnaturalizó mediante autoclavado a 135°C durante 40 min y se comprobó que no

había actividad en el sólido mediante el correspondiente análisis. Para diferenciar las muestras desnaturalizadas se añadió al nombre del catalizador la letra D.

Al igual que el experimento anterior para aportar más claridad y facilidad en la interpretación de la tabla 8.9, se hace una breve descripción de cada uno de los ensayos con su respectiva denominación.

- Lodo (L): Lodo proveniente de EDAR.
- Lodo + catalizador termófilo (LT): mezcla del lodo con el catalizador termófilo.
- Lodo + catalizador termófilo, desnaturalizado (LTD): mezcla del lodo con el catalizador termófilo sometido a desnaturalización con autoclavado.
- Catalizador termófilo (T): Catalizador denominado de esta manera pues es obtenido en el primer punto termófilo de la SSF.
- Catalizador termófilo desnaturalizado (TD): catalizador termófilo que ha sido desnaturalizado con autoclavado.

Los resultados obtenidos durante la evaluación con ANOVA, dieron como resultado que no hubo diferencias estadísticas entre los valores de producción de biogás por kg de sólido total alimentado ni por kg de sólido total de lodo.

La producción de biogás durante el ensayo se presenta en la tabla 8.9.

Tabla 8.9 Producción de biogás obtenida durante los ensayos utilizando el biocatalizador desnaturalizado

Mezcla	Nomenclatura	L biogas kg ⁻¹ ST alimentado	L biogas L ⁻¹ reactor	L biogas kg ⁻¹ ST Lodo
Lodo	L	222	1.2 ^{a,b}	222
Lodo+ catalizador termófilo	LT	236	1.2 ^a	153
Lodo+ catalizador termófilo desnaturalizado	LTD	253	1.3 ^a	217
Catalizador termófilo	T	304	0.9 ^{b,c}	
Catalizador termófilo desnaturalizado	TD	282	0.8 ^c	

Al observar la información reportada en la tabla, se observan producciones de biogás similares, de las mezclas con y sin el catalizador desnaturalizado, y la del lodo en ambos experimentos (entre 202 y 232 L biogás Kg⁻¹ ST lodo). Con este experimento se podría afirmar que la presencia del catalizador no está incidiendo en la hidrólisis de manera significativa. Los resultados permiten observar que no se repite el efecto positivo por la presencia del catalizador, efecto que si había estado presente en el experimento previo. Una hipótesis para este resultado podría ser causado por la pérdida paulatina de la actividad del catalizador, ya que ha pasado un tiempo considerable (2 meses) desde el momento en que ha sido extraído hasta su potencial uso. Sin embargo, con este experimento se descartan los posibles efectos por la sinergia de la mezcla lodo+sólidos fermentados, la posible bioaumentación ó bioestimulación, ya que si alguno de estos supuestos se hubiese cumplido se habría tenido que observar un incremento de biogás similar al experimento anterior.

8.4 Resumen

El capítulo previamente descrito se centra en la aplicación de lipasas obtenidas por SSF, y la evaluación de su potencial en la hidrólisis de grasas en procesos aerobios y anaerobios.

Durante la aplicación aerobia de residuos con altos contenidos de grasas, se observó la aceleración de la hidrólisis de las grasas, reflejado en los consumos de oxígeno debido a la maximización de la actividad biológica.

Para la aplicación anaerobia, se realizó en los mismos residuos utilizados en los procesos aerobios y en lodos de EDAR, los cuales se caracterizan por ser residuos que se generan en gran cantidad y contienen cantidades importantes de grasa. De estas pruebas se observan disminuciones en las fases de latencia, y velocidades más elevadas de producción de biogás, que pueden deberse a la acción del catalizador en la hidrólisis de los lípidos.

Para descartar los efectos de la mezcla lodo+sólidos fermentados en el proceso de digestión se realizó un experimento con el catalizador en condiciones donde la enzima era activa y en la otra no por la acción de una desnaturalización. Los resultados no fueron concluyentes pues el catalizador posiblemente había perdido su actividad.

CAPÍTULO 9.

9. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas del trabajo de investigación son las siguientes:

- Se ha verificado que evidentemente la fermentación en estado sólido es una muy buena alternativa para reducir la contaminación y para aprovechar algunos residuos agroindustriales como los procedentes de la industria del refinado de aceites vegetales. A través de la fermentación en estado sólido se pudo obtener lipasas termoestables que son un producto de alta utilidad y que ofrecen ventajas al ser usadas en procesos ambientales.
- Se caracterizó el residuo con alto contenido de grasa, y se evaluó para su utilización en fermentaciones en estado sólido para la producción de lipasas.
- Se ha hecho una recopilación bibliográfica, donde se describe que la mayoría de los ensayos para la obtención de lipasas por SSF, se han realizado principalmente a escala de laboratorio con pequeñas cantidades de sustrato. En este trabajo se realizaron fermentaciones utilizando reactores previamente acondicionados, y se utilizaron mayores cantidades de sustrato, lo que podría ser un gran aporte para abordar la producción de enzimas a mayor escala.
- Se optimizaron algunas condiciones para la fermentación, tales como las cantidades de sustrato y cosustrato de la mezcla. Así mismo, el material que se utilizará como cosustrato, compensará las deficiencias del material que actúa como sustrato (residuo con alto contenido de grasa).
- Se observó que para disminuir problemas causados por limitaciones o ralentizaciones del proceso fermentativo, la mezcla de fermentación debe tener un contenido de grasa que no supere el 20%.
- Se determinaron las propiedades físicas de la matriz para realizar la fermentación en estado sólido; entre ellas humedad, materia orgánica, porosidad, pH, etc. Estas propiedades serán importantes si se quiere comprobar la efectividad del proceso fermentativo.
- Se utilizaron técnicas respirométricas como herramienta para conocer la actividad biológica del proceso. Se precisó el potencial de biodegradabilidad de

la matriz de fermentación, y se observó la diferencia del potencial en función de las características de la mezcla realizada.

