



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – RESIDUOS SÓLIDOS

**FERMENTACIÓN ÁCIDA DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS
MUNICIPALES DURANTE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA

M. en I. Germán Dimitriv Jojoa Unigarro

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Simón González Martínez - Instituto de Ingeniería

COMITÉ TUTOR

Dr. Oscar Monroy Herмосillo – Universidad Autónoma Metropolitana
Dr. Adalberto Noyola Robles – Instituto de Ingeniería

Ciudad de México, septiembre de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO DESIGNADO

- Presidente:** Dra. Petia Mijaylova Nacheva
- Secretario:** Dr. Adalberto Noyola Robles
- Vocal 1:** Dr. Oscar Armando Monroy Hermosillo
- Vocal 2:** Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta
- Vocal 3:** Dr. Simón González Martínez

El trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tutor de la tesis: Dr. Simón González Martínez



Firma

Dedicatoria

Hace diez y seis años pensaba que para obtener mi título de doctor era mucho tiempo, pero con el tiempo obtuve mi título de pregrado como ingeniero químico, luego mi maestría y finalmente obtengo mi título de doctor en ingeniería ambiental.

En todo este proceso me han ayudado mi mamá, **Sofi**, Marcela, Sara, también familiares cercanos como mis tías Gladys, Marlene y Genith, a todas estas grandes personas siempre les tendré un sentimiento de gratitud.

Esta investigación que permite obtener mi título de doctor quiero dedicárselo a una persona que en estos cuatro años estuvo conmigo tanto en lo **emocional** como en lo académico, muchas veces le cambie el tema de conversación, diciéndole “ya se cómo responder esta pregunta, a mis sinodales”. En pandemia, época difícil, gracias, por ser un pilar emocional sino hubiera claudicado.

Como dice Cicerón:

¿Qué cosa más grande que tener a alguien con quien te atrevas a hablar como contigo mismo?

Y yo la encontré, por eso este trabajo se lo dedico a
Rox Roomie Corazón

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** y a su **Instituto de Ingeniería (II)** por haberme dado la oportunidad de formarme en tan prestigiosa institución y hacer realidad mi sueño de cursar un doctorado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** de México por la beca otorgada, sin la cual mi estancia en este hermoso país no habría sido posible.

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)**, proyecto **IT101320**, por haber aportado la financiación de mi trabajo de tesis.

Al **Dr. Simón González Martínez** por haberme acogido como parte de su grupo de trabajo, por guiarme con dedicación durante todo el proceso de formación doctoral, por forjarme como un investigador tanto en la elaboración de proyectos, trámites administrativos y en el debate de ideas necesario para pasar de datos a resultados.

A los **Doctores Oscar Monroy Hermosillo** y **Adalberto Noyola Robles**, quienes, como parte de mi Comité Tutor, semestre a semestre fueron dándome valiosos aportes que sin duda enriquecieron mi trabajo y mi formación.

Al **Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta** y la **Dra. Petia Mijaylova Nacheva** por aceptar formar parte del jurado calificador en el examen de grado.

Al **Dr. Oscar González Barceló** por estar siempre dispuesto a resolver mis dudas y a compartir su experiencia y conocimientos.

Al personal de la **Coordinación de Hidráulica y Ambiental**, y especialmente al personal del **Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA)**, quienes siempre estuvieron a disposición para darme apoyo técnico y logístico.

Al **M. C. Francisco Rojo Callejas**, de la **Facultad de Química** por permitirme trabajar en su laboratorio durante todo el desarrollo de mi trabajo de tesis y al **Grupo de Investigación en Procesos Anaerobios (GIPA)**, liderado por el **Dr. Adalberto Noyola Robles**, del Instituto de Ingeniería, por haberme colaborado muchas veces y de distintas formas para el desarrollo exitoso de este trabajo.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Hipótesis.....	4
1.2 Objetivo general.....	4
1.3 Objetivos particulares.....	4
1.4 Alcances.....	4
2. Composición de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.....	5
2.1. Características de la FORSU y sus fracciones.....	5
2.2. Composición bromatológica.....	6
2.2.1. Carbohidratos.....	7
2.2.1.1. Proteínas.....	9
2.2.1.2. Lípidos.....	10
2.2.1.3. Lignina y Complejo lignocelulósico.....	11
3. Fermentación de FORSU como primera etapa de la digestión anaerobia.....	12
3.1. Digestión anaerobia.....	12
3.1.1. Etapas de la digestión anaerobia.....	12
3.1.2. Procesos en una o dos etapas.....	13
3.1.3. Termodinámica del proceso de digestión anaerobia.....	14
3.1.4. Presión parcial de hidrógeno.....	16
3.2. Fermentaciones a partir de FORSU.....	17
3.2.1. Fermentación acidas (AGV).....	17
3.2.2. Fermentación etanólica.....	18
3.2.3. Fermentaciones lácticas.....	20
3.3. Parámetros que afectan las fermentaciones.....	22
3.3.1. pH.....	22
3.3.1.1. Fermentación acidogénica.....	22
3.3.1.2. Fermentación alcohólica.....	23
3.3.1.3. Fermentación láctica.....	23
3.3.2. Temperatura.....	23
3.3.2.1. Fermentación acidogénica.....	23
3.3.2.2. Fermentación alcohólica.....	24
3.3.2.3. Fermentación láctica.....	24
3.3.3. Tiempo de retención hidráulico y tiempo de retención de sólidos.....	24
3.3.3.1. Fermentación acidogénica.....	25
3.3.3.2. Fermentación alcohólica.....	25
3.3.3.3. Fermentación láctica.....	25
3.3.4. Carga orgánica (CO) y concentración de sustrato.....	26

3.3.4.1.	Fermentación ácida.....	26
3.3.4.2.	Fermentación láctica.....	26
4.	Metodología	28
4.1.	Muestreo y caracterización de FORSU	29
4.2.	Etapa 1. Caracterización de la FORSU e identificación de metabolitos	30
4.2.1.	Caracterización de FORSU	30
4.2.2.	Identificación de metabolitos a partir de una fermentación sin control de pH.....	31
4.3.	Etapa 2. Cinética de metanización de metabolitos puros	31
4.3.1.	Cinética de metanización y montaje.....	31
4.3.2.	Inyección de metabolito	32
4.4.	Etapa 3. Fermentación controlada de la FORSU de la CDMX.....	32
4.4.1.	Experimento exploratorio. Fermentación de FORSU con diferentes inóculos a pH 4	32
4.4.1.1.	Montaje de reactor de fermentación batch	33
4.4.1.2.	Metanización de FORSU fermentada a pH 4 con diferentes inóculos	33
4.4.2.	Fermentación de FORSU con control de pH y tiempo de reacción	34
4.4.2.1.	Montaje de reactor con control de pH y tiempo de reacción (tiempo de fermentación)	34
4.4.2.2.	Metanización de fracción líquida y sólida de la FORSU fermentada	35
4.4.2.3.	Determinación de comunidades microbianas.....	35
4.5.	Determinaciones analíticas.....	36
4.6.	Modelación y software	37
4.6.1.	Modelo Michaelis & Menten	37
4.6.2.	Modelo de Gompertz.....	37
4.6.3.	Softwares para análisis de biología molecular	38
5.	RESULTADOS.....	39
5.1.	Caracterización de la FORSU	39
5.2.	Identificación de metabolitos en fermentación sin control de pH.....	40
5.3.	Cinética de metanización de metabolitos puros	41
5.3.1.	Curvas de producción de metano	42
5.3.1.1.	Ácido acético.....	43
5.3.1.1.	Etanol	43
5.3.1.2.	Ácido láctico	47
5.3.1.3.	Ácido propiónico.....	48
5.3.1.4.	Ácido butírico.....	48
5.3.1.5.	Metanol.....	49
5.3.2.	Determinación de la producción específica de metano	49

5.3.3.	Determinación de parámetros cinéticos	52
5.3.4.	Evaluación de pH inicial y final en la metanización	54
5.4.	Fermentación de FORSU con diferentes inóculos a pH 4, experimento exploratorio	55
5.4.1.	Fermentación con diferentes inóculos	55
5.4.2.	Metanización de digestatos previamente fermentados	59
5.4.2.1.	Discusión de resultados	62
5.4.3.	Modelación por Gompertz.....	64
5.4.4.	Metabolitos remanentes después de la metanización	66
5.5.	Fermentación de FORSU con control de pH y tiempo de fermentación.....	68
5.5.1.	Composición de las fracciones sólida y líquida de los digestatos fermentados	69
5.5.1.1.	Composiciones de las fracciones sólidas.....	69
5.5.1.2.	Composición de las fracciones líquidas	73
5.5.2.	Generación de metabolitos en la fermentación con control de pH (6, 5 y 4) y tiempo de fermentación (1, 3 y 6 días).....	74
5.5.3.	Producción de metano de las fracciones líquida, sólida de los digestatos y del proceso	75
5.5.4.	Análisis cinéticos de las fracciones líquida y sólida de los digestatos generados a pH 6,5 y 4 y tiempo de fermentación de 1, 3 y 6 días.....	83
5.5.5.	Determinación de comunidades microbianas.....	88
5.5.5.1.	FORSU cruda sin fermentar y lodos de UASB.....	88
5.5.5.2.	Efecto del pH de fermentación sobre las comunidades bacterianas de los digestatos generados a un tiempo de fermentación de 6 días.....	91
6.	Conclusiones	94
7.	Referencias.....	97
Anexo 1.	Análisis de varianza.....	110
Anexo 2.	Concentraciones de metabolitos (mg_{DQO}/L) después de la metanización para las fracciones líquida y sólida del digestatos fermentados a diferentes pH y tiempos de fermentación.....	111
Anexo 3.	Productos de la investigación	114

Figuras

Figura 2-1. Esquema general de una fermentación a partir de carbohidratos complejos	8
Figura 2-2. Rutas metabólicas de la fermentación (Luo et al., 2018)	9
Figura 2-3 β -oxidación de grasas para la generación de acetil-CoA (Berg et al., 2007).....	11
Figura 3-1 Efecto de la presión parcial de hidrógeno sobre la energía libre Gibbs (Azbar et al., 2001)	17
Figura 3-2. Proceso de fermentación alcohólica a partir de una biomasa	19
Figura 4-1. Esquema de metodología general	29
Figura 4-2. FORSU después de someterse al método de cuarteo, lista para ser almacenada.....	30
Figura 4-3. Esquema de proceso de molienda de FORSU	31
Figura 4-5. Reactor de fermentación.....	34
Figura 4-6. Esquema de centrifugación para FORSU fermentada	35
Figura 5-1. Producción de metabolitos sin control de pH.....	41
Figura 5-2. Curva de producción de metano para cada metabolito.....	44
Figura 5-3. Curvas de metanol para cada metabolito restando el inóculo	44
Figura 5-4. Producción específica de metano para cada metabolito a partir de diferentes masas de sustrato.....	50
Figura 5-5 Tasa de producción vs concentración inicial de sustrato, comparación entre modelo (línea punteada) y datos experimentales (marcadores)	54
Figura 5-6 Comparación entre el pH inicial (rojo) y pH final (azul)de la metanización para cada sustrato y concentración.	54
Figura 5-7. Producción de metabolitos para cada inóculo de trabajo	56
Figura 5-8 Curvas de producción de metano de digestato y FORSU cruda sin fermentar.....	60
Figura 5-9. Producción específica para digestatos y la FORSU cruda sin fermentar. MA (microorganismos autoctonos)	60
Figura 5-10. Ajuste del modelo Gompertz a los datos experimentales de metanización de digestatos fermentados con diferentes inóculos	65
Figura 5-11. Metabolitos remanentes después de la metanización.	67
Figura 5-12 pH final después de la metanización de digestatos fermentados con diferentes inóculos	68
Figura 5-13. Composición de diferentes digestatos generados a pH 6, 5 y 4 y tiempo de reacción de 1, 3 y 6 días	69
Figura 5-14. Comportamiento de carbohidratos, grasas y nitrógeno Kjeldahl en la fracción sólida de los diferentes digestatos fermentados a diferentes pH y tiempo de reacción.	71
Figura 5-15 Distribución de DQO, carbohidratos y solidos volátiles (SV) en la fracción sólida y líquida de los digestatos generados.	72
Figura 5-16. Generación de metabolitos, DQO filtrada (DQOf) y grado de fermentación (%)......	74
Figura 5-17. Producción de metano de la fracción líquida del digestato fermentado a pH 6, 5 y 4, y tiempos de reacción de 1, 3 y 6 días.....	76

Figura 5-18. Producción de metano de la fracción sólida del digestato fermentado a pH 6, 5 y 4, y tiempos de reacción de 1, 3 y 6 días.....	77
Figura 5-19. Producción específica en función a masa alimentada de sólidos volátiles para FORSU fermentada a diferentes pH y tiempos de reacción.....	78
Figura 5-20. Comparación entre los datos experimentales y el modelo de Michaelis & Mente para la fracción líquida y sólida de los diferentes digestatos generados.....	84
Figura 5-22. Composición de metabolito vs tasa de generación de metano (V_{max}).....	87
Figura 5-23. Composición y estructura de las comunidades para la FORSU cruda sin fermentar (Bacteria y Eucaria) y para lodos de UASB (Bacteria y Archaea).....	89
Figura 5-24 Comportamiento de la diversidad taxonómica para filo, clase y género para FORSUc y los digestatos generados a pH 6, 5 y 4.	92

Tablas

Tabla 2-1. Características de fracciones de la FORSU de la CDMX, estación de transferencia de Coyoacán (Figueroa, 2018.).....	6
Tabla 2-2. Composición bromatológica de la FORSU	6
Tabla 2-3. Clasificación de carbohidratos (Mataix Verdú, 2009).....	7
Tabla 3-1. Energías libre de Gibbs para reacciones en el proceso de digestión anaerobia (Azbar et al .2001)	15
Tabla 3-2. Distribución de cambio de energía libre de Gibbs para comunidades fermentativas y microorganismos sintróficos a hidrógeno y metano.....	15
Tabla 3-3. Ganancia de ΔG por mol de metano producido	16
Tabla 3-4. Reacciones fermentativas según tipo de microorganismo.....	20
Tabla 3-5. Microorganismos lácticos y condiciones de metabolismo.....	21
Tabla 4-1 Métodos analíticos	36
Tabla 5-1. caracterización de la FORSU de la estación de transferencia de Coyoacán, CDMX	39
Tabla 5-2 Balance de materia para reacciones de acidogénesis de un gramo de DQO para diferentes sustratos.....	42
Tabla 5-3 DQO y metabolitos presentes después de la metanización de sustratos puros .45Tabla 5-4. Producción específica, producción por el inóculo y coeficiente de correlación	51
Tabla 5-5. Parámetros cinéticos de las curvas de la figura 5-2, de acuerdo con el método de linealización de Lineweaver-Burk	53
Tabla 5-6 Concentración promedio de metabolitos de los seis días de fermentación (mMol/L).....	58
Tabla 5-7 DQO, sólidos y tasas de hidrólisis, promedio de los seis días de fermentación	59
Tabla 5-8 Resultados de la linealización para determinar la producción de metano de los digestatos y FORSU cruda sin fermentar	61
Tabla 5-9 Comparación de la producción específica y condiciones de operación de fermentación de residuos orgánicos	63
Tabla 5-10 producción específica de metano y parametros de modelos de Gompertz	66
Tabla 5-11. DQO, sólidos volátiles y totales de la fracción sólida de los digestatos generados y tasas de hidrólisis	70
Tabla 5-12. DQO, sólidos volátiles y totales de la fracción líquida de los digestatos generados	73
Tabla 5-13. Concentración final de ácido propiónico (mg _{DQO} /L) después de la metanización.....	79
Tabla 5-16. Producción específica de metano en la primera etapa de metanización para la fracción líquida y sólida	83
Anexo 1.1. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra para producción específica del proceso.	110
Anexo 2.2. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra para V _{max} de la fracción líquida	110
Anexo 1.3. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra para V _{max} de la fracción sólida	110
Anexo 2.1 Concentración de ácido acético	111

Anexo 2.2 Concentración de etanol	111
Anexo 2.3 Concentración de metanol	112
Anexo 2.4 Concentración de ácido butírico	112
Anexo 2.5 Concentración de ácido valérico.....	113

Resumen

Este trabajo propone la fermentación de la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales (FORSU) como una primera etapa, la más importante, para la producción de metano. Los productos de la fermentación pueden generar diferentes efectos sobre la metanización. Las fermentaciones más estudiadas son las ácidas que producen ácidos grasos volátiles (AGV). El ácido acético es el metabolito requerido para realizar la metanogénesis heterótrofa; en cambio, los otros productos de la metanización deben primero pasar por un proceso de acetogénesis para luego ser metanizados. Las fermentaciones etanólicas y lácticas han sido poco estudiadas como una primera etapa de la producción de metano y, a pesar de que presentan una viabilidad energética, un beneficio termodinámico no representa un beneficio cinético o un aumento en la producción específica de metano. Por esta razón, en este trabajo se analizan los diferentes productos de la fermentación de FORSU modificando variables de proceso como pH, de operó a pH de 6, 5 y 4, tiempo de reacción de la fermentación (1, 3 y 6 días) y diferentes inóculos para conocer cuáles son los productos de la fermentación bajo esas diferentes condiciones y sus posteriores efectos en la metanización, Como complemento se realizó un estudio cinético de los productos de la fermentación de FORSU para evaluar el efecto de cada metabolito sobre la metanización.