- Se realizó el seguimiento de la evolución de la matriz durante el proceso de fermentación, y se estableció su cinética de degradación por medio de ajustes matemáticos que facilitan el control del proceso.
- Se logró desarrollar y optimizar las condiciones de extracción para muestras líquidas. Sin embargo, por consideraciones de tipo práctico y económico resulta más eficiente utilizar los sólidos fermentados como biocatalizadores, actuando como soportes naturales para la enzima.
- Se efectuó la caracterización de la enzima extraída y se determinaron los efectos en la estabilidad, derivados del pH y de la temperatura, resultando una enzima con propiedades prometedoras.
- Se realizó una comparación de las fermentaciones en reactores de 4.5 L. La información obtenida se utilizó como referencia para la realización de nuevas fermentaciones y como punto de partida del estudio con reactores de 50 L.
- Se analizó el impacto ambiental por las emisiones del proceso de SSF del residuo proveniente de la industria de producción y refinado de aceites vegetales, de allí se pudo concluir:
 1. Las emisiones que se emitieron de N_2O fueron bajas, debido a las altas temperaturas que se mantienen durante el proceso fermentativo.
 2. A pesar de los valores bajos en la emisión de N_2O , se puede producir cantidades aceptables de CH_4 , esto, debido al comportamiento inverso que se observa en estos dos gases bajo condiciones de altas temperaturas.
 3. Por el tipo de residuo utilizado (que contiene bajo nitrógeno y alto carbono) más el pH ácido, las emisiones por NH_3 pueden ser prácticamente despreciables durante el proceso.
 4. Es importante realizar seguimiento e identificación de las emisiones de COVs, para determinar el grado de peligrosidad por las emisiones derivadas de éste.
 5. Si las emisiones de COVs son muy altas, sería necesario añadir un sistema de biofiltración, para controlar las emisiones de estos compuestos.

- Se aplicó el sólido fermentado como catalizador para mejorar la hidrólisis de las grasas en procesos de digestión anaerobia de residuos con un contenido elevado de grasa, obteniéndose menores fases de latencia, mayor velocidad de producción de biogás y mayor producción por kg de residuo rico en grasa alimentado.

TRABAJO ACTUAL Y FUTURO

Algunos aspectos que complementan esta investigación que podrían ser tratados a futuro son:

1. Realización de una nueva réplica de la fermentación con el reactor de 50 L, para comprobar y mejorar los resultados obtenidos.
2. Identificación y cuantificación detallada de los compuestos orgánicos volátiles que se producen durante la fermentación.
3. Utilización de técnicas más avanzadas para la identificación de las enzimas en muestras sólidas, debido a que las que se ha utilizado están basadas en muestras líquidas.
4. Identificación y caracterización microbiológica y molecular de los microorganismos productores de las lipasas obtenidas por SSF.
5. Realización de ensayos bioquímicos para la detección de otras enzimas u otros microorganismos producidos durante la fermentación por SSF de los residuos de la industria de producción y refinado de aceites vegetales.
6. Aplicación de las lipasas obtenidas y búsqueda de nuevas alternativas para la producción de biocombustibles.

CAPÍTULO 10.

10. BIBLIOGRAFIA

- Açikel, Ü., Erşan, M., Sağ Açikel, Y., 2010. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. Food and Bioproducts Processing, 88(1), pp.31-39.
- Adani, F., Ubbiali, C., Generini, P., 2006. The determination of biological stability of composts using the Dynamic Respiration Index: The results of experience after two years. Waste Management, 26(1), pp.41-48.
- Aloulou, A., Puccinelli, D., De Caro, A., Leblond, Y., Carrière, F., 2007. A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular and Cell Biology of Lipids, 1771(12), pp.1446-1456.
- Amlinger, F., Peyr, S., Cuhls, C., 2008. Green house gas emissions from composting and mechanical biological treatment. Waste Management and Research, 26(1), pp.47-60.
- Annan, J.S., White, R.K., 1998. Evaluation of techniques for measuring air-filled porosity in compost of municipal biosolid and wood chips. Athens, Georgia, pp. 88-96.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. Progress in Energy and Combustion Science, 34(6), pp.755-781.
- Awan, U.F., Shafiq, K., Mirza, S., Ali, S., Rehman, A., Haq, I., 2003. Mineral Constituents of Culture Medium for Lipase Production by *Rhizopus oligosporous* Fermentation. Asian Journal of Plant Sciences, 2(12), pp.913-915.
- Baeta-Hall, L., Céu Sàágua, M., Bartolomeu, M.L., Anselmo A.M., Rosa, M.F., 2005. Bio-degradation of olive oil husks in composting aerated piles. Bioresource Technology, 96(1), pp.69-78.
- Barrena, R., Turet, J., Busquets, A., Farrés, M., Font, X., Sánchez, A., 2011. Respirometric screening of several types of manure and mixtures intended for composting. Bioresource Technology, 102(2), pp.1367-1377.

- Barrena, R., 2006. *Compostaje de residuos orgánicos. Aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento de proceso*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Barrena, R., Canovas, C., Sánchez, A., 2006. Prediction of temperature and thermal inertia effect in the maturation stage and stockpiling of a large composting mass. *Waste Management*, 26(9), pp.953-959.
- Benjamin, S., Pandey, A., 1997. Coconut cake a potent substrate for the production of lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation. *Acta Biotechnologica*, 17(3), pp.241-251.
- Benjamin, S., Pandey, A., 1998. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14(12), pp.1069-1087.
- Beys da Silva, W.O., Mitidieri, S., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 40(1), pp.321-326.
- Botella, C., Ory, de I., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A., 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, 26(2-3), pp.100-106.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248-254.
- BRENDA, 2013. Enzyme Database-BRENDA. <http://www.brenda-enzymes.org/>. [Accedido diciembre, 2012].
- Cadena, E., 2009. Environmental impact analysis at full-scale OFMSW biological treatment plants. Focus on gaseous emissions. Tesis doctoral. Barcelona, Spain: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Casco, J.M., 2008. *Compostaje*. Mundi-Prensa Libros.
- Cavalcanti, E.A.C., Gutarra, M.L.E, Freire, D.M.G., Castilho, L., dos R., Sant'Anna Júnior, G.L., 2005. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(spe), pp.79-84.

- Cegarra, J., Alburquerque, J.A., González, J., Tortosa, G., Chaw, D., 2006. Effects of the forced ventilation on composting of a solid olive-mill by-product («alperujo») managed by mechanical turning. *Waste Management*, 26(12), pp.1377-1383.
- Chaturvedi, M., Singh, M., Man, C. R., Pandey, S., 2010. Lipase production from *Bacillus subtilis* MTCC 6808 by solid state fermentation using ground nut oil cake as substrate. *Research Journal of Microbiology*, 5(8), pp.725-730.
- Cirne, D.G., Björnsson, L., Alves, M., Mattiasson, B., 2006. Effects of bioaugmentation by an anaerobic lipolytic bacterium on anaerobic digestion of lipid-rich waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(11), pp.1745-1752.
- Colla, L.M., Rizzardi, J., Pinto, M.H., Reinehr, C.O., Bertolin, T.E., Costa, J.A.V., 2010. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*, 101(21), pp.8308-8314.
- Colón, J., Cadena, E., Pognani, M., Barrena, R., Sánchez, A., Font, X., 2012. Determination of the energy and environmental burdens associated with the biological treatment of source-separated Municipal Solid Wastes. *Energy and Environmental Science*, 5(2), pp.5731-5741.
- Contesini, F.J., Lopes, D.B., Macedo, G.A., Nascimento, M. da G., Carvalho, P. de O., 2010. *Aspergillus sp.* lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67(3–4), pp.163-171.
- Cordova, J., Nemmaoui, M., Ismaïli-Alaoui, M., Morin, A., Roussos, S., Raimbault, M., 1998. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5(1-4), pp.75-78.
- Costa, J.C., Barbosa, S.G., Alves, M.M., Sousa, D.Z., 2012. Thermochemical pre- and biological co-treatments to improve hydrolysis and methane production from poultry litter. *Bioresource Technology*, 111, pp.141-147.
- Couto, S.R., Sanromán, M.Á., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry. A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), pp.291-302.
- Cuhls, C., 2001. Schadstoffbilanzierung und Emissionsminderung bei der mechanisch-biologischen Abfallbehandlung, ISAH, Inst. für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Univ. Hannover.

- Da Rós, P.C.M., Silva, G.A.M., Mendes, A.A., Santos, J.C., de Castro, H.F., 2010. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 101(14), pp.5508-5516.
- Damasceno, F.R.C., Cammarota, M.C., Freire, D.M.G, 2012. The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, pp.241-246.
- Delorme, V., Dhoub, R., Canaan, S., Fotiadu, F., Carrière, F., Cavalier, J.F., 2011. Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition. *Pharmaceutical research*, 28(8), pp.1831-1842.
- Donoso-Bravo, A., Fdz-Polanco, M., 2013. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and grease trap: Assessment of enzyme addition. *Process Biochemistry*, 48(5–6), pp.936-940.
- Dossat, V., Combes, D., Marty, A., 2002. Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process. *Journal of Biotechnology*, 97(2), pp.117-124.
- Duran, M., Tepe, N., Yurtsever, D., Punzi, V.L., Bruno, C., Mehta, R.J., 2006. Bioaugmenting anaerobic digestion of biosolids with selected strains of *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Actinomyces* species for increased methanogenesis and odor control. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(4), pp.960-966.
- Durand, A., 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), pp.113-125.
- Edwinoliver, N.G., Thirunavukarasu, K., Naidu, R.B., Gowthaman, M.K., Kambe, T.N., Kamini, N.R., 2010. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. *Bioresource Technology*, 101(17), pp.6791-6796.
- Elibol, M., Ozer, D., 2000. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, 36(4), pp.325-329.
- Federal Government of Germany, 2001. Ordinance on Environmentally Compatible Storage of Waste from Human Settlements and on Biological Waste-Treatment

Facilities, Disponible en http://www.bmu.de/fileadmin/bmu-import/files/pdfs/allgemein/application/pdf/abfallablagerungsvo_engl.pdf.

- Fujian, X., Hongzhang, C., Zuohu, L., 2002. Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(1), pp.45-48.
- Garlapati, V.K., Banerjee, R., 2010. Optimization of lipase production using differential evolution. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(2), pp.254-260.
- Gea, T., Ferrer, P., Alvaro, G., Valero, F., Artola, A., Sánchez, A. 2007a. Co-composting of sewage sludge:fats mixtures and characteristics of the lipases involved. *Biochemical Engineering Journal*, 33(3), pp.275-283.
- Gea, T., Barrena, R., Artola, A., Sánchez, A., 2007b. Optimal bulking agent particle size and usage for heat retention and disinfection in domestic wastewater sludge composting. *Waste Management*, 27(9), pp.1108-1116.
- Gea, T., 2001. Diseño y validación de sistemas de compostaje a escala laboratorio. Aplicación a tratamientos de residuos sólidos urbanos y lodos de depuradora. Tesis maestría. Barcelona, Spain: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Giménez, I., 1984. Efecto inhibitor de algunos biocidas sobre la actividad enzimática del suelo. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 10, pp.257-298.
- Godoy, M.G., Gutarra, M.L.E., Castro, A.M., Machado, O.L.T., Freire, D.M.G., 2011. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(8), pp.945-953.
- Godoy, M.G., Machado, O.L.T., Roussos, S., Freire, D.M.G., 2012. Degradation of phorbol esters of *Jatropha curcas* cake by solid-state fermentation and simultaneous lipase production. *New Biotechnology*, 29, Supplement, p.S209.
- Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R., Freire, D.M., 1999. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, 35(1-2), pp.85-90.

- Gotor-Fernández, V., Brieva, R., Gotor, V., 2006. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40(3–4), pp.111-120.
- Graefe, G., 1983. *Dünger und Energie aus Traubentrestern*, Wien: Bundesministerium für Wiss. u. Forschung.
- Graminha E.B.N., Gonçalves, A.Z.L., Pirota, R.D.P.B., Balsalobre, M.A.A., Da Silva, R., Gomes, E., 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144(1-2), pp.1-22.
- Gutarra, M., Godoy, M.G., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., Freire, D.M.G., Castilho, L.R., 2009. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100(21), pp.5249-5254.
- Hao, X., Chang, C., Larney, F.J., Travis, G.R., 2001. Greenhouse gas emissions during cattle feedlot manure composting. *Journal of Environmental Quality*, 30(2), pp.376-386.
- Haq, I., Idrees, S., Rajoka, M.I., 2002. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 37(6), pp.637-641.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), pp.235-251.
- Haug, R.T., 1993. *The Practical Handbook of Compost Engineering*, Boca Raton, FL.: Lewis Publishers.
- He, Y., Inamori Y., Mizuochi M., Kong, H., Iwami, N., Sun, T., 2000. Measurements of N₂O and CH₄ from the aerated composting of food waste. *The Science of the Total Environment*, 254(1), pp.65-74.
- Hellmann, B., 1995. *Freisetzung klimarelevanter Spurengase in Bereichen mit hoher Akkumulation von Biomassen*, Zeller.
- Hellner, G., Tőke, E.R., Nagy, V., Szakács, G., Poppe, L., 2010. Integrated enzymatic production of specific structured lipid and phytosterol ester compositions. *Process Biochemistry*, 45(8), pp.1245-1250.