El análisis de la cinética de los metabolitos de la fermentación mostró que el ácido acético presenta la mayor producción específica de metano con 343 NL/kg_{DQO}, el etanol presenta la segunda producción específica, con 296 NL/kg_{DQO} y presentó una tasa de producción de metano de 1,928 NmL_{CH₄}/L·d más alta que el ácido acético que fue de 668 NmL_{CH₄}/L·d. Las curvas de producción de metano demostraron que la acetogénesis no es una etapa limitante para la metanización de etanol. De los metabolitos analizados, el ácido láctico presentó la producción específica de metano más baja, con 64 NL/kg_{DQO}, pero su tasa de producción de metano (V_{max}) es superior al del ácido acético con 1,001 NmL_{CH₄}/L·d y la constante de Michaelis & Mente (K_m) es relativamente bajo con 1.9 g_{DQO}/L indicando una buena afinidad entre sustrato y microorganismos; la baja producción de metano se debe a que, bajo condiciones anaerobias, el ácido láctico tiene una acetogénesis parcial formando ácido propiónico y ácido acético, reacción ya conocida en literatura de bioquímica, pero en este trabajo se demuestra que en condiciones anaerobias sucede.

La fermentación con diferentes inóculos demuestra que una fermentación con microorganismos autóctonos y lodos de UASB provenientes de una cervecera es selectiva hacia la generación de ácido láctico, seguido de etanol. De manera diferente, la fermentación con levaduras presentó una selectividad hacia etanol. Al someter el digestato producto de la fermentación a metanización, se encontró que la mayor producción específica de metano se obtiene con el digestato fermentado con microorganismos autóctonos, produciendo 322 NL/kg_{sv}.

Al evaluar el efecto del pH sobre la fermentación de FORSU, se encontró que a pH 6 se presenta una alta formación de ácidos acético y butírico, a pH 5 la fermentación es selectiva a ácido láctico y, a pH 4, la fermentación es selectiva a etanol y ácido láctico. Las fermentaciones etanólicas se llevan a cabo con tiempos de fermentación cortos, entre 1 y 3 días, y se debe a que, en este tiempo, se agotan los carbohidratos solubles en agua. Al ser metanizados los digestatos generados a diferentes valores de pH de 6, 5 y 4 y tiempos de fermentación de 1, 3 y 6 días, observa que la producción más alta de metano se logra bajo pH de 5 y un tiempo de fermentación de 3 días con una producción de 418 NL/kg_{sv}, en esta condición se logró la mayor generación de etanol en el proceso de fermentación. Asimismo, se concluye que una fermentación previa de la FORSU bajo pH de 5 en 3 días permite una reducción de tiempo de metanización en un 78.5%, logrando un 68% de la producción específica de metano.

Este trabajo permite comprender que las fermentaciones selectivas a etanol y ácido acético permiten obtener mayores producciones específicas y tasas de producción de metano que sin la fermentación controlada. Como consecuencia se reducen los tiempos de metanización.

Abstract

The present work studied the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) fermentation as a first stage before methanization. Fermentation can produce different effects on subsequent methanization. The most studied fermentations are acid fermentations that produce volatile fatty acids (VFA). Acetic acid is the direct metabolite used by heterotrophic methanogens as substrate to produce methane, while other metabolites must undergo acetogenesis before methanization. Ethanolic and lactic acid fermentations have been little studied as a first stage before methanization. For better understanding, a kinetic study of the methanization of different fermentation metabolites was performed to evaluate the effects of every metabolite on methanization. Although ethanol and lactic acid present energy viability, a thermodynamic benefit does not represent a kinetic benefit or an increase in the specific production of methane. OFMSW was fermented under different process conditions: The tested pH values were 4, 5, and 6, and the adjusted reaction times during fermentation were 1, 3, and 6 days. Also, different inocula were tested. The products obtained under the different fermentation conditions were exposed to methanization to determine adequate conditions for fermentation and methanization.

The kinetic analysis of fermentation metabolites showed that acetic acid has the highest specific methane production with 343 NL/kgCOD; ethanol has the second place with 296 NL/kgCOD, and presented a methane production rate (V_{max}) of 1,928 NmL/L·d, higher than the one for acetic acid. Michaelis & Menten constant K_m was 2.0 gCOD/L, indicating good affinity between substrate and methanogens. The methanization curves show that acetogenesis is a limiting step for the methanization of ethanol and other metabolites different than acetic acid. The lowest specific methane production corresponds to lactic acid with 64 NL/kgCOD; in contrast, lactic acid presented the highest methane production rate with 1,001 NmL/L·d and a lower K_m of 1.9 gCOD/L. Under anaerobic conditions, lactic acid undergoes acetogenesis, causing the accumulation of propionic acid and the inhibition of methanogenesis.

The fermentation with different inocula shows that fermentation with naturally occurring microorganisms (NOM) and UASB sludge presents a selectivity for lactic acid production, followed by ethanol. Fermentation with yeast demonstrated selectivity for ethanol production. When the fermentation digestates were subjected to methanization, the highest specific methane production corresponds to the fermentation with NOM, with a production of 322 NL/kg_{VS}.

When evaluating the effects of pH on OFMSW fermentation, at pH 6, there is mainly acetic and butyric acid production; at pH 5, fermentation is selective for lactic acid, and at pH 4, fermentation is selective for ethanol and lactic acid. Ethanolic fermentation develops at short reaction times of 1 to 3 days; water-soluble carbohydrates are readily consumed. The digestates generated at different pH (4, 5, and 6) and reaction times (1, 3, and 6 days) produced specific methane differently. The highest methane production corresponds to the fermentation under pH 6, and a reaction time of 6 days, and under pH 5, and fermentation time 3 days with 418 NL/kg_{VS}. In 3 days of fermentation time, 68% of the specific methane production was achieved.

This work explains that selective fermentations to ethanol and acetic acid allow subsequent higher specific methane production and higher methane production rates reducing reaction times.

1. Introducción

El problema del calentamiento global, provocado por el aumento de los gases de efecto invernadero, fomentó el surgimiento del concepto de “biorrefinería”. La biorrefinería representa un enfoque innovador en la gestión ambiental, donde los productos al final de su vida útil o los materiales de desecho se consideran recursos valiosos para la producción de productos biológicos o biocombustibles, de alto valor agregado y se producen a partir de fuentes renovables, incluso desechos orgánicos (Nghiem et al., 2017). Entre ellos, la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) representa un candidato con gran potencial para los procesos de biorrefinería (Alibardi y Cossu, 2015).

La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estimó que un tercio de la producción mundial de alimentos se pierde o se desperdicia a lo largo de la cadena de suministro de alimentos, incluidos los pasos finales, como hogares, restaurantes y comedores. Los Estados miembros de la Unión Europea produjeron aproximadamente 89 millones de toneladas de desperdicio de alimentos en 2016 (Braguglia et al., 2018; Lucifero, 2016). Actualmente la generación mundial de residuos sólidos urbanos (RSU) es aproximadamente de 1300 millones de toneladas por año y se estima que para 2025 incremente a 2200 millones de toneladas. El contenido de compuestos orgánicos es en promedio de 46% (Al Seadi et al., 2013).

Muy a menudo, la FORSU se desecha en vertederos o se envía a incineración con una recuperación nula o limitada de recursos y una alta emisión de gases de efecto invernadero y de compuestos tóxicos para la atmósfera y el suelo (Ren et al., 2018). En la actualidad el proceso de digestión anaerobia para la generación de biogás a partir de una biomasa es una alternativa consolidada de energía renovable y entra en la conceptualización de una biorrefinería (Dahlin et al., 2017).

La generación de metano con fines comerciales a partir de una biomasa ha tomado fuerza desde comienzo del siglo XXI, principalmente en Europa, debido a que el metano puede ser utilizado para la generación de dos formas de energía, la eléctrica y la térmica. Se estimó que para el 2016 la producción de metano en Europa fue 4,971 GWh (+ 40%) y en el 2011 apenas fue de 752 GWh. Los países que vieron el desarrollo más significativo en la producción de metano en 2016 fueron: Alemania (+900 GWh) y Francia (+133 GWh). Aunque la generación de metano en Europa se da principalmente de biomásas del sector agrícola (cultivos energéticos, residuos de cosechas y purines) también se utiliza la FORSU como una biomasa, la cual para el 2016 aportó 10% del total del metano generado.

La FORSU es una biomasa con gran potencial hacia la generación de metano, aunque su composición depende de la legislación de cada país o territorio, en algunos lugares son principalmente desechos alimenticios mientras que en otros casos se incluyen los residuos de poda o jardinería. Pero en la FORSU se pueden distinguir principalmente tres grupos de sustancias, que son carbohidratos, proteínas y lípidos. Particularmente los carbohidratos contienen complejos lignocelulósicos, carbohidratos complejos (ej. Almidón) y carbohidratos simples (disacáridos o monosacáridos). Una parte de los carbohidratos que componen a la FORSU son fácilmente biodegradables (monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, 45-65% ST) pero no todos los carbohidratos son degradables; el complejo

lignocelulósico (celulosa, hemicelulosa y lignina) se pueden considerar inertes si se someten a procesos de digestión anaerobia. Las fracciones de proteínas y grasas, aunque su proporción es menor, (entre 5-25%ST) son fracciones que producen grandes cantidades de biogás.

La FORSU al ser una biomasa que contiene todo el anterior conjunto sustratos (carbohidratos, lípidos y proteínas), necesita de diferentes rutas de degradación y tiene la necesidad de una gran variedad de conjuntos de microorganismos capaces de degradar los diferentes grupos de macromoléculas o una parte de ellos. En general se ha observado que para los tratamientos de FORSU con cepas selectas o enzimas no es una opción porque la cepa o enzima entra en competencia con los microorganismos autóctonos, los cuales tienden a limitar a la cepa, en cambio en uso de inóculos como estiércoles, lodos aerobios, lodos anaerobios o los microorganismos autóctonos de la FORSU suelen presentar mejores rendimientos en la degradación de FORSU y en los procesos de fermentación de las macromoléculas (Cheng et al.,2021; Jørgensen et al., 2007).

La generación de biogás a partir de FORSU está disminuyendo considerablemente debido a que muchas plantas de biogás que utilizan la FORSU como biomasa y tienen una eficiencia de conversión relativamente baja y no logran competir con las eficiencias que se logran con otras biomásas como los cultivos energéticos (principalmente maíz, que son ricos en almidones o carbohidratos simples) y estiércoles (Tezel et al., 2016). Además, la FORSU a diferencia de las otras biomásas presenta una gran heterogeneidad lo que complica el control del proceso, también tiende rápidamente a fermentarse lo que puede causar problemas de inhibición en el proceso de metanización.

Los procesos de digestión anaerobia en dos etapas permiten aumentar la productividad del proceso puesto que se separa la etapa fermentativa de la etapa metanogénica, permitiendo que se operen como dos procesos distintos y en condiciones que favorezcan a cada una de las etapas (De Baere, 2000). Esto permite un mejor control y evita los problemas de inhibición por un exceso de generación de ácidos grasos volátiles, a pH inferiores a 6.5 los procesos metanogénicos se limitan. En reactores de una sola etapa la generación de ácidos grasos volátiles (AGV) debe ser igual de rápida que su consumo para no generar una limitante en la generación de metano (Jenkins et al., 2008).

En los procesos fermentativos se pueden obtener varios metabolitos como acetato, propionato, butirato, lactato y etanol, de todos ellos existen rutas metabólicas que pueden llevar a la posterior generación de metano. Cuando se realiza un proceso en dos etapas comúnmente se busca obtener una alta tasa de generación de AGV (acetato principalmente) en la primera etapa fermentativa (Wu et al., 2017; Zhou et al., 2018). El acetato es un intermediario clave para la generación de metano, el cual, durante el proceso de fermentación (pasa de glucosa a acetato) consume 51.0% de energía disponible en el proceso de digestión, el resto de la energía se distribuye de la siguiente manera: 33.6% de la energía está disponible para la producción de H₂ y solo 15.4 % está disponible para la generación de metano (Pipyn y Verstraete, 1981).

Pipyn y Verstraete (1981) en su estudio sobre la termodinámica del proceso de digestión anaerobia demostró que fermentaciones etanólicas y lácticas son más beneficiosas para los organismos sintróficos generadores de metano (bacterias fermentativas y archeas) que una fermentación hacia la generación de AGV. Debido a que en el proceso de fermentación etanólica y láctica se consume 55.9 y 49%, respectivamente, de la energía disponible para el proceso digestión anaerobia, el resto de la energía se encuentra disponible para la generación de metano. En cambio, al fermentar hacia butirato y propionato se consumen entre 63 y 88.7%, respectivamente, el etanol y el láctico presentan una distribución energética similar a la del acetato, la cual se distribuye casi en un 50% para la etapa de fermentación y el otro 50% para la etapa de metanización. En cambio, metabolitos como butirato y propionato ocasionan una descompensación de la energía y el proceso de fermentación consume más energía que el proceso de metanización.

En los últimos 4 años han aumentado los estudios de generar fermentaciones selectivas en el reactor acidogénico principalmente a etanol o láctico que, termodinámicamente pueden presentar un beneficio al proceso de metanización, pero un beneficio termodinámico no necesariamente se refleja en un beneficio cinético o en un aumento en la producción específica de metano, existen procesos que presentan una energía libre de Gibbs (ΔG°) negativo, pero la cinética de ese proceso puede durar años o décadas (Levine, 2002). Debido que no se conoce el efecto cinético específico de cada metabolito en la etapa de metanización (acetogénesis y metanización), los resultados con fermentaciones selectivas divergen. Wu et al., (2017) realizó una fermentación selectiva a etanol con residuos de fruta, encontró un aumento del 5% en la producción de metano, en cambio W. Li et al., (2017) afirma que al realizar una fermentación etanólica y acética con residuos de comida no se encontró un aumento en la producción de metano, pero si se disminuyeron los tiempos de metanización, Zhang et al., (2007) realizó una fermentación etanólica y láctica con residuos de un restaurante y determinó que no se presentó un aumento sino una disminución en la generación de metano cuando se operaba a concentraciones altas en el reactor de metanización.