- Hernández-Rodríguez, B., Córdova, J., Bárzana, E., Favela-Torres, E., 2009. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61(3-4), pp.136-142.
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), pp.175-186.
- Imandi, S.B., Karanam, S.K., Garapati, H.R., 2010. Optimization of Process Parameters for the Production of Lipase in Solid State Fermentation by *Yarrowia lipolytica* from Niger Seed Oil Cake (*Guizotia Abyssinica*). *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 02(01), pp.028-033.
- Jiang, T., Schuchardt, F., Li, G., Guo, R., Zhao, Y., 2011. Effect of C/N ratio, aeration rate and moisture content on ammonia and greenhouse gas emission during the composting. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 23(10), pp.1754-1760.
- Kamini, N.R., Mala, J.G.S., Puvanakrishnan, R., 1998. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, 33(5), pp.505-511.
- Kempka, A.P., Lipke, N.L., Pinheiro, T. da L.F., Menoncin, S., Treichel, H., Freire, D.M.G., 2008. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(2), pp.119-125.
- Komilis, D.P., Ham, R.K., Park, J.K., 2004. Emission of volatile organic compounds during composting of municipal solid wastes. *Water Research*, 38(7), pp.1707-1714.
- Kourtev, P., Ehrenfeld, J., Huang, W., 2002. Enzyme activities during litter decomposition of two exotic and two native plant species in hardwood forests of New Jersey. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(9), pp.1207-1218.
- Kumar, S., Katiyar, N., Ingle, P., Negi, S., 2011. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. *Bioresource Technology*, 102(7), pp.4909-4912.

- Kumar, S., Mathur, A., Singh, V., Nandy, S., Khare, S.K., Negi, S., 2012. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresource Technology*, 120, pp.300-304.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Principios de Bioquímica* 4.^a ed., Ediciones Omega
- Li, Y., Park, S.Y., Zhu, J., 2011. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), pp.821-826.
- Long, J.H., Aziz, T.N., Reyes III, F.L. de los, Ducoste, J.J., 2012. Anaerobic co-digestion of fat, oil, and grease (FOG): A review of gas production and process limitations. *Process Safety and Environmental Protection*, 90(3), pp.231-245.
- López N, Pérez R, Vázquez F, Valero F, Sánchez A., 2002. Immobilisation of different *Candida rugosa* lipases by adsorption onto polypropylene powder: application to chiral synthesis of ibuprofen and trans-2-phenyl-1-cyclohexanol esters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 77(2), pp.175–182.
- López, N., Pernas, M.A., Pastrana, L.M., Sánchez, A., Valero, F., Rúa, M.L., 2004. Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. *Biotechnology progress*, 20(1), pp.65-73.
- Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M., Gokhale, D.V., 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38(5), pp.715-721.
- Mahanta, N., Gupta, A., Khare, S.K., 2008. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresource Technology*, 99(6), pp.1729-1735.
- Mala, J.G., Edwinoliver, N.G., Kamini, N.R., Puvanakrishnan, R., 2007. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 53(4), pp.247-253.

- Mamma, D., Kourtoglou, E., Christakopoulos, P., 2008. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, 99(7), pp.2373-2383.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., Banerjee, U.C., 2005. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), pp.1-9.
- Martínez-Ruiz, A., García, H.S., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., 2008. Organic Phase Synthesis of Ethyl Oleate Using Lipases Produced by Solid-state Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3), pp.393-401.
- Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H., Kondo, A., 2001. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(4), pp.515-520.
- Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart, D.M., Pandey, A., 2000. New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, 35(10), pp.1211-1225.
- Mitchell, D.A., de Lima Luz, L.F., Krieger, N., Berovič, M., 2011. Bioreactors for solid-state fermentation. *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, pp. 347-360.
- Mitchell, D.A., Krieger, N., Berovič, M., 2006. *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*, Springer.
- Mogensen, J.E., Sehgal, P., Otzen, D.E., 2005. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. *Biochemistry*, 44(5), pp.1719-1730.
- Nabarlatz, D., Vondrysova, J., Jenicek, P., Stüber, F., Font, J., Fortuny, A., Fabregat, A., Bengoa, C., 2010. Hydrolytic enzymes in activated sludge: Extraction of protease and lipase by stirring and ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(5), pp.923-931.
- Naik, S., Basu, A., Saikia, R., Madan, B., Paul, P., Chatterjee, R., Brask, J., Svendsen, A., 2010. Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected

- structural groups of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65(1–4), pp.18-23.
- Nair, C.S., Bone, D.H., 1987. Production of lipase of *Aspergillus foetidus* in a batch stirred reactor. *Biotechnology Letters*, 9(8), pp.601-604.
- Neumann, L., Scherer, P., 2011. Impact of bioaugmentation by compost on the performance and ecology of an anaerobic digester fed with energy crops. *Bioresource technology*, 102(3), pp.2931-2935.
- Neves, L., Ferreira, V., Oliveira, R., 2009. Co-composting of cow manure with food waste: the influence of lipids content. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 58, pp. 986-991.
- Nicholls, D.G., 2002. *Bioenergetics 3 3rd ed.*, Amsterdam, Academic Press.
- Nielsen, H.B., Mladenovska, Z. , Ahring, B.K., 2007. Bioaugmentation of a two-stage thermophilic (68°C/55°C) anaerobic digestion concept for improvement of the methane yield from cattle manure. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(6), pp.1638–1643.
- Pagans, E., 2007. Estudi de les emissions i la biofiltració dels gasos emesos en el procés de compostatge de diferents residus orgànics. Tesis doctoral. Barcelona, Spain: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Palma, M.B., Pinto, A.L., Gombert, A.K., Seitz, K.H., Kivatinitz, S.C., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., 2000. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86(1-9), pp.1137-1145.
- Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), pp.81-84.
- Pandey, A., 2008. *Current Developments in Solid-State Fermentation*, Springer.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35(10), pp.1153-1169.
- Pathak, N., Sanwal, G.G., 1998. Multiple forms of polygalacturonase from banana fruits. *Phytochemistry*, 48(2), pp.249-255.