Además, no existe un consenso sobre las condiciones en las cuales se pueden maximizar etanol o láctico en biomazas no sanitizadas (Una biomasa sanitizada es una biomasa que pasado por un proceso para reducir a la comunidad autóctona presente en la biomasa). En el caso de AGV sí se tiene conocimiento sólido, principalmente por su papel de intermediarios en la generación metano (Wu et al., 2017; Yu et al., 2018b; Zhang et al., 2007; N. Zhao et al., 2016). Se tiene conocimiento consolidado sobre producción de etanol y láctico como producto principal a partir de biomazas, pero por lo general tratan de eliminar la interacción de los microorganismos autóctonos de la biomasa en la fase de pretratamiento o adicionan una alta cantidad de inóculo para que domine sobre el consorcio autóctono (Kazemi et al., 2022; Ohara, 2003; Ohkouchi y Inoue, 2006).

Las condiciones en donde se presentan altas tasas de generación de etanol a partir de FORSU son en sistemas que operan con las altas cargas (que se encuentran asociados a tiempos de retención hidráulicos bajos) y a pH bajos (Taghizadeh-Alisaraei et al., 2019). Bajo estas condiciones también se puede favorecer la generación de lactato, se puede inocular con organismos fermentadores a etanol como *Saccharomyces cerevisiae* pero la generación de etanol principalmente se genera a partir de carbohidratos, por lo que realizar una fermentación 100% etanólica a la FORSU no permitiría la degradación de las fracciones de proteína y lípidos, que son fracciones muy importantes de la FORSU (Barampouti et al., 2019; Figueroa, 2018.; Zhou et al., 2018).

El pH es una variable importante para la selectividad hacia un metabolito, en particular en un proceso de fermentación, a pH de 6 se beneficia la generación de acetato, a pH de 5.5 se suele beneficiar la selectividad hacia butirato, a pH inferiores a 4.7 se puede lograr una inhibición de los organismos acidogénicos, pero se puede lograr la selectividad hacia etanol y lactato debido a que los organismos generadores de etanol o ácido láctico son resistentes a medios ácidos (Taghizadeh-Alisaraei et al., 2019; C. Wu et al., 2015; Zhou et al., 2018). Aunque se sabe que a estas condiciones se puede ser selectivo a etanol y láctico, no se conoce si la producción etanol está asociada con la generación de lactato (en las fermentaciones heterolácticas, el láctico y etanol son productos) o si el etanol se genera de una fermentación independiente a una fermentación heteroláctica.

En cuanto al efecto del tiempo de reacción o fermentación (TF) sobre la selectividad de la fermentación hacia etanol y ácido láctico utilizando FORSU como sustrato, se sabe que a tiempos relativamente cortos de 8 a 48 horas se pueden lograr concentraciones altas de etanol y láctico. Que en el caso del etanol se debe al agotamiento de carbohidratos simples (Lim et al., 2008). En cuestión de los AGV los TF suelen ser más grandes, entre 2 a 12 días, a tiempos cortos 2-4 días suelen primar la generación de acetato, a TF de 4-8 días se genera butirato, acetato y trazas de propionato y/o valerato y a TF superiores a 8 días puede predominar el propionato, butirato y la formación de AGV de más de 5 carbonos y además se presenta una importante formación de acetato que se asocia a la

acetogénesis del butirato y no a una fermentación acetogénica (Han y Shin, 2002). En general, que el TF esté asociado a la degradación del sustrato a TF cortos solo da tiempo a degradar moléculas simples, en cambios a tiempos largos da oportunidad a que los microorganismos degraden moléculas más complejas.

El presente trabajo busca analizar la fermentación de la FORSU como una primera etapa a la etapa de metanización, para determinar de los productos de la fermentación de FORSU sobre su metanización a partir de la producción específica de metano y su cinética. Luego se realizarán procesos de fermentación en FORSU buscando entender cómo afectan las variables inóculo, pH y tiempo de reacción a la selectividad de etanol, láctico y AGV, los digestatos generados se llevarán a metanizar, para determinar qué fermentaciones permiten tener mayores producciones específicas y mayores tasas de generación de metano (cinética) en comparación a metanizar FORSU sin fermentar.

1.1 Hipótesis

Por medio de una fermentación etanólica y láctica de FORSU es posible mejorar la producción específica de metano de metano en una posterior etapa de metanización.

1.2 Objetivo general

Determinar la influencia del tiempo de reacción, inóculo y pH sobre la producción y selectividad de etanol y ácido láctico sobre ácidos grasos volátiles a partir de residuos sólidos orgánicos municipales.

1.3 Objetivos particulares

- Determinar la producción específica de metano y la cinética de metanización de los principales productos de la fermentación de la FORSU sin control de pH.
- Determinar el efecto de los inóculos *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) y lodos de UASB en la selectividad de la fermentación de la FORSU y comparar con una fermentación con microorganismos autóctonos.
- Determinar el efecto del pH y tiempo de reacción en la selectividad de la fermentación de la FORSU.
- Evaluar la producción de metano y la cinética de metanización de los digestatos generados producto de la FORSU previamente fermentada.

1.4 Alcances

- El sustrato de alimentación al reactor fermentativo será la FORSU generada en la Ciudad de México, la cual será obtenida de la estación de transferencia Coyoacán.
- Para la etapa de fermentación se utilizarán como inóculos, los lodos anaerobios granulares provenientes del reactor UASB de una planta de tratamiento de aguas residuales de la fábrica de cerveza y *Saccharomyces cerevisiae* comercial.
- Para la metanización de la FORSU se utilizará, como inóculo, los lodos anaerobios granulares provenientes del reactor UASB de la planta de tratamiento de aguas residuales.
- Todos los experimentos se realizarán a escala de laboratorio.

2. Composición de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

La composición orgánica de los residuos orgánicos urbanos varía significativamente según las regiones, las temporadas, los esquemas de recolección y las características de procesamiento.

Dado que el componente principal de la FORSU son residuos de comida y en algunos países donde su normativa lo permite, mezcla con residuos de poda, la composición bromatológica está bien establecida en términos de grasas, almidón, hemicelulosa y celulosa (Campuzano y González Martínez, 2016). En este contexto, la FORSU en la mayoría de los países comprende: lípidos (9% g/g SV), proteínas (14% g/g SV) y carbohidratos (35% g/g SV) y dependiendo de la normativa puede variar la composición de lignina, pectina, vitaminas, nutrientes, extractos y cenizas (Deronzier et al., 2002; Dong et al., 2010).

2.1. Características de la FORSU y sus fracciones

Campuzano y González-Martínez, (2016) en su estudio analizan las características de la FORSU de 43 ciudades en 22 países diferentes, donde se puede observar la heterogeneidad de la FORSU y cómo cambia debido a la posición geográfica. Concluyen que el pH de FORSU tiende a ser ácido con un intervalo de 3.9 a 7.9 y un promedio de 5.2 ± 0.95 . El rango de sólidos totales (ST) para las 43 ciudades fue de 15 a 50.2 %, el promedio reportado de ST fue de 27.2 ± 7.6 % y valor promedio de humedad de 72.8 ± 7.6 %. En términos del contenido de sólidos volátiles (SV) el rango de variación se presentó desde valores de 7.4 hasta 36.1%.

Figuroa-Escamilla y González-Martínez (2021) realizó un estudio sobre las fracciones que componen a la FORSU de la Ciudad de México, encontró que la FORSU se compone de 9 fracciones, ver tabla 2-1, que se distribuyen de la siguiente manera: frutas (36%), vegetales (13%), origen animal (8%), harinas (3%), poda fresca (6%), papel (2%), hojas secas (7%), ramas (4%), sin clasificar (20%) y contaminantes (1%). El 50 % de la FORSU se compone de frutas y verduras que a su vez tienen un alto contenido de carbohidratos degradables 37.7 y 29.9% SV respectivamente y la fracción con menor contenido de carbohidratos es la fracción de origen animal, 6.3% SV.

La fracción de origen animal es la que contiene menos contenido de complejo lignocelulósico (4.6%), las 8 fracciones restantes presentan un contenido de complejo lignocelulósico entre el rango de 16 hasta 59.3% de los SV. Aunque la FORSU se compone de fracciones con alto contenido de complejo lignocelulósico, la FORSU como matriz no presenta el mismo comportamiento, el contenido de complejo lignocelulósico es de 16.4% y su contenido de carbohidratos degradables es del 68%. Es debido al alto contenido de carbohidratos degradables que la FORSU se considera una biomasa susceptible para la generación de etanol, butanol, AGV, biogás, etc (Campuzano y González-Martínez, 2015).

Tabla 2-1. Características de fracciones de la FORSU de la CDMX, estación de transferencia de Coyoacán (Figuroa, 2018.).

Fracción	Proteína (%SV)	Lípidos (%SV)	Carbohidratos degradables (%SV)	Complejo lignocelulósico (%SV)
Origen animal	37.3	39.3	6.3	4.6
Harina	12.3	12.1	12.1	31.7
Sin clasificar	13.1	18.1	19.7	26
Papel de cocina	6.2	20.3	74.3	25.9
Frutas	9.4	8.2	37.7	16
Poda fresca	13	15.2	34.2	23.1
Vegetales	12.1	9.6	29.9	23
Hojas secas	8.9	16.6	24.7	21.5
Ramas	4.4	9.7	25.9	59.3
FORSU	16.8	13.5	68	16.4

2.2. Composición bromatológica

La composición bromatológica de la FORSU en términos de macromoléculas como grasas y aceites, proteínas y carbohidratos, varía en cada país, también por ciudad, en la tabla 2-2 se presenta la composición de la FORSU de varias ciudades del mundo. Las diferencias son altas en cada una de las columnas de la tabla por lo cual no se puede generalizar. Esto podría atribuirse a diferentes sistemas de gestión junto con diversas condiciones regionales, socioeconómicas y dietéticas. El contenido de grasas y aceites va de 8.5% en Indore a 19.0% en Padua, proteína de 6.8% en India a 25.8% en Reino Unido, fibra cruda de 3.5% en Dinamarca a 33.5% en Indore y carbohidratos totales de 39.7% en Ciudad de México a 53.5% en Irán.

Tabla 2-2. Composición bromatológica de la FORSU

País	Ciudad	GA	P	FC	L	C	H	A	CT	Referencia
Colombia	Bucaramanga	ND	ND	18.8	4.9	6.0	2.7	ND	ND	(Castillo et al., 2006)
México	Ciudad de México	13.1	11.4	29.7	10.1	15.8	3.8	ND	39.7	(Campuzano y González-Martínez, 2015)
Italia	Treviso	10	15	ND	12.0	4.2	5.1	24	41.3	(di Bitonto et al., 2018)
	Padua	19.0	16.0	21.1	5.0	11.0	5.1	16.0	57.0	(Alibardi y Cossu, 2015)
Reino unido	Newtown	16.6	25.8	ND	1.8	5.5	4.2	ND	49.8	(Zhang et al., 2012)
	Lester	10.8	20.5	ND	29.0	39.7	8.2	ND	53.5	
Dinamarca	Copenhague	8.1-16.6	8.1-16.6	3.5-15.5	ND	ND	ND	11.7	ND	(Davidsson et al., 2007)
	Grindsted	ND	ND	ND	31.5	15.9	4.3	11.3	ND	(Hartmann y Ahring, 2005)
India	Indore	8.5	6.8	33.5	8.5	15.5	9.5	ND	ND	(Rao y Singh, 2004)
Grecia	Atenas	9.2	10.0	ND	6.3	3.2	11.1	26.0	50.3	(di Bitonto et al., 2018)

GA: grasas y aceites; P: proteína; FC: fibra cruda; L: lignina; C: celulosa; H: hemicelulosa; A: almidón; CT: carbohidratos totales; Unidades: (%) g/gSV

Barampouti et al., (2019) concluye en su estudio de caracterización de FORSU de diferentes regiones del mundo: La FORSU podría considerarse como un sustrato ideal para procesos biológicos dado su contenido en humedad (~70%), materia orgánica (más del 70%), metales y macro/micronutrientes. Además, su alto contenido de carbohidratos (35-50%) refleja su potencial en la producción de AGV y/o bioetanol, mientras que su contenido de grasa y aceite (8-13%) revela que podría ser una materia prima para la producción de biodiesel.

De acuerdo con Nielfa et al. (2015) la degradabilidad anaerobia de la FORSU depende de su composición en términos de carbohidratos, proteínas, lípidos y compuestos escasamente degradables como las fibras. Mientras que Hartmann y Ahring, (2006) señalan que el potencial de biogás depende en gran medida de la calidad y biodegradabilidad del sustrato, especialmente en los contenidos de macromoléculas como lignocelulosas.

2.2.1. Carbohidratos

Los hidratos de carbono (también llamados glúcidos o glícidos) constituyen una parte fundamental de la alimentación. En la tabla 2-3 se indican los distintos hidratos de carbono. El primer grupo contiene carbohidratos que consisten en azúcares más simples. Estos incluyen mono y disacáridos que son, en su mayoría, solubles en agua y fácilmente degradables bajo condiciones anaerobias (Labatut et al., 2011; Y. Li et al., 2017). El segundo grupo de polisacáridos con estructuras simples es el almidón, que es una de las sustancias orgánicas fácilmente degradables bajo condiciones anaerobias. El tercer grupo de carbohidratos está compuesto por el complejo lignocelulósico que presenta una baja degradación. El complejo lignocelulósico consisten en pectinas, hemicelulosas y celulosa, por lo que su degradabilidad es compleja (Labatut et al., 2011; Y. Li et al., 2017).

Yang et al., (2015) muestran que los primeros tres días de digestión anaerobia presentaron una fase de retraso para la degradación de proteínas en comparación con la degradación rápida de carbohidratos al inhibirse la formación de proteasas. La eficiencia final de degradación de proteínas y carbohidratos es del 35% y 50%, respectivamente.

Tabla 2-3. Clasificación de carbohidratos (Mataix Verdú, 2009)

	Grado de polimerización	Subgrupo
Azúcares simples	Monosacáridos	Glucosa, fructosa, galactosa
	Disacáridos	Sacarosa, lactosa, maltosa
Oligosacáridos	α -glucanos (maltodextrinas)	Productos de hidrólisis parcial del almidón
	No α -glucanos (fructooligosacaridos)	Galactooligosacáridos (rafinosa, estaquiosa y verbosa)
Polisacáridos	α -glucanos (maltodextrinas)	Amilosa
		Amilopectina
	No α -glucanos (polisacáridos no almidonáceos)	Pared celular
		Celulosa
		Hemicelulosa
		Pectinas

La hidrólisis de polisacáridos con estructuras simples por lo general se lleva a cabo sin mucho obstáculo. Los mono y disacáridos se hidrolizan más rápido que los polisacáridos, ya que en su mayoría son solubles en agua. Además, cuanto más complicada es la estructura de los carbohidratos, más enzimas participan en la hidrólisis y la degradación es más compleja. Los monómeros de azúcar formados a partir de los carbohidratos en la hidrólisis son fácilmente acidificables, por lo que su

acidificación generalmente no es un paso limitante (Alibardi y Cossu, 2016). Una limitación del proceso de degradación solo puede ocurrir a altos valores de pH, debido a que la formación óptima de ácido tiene lugar por debajo del valor de pH de 6.5 (Buchholz, 1986). La acidificación se caracteriza por un valor de pH que disminuye rápidamente y luego por una presión parcial de hidrógeno que aumenta rápidamente. Los productos de descomposición formados durante la acidificación dependen de las condiciones ambientales, en particular de la presión parcial de hidrógeno.

Los carbohidratos, principalmente los monosacáridos, son los sustratos más importantes para los procesos fermentativos y de los cuales, en procesos industrializados, son el sustrato de preferencia porque la fermentación de carbohidratos ocurre de manera directa (Zamri et al., 2020; Zou et al., 2019). En la figura 2-1 se presentan los pasos para el proceso de fermentación de carbohidratos complejos que se pueden encontrar en la FORSU, como son la hemicelulosa, celulosa y los almidones, los cuales se hidrolizan principalmente a hexosas y pentosas, que a su vez son los precursores de la fermentación, independientemente de si la fermentación parte de una hexosa o pentosa, sus rutas metabólicas generan piruvato, que es la molécula eje para la transformación a los productos; los productos que se obtienen son ácidos como: láctico, acético, butírico, propiónico y valérico, y alcoholes como: metanol, etanol, butanol (Luo et al., 2018; Taghizadeh-Alisaraei et al., 2019; Thygesen et al., 2021). Un punto importante es que no todos los carbohidratos complejos se pueden fermentar, por ejemplo, las ligninas son de difícil degradación, lo que implica que es difícil descomponerse en monosacáridos (Moretto et al., 2019).

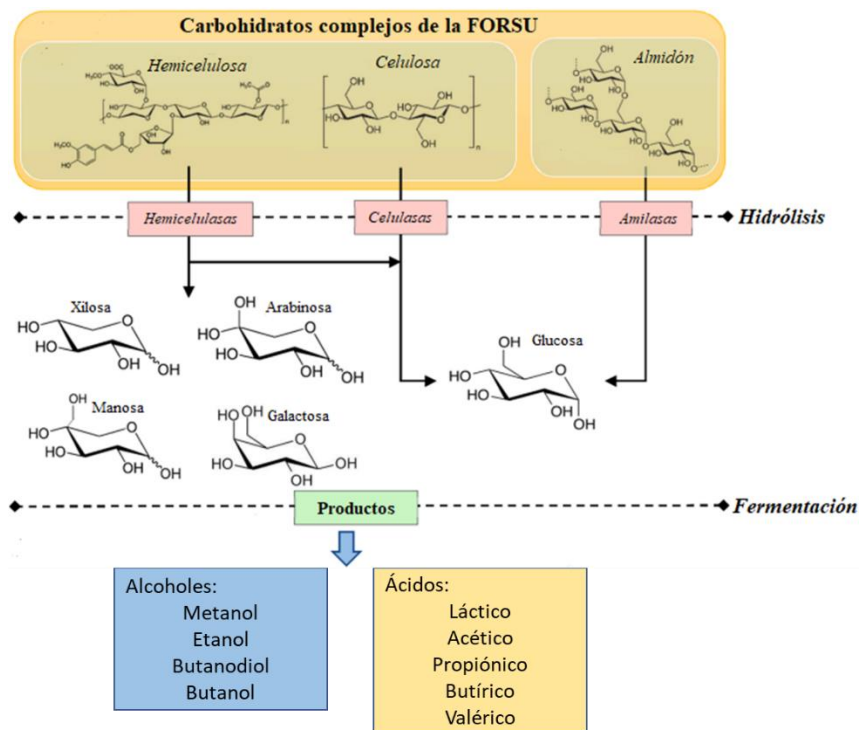


Figura 2-1. Esquema general de una fermentación a partir de carbohidratos complejos (Luo et al., 2018)

En la figura 2-2 se presentan las rutas metabólicas para una pentosa como la xilosa y una hexosa como la glucosa, en general se observa que independiente del monosacárido la ruta metabólica busca llegar a la molécula de piruvato, de la cual se puede obtener como primer producto de la fermentación y de manera directa el lactato, si el microorganismo transforma el piruvato en acetyl-CoA, esta molécula puede generar dos productos de la fermentación que son el acetato y el etanol (generalmente

la fermentación etanólica es estrictamente a hexosas) y, si la acetil-CoA es transformada a butiril-CoA, el microorganismo obtendrá como productos de la fermentación butirato o butanol (Luo et al., 2018; Song et al., 2021; Zamri et al., 2020; Zou et al., 2019).

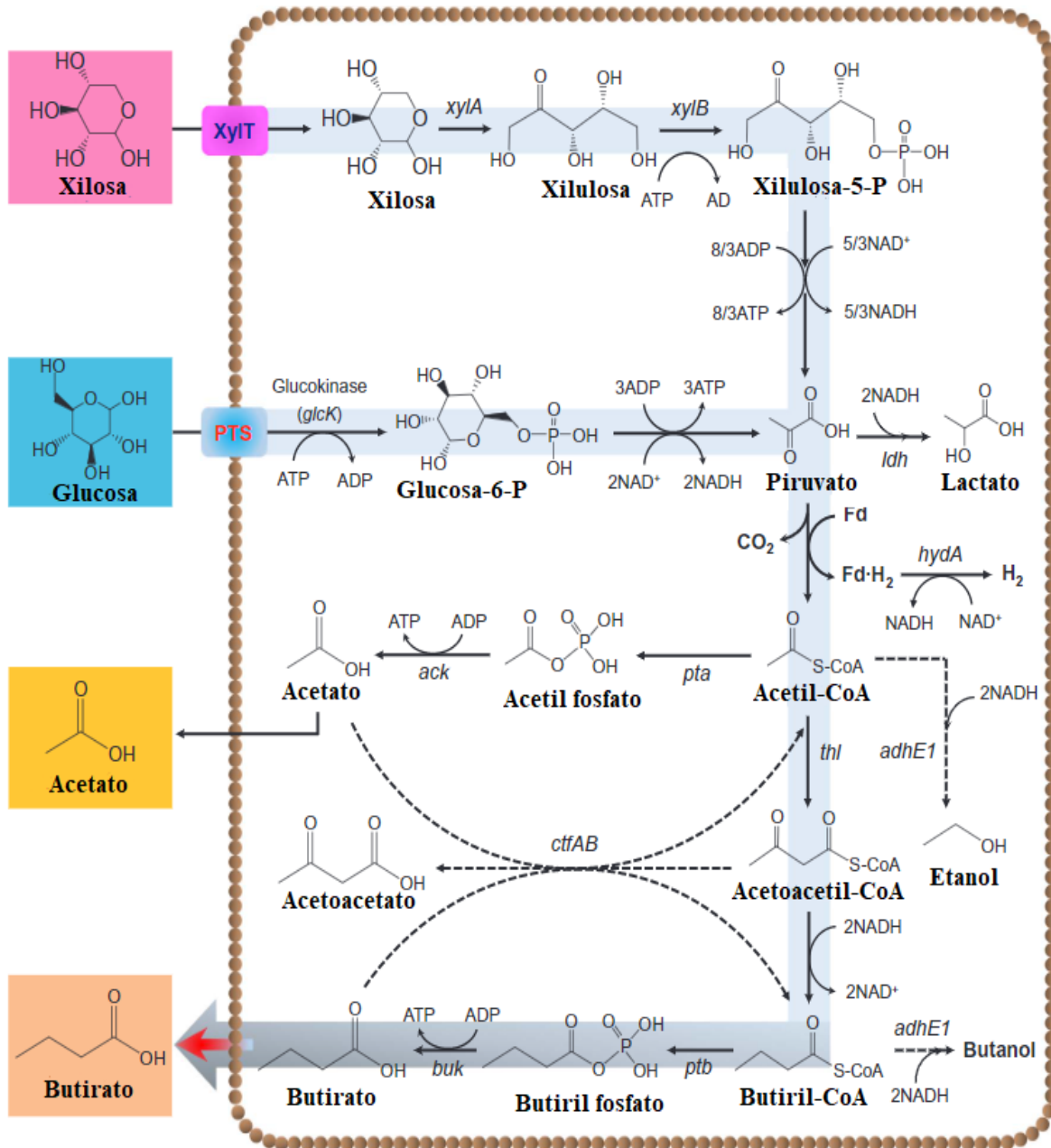


Figura 2-2. Rutas metabólicas de la fermentación (Luo et al., 2018)

2.1.1. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas constituidas a partir de aminoácidos que llevan al menos un grupo amino y un grupo carboxilo. Las proteínas son hidrolizadas en péptidos y aminoácidos por la acción de enzimas proteolíticas extracelulares llamadas proteasas. Parte de estos aminoácidos son utilizados directamente en la síntesis de nuevo material celular y el resto son degradados a ácidos volátiles, dióxido de carbono, hidrógeno, amonio y sulfuro en posteriores etapas del proceso. La degradación

de proteínas a los ácidos orgánicos se produce por medio de tres vías: la reacción de Stickland, desaminación oxidativa del único aminoácido y desaminación reductiva del único aminoácido. La primera reacción controla casi el 90% de la degradación, la segunda, con hidrógeno como uno de los productos, requiere valores extremadamente bajos de presión parcial de hidrógeno, mientras que la tercera consume hidrógeno (Alibardi y Cossu, 2016).

La presencia de proteínas puede mejorar el proceso de fermentación al proporcionar los nutrientes necesarios para la célula en crecimiento (Alibardi y Cossu, 2016). Sin embargo, la degradación de aminoácidos implica reacciones que consumen hidrógeno y estudios han demostrado que los sustratos ricos en proteínas producen niveles más altos de amoníaco que inhiben a las archeas metanogénicas (Y. Li et al., 2017). La concentración de amoníaco producido se correlaciona con la cantidad de aminoácidos (proteínas) degradados. Por lo tanto, el grado de degradación proteica se puede conocer observando la concentración de amoníaco (Okamoto et al., 2000).

Principalmente las proteínas se utilizan para síntesis celular, la generación de biomasa no requiere de la remoción del radical amino, en el caso que en un sistema se terminen los carbohidratos, los microorganismos empiezan la obtención de energía a partir de proteínas o grasas. Primero las proteínas tienen que hidrolizarse a aminoácidos, luego tienen dos rutas para la utilización de aminoácidos como fuente de energía, la primera es la producción de glucosas a partir de aminoácidos (gluconeogénesis) y realizar la fermentación de la glucosa para la obtención de energía (Alibardi y Cossu, 2016, 2015; Shen et al., 2017; G. Yang et al., 2015). La mayoría de los microorganismos anaerobios no tiene la capacidad de realizar la gluconeogénesis por lo que recurren a la segunda ruta metabólica que es la fermentación u oxidación directa de aminoácidos donde se busca generar una molécula de piruvato y así seguir las rutas metabólicas presentadas en la figura 2-2, los productos principales son AGV, por ejemplo, en la fermentación directa de la lisina se genera una molécula de ácido butírico y acético. O en la fermentación de alanina y glicina se obtienen ácido acético, amoníaco y dióxido de carbono (G. Yang et al., 2015).

2.1.2. Lípidos

Las grasas se forman a partir del éster de alcohol trivalente, glicerol, con tres ácidos grasos cada uno. La naturaleza hidrofóbica de las grasas y aceites los hace insolubles en agua y se adhieren fácilmente a las partículas de desecho. Las grasas y aceites son fácilmente hidrolizados a ácidos grasos de cadena larga y luego a acetato, dióxido de carbono e hidrógeno (C. Wang et al., 2017). La degradación de los ácidos grasos de cadena larga son reacciones termodinámicamente desfavorables a menos que la presión parcial de hidrógeno se mantenga en un nivel extremadamente bajo (Okamoto et al., 2000). Además, lleva mucho tiempo degradar los ácidos grasos de cadena larga por bacterias anaerobias, ya que los ácidos grasos de cadena larga inhiben a las bacterias anaerobias al adherirse a la membrana celular y disminuyen la eficiencia del transporte de nutrientes (Alibardi y Cossu, 2016).

Al igual que las proteínas, los lípidos son utilizados para la obtención de energía cuando los carbohidratos se terminan o se presenta una cantidad limitada en el sistema, como una primera etapa de la hidrólisis de los lípidos se separa el glicerol de sus ácidos grasos, el glicerol puede entrar a la glucólisis, formar un piruvato y continuar el proceso de fermentación, en el caso del proceso de oxidación parcial de ácidos grasos no se le suele llamar fermentación sino β -oxidación de ácidos grasos, proceso por el cual la cadena principal de un ácido graso de cadena larga o media sufre la remoción de un par átomos de carbono, con los que se genera una acetil-CoA que puede entrar a las rutas metabólicas de la fermentación figura 2-2, teniendo como productos principales ácido butírico y acético, los productos finales como los alcoholes generalmente no se producen a partir de la β -oxidación (di Bitonto et al., 2018; Dong et al., 2022; Maurus et al., 2020).

La β -oxidación se realiza en cuatro etapas que se presentan en la figura 2-3, se parte ya de la unión entre el ácido graso y la acetil-CoA, a partir de esto la primera etapa es la oxidación por flavín adenín dinucleótido (abreviado FAD en su forma oxidada), la segunda etapa es la hidratación de los carbonos C-2 y C-3, la tercera etapa es la oxidación por NAD^+ con el fin de convertir el grupo hidroxilo en un grupo cetona y por último el tiólisis que es la separación de cetoacil-CoA para formar una molécula de acil-CoA y otra de acetil-CoA (De Baere, 2000; Dong et al., 2022; Jenkins et al., 2008).

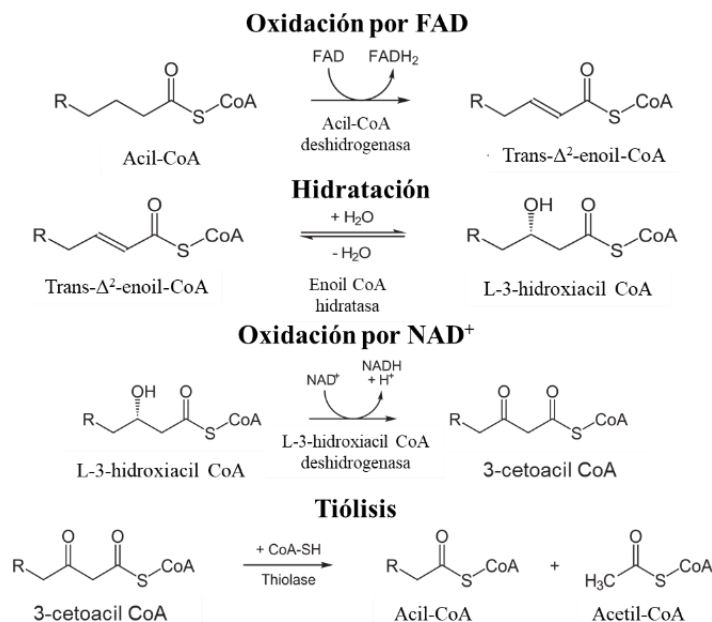


Figura 2-3 β -oxidación de grasas para la generación de acetil-CoA (Berg et al., 2007)

2.1.3. Lignina y Complejo lignocelulósico

Las ligninas son macromoléculas con elevado peso molecular que resultan de la unión de alcoholes fenil-propílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico). El acoplamiento aleatorio de estos radicales da origen a una estructura tridimensional, de polímero amorfo, altamente ramificada. La lignina y los polisacáridos, tales como celulosa y hemicelulosas forman un enlace estructural en el que la lignina puede penetrar en los polisacáridos membranosos y rellenar los espacios entre las células, creando el complejo lignocelulósico (Zhou et al., 2014). Los componentes como la celulosa y la hemicelulosa son fermentables pero a causa de la estructura fuertemente integrada de este complejo no son accesibles, debido a la lignina que altera la degradación microbiana de los polisacáridos, pues se comporta como una barrera física (Buxton y Russell, 1988).

3. Fermentación de FORSU como primera etapa de la digestión anaerobia

Debido a la composición de la FORSU y a los avances en biotecnología, los productos de valor agregados que se le pueden extraer a la FORSU son amplios, entre ellos se encuentran el etanol, biodiesel, ácidos grasos volátiles, hidrógeno, metano; todos los anteriores se realizan bajo procesos fermentativos, además el digestato resultante se puede utilizar como mejorador de suelos (Demichelis et al., 2018).

Uno de los procesos con más desarrollo es la generación de metano a partir de una biomasa (residuos agrícolas, cultivos energéticos, estiércoles, FORSU y aguas residuales), se estimó que la producción de metano ha aumentado considerablemente desde 2011: la producción aumentó de 752 GWh en 2011 a 17,264 GWh en 2016 (+16,512 GWh). Solo en 2016, la producción de metano en Europa aumentó a 4,971 GWh (+ 40%). Los países que vieron el desarrollo más significativo en la producción de metano en 2016 fueron: Alemania (+900 GWh) y Francia (+133 GWh).