- Paul, J., 2008. Carbon Credits from Composting: Is Nitrous Oxide Emission a Lurking Laughing Monster? <http://www.transformcompostsystems.com/learn-articles.php>. [Accedido diciembre, 2012].
- Plou, F.J., Cruces, M.A., Ferrer, M., Fuentes, G., Pastor, E., Bernabé, M., Christensen, M., Comelles, F., Parra, J.L.; Ballesteros, A., 2002. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *Journal of Biotechnology*, 96(1), pp.55-66.
- Pognani, M., Barrena, R., Font, X., Adani, F., Scaglia, B., Sánchez, A., 2011. Evolution of organic matter in a full-scale composting plant for the treatment of sewage sludge and biowaste by respiration techniques and pyrolysis-GC/MS. *Bioresource Technology*, 102(6), pp.4536-4543.
- Ponsá, S., 2010. Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. Application to full scale waste treatments plants. Tesis doctoral. Barcelona, Spain: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2010. Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. *Journal of Environmental Quality*, 39(2), pp.706-712.
- Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2011. Anaerobic co-digestion of the organic fraction of municipal solid waste with several pure organic co-substrates. *Biosystems Engineering*, 108(4), pp.352-360.
- Puyuelo, B., 2012. Estratègies per optimitzar el procés de compostatge. Desenvolupament d'un sistema de control de l'aeració i d'una nova metodologia per definir la relació de nutrients en termes de biodegradabilitat. Tesis doctoral. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Puyuelo, B., Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2011. Determining C/N ratios for typical organic wastes using biodegradable fractions. *Chemosphere*, 85(4), pp.653-659.
- Puyuelo, B., Gea, T., Sánchez, A., 2010. A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate. *Chemical Engineering Journal*, 165(1), pp.161-169.

- Raghavarao, K.S.M., Ranganathan, T., Karanth, N., 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), pp.127-135.
- Raimbault, M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), pp.26-27.
- Rajendran, A., Palanisamy, A., Thangavelu, V., 2008. Evaluation of medium components by Plackett-Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 24(3), pp.436-444.
- Ramachandran, S., Singh, S.K., Larroche, C., Soccol, C.R., Pandey, A., 2007. Oil cakes and their biotechnological applications-a review. *Bioresource technology*, 98(10), pp.2000-2009.
- Resina, D., Serrano, A., Valero, F., Ferrer, P., 2004. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *Journal of Biotechnology*, 109(1-2), pp.103-113.
- Resina, D., Maurer, M., Cos, O., Arnau, C., Carnicer, M., Marx, H., Gasser, B., Valero, V., Mattanovich, D., Ferrer, P., 2009. Engineering of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. *New Biotechnology*, 25(6), pp.396-403.
- Richard, T.L., Walker, L.P., Gossett, J.M., 2006. Effects of oxygen on aerobic solid-state biodegradation kinetics. *Biotechnology Progress*, 22(1), pp.60-69.
- Rigo, E., Ninow, J.L., Polloni, A.E., Remonatto, D., Arbter, F., Vardanega, R., Oliveira, D., Treichet, H., Di Luccio, M., 2009. Improved lipase biosynthesis by a newly isolated *Penicillium sp.* grown on agricultural wastes. *Industrial Biotechnology*, 5(2), pp.119-126.
- Rodriguez, J.A., Mateos, J.C., Nungaray, J., González, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J., Baratti, J., 2006. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41(11), pp.2264-2269.

- Rosa, D.R., Duarte, I.C.S., Saavedra, N.K., Varesche, M.B., Zaiat, M., Cammarota, M.C., Freire, D.M.G., 2009. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 100(24), pp.6170-6176.
- Ruggieri, L., Gea, T., Artola, A., Sánchez, A., 2012. A study on Air Filled Porosity evolution in sludge composting. *International Journal of Environment and Waste Management*, 9(1-2), pp.56-68.
- Ruggieri, L., Artola, A., Gea, T., Sánchez, A., 2008a. Biodegradation of animal fats in a co-composting process with wastewater sludge. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62(3), pp.297-303.
- Ruggieri, L., Gea, T., Artola, A., Sánchez, A., 2008b. Influence of different co-substrates biochemical composition on raw sludge co-composting. *Biodegradation*, 19(3), pp.403-415.
- Ruggieri, L., 2008. Composting Organic Wastes. Determination, monitoring and evolution of air filled porosity by air pycnometry. Tesis doctoral. Barcelona, Spain: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Salum, T.F.C., Villeneuve, P., Barea, B., Yamamoto, C.I., Côcco, L.C., Mitchell, D.A., Krieger, N., 2010. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochemistry*, 45(8), pp.1348-1354.
- Sánchez A, Valero F, Lafuente J, Solà C, 2000. Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofen in a packed bed reactor using immobilised *Rhizomucor miehei* lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1-2), pp.157-166.
- Saravanane, R., Murthy, D.V., Krishnaiah, K., 2001. Bioaugmentation and anaerobic treatment of pharmaceutical effluent in fluidized bed reactor. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances y environmental engineering*, 36(5), pp.779-791.
- Schauer-Gimenez, A.E., Zitomer, D.H., Maki, J.S., Struble, C.A., 2010. Bioaugmentation for improved recovery of anaerobic digesters after toxicant exposure. *Water Research*, 44(12), pp.3555-3564.

- Schenk, K., Appel, S., Daum, D., 1997. N₂O Emissions during composting of organic waste. International Symposium Growing Media and Plant Nutrition in Horticulture. Acta Horticulturae, pp. 253-262.
- Schmid, R.D., Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. Angewandte Chemie International Edition, 37(12), pp.1608–1633.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances, 19(8), pp.627-662.
- Shin, G.S., Lee, K.W., Kim, T.K., Shin, H.D., Lee, Y.H., 2005. Lipase-catalyzed production of optically active (S)-flurbiprofen in aqueous phase reaction system containing chiral succinyl β-cyclodextrin. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 33(3–6), pp.93-98.
- Silva, M.F., Freire, D.M.G., Castro, A.M. de, Luccio, M.D., Mazutti, M.A., Oliveira, J.V., Treichel, H., Oliveira, D., 2011. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. Bioprocess and Biosystems Engineering, 34(2), pp.145-152.
- Singh, S., Kaur, G., Chakraborti, A.K., Jain, R.K., Banerjee, U.C., 2006. Study of the experimental conditions for the lipase production by a newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa* for the enantioselective hydrolysis of (+/-)-methyl trans-3(4-methoxyphenyl) glycidate. Bioprocess and Biosystems Engineering, 28(5), pp.341-348.
- Smidt, E., Lechner, P., 2005. Study on the degradation and stabilization of organic matter in waste by means of thermal analyses. Thermochemica Acta, 438(1–2), pp.22-28.
- Sommer, S.G., Møller, H.B., 2000. Emission of greenhouse gases during composting of deep litter from pig production effect of straw content. The Journal of Agricultural Science, 134(03), pp.327-335.
- Soto, G., Meléndez, G., 2003. MATERIA ORGÁNICA DE SUELOS. Memoria Taller Abonos Orgánicos.pdf Centro de Investigaciones Agronómicas de la UCR., Costa Rica.

- Spigno, G., Pagella, C., Fumi, M.D., Molteni, R., De Faveri, D.M., 2003. VOCs removal from waste gases: gas-phase bioreactor for the abatement of hexane by *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Science*, 58(3–6), pp.739-746.
- Surribas, A., Stahn, R., Montesinos, J.L., Enfors, S.O., Valero, F., Jahic, M., 2007. Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. *Journal of Biotechnology*, 130(3), pp.291-299.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), pp.1621-1651.
- Tecelão C, Guillén M, Valero F, Ferreira-Dias S., 2012. Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: A feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes. *Biochemical Engineering Journal*, 67, pp.104-110.
- Teng, Y., Xu, Y., 2008. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. *Bioresource Technology*, 99(9), pp.3900-3907.
- Tsutsui, H., Fujiwara, T., Matsukawa, K., Funamizu, N., 2013. Nitrous oxide emission mechanisms during intermittently aerated composting of cattle manure. *Bioresource Technology*, 141, pp.205-211.
- U.S. Department of Agriculture and U.S. Composting Council, 2001. The Test Methods for Evaluation of Compost and Composting (TMECC) provides detailed protocols for the composting industry to verify the physical, chemical, and biological condition of composting feedstocks, material in process and compost products at the point of sale. <http://compostingcouncil.org>
- U.S. Environmental Protection Agency, 1998. Method 9071B. <http://www.epa.gov>. [Accedido mayo 31, 2011].
- Valzano, F., Jackson, M., Campbell, A., 2001. Greenhouse gas emissions from composting facilities, Sydney, Australia: Recycled Organics Unit. University of New South Wales.
- Van Nieuwenhove, C.P., Oliszewski, R., González, S.N., Pérez Chaia, A.B., 2007. Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. *Letters in Applied Microbiology*, 44(5), pp.467-474.

- Vardanega, R., Remonato, D., Arbter, F., Polloni, A., Rigo, E., Ninow, J.L., Treichel, H., Oliveira, D.; Di Luccio, M., 2010. A systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium* sp. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), pp.461-465.
- Weber, F.J., Oostra, J., Tramper, J., Rinzema, A., 2002. Validation of a model for process development and scale-up of packed-bed solid-state bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(4), pp.381-393.
- Weiss, S., Tauber, M., Somitsch, W., Meincke, R., Müller, H., Berg, G., Guebitz, G.M., 2010. Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite. *Water Research*, 44(6), pp.1970-1980.
- Won, K., Hong, J.K., Kim, K.J., Moon, S.J., 2006. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic ibuprofen coupled with pervaporation. *Process Biochemistry*, 41(2), pp.264-269.
- Yang, Q., Luo, K., Li, X., Wang, D., Zheng, W., Zeng, G., Liu, J., 2010. Enhanced efficiency of biological excess sludge hydrolysis under anaerobic digestion by additional enzymes. *Bioresource Technology*, 101(9), pp.2924-2930.
- Yu, H., Huang, G.H., 2009. Effects of sodium acetate as a pH control amendment on the composting of food waste. *Bioresource Technology*, 100(6), pp.2005-2011.

CAPÍTULO 11.

11. ANEXOS

11.1 Calibrado cromatografía de gases para determinar AGCL.

El calibrado para la cromatografía de gases de los diferentes ácidos se presenta en las figuras 11.1 y 11.2