3.1. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el que la materia orgánica mediante la acción de un grupo de bacterias específicas, se transforma en productos gaseosos o “biogás” (CH_4 , CO_2 , H_2 , H_2S , etc.) y en un digestato, que es una mezcla de productos minerales (N, P, K Ca, etc.) y compuestos de difícil biodegradación (IDEA, 2007). La digestión anaeróbica es una forma de tratar la fracción orgánica de RSU con el fin de proporcionar un producto estabilizado y tener como consecuencia la producción de biogás, un gas rico en metano (50 – 70% v/v) con un alto poder calorífico que puede usarse como combustible (Roati et al., 2012; Sawatdeenarunat et al., 2016).

3.1.1. Etapas de la digestión anaerobia

Hidrólisis. Es la primera etapa del proceso de digestión anaerobia, para que los microorganismos puedan acceder al potencial de energía química de la materia orgánica, las cadenas largas de las moléculas orgánicas deben ser fragmentadas a sus partes constituyentes. Estos monómeros como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta y larga (provenientes de los carbohidratos, proteínas y lípidos, respectivamente) están en estado de biodisponibilidad y los microorganismos pueden usarlos para nutrirse (Gregor y Grilc, 2012). Los procesos de ruptura de cadenas largas a los monómeros correspondientes reciben el nombre de hidrólisis y es llevado a cabo por la acción de enzimas extracelulares que son excretadas por bacterias fermentadoras (Mata-Alvarez, 2002).

Acidogénesis. Es la segunda etapa, también conocida como fermentación. Los productos obtenidos en la etapa de hidrólisis (monómeros y dímeros) son convertidos principalmente por bacterias anaerobias y facultativas, a ácido acético y otros ácidos grasos volátiles (AGV), ácidos grasos de cadena larga (AGCL), alcoholes, aldehídos, hidrógeno y dióxido de carbono (Ali Shah et al., 2014). En esta etapa se producen principalmente ácidos grasos de más de dos átomos de carbono como los

ácidos propiónico o butírico (Khanal, 2008). Las proporciones de los diferentes subproductos dependen de las especies de microorganismos y de las condiciones ambientales dentro del reactor.

Acetogénesis. En esta etapa los microorganismos facultativos transforman los productos finales de la etapa anterior en acetato, hidrógeno y CO₂, aportando aproximadamente el 54% del hidrógeno que se utilizará en la formación de metano (Deublein y Steinhauser, 2008). La etapa de acetogénesis es de vital importancia debido a que los productos finales de la acetogénesis son los utilizados en la producción de biogás; sin embargo, deben estar en determinadas cantidades, puesto que, en caso de existir una elevada concentración de hidrógeno, se inhibe la producción de metano, incrementando la concentración de AGV (como el ácido propiónico y butírico) dentro del reactor, acidificándolo y disminuyendo el pH. El nivel óptimo de presión parcial de hidrógeno para que las reacciones de acetogénesis sean termodinámicamente favorables (el intercambio neto de energía, ΔG° , debe ser negativo) está ubicado dentro del rango de 10^{-4} a 10^{-5} atm (Mata-Alvarez, 2002).

Metanogénesis. La generación de metano se da por las siguientes rutas metabólicas: una es la conversión que hacen las archeas acetoclásticas metanogénicas o acetotróficas, donde el precursor es el ácido acético y aporta la mayor proporción de metano: el 70% del metano es producido mediante esta ruta metabólica (Khanal, 2008). La metanogénesis hidrogenotrófica emplea H₂ y CO₂, donde el dióxido de carbono es el aceptor de electrones mientras que el hidrógeno actúa como donador. Esta ruta genera una cantidad menor de metano, el 30% del metano restante (Khanal, 2008) y posee un papel importante en el proceso. Las bacterias hidrogenofílicas o consumidoras de hidrógeno evitan la acumulación del hidrógeno en el sistema y por ende evitan el incremento de la presión parcial de este, la cual es una de las causas de inhibición de los microorganismos metanogénicos (Mata-Alvarez, 2002).

3.1.2. *Procesos en una o dos etapas*

En los procesos de una sola etapa todas las reacciones se realizan en un solo reactor en el que se alimenta el sustrato periódicamente (De Baere, 2000). Los digestores de una etapa son sencillos de diseñar, construir y operar, y generalmente son menos costosos. Si los procesos en una etapa son operados en condiciones ideales, se puede obtener un rendimiento biológico tan eficiente como el de los sistemas de dos etapas (Forster, 2005). Una de las desventajas de este proceso es que la tasa de carga orgánica está limitada por la capacidad de los organismos metanogénicos para tolerar la repentina disminución del pH que resulta de la rápida producción de ácidos durante la acidogénesis (Rapport et al., 2008).

En los procesos de dos etapas se busca a través de la separación física de los reactores establecer condiciones óptimas tanto para la etapa de fermentación (hidrólisis-acidogénesis-acetogénesis) como para la metanogénesis (acetogénesis y metanización); optimizando así las actividades metabólicas específicas y, en última instancia, maximizando la generación de metano (Schievano et al., 2010). Esta configuración de los reactores también implica la separación de la ecología natural y el metabolismo del consorcio de microorganismos responsables del proceso de digestión anaerobia; de allí que para la primera etapa la tasa limitante es la hidrólisis y para la segunda, la velocidad del crecimiento bacteriano (De Baere, 2000; Luongo Malave' et al., 2014).

Un proceso de dos etapas o multi etapas es una estrategia para aumentar el rendimiento global del proceso en términos de estabilidad, eficiencia de degradación, tanto en la fase de fermentación como de metanogénesis y, por tanto, en términos de recuperación total de energía. Esto se logra a través de la aplicación de condiciones diferentes a los reactores en cada etapa, lo que permite que cada etapa opere a las condiciones donde obtenga mayor rendimiento (Jenkins et al., 2008).

En la primera etapa que corresponde al proceso fermentativo se ha generalizado maximizar el contenido de acetato, propionato y butirato y se le ha dado poca importancia a la generación de otros

metabolitos como etanol y lactato. El enfoque de realizar una fermentación etanólica como primera etapa de la digestión anaerobia (DA), ha sido limitado (Dionisi et al., 2015). Ren et al., (1997) propusieron una fermentación de tipo etanol; sin embargo, el objetivo era la generación de hidrógeno en lugar de la producción de etanol. Además, el etanol no se incluyó en el primer modelo de digestión anaeróbica (ADM1) porque se consideró que tenía una influencia limitada en los sistemas de baja carga; sin embargo, en sistemas de alta carga, el etanol es inevitable (M. Zheng et al., 2015).

En experimentos por lotes para el tratamiento de desperdicios de alimentos, Jiang et al. (2013) encontraron que cuando el pH del reactor no se controlaba operando a una temperatura mesófila, la concentración de etanol era de 11.75 g_{DQO}/L, lo que representa el 66.6% de los productos fermentativos. Además, Shen et al. (2013) informaron que la concentración de etanol fue de 12.52 g_{DQO}/L para la codigestión de residuos de comida en un reactor ácido donde la carga orgánica fue de 10 g_{SV}/(L·d). Zheng et al., (2015) propusieron la definición precisa de cuatro tipos de fermentación acidogénica, incluidos el tipo etanol, el tipo butirato, el tipo ácido mixto y el tipo propionato. Y la fermentación de tipo etanol se definió como la producción de etanol alcanzando un 30% (calculado como DQO equivalente) y su suma con el acetato es superior al 50% (Zheng et al., 2015).

3.1.3. Termodinámica del proceso de digestión anaerobia

La termodinámica juega un papel importante en la degradación de diversos compuestos orgánicos, todas las reacciones de óxido-reducción pueden describirse en términos termodinámicos con sus respectivos valores de cambio de energía libre de Gibbs, ver tabla 3-1 (Azbar et al., 2001). La reacción global es favorable solo si el cambio neto de energía libre, ΔG° , tiene un valor negativo. Si este valor es positivo, la reacción en cuestión no es favorable en condiciones estándar y para que esa reacción continúe es necesario que los productos de reacción (principalmente H₂) se reduzcan lo suficiente en concentración para producir un valor negativo en la energía libre de Gibbs.

Los valores de la tabla 3-1 muestran el cambio de energía libre de Gibbs para varios intermediarios partiendo de glucosa hasta llegar a metano. La conversión de glucosa en propionato produce el mayor cambio de energía libre (-358 kJ/mol) en comparación con el resto de los intermediarios, pero el propionato presenta la mayor dificultad en la conversión posterior a acetato e H₂ (+152 kJ/mol). La conversión de propionato también es más sensible a la presión parcial, mientras que la conversión de butirato, etanol y lactato son más tolerantes a aumentos en la presión parcial de H₂.

Pipyn y Verstraete, (1981) en su estudio determinaron como se distribuye la energía libre en los diferentes grupos de microorganismos que hacen posible el proceso de digestión anaerobia utilizando como sustrato glucosa. En el estudio los grupos de microorganismos son bacterias fermentativas, archeas consumidoras de hidrógeno y archeas consumidoras de acetato. Concluye que la cantidad de energía restante para las archeas metanogénicas depende en gran medida de los productos finales de la fermentación. La tabla 3-2 resume la cantidad de energía disponible para los microorganismos fermentativos y para las archeas. Se observa que la fermentación de glucosa a ácidos volátiles no es ventajosa para las archeas metanogénicas. La fermentación hacia etanol y ácido láctico, por otro lado, son más rentables tanto para bacterias como para archeas.

Los cambios de energía libre de Gibbs por mol de metano, permite observar la cantidad de energía que gana el microorganismo al realizar el metabolismo, ver tabla 3-3. Se observa que la ventaja de realizar una primera etapa de fermentación hacia etanol y lactato, es que en la etapa de metanización los microorganismos van a poder obtener una mayor cantidad de energía a partir de lactato y etanol (-59.5 y -68.8 kJ/mol de metano producido), que es casi el doble de lo que pueden ganar a partir de ácido acético, propiónico y butírico.(Azbar et al., 2001).

Tabla 3-1. Energías libre de Gibbs para reacciones en el proceso de digestión anaerobia (Azbar et al. 2001)

Número	Reacción	$\Delta G(\text{kJ/mol})$
	Reacción global	
1.	$C_6H_{12}O_6 + 3H_2O \rightarrow 3CH_4 + 3HCO_3^- + 3H^+$	-404
	Fermentación y/o acetogénesis	
	Acetato	
2.	$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 4H^+ + 2H_2$	-206
	Etanol como intermediario	
3.	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2C_2H_5COH + 2HCO_3^- + 2H^+$	-226
4.	$2C_2H_5COH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 2H^+ + 4H_2$	+19
	Lactato como intermediario	
5.	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHCOO^- + 2H^+$	-198.3
6.	$2CH_3CHCOO^- \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 2H^+ + 4H_2$	-8.4
	Otras reacciones con el lactato	
7.	$2CH_3CHCOO^- \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 2H^+$	-165
8.	$2CH_3CHCOO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 2H^+$	-56
	Butirato como intermediario	
9.	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 3H^+ + 2H_2$	-255
10.	$2CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+48
	Propionato como intermediario	
11.	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$	-358
12.	$2CH_3CH_2COO^- + 6H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + H^+ + 6H_2$	+152
	Metanol como intermediario	
13.	$8CH_3OH + 4HCO_3^- \rightarrow 6CH_3COO^- + 2H^+ + 12H_2O$	
	Metanización directa	
14.	$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + HCO_3^- + H^+ + H_2O$	
	Metanización	
	Vía acetotrófica	
15.	$2CH_3COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2HCO_3^-$	-62
	Vía hidrogenotrófica	
16.	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135

Tabla 3-2. Distribución de cambio de energía libre de Gibbs para comunidades fermentativas y microorganismos sintróficos a hidrógeno y metano (Pipyn y Verstraete, 1981).

Intermediario	Cambio de energía libre de Gibbs disponible para bacterias fermentativas (%)	Cambio de energía libre de Gibbs disponible para microorganismo sintróficos	
		H ₂ gas (%)	Metano (%)
Ácido acético	51.1	33.6	15.4
Ácido propiónico	88.7	0.0	11.3
Ácido butírico	63.0	16.8	20.2
Etanol	55.9	0.0	44.1
Ácido láctico	49.0	0.0	51.1

Tabla 3-3. Ganancia de ΔG por mol de metano producido

Sustrato	Cambio de energía libre Gibbs ΔG° , por mol de metano producido (kJ/mol)
Ácido acético	-31.0
Ácido propiónico	-32.3
Ácido butírico	-32.7
Etanol	-59.5
Ácido láctico	-68.8

3.1.4. Presión parcial de hidrógeno

Durante la acetogénesis el hidrógeno es un factor de regulación de la degradación anaerobia de compuestos orgánicos. La producción de hidrógeno en esta fase proviene de la oxidación del NADPH (nicotin-adenin-difosfo-nucleótido) cuyo potencial redox a pH 7 es -0.32 V (Mata-Alvarez, 2002). Sistemas con bajos potenciales redox, como el que se obtiene durante la acetogénesis del piruvato, se ven poco afectados por la presión parcial de hidrógeno y las reacciones están favorecidas, por lo cual no pueden ser controladas. Reacciones en sistemas con altos potenciales redox, como los que se presentan en la producción de H_2 a partir del NADPH, o en la acetogénesis a partir del propionato, ver figura 3-1, sólo estarán favorecidas a bajas presiones parciales de hidrógeno, condición que depende de la interrelación entre las bacterias fermentativas (BF) y las archeas metanogénicas hidrogenotróficas. Este último grupo, consume el hidrógeno generado por las BF manteniendo una presión parcial de H_2 a un nivel adecuado para que termodinámicamente pueda darse la conversión de los AGV a acetato e hidrógeno. Esta asociación se conoce como ‘relación sintrófica’ de hidrógeno (Azbar et al., 2001; Díaz-Báez et al., 2002; Mata-Alvarez, 2002).

A presiones parciales de H_2 mayores a 10^{-1} para el etanol, 10^{-4} para el propionato, y 10^{-5} para el butirato, la transferencia de hidrógeno no ocurre. A estos valores se produce una inhibición de las archeas hidrogenofílicas, lo cual genera una sobreproducción de H_2 cuya acumulación inhibe el proceso de digestión anaerobia. También es necesario tener en cuenta que en la etapa fermentativa las bacterias fermentativas transfieren los electrones vía H_2 a las bacterias hidrogenotróficas, haciendo que las primeras produzcan una mayor cantidad de acetato. Cuando la transferencia de hidrógeno no ocurre, el metabolismo de las bacterias fermentativas se desplazará hacia una mayor producción de compuestos reducidos como el etanol, el lactato, el propionato y el butirato (Díaz-Báez et al., 2002).

Las bacterias involucradas en el catabolismo de alcoholes o lactato pueden realizar su metabolismo sin necesidad de una transferencia de hidrógeno, pero sólo pueden degradar alcoholes o lactato cuando el hidrógeno es removido por asociación con archeas consumidoras de hidrógeno o cuando hay un aceptor de hidrógeno inorgánico (sulfato) u orgánico (fumarato) (Díaz-Báez et al., 2002; Mata-Alvarez, 2002).

Las bacterias que degradan carbohidratos simples y complejos crecen bien sin que se produzca la remoción de hidrógeno, sin embargo cuando están en presencia de archeas consumidoras de hidrógeno, incrementan la generación de productos por parte de las bacterias fermentativas, y si la tasa de generación de hidrógeno (fermentación) es igual a la tasa de consumo de hidrógeno (metanización hidrogenotrófica) se evita la acumulación de propionato y butirato en el sistema (Díaz-Báez et al., 2002). Esto no afecta a un sistema en dos etapas ya que las etapas de fermentación y metanización están separadas.

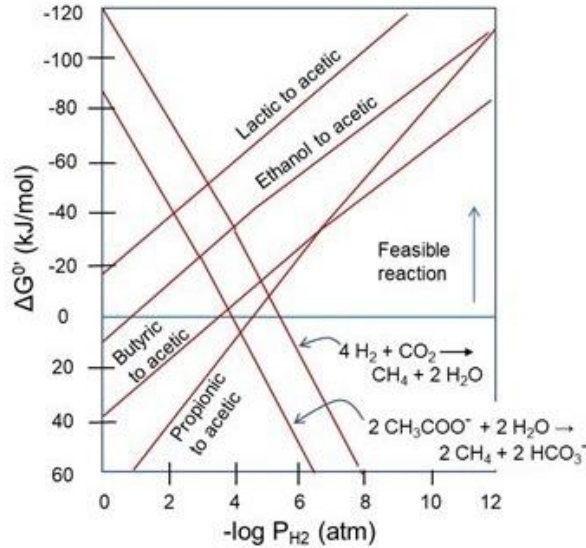


Figura 3-1 Efecto de la presión parcial de hidrógeno sobre la energía libre Gibbs (Jojoa-Unigarro y González-Martínez, 2021)

3.2. Fermentaciones a partir de FORSU

3.2.1. Fermentación ácida (AGV)

Las fermentaciones ácidas son las más estudiadas con relación a su efecto en la metanización debido principalmente a que, el ácido acético, es el metabolito directo de la metanización. Las fermentaciones ácidas pueden incluir a los ácidos con C1 hasta C10 y sus formas iso, por lo cual en esta sección se analizarán las fermentación acéticas, propiónicas y butíricas que son las más comunes (Chang et al., 2010; Ghimire et al., 2015; Strazzer et al., 2018).

Como se menciona anteriormente, los AGV pueden generarse a partir de carbohidratos, proteínas y grasas (sección 2-2, se presentan los mecanismos de fermentación carbohidratos, proteínas y grasas), cuando se presenta una fermentación con un sustrato no esterilizado en donde se presentará una competencia por sustrato, las fermentaciones ácidas tienen una ventaja sobre la fermentación etanólica, que depende principalmente de los carbohidratos y aunque las fermentaciones lácticas se pueden dar por proteínas, estos pueden tardar de 3 a 5 días (Yin et al., 2016). Pero las condiciones de operación pueden jugar un papel clave en la ruta metabólica que pueda tener un reactor. La generación de AGV se puede dar a un amplio rango de pH (5-8) pero se ha reportado que a pH entre (4-6) dominan las fermentaciones etanólicas o lácticas (Atasoy et al., 2019; Murali et al., 2017; Yin et al., 2016).

Para las fermentaciones se pueden utilizar diferentes tipos de inóculos, que se clasifican además en consorcios puros (cepas aisladas) y mixtos (obtenidos de varios hábitats ambientales, como lodos anaeróbicos, composta, suelo o microorganismos autóctonos) (Ghimire et al., 2015). Sin embargo, los consorcios mixtos son más adecuados para la producción de AGV debido a sus numerosas ventajas, como su capacidad para metabolizar un amplio espectro de sustratos, la tolerancia al pH ácido y alcalino, la simplicidad de los pasos del proceso ya que no se requiere esterilidad (Sekoai et al., 2021, 2019). Además, estos inóculos forman una relación sinérgica con otros microbios durante el proceso acidogénico, lo que resulta en una mayor producción de AGV (Deng y Wang, 2016; Jankowska et al., 2015). Entre las especies microbianas que se deben evadir son las archeas

metanógenas porque convierten estos metabolitos en metano y esto en un primer reactor fermentativo o acidogénico se debe evitar (Agneessens et al., 2018; Lecker et al., 2017). Para evitar la proliferación de organismos metanogénicos, se opera a pH por debajo de 6 en donde las archeas son inhibidas. Algunos de los filos (y géneros) generadores de AGV pertenecen al filo Firmicutes, incluidas las anaerobias obligadas y facultativas como *Clostridium sp.*, *Pseudomonas sp.*, otras bacterias pertenecen a los filos *Bacteroides*, *Proteobacteria* y *Actinobactia* (Sekoai et al., 2021).

En general en una primera etapa fermentativa para luego pasar a una etapa metanogénica, la producción de AGV suele maximizar la generación de acetato y butirato debido a que el acetato es el metabolito directo para la metanización y el butirato en el proceso de acetogénesis se divide en dos moléculas acetato, para ellos se ha observado que pH alrededor de 6 permiten que entre 60-85% de los metabolitos sean acetato y butirato (Atasoy et al., 2019; Garcia-Aguirre et al., 2017^a; Jankowska et al., 2017; Zou et al., 2019). Los AGV de más de 5 carbonos pueden generar propionato, la generación de propiónico se evita en la etapa fermentativa porque en la posterior etapa de metanización el propionato actúa como un inhibidor o recalcitrante que afecta principalmente a las hidrogenotróficas afectando el consumo de hidrógeno y, para pasar de propionato a acetato se necesita de presiones parciales de hidrógeno bajas, se ha observado que en reactores fermentativos se logran altas producciones de propionato y acetato, alcanzando entre 60-80% de total de metabolitos cuando se opera a pH entre 7-8 (más adelante se ampliara el efecto del pH en la fermentación de AGV) (Edwiges et al., 2020; Han et al., 2020; Kant y Yang, 2017; Shen et al., 2013^a).

3.2.2. Fermentación etanólica

El etanol es un tipo de alcohol inflamable que se obtiene a partir de la fermentación de materia orgánica, en la industria principalmente de material vegetal con alto contenido en celulosa y/o azúcares como caña de azúcar, cereales o remolacha. El etanol tiene los mismos usos que los combustibles que se queman para obtener otro tipo de energía, ya sea motriz o eléctrica (Sawatdeenarunat et al., 2016).

En la actualidad existen pocos estudios sobre fermentación alcohólica como una primera etapa fermentativa antes de la etapa de generación de metano a partir de FORSU (Wu et al., 2017). Bajo la definición de M. Zheng et al., (2015) propusieron cuatro tipos de fermentación, tipo etanol, tipo butirato, ácido mixto y tipo propionato. La fermentación de tipo etanol se definió de la siguiente manera, si en el proceso se obtiene un porcentaje de etanol del 30% (calculado como DQO equivalente) y la suma de acetato y etanol es superior al 50%. Sin embargo, existen investigaciones sobre la generación de etanol a partir de FORSU con el objetivo de utilizarlo como combustible, lo que nos permite realizar un análisis sobre los parámetros, condiciones e inóculos que se han utilizado para obtener mejores rendimientos en la generación de etanol.

En la figura 3 se presenta el diagrama de proceso para generación de etanol como producto principal a partir de FORSU. El pretratamiento de la FORSU se centra en modificar y romper las características estructurales de la FORSU, facilitando el acceso de las enzimas y maximizando la producción de monómeros de azúcar. (Hafid et al., 2017b). Debido al bajo contenido de monosacáridos en algunas biomásas, el pretratamiento permite una mayor acción de las enzimas que van a hidrolizar el complejo lignocelulósico para aumentar el contenido de monosacáridos. En esta etapa es necesario un proceso de sanitización antes de los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación, para que las enzimas seleccionadas y/o microorganismos no compitan con los microorganismos autóctonos provenientes en las biomásas (Barampouti et al., 2019).

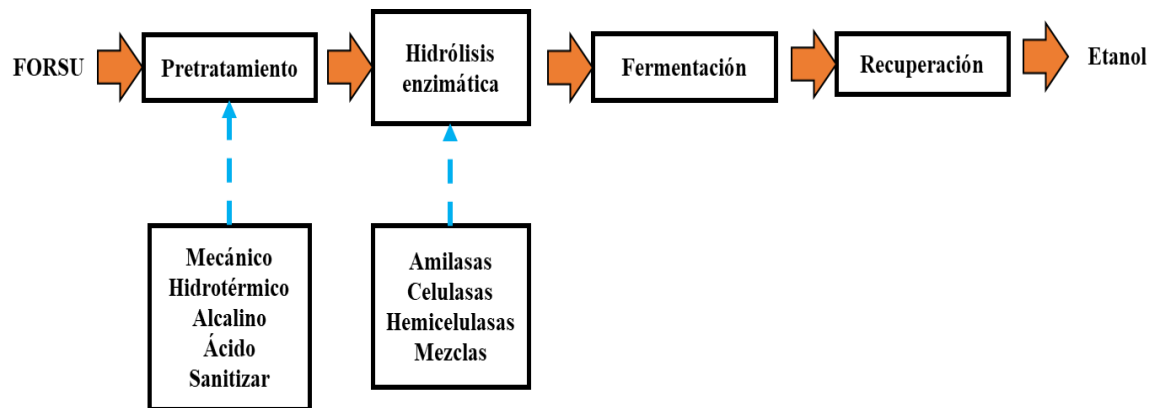


Figura 3-2. Proceso de fermentación alcohólica a partir de una biomasa

El proceso de hidrólisis enzimática es un paso crucial para la producción de bioetanol a partir de FORSU. Los carbohidratos estructurales de lignina, celulosa y hemicelulosa son los componentes objetivos, liberando durante la hidrólisis pentosas y hexosas que pueden utilizarse en la etapa de fermentación. Esta etapa se ve afectada por la enzima seleccionada y su especificidad, pueden ser amilasas, celulasas, hemicelulasas. Cada enzima tiene condiciones específicas de funcionamiento que condicionan a las parámetros de operación (Ballesteros et al., 2010).

El bioetanol es el producto metabólico de la fermentación de FORSU por levaduras y bacterias etanólicas. Los sistemas de fermentación pueden clasificarse según su modo operativo como continuo, semicontinuo o por lotes. Las características del hidrolizado y las propiedades cinéticas de los microorganismos son las fuerzas impulsoras para la selección del sistema más apropiado (Chandel et al., 2007). Desde el punto de vista de la viabilidad, una concentración mínima de etanol (4% p/v) debe considerarse como un umbral para la recuperación de etanol por destilación (Ballesteros et al., 2010). La alta concentración de etanol podría garantizarse mediante altas cargas de sólidos. Las concentraciones iniciales de FORSU superiores al 10-15% (ST) han sido técnicamente difíciles. La viscosidad inicial es muy alta, lo que hace que la agitación sea laboriosa acompañada de problemas de transferencia de calor y masa, lo que aumenta el consumo de energía en los reactores completamente mezclados (Fan y Lynd, 2007). En aplicaciones a escala piloto la concentración de ST se tiene como rango entre un 15-20% como límite superior manejable (Jørgensen et al., 2007).

La cepa microbiana más extendida para la producción de etanol es *Saccharomyces cerevisiae*, (levadura de panadería) (John et al., 2017), con alta tolerancia en compuestos inhibidores (Banerjee et al., 2010). Su uso en la FORSU ha sido ampliamente estudiado (Hafid et al., 2017^a; Loizidou et al., 2017; Uncu y Cekmecelioglu, 2011; Yan et al., 2011^a). También se ha informado que no es necesaria la adición de nutrientes para el funcionamiento correcto de la levadura durante la fermentación (Alamanou et al., 2015; Cekmecelioglu and Uncu, 2013; Li et al., 2007; Uncu y Cekmecelioglu, 2011; Y. F. Wang et al., 2017).

Además de *Saccharomyces cerevisiae*, otros organismos como bacterias han sido reportadas como etanógenos. *Zymomonas mobilis*, que es una cepa de etanol tolerante al ácido, presentó mayores tasas de producción de etanol en comparación con las levaduras convencionales para la fermentación de la FORSU y se encuentra presente en los residuos orgánicos, principalmente en desechos de frutas (Balat, 2011; Hafid et al., 2017b). En tabla 3-4 se presentan diferentes microorganismos y su respectiva reacción para la generación de etanol, se observa que las bacterias *Zymomonas* y las levaduras *Saccharomyces* generan una conversión del 100% debido a que no producen otro tipo de metabolito a excepción de dióxido de carbono, como es el caso de *Ethanoligenens harbinense* B49 que también genera ácido acético y *Lactobacillus* que genera ácido láctico.

Tabla 3-4. Reacciones fermentativas según tipo de microorganismo

Microorganismo	Reacción	Etanol (%)	H ₂ (%)	Referencia
<i>Zymomonas</i>	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$	100		(Swings y De Ley, 1977)
<i>Saccharomyces</i>	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$	100		(Lin y Tanaka, 2006)
<i>Ethanoligenens harbinense</i> B49	$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow 2C_2H_5OH + C_2H_3OOH + 2H_2 + 2CO_2$	60	50	(Ren et al., 1997)
<i>Lactobacillus leuconostoc</i>	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_2H_5OH + C_3H_6O_3 + 2CO_2$	50		(Kandler, 1983)

3.2.3. Fermentaciones lácticas

Al igual que el etanol, existen pocos estudios sobre el proceso de digestión anaerobia en dos etapas donde se busque una fermentación selectiva a láctico para observar el efecto en la metanización, pero existe información sobre fermentación láctica a partir de residuos sólidos donde el láctico es el producto final.

La fermentación láctica se puede sintetizar por métodos químicos y catálisis enzimática (Mäki-Arvela et al., 2014). Debido a la disponibilidad de materias primas, el ácido láctico con alta pureza óptica se puede obtener por fermentación microbiana, de modo que el 90% del ácido láctico es producido por fermentación microbiana. *Lactobacillus* son las cepas ampliamente utilizadas en lugar de levaduras, cianobacterias u otros microorganismos, ya que *Lactobacillus* existe ampliamente en la naturaleza, crece y se reproduce rápidamente (Ilmén et al., 2007; Wang et al., 2015; Wee et al., 2006). Aunque no se tiene en consideración el alto costo en la producción fermentativa de láctico, el costo de la materia prima, los costos de separación y purificación aguas abajo. Para reducir los costos de producción, se han utilizado desechos agrícolas, residuos de comida y otras materias primas baratas como sustrato para la producción de ácido láctico (Gu et al., 2018; Liang et al., 2016; Ohkouchi y Inoue, 2006; Panesar y Kaur, 2015; Peinemann et al., 2019). Como se ha señalado, los residuos de comida son ricos en polisacáridos, lo que los convierte en un buen sustrato para la producción de ácido láctico (Li et al., 2015; Wang et al., 2015) (Li et al., 2015; Wang et al., 2015b). La fermentación de residuos de comida o FORSU para producir ácido láctico puede lograr no solo la reducción de desechos sino también el reciclaje de desechos orgánicos dándole un valor agregado.

Algunos microorganismos procariontes, como las bacterias y las cianobacterias, pueden descomponer la materia orgánica para producir ácido láctico, al igual que algunos hongos y microalgas eucarióticos (Tan et al., 2017; Wang et al., 2014). Los microorganismos productores de ácido láctico específicos se pueden ver en la Tabla 1. Entre los microorganismos a los que se hace referencia en la Tabla 3-5, las bacterias ácido lácticas son los microorganismos de producción de ácido láctico más utilizados debido a su rápido crecimiento, reproducción y altas tasas de producción de ácido láctico. Las bacterias ácido lácticas son generalmente anaerobias obligadas o anaerobias facultativas que pueden crecer en una amplia gama de valores de pH y temperaturas (Bühlmann et al., 2020; Mäki-Arvela et al., 2014).

De acuerdo con los diferentes metabolitos y vías de fermentación de bacterias ácido lácticas, la fermentación láctica se puede dividir en homoláctica y heteroláctica (Wang et al., 2015), mientras que el metabolismo heteroláctico se puede transformar en hexosas y producir de manera equimolar láctico, etanol y acético, existe una segunda vía heteroláctica llamada “vía de la

hexocinasa” donde se generan dos moles de láctico y tres moles de acético. En el metabolismo del ácido homoláctico, solo el ácido láctico es el producto de fermentación (Song et al., 2021).