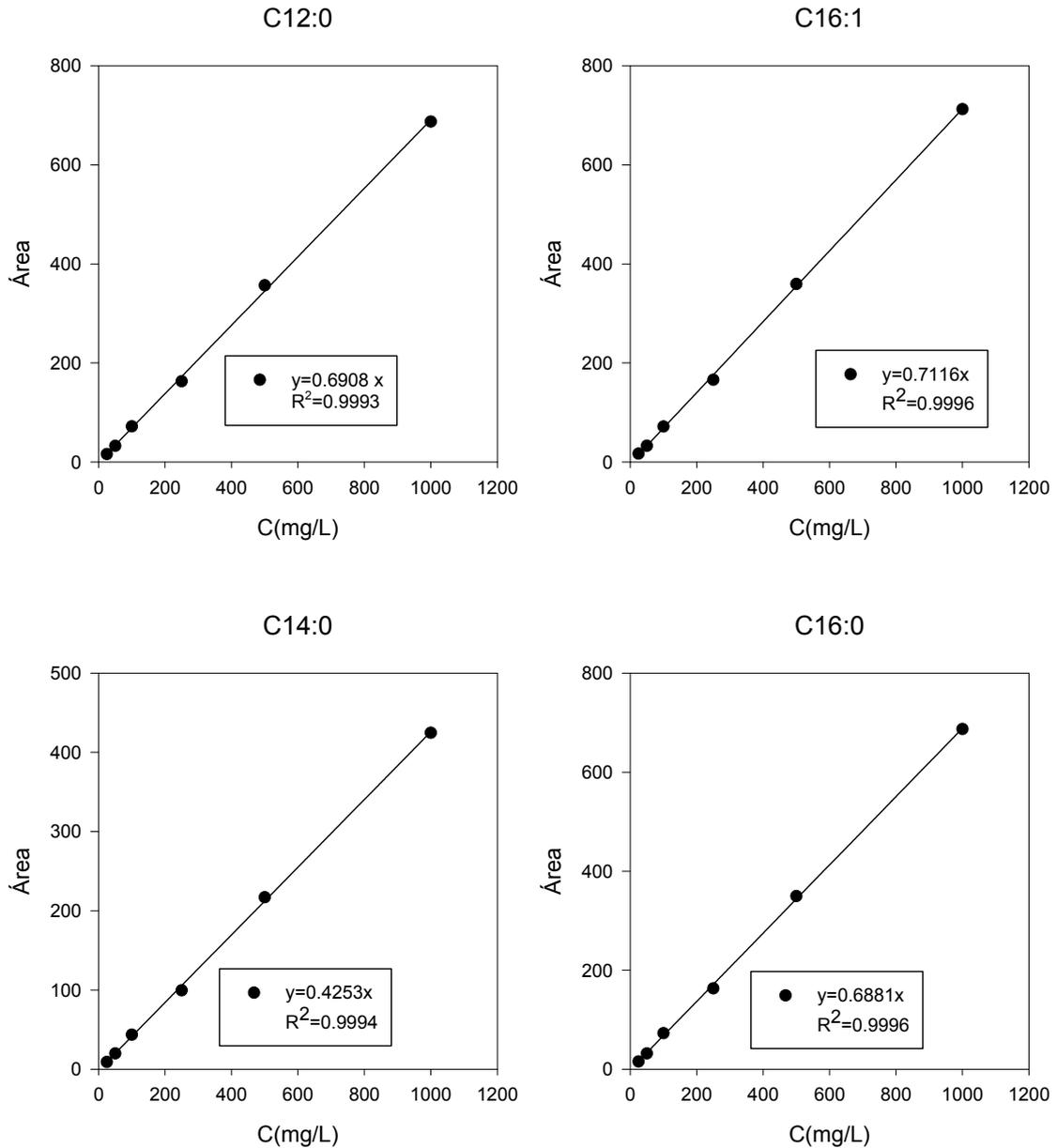


Figura 11.1 Calibrado para cromatografía de gases de los ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1)

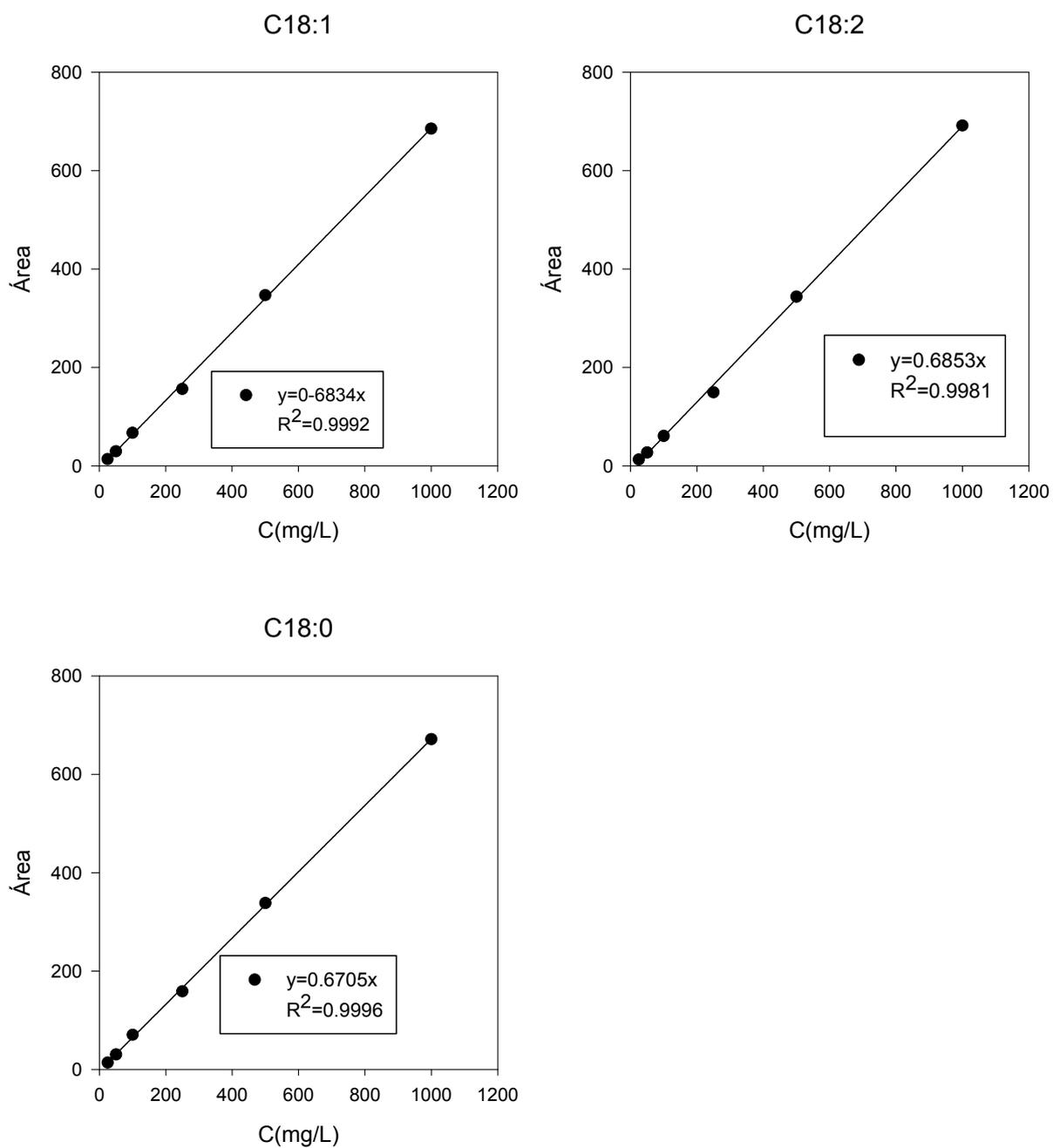


Figura 11.2 Calibrado para cromatografía de gases de los ácidos esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2)