Tabla 3-5. Microorganismos lácticos y condiciones de metabolismo

Microorganismos productores de ácido láctico		Condiciones de operación	Producción	Referencia		
Procariontes	Bacteria	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	pH = 6.1, 37 °C, anaerobio	10 g/L	(Pagana et al., 2014)	
		BAL	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL-B1445	pH = 6.1, 37 °C, anaerobio	118 g/L	(Lee, 2005)
			<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 9649	pH = 6.1, 37 °C, anaerobio	77 g/L	(Demirci y Pometto, 1992)
		Bacillus	<i>Bacillus licheniformis</i> BL	pH = 7, 50 °C, anaerobio	130 g/L	(Q. Wang et al., 2011)
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> W	pH = 7, 37 °C, anaerobio	12.9 g/L	(J. Zhao et al., 2012)
			<i>Escherichia coli</i> WD 206	pH = 7, 37 °C, anaerobio	88.15 g/L	(X. Zhao et al., 2012)
Cyano-bacteria	Engineered bacteria	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	pH = 8, 30 °C, anaerobio	1.80 g/L	(Van der Woude et al., 2014)	
Eucaria	Fungus	Saccharomyces	<i>S. cerevisiae</i> OC-2 T T165R	pH = 5.2, 30 °C, anaerobio	50 g/L	(Gao et al., 2009)
	Micro-algae	Rhizopus	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL-395	30 °C, aerobio	299.4 ± 6.8 g/ kg TS	(Ruengruglikit y Hang, 2003)
			<i>Nannochlorum</i> sp. 26 ^a 4	pH = 7.7, 25–35 °C, anaerobio	5.1 g/L	(Hirayama y Ueda, 2004)

BAL: bacterias ácido-lácticas

En teoría la fermentación homoláctica no produce subproductos, es decir la tasa de conversión debe ser del 100 % en este proceso, pero en la práctica, solo se puede obtener alrededor del 90 % de ácido láctico y se produce una pequeña cantidad de ácido acético, ácido fórmico y glicerol. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* y algunos otros *Lactobacillus* son productores homolácticos (Song et al., 2021). En el caso de las fermentaciones heterolácticas, cuando se utiliza glucosa para producir ácido láctico a través de la vía monofosfato de hexosa, la tasa de conversión de glucosa a ácido láctico es solo del 50%. *Leuconostoc mesenteroides* es una cepa representativa de esta vía metabólica, la conversión para la vía hexocinasa es 40% de la glucosa se convierte en ácido láctico, un organismo que realiza esta vía es el género *Bifidobacterium* (Chen et al., 1999).

Cuando no se utiliza una biomasa previamente esterilizada las condiciones óptimas de producción de láctico difieren, aunque se utilice una cepa conocida, esto principalmente se debe a la interacción de la cepa con los microorganismos nativos los cuales entran en competencia con el sustrato. Los pH en donde se suele ver mayor rendimiento de ácido láctico es a un rango de 4-5 unidades pH (se ampliara esto más adelante; Ohara, 2003; Song et al., 2021; Tang et al., 2017). A escala de piloto o industrial la generación de láctico es similar a la producción de etanol, se necesita un pretratamiento de la biomasa, una hidrólisis enzimática (que busca obtener la mayor cantidad de monosacáridos principalmente hexosas), la fermentación láctica y la recuperación del ácido láctico (ver figura 3-2).

3.3. Parámetros que afectan las fermentaciones

Los parámetros operacionales, como la temperatura, el pH, el tiempo de retención hidráulica (TRH) y la carga orgánica (CO) muestran efectos importantes en la producción de AGV, alcoholes y ácido láctico a partir de la fermentación de los sustratos, tanto en términos de rendimiento como de distribución relativa entre los diferentes productos.

3.3.1. pH

3.3.1.1. Fermentación acidogénica

Entre los parámetros operacionales, el pH tiene un efecto muy fuerte en la producción de AGV en la fermentación, pero existen inconsistencias con respecto a los valores de pH óptimos en la literatura debido a la heterogeneidad que se puede presentar en la FORSU o los residuos de comida en cada país o región en concreto, estos residuos tan heterogéneos se utilizan como sustrato en estudios de digestión anaerobia en dos etapas (Kapdan y Kargi, 2006). Sin embargo, los valores de pH cercanos al neutro (5.8–7.0) se consideran óptimos para la producción de AGV (Venkata Mohan, 2009). Recientemente, Farouk et al., (2020) informaron que un rango de pH de 5.0 a 7.0 favorecía la producción de acetato y butirato cuando se usaban desechos de alimentos como sustrato. Estos intermedios representaron más del 60 % del total de AGV durante el proceso biogénico.

Jiang et al., (2013) estudiaron la influencia de diferentes valores de pH, comprendidos en un rango ligeramente ácido (5-7), sobre la producción de AGV a partir de residuos de cocina. Descubrieron que un control de pH comprendido en el intervalo de 6 a 7 llevó a un aumento de alrededor del 20% de la tasa de hidrólisis, logrando un valor de DQO soluble de 82 g/L. A un pH no controlado más bajo, la DQO soluble (DQOs) observada fue de 60 g/L. El aumento de la solubilización a pH (6-7) permitió duplicar la producción de AGV en comparación con el reactor que no controlaba pH, los autores afirman que trabajar a pH cercanos al neutro presentan una mayor actividad de las enzimas hidrolíticas y evitan la inhibición debida a la acidificación del medio. La distribución de ácidos de mayor a menor fue Hbu, Hac y HPr representando alrededor del 50%, 25% y 15% del total de productos de fermentación.

Zhang et al., (2005) llevaron a cabo un estudio sobre el efecto del pH en el rendimiento de la fermentación en un reactor que trabaja en modo continuo, inoculado con los de UASB, ajustando el pH a un valor de 5, 7, 9 y 11. Este estudio confirma que el pH cercano a la neutralidad conduce a un mejor rendimiento de los AGV. De hecho, a un valor de pH de 7, se favorece el metabolismo fermentativo y un rendimiento de AGV de 0.27 gAGV/gST, mientras que fue de 0.15 gAGV/gST en el reactor donde el pH no fue controlado.

También se informaron otros resultados contradictorios con respecto al pH óptimo. Usando residuos de comida con un alto contenido de hongos (comestibles) como fuente de carbono, Lay et al., (2012) evaluó el efecto de varios inóculos como lodo primario, lodo secundario, estiércol de vaca y lodo de cerdo en la producción de AGV a pH 8.0. Los principales AGV producidos durante la fermentación fueron acetato y propionato y representaron el 86.8 % y el 20.0 %, respectivamente, del total de AGV cuando se utilizó estiércol de vaca como inóculo.

En otro estudio, Choi y Ahn, (2015) observaron que, durante la fermentación de sacarosa y desechos de cerdos, el butirato era el principal subproducto cuando el pH se mantenía en 8.9. Se ha demostrado que valores altos de pH mejoran la digestibilidad de las materias primas y la capacidad de inhibir las comunidades microbianas no deseadas, lo que en última instancia da como resultado una mayor producción de AGV (Faloye et al., 2014; Lee et al., 2002; Xiao et al., 2014), pero trabajar a pH por encima de neutro puede iniciar proceso metanogénicos, los cuales se quieren evitar en una primera

etapa fermentativa. En general, estos hallazgos muestran esencialmente que, aunque la producción de AGV depende en gran medida del pH operativo, inóculo y materia prima (composición) variables, también pueden afectar la generación de productos en la fermentación.

3.3.1.2. Fermentación alcohólica

Wu et al., (2017) evaluó el efecto de pH en reactor completamente mezclado que su inóculo con lodos de un reactor UASB, trabajó con a pH de 4.0, 5.0, 5.5 y 6.0, demostró que a un pH 4 se obtienen los rendimientos más altos de etanol, en cambio en el resto de las condiciones de pH los rendimientos disminuyeron de manera drástica. Además, explica que, aunque obtuvo una alta tasa de generación de alcoholes no se presentó una alta generación de hidrógeno por lo cual los posibles microorganismos que llevaron a cabo la fermentación fueron *Zymomonas*, *Saccharomyces* y *Lactobacillus* que, como se puede observar en la tabla 3-4, no generan hidrógeno.

El efecto de pH bajos en los procesos de fermentación alcohólica no produce efectos negativos en las comunidades microbianas principalmente *Zymomonas* (bacteria), *Saccharomyces* (levadura) debido a que son muy tolerantes a las condiciones ácidas. Además operar a pH's bajos permite una mayor tasa de hidrólisis de las biomásas lignocelulósicas (Taghizadeh-Alisaraei et al., 2019)

3.3.1.3. Fermentación láctica

El pH es un factor clave que determina el tipo de fermentación en sistemas abiertos de fermentación y tiene un efecto sobre las comunidades microbianas, las rutas metabólicas, las actividades enzimáticas y los productos fermentativos (Dreschke et al., 2015; Feng et al., 2018; Tang et al., 2017). Sin embargo, no está claro cuál es el pH óptimo y se ha informado que el pH para la producción de ácido láctico puede oscilar entre 3.2 y 11 (Li et al., 2015; Wang et al., 2015). Feng et al., 2018, encontraron que la concentración de ácido láctico era como máximo de 13.55 g/L a pH de 4.2 en un reactor continuo mesófilo, mientras que Li et al., (2015) informaron que a pH 11, la concentración de ácido láctico fue como máximo de 13.11 g/L a temperatura ambiente, y se mejoraron las actividades de las enzimas relacionadas con la hidrólisis de residuos de comida y la producción de ácido láctico.

En la literatura se presentan discrepancias sobre el pH óptimo para la generación de láctico y etanol; Y. Wu et al., (2015) encontraron que el ácido láctico de 10 a 20 g/L se producía de manera estable a pH 4.0 y representaba el 60 % de los AGV, mientras que Zheng et al., (2015) descubrieron que el etanol, que representa el 97.5 % de los productos de acidificación, era el principal producto de fermentación a un pH de 4.0–4.5. Además, Wu et al., (2017) también encontraron que el contenido de etanol era del 88.8 % a pH 4, un punto importante de las dos últimas investigaciones es que se descarta la generación de ácido láctico en la fermentación de los residuos orgánicos. Debido a las diferencias entre materias primas, condiciones de operación y modo de fermentación, el pH óptimo para la producción de láctico en un sistema abierto a partir de FORSU u otro residuo orgánico, no es el mismo o incluso entra en conflicto con estudios donde se analiza el metabolismo de una cepa específica. Por lo tanto, el pH óptimo y su influencia en el proceso de fermentación láctica aún deben estudiarse más a fondo para FORSU, tanto para reactores batch o en continuo.

3.3.2. Temperatura

3.3.2.1. Fermentación acidogénica

La temperatura es un parámetro clave durante la fermentación acidogénica, por su participación directa tanto en el crecimiento microbiano como en el metabolismo. Cada taxón microbiano tiene un rango óptimo de temperatura para su replicación, por lo que un cambio de temperatura de trabajo puede alterar la estructura microbiana del consorcio microbiano involucrado en la fermentación acidogénica.

He et al., (2012) descubrieron que un aumento de la temperatura de funcionamiento del rango mesofílico (35°C) al rango termofílico (55°C) llevó a una disminución de la producción total de AGV de una concentración máxima de 17 g/L a 11 g/L, bajo pH ácido no controlado. Un aumento adicional de la temperatura hacia el rango hipertermofílico (70°C) provocó un aumento bajo de la producción total de AGV, que alcanzó un valor máximo de aproximadamente 13 g/L.

Komemoto et al., (2009) exploraron el efecto de la temperatura en la fermentación acidogénica en un rango mayor, desde psicofílico (15-20°C) hasta hipertermofílico (65°C). Descubrieron que a 55 y 65°C, la DQOd en el reactor aumentó notablemente al principio del tiempo experimental hasta un valor de alrededor de 40 g_{DQO}/L, y luego se redujo rápidamente a 30 g_{DQO}/L. En cambio, en el rango mesofílico, la DQOd alcanzó un valor similar (30 g_{DQO}/L), pero se mantuvo estable hasta el final del ensayo experimental. Esta similitud se debe a la actividad de hidrólisis microbiana; a mayor temperatura, la solubilización es el resultado del efecto fisicoquímico (aumento de temperatura), mientras que en el rango mesofílico hay una mayor actividad de las enzimas microbianas. Con respecto a la producción de AGV, el ácido acético se produjo en las etapas iniciales, alcanzando un valor de 1 g_{DQO}/L y 2 g_{DQO}/L a 35 y 45°C respectivamente, y posteriormente su concentración disminuyó como consecuencia de la producción de biogás. En cambio, el ácido butírico se obtuvo a los 15 días de experimentación, y mostró una alta concentración (6.2 y 5.7 g/L a 35°C y 45°C respectivamente) independientemente de la producción de biogás. En condiciones psicofílicas (T = 20°C), la producción de AGV fue extremadamente baja y este rango de temperatura puede considerarse inadecuado para cualquier aplicación.

Por lo tanto, está claro que una temperatura de trabajo más alta, alrededor del rango termo e hipertermofílico (40-80°C), conduce a un aumento de la tasa de hidrólisis, dando a los carbohidratos teóricamente disponibles para el metabolismo microbiano fermentativo. Sin embargo, un aumento de la producción de AGV solo es posible de acuerdo con la temperatura óptima de crecimiento bacteriano, ya que muchos microorganismos acidogénicos no pueden sobrevivir en un rango de temperatura extremo (Shin et al., 2004).

3.3.2.2. Fermentación alcohólica

El rango de temperatura operación para los microorganismos etanólicos está entre los 20-37°C, y sus temperaturas óptimas se encuentran entre 35 y 37°C (Bai et al., 2008; Li et al., 2007; Saha et al., 2010). A condiciones termofílicas, *Zymomonas* baja su rendimiento y en el caso *Saccharomyces* pueden inhibirse completamente (Hafid et al., 2016; Yan et al., 2011b). En estudios realizados sobre generación de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica o FORSU en rango de operación está entre los 30 a 37 grados Celsius (Barampouti et al., 2019; Taghizadeh-Alisaraei et al., 2019).

3.3.2.3. Fermentación láctica

Liang et al., (2014) reportaron que el rendimiento de ácido láctico fue de 0.22 g/gST y 0.088 g/g ST a 35°C y 50°C, respectivamente. Zhang et al., (2017) encontraron de manera similar que el rendimiento de ácido láctico fue de 0.618 g/g TCOD y 0.508 g/g TCOD a 35°C y 50°C, respectivamente, mientras que X. Wang et al., (2011), compararon el rendimiento de producción de láctico de *Lactobacillus* TY 50 de 30°C a 50°C (en intervalo de 5°C), y los resultados mostraron que la concentración de ácido láctico más alta fue de 36.29 g/L con un rendimiento de 0.44 g ácido láctico/g TS a 45 °C. Se observa que se presenta rendimiento más alto cuando se opera a condiciones mesofílicas y al subir la temperatura existe un decaimiento en el rendimiento.

3.3.3. Tiempo de retención hidráulico y tiempo de retención de sólidos

El tiempo de retención hidráulica (TRH) se puede definir como el tiempo promedio que permanece la materia (tanto el sustrato como la biomasa) en un reactor. Si el reactor es un reactor completamente

mezclado, el tiempo de retención de sólidos y el hidráulico son iguales. En consecuencia, es un parámetro muy importante en una perspectiva a gran escala, pues establece el caudal que se trata diariamente en el reactor. Debe ser lo suficientemente largo como para permitir la solubilización de materia orgánica compleja, favoreciendo así la posterior fermentación de los hidrolizados. Al mismo tiempo, un TRH demasiado alto reduce la cantidad de sustrato manejable por día y favorece los metanógenos a valores de pH favorables (6.5–7.5).

3.3.3.1. Fermentación acidogénica

Lim et al., (2008) investigaron el efecto del aumento de la TRH en la acidogénesis, a partir de residuos de comida, en un fermentador semicontinuo alimentado, en condiciones mesofílicas, con un pH ajustado a 5.5 y una carga de 5 g_{ST}/L·d. Probaron tres TRH diferentes: 4, 8 y 12 días. La concentración total de AGV aumentó con el TRH, de 5.5 g/L a 13 g/L, y finalmente a 22 g/L. Además, con el TRH más alto, se observó un cambio en la distribución relativa de los AGV. En general, el ácido acético representó el producto de fermentación principal en TRH más cortos, mientras que bajo un TRH de 12 días el ácido propiónico fue el ácido predominante.