11.2 Calibrado de la actividad lipásica mediante el método colorimétrico.

El calibrado de la pendiente obtenida para el test de actividad lipásica descrito en la sección 3.5.1.1 se muestra en la figura 11.3.

$$\text{Actividad Lipásica: } A \text{ (U mL}^{-1}\text{)} = 978.9878 m - 3.8289$$

En donde A es la actividad lipásica (U mL⁻¹) y m es la pendiente (Absorbancia/ tiempo)

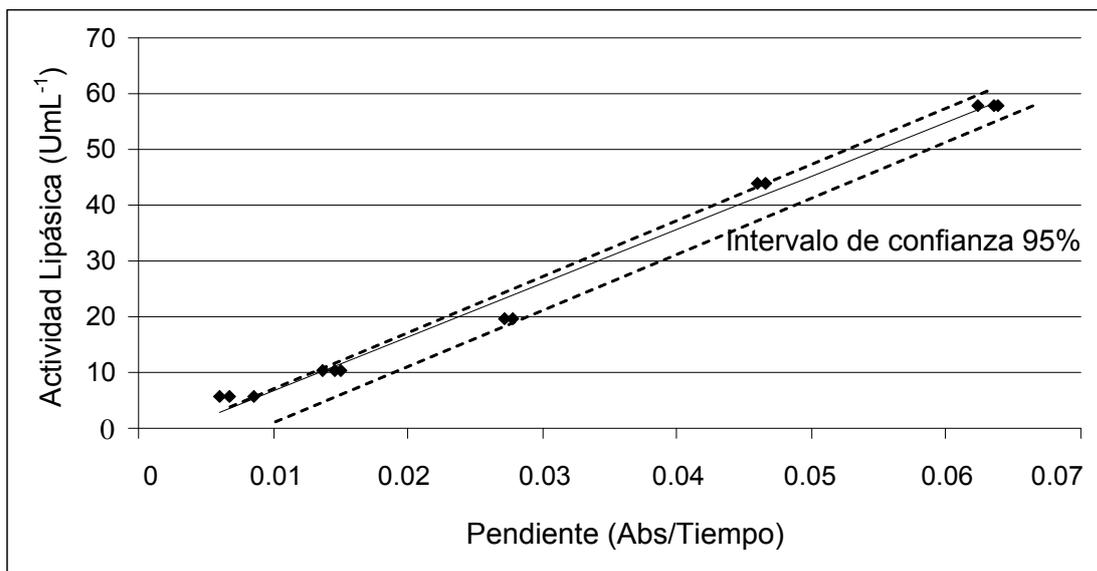


Figura 11.3 Calibrado de la actividad lipásica para muestras líquidas

11.3 Calibrado actividad en muestras sólidas

El calibrado para la determinación de la actividad lipolítica por hidrólisis del aceite de oliva se presenta en la figura 11.4

$$\text{Abs}(\text{nm}) = 0.1416 \text{ C}(\text{mM})$$

$$R^2 = 0.9973$$

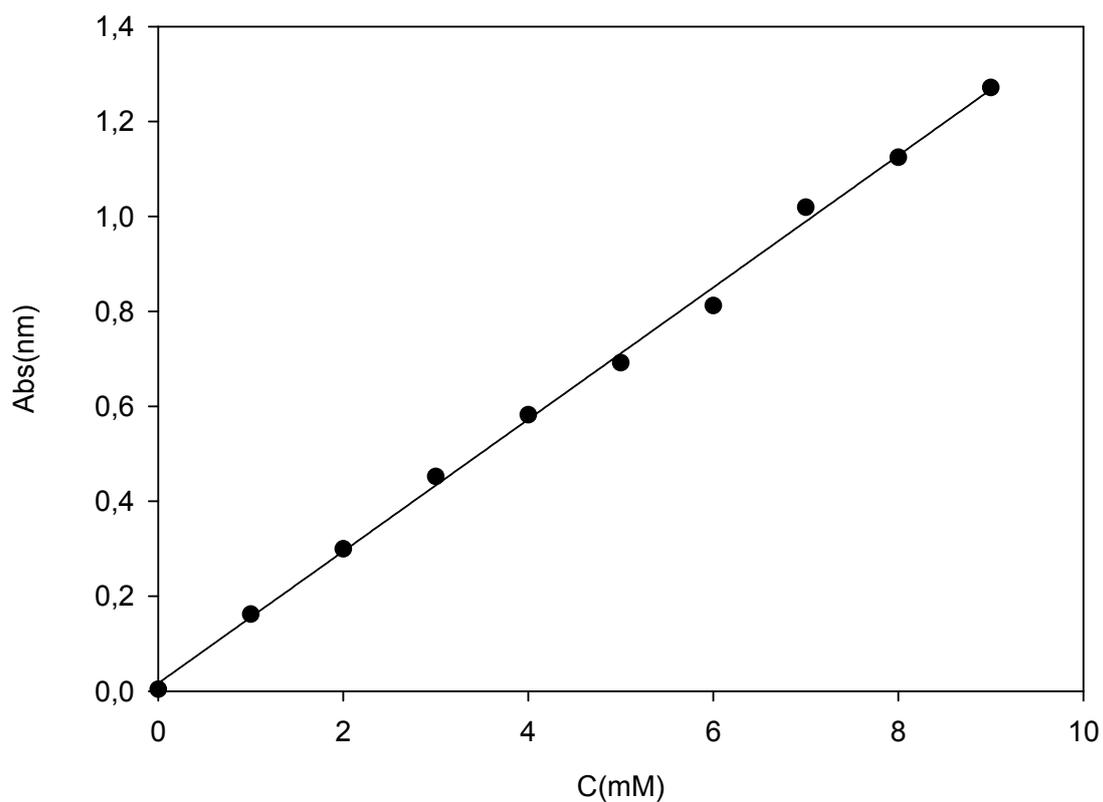


Figura 11.4 Calibrado de la actividad lipásica para muestras sólidas