Han y Shin, (2002), estudiaron el efecto de diferentes TRH en el rendimiento de la fermentación (1.00, 0.50, 0.33 y 0.25 d). Los autores realizaron la fermentación de los residuos de una cafetería en un reactor de lecho de lixiviación (LBR) de 2 l, en condiciones mesofílicas y pH no controlado. También se estudió el efecto de dos inóculos diferentes: bacterias ruminales del estómago de una vaca y un consorcio anaeróbico tomado de otro reactor de fermentación residuos de comida. Se logró una concentración máxima de AGV de 202 mmol/L y 181 mmol/L con una TRH de 1 día, con rumen y bacterias anaeróbicas, respectivamente. Por el contrario, la menor acumulación de AGV se logró con una TRH de 0.25 d, obteniendo concentraciones de AGV de 53 y 47 mmol/l, para el rumen y las bacterias mesófilas anaeróbicas, respectivamente. Según los autores, este resultado se debió al lavado de microorganismos, que tuvo lugar a un TRH bajo (0.25 d) que resultó en una consecuente disminución de la concentración total de AGV. Además, el TRH óptimo fue de 0.33 d para cada inóculo, en términos de eficiencias de fermentación, expresada como la relación entre el AGV teórico del sustrato y el AGV real producido: 71.2 y 59.8% a 0.33 d para microorganismos del rumen y acidogénicos mesófilos, respectivamente. Esto indicó que las bacterias del rumen tenían un efecto de mejora en la capacidad de fermentación.

3.3.3.2. Fermentación alcohólica

Wu et al., (2017) operó un reactor completamente mezclado con un TRH de 3 días a diferentes pH de operación 4, 5.0, 5.5 y 6, con una carga de 13 g_{sv}/L d, logrando la presencia de microorganismos etanólicos, la mayor productividad de etanol la logró a un pH de 4, y una conversión del 88% (en términos de DQO); para las demás condiciones de pH se lograron conversiones de 12.7, 6.2 y 4.2 %, respectivamente. Si comparamos con la investigación de Lim et al., (2008), que operó un reactor completamente mezclado, a pH de 5.5, con tiempos de retención de 4, 8 y 12 días y una carga de 12 g_{sv}/L·d, encontró que al operar con un tiempo de retención hidráulico de 4 días se favorece la producción de ácido acético y en la medida que aumenta el TRH se favorece la producción de ácido propiónico; es posible observar que al disminuir el THR de 4 a 3 días y ajustar el pH a condiciones favorables a la fermentación etanólica se puede lograr un aumento considerable en la generación de etanol.

3.3.3.3. Fermentación láctica

De Groof et al., (2021) investigaron los efectos de tiempo de reacción y concentración en productos de fermentación usando residuos de comida como materia prima y encontraron que a una concentración baja de 12 g_{DQO}/L y un tiempo de reacción (TR) de 8.5 d se condujo a la formación de ácido n-butírico como producto principal, *Lactobacillus spp* homofermentativa fue la especie

dominante a 20 g_{DQO}/L con tiempos menores a 3 días; a un TR más prolongado de 10.5 días dio como resultado una fermentación secundaria y la producción de ácidos carboxílicos de cadena media.

En general, las condiciones de operación, especialmente en las condiciones no esterilizadas de producción de ácido láctico de FORSU o residuos de comida, quedan por estudiar más a fondo. Debido a que el comportamiento de un microorganismo específico varía en un sustrato esterilizado o uno donde existe una competencia por el sustrato, en general se ha observado en sustratos no esterilizados que a tiempo de retención hidráulico corto o tiempos de reacción cortos de menos de 36 horas se logra obtener una gran concentración de láctico pero el rendimiento es bajo en comparación a los sustratos esterilizados (López-Gómez et al., 2020; Tan et al., 2017; Zhang et al., 2005b).

3.3.4. *Carga orgánica (CO) y concentración de sustrato*

3.3.4.1. Fermentación ácida

La carga orgánica (CO) indica la cantidad de sustrato alimentado al reactor por día y por unidad de volumen de trabajo. Lim et al., (2008) estudiaron el efecto de la CO sobre la acidogénesis, en un reactor semicontinuo, observaron que la producción total de AGV aumentó con el aumento de CO, logrando una concentración máxima de alrededor de 14.0, 24.0 y 30 g/L, con una CO de 5.0, 9.0 y 13.0 gST/L-d, respectivamente. Aunque la concentración más alta a 13.0 g/L-d, el rendimiento de los AGV fue menor con respecto a los valores de CO más pequeñas; fue debido a la alta viscosidad del medio que afecta negativamente a la fermentación (Battista et al., 2018). El análisis de la distribución de los AGV mostró que el ácido acético era el producto más abundante y su concentración aumentaba cuando aumentaba la CO, mientras que los otros productos como los ácidos propiónicos, butírico y valérico disminuían. Además, al aumentar la CO, se observó el aumento de ácido cáprico, succinato y lactato. Entre las tres diferentes CO probadas, una CO de 9.0 gST/L-d es mejor para una producción adecuada de AGV, en comparación con los parámetros operativos establecidos.

Se obtuvo un resultado similar a partir de residuos de comida, fermentados en semicontinuo con la configuración operativa subsiguiente: pH 6, T 35 °C y TRH 5 días. En un incremento de CO de 5.0 a 11.0 gST/L-d, la concentración total de AGV aumentó de aproximadamente 13.0 a 21.0 g/L. En ambos casos, se logró una distribución homogénea de AGV, pero a menor CO el ácido butírico fue el producto principal, mientras que el ácido acético fue más abundante con CO más altas. De todos modos, el rendimiento de AGV (gAGV/gST) fue 13% mejor cuando se adoptó una CO de 5.0 gST/L-d (Jiang et al., 2013).

Gou et al., (2014) investigaron una posible relación entre la CO y la temperatura de trabajo a partir de una co-fermentación de lodos PTAR y residuos de comida (mezclados en una proporción de 2:1 en términos de ST) que se realizan de forma semicontinua. Se probaron unas CO crecientes, desde 1.0 hasta 8.0 g_{SV}/L-d, en tres reactores completamente mezclados, idénticos, operando a 35, 45 y 55 °C. Descubrieron que se logra una concentración de AGV total estable de 4 g/L con una temperatura más alta, mientras que, en condiciones mesofílicas, la CO debe mantenerse por debajo de 5 gST/L-d para obtener una concentración AGV total estable de alrededor de 3.5 g/L.

Por lo tanto, la elección de una CO óptima es fundamental para alcanzar una producción estable de AGV. Para garantizar un buen rendimiento en términos de AGV, la CO debe ser lo suficientemente abundante como para proporcionar una cantidad adecuada de fuente de carbono al metabolismo fermentativo, de acuerdo con la temperatura de trabajo

3.3.4.2. Fermentación láctica

Jiang et al. (2013) demostraron que, con el aumento en la concentración de sustrato de 4% a 8% como ST, los contenidos de acetato y valerato aumentaron, mientras que los contenidos de propionato y butirato disminuyeron, pero la concentración de láctico al aumentar la concentración disminuye casi

a la mitad. En cambio, en las investigaciones de John et al., (2009) y Tang et al., (2016) a un cambio alto en la concentración de sustrato podría aumentar la concentración de ácido láctico, pero un CO excesivo puede provocar una presión osmótica desequilibrada y una ruptura del sistema de fermentación. (Tang et al., 2016b) encontraron que, en un reactor anaeróbico semicontinuo de 10 L, la temperatura era de 37 °C, el pH se ajustaba a 6 cada 12 h, el tiempo de retención de sólidos era de 5 d, cuando la CO era de 13.496 g_{sv}/L·d, 17.352 g_{sv}/L·d y 21.208 g_{sv}/L·d, y la concentración de ácido láctico fue de 30.5 g/L, 37. g/L y 32.3 g/L, respectivamente.

4. Metodología

En un proceso de digestión anaerobia en dos etapas, en la primera etapa busca maximizar la generación de metabolitos, principalmente se ha enfocado en la producción de AGV y se ha dejado de lado a los alcoholes y al ácido láctico. Una fermentación no selectiva puede alcanzar altas tasas de generación de metabolitos, pero los productos pueden generar inconvenientes en la etapa de acetogénesis, cada metabolito presenta ΔG° diferentes y en consecuencia los requerimientos energéticos son diferentes (ver tabla 3-1). Para ello el presente trabajo busca determinar cuáles son los productos de la fermentación de FORSU (metabolitos intermediarios para la metanización), determinar que metabolitos favorecen a las etapas de acetogénesis y metanización a partir de realizar estudios cinéticos, determinar el efecto de una fermentación controlada y selectiva a partir del control de las variables pH y tiempo de reacción (TR) sobre la metanización donde se presente la mayor producción específica de metano, determinar los efectos de realizar una separación de la fracción líquida y sólida del digestato fermentado sobre la metanización, y por último determinar el efecto del pH sobre la diversificación taxonómica de la microbiota a diferente pH de operación.

Para alcanzar los objetivos de la investigación la metodología se planteó en tres etapas, la primera correspondió a la determinación de los productos de la fermentación de FORSU sin control de pH, buscando determinar cuáles son los productos de mayor generación. La segunda etapa consistió en trabajar los metabolitos (productos de la fermentación) puros, que se identificaron en la primera etapa y, a partir de pruebas de metanización, determinar los parámetros cinéticos de cada metabolito para evaluar los efectos positivos y negativos al someter estos intermediarios a un proceso de metanización. En la tercera etapa se realizó un experimento exploratorio para evaluar el efecto del inóculo sobre la fermentación y luego se planteó un segundo experimento con microorganismos autóctonos modificando las variables pH y el tiempo de reacción en la fermentación para modificar la selectividad de la fermentación, identificar hacia que metabolitos se dirige la fermentación, determinar qué cambios se presentan en términos de abundancia en microbiota y someter estos digestatos a un proceso de separación de la fracción líquida y sólida para someterlas a un proceso de metanización para evaluar sus efectos sobre la producción específica de metano del proceso. Un esquema general de la metodología se presenta en la figura 4-1 donde se detallan los pasos de la metodología.

En los siguientes subcapítulos se especifica cada etapa, condiciones de operación, equipos utilizados, determinaciones analíticas realizadas y los modelos que se utilizaron para el análisis de resultados. Cabe mencionar que antes de iniciar la etapa experimental se realizó un muestreo para la recolección de FORSU de la Ciudad de México, esto se realizó en la estación de transferencia de Coyoacán, la FORSU recolectada fue caracterizada y almacenada en condiciones adecuadas para su posterior uso en las diferentes etapas de experimentación.

4.1. Muestreo y caracterización de FORSU

Para la obtención de las muestras de la FORSU se seleccionó la Estación de Transferencia de residuos sólidos de la alcaldía de Coyoacán en la Ciudad de México. Según el Inventario de Residuos Sólidos de la Ciudad de México elaborado por la Secretaría de Medio Ambiente (SEDEMA, 2019), en el año 2018 la Alcaldía de Coyoacán registró una eficiencia de recolección selectiva de la FORSU en la Ciudad de México de 75 %. La Alcaldía de Coyoacán hace una recolección separada de los residuos sólidos municipales, los separa en la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) y de la fracción inorgánica de residuos sólidos urbanos (FIRSU), la FORSU de los domicilios, se transporta a la estación de transferencia los martes, jueves y sábados; lo cual fue considerado para definir el día de muestreo. La muestra recolectada fue utilizada para el desarrollo experimental descrito en la Figura 4.1.

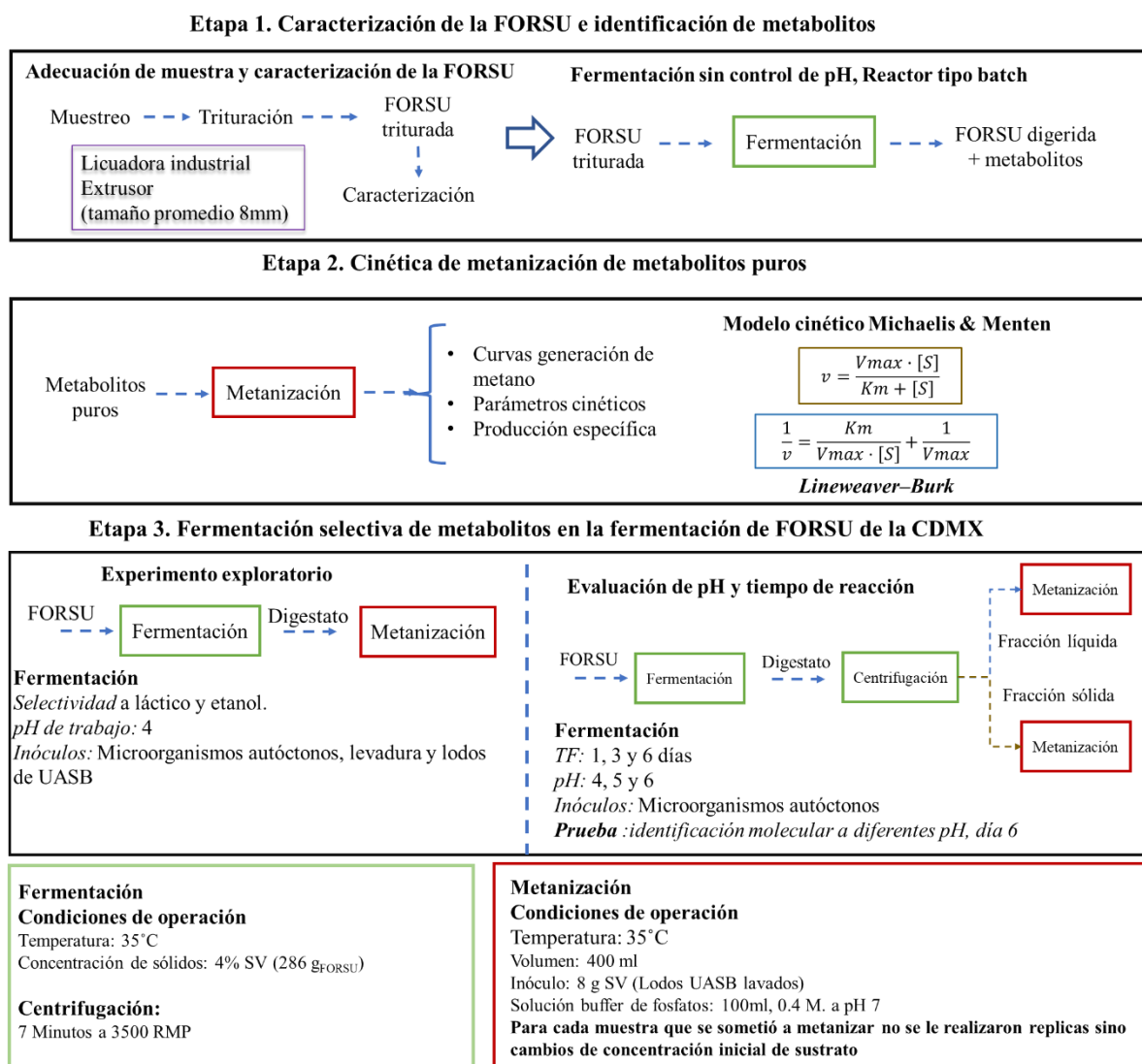


Figura 4-1. Esquema de metodología general

Para la toma de la muestra representativa de la FORSU de la estación de transferencia de residuos sólidos de Coyoacán, se cumplió con el procedimiento recomendado en la Norma Mexicana NMX-

AA-015-1985: donde se especifica como realizar el Método de cuarteo para residuos sólidos municipales. Se muestrearon 11 camiones, obteniendo de cada uno un peso aproximado de 100 kg. Posteriormente, el total de la muestra se mezcló completamente usando un trascabo y palas. Terminada la mezcla se realizó el proceso de cuarteo (en este proceso también se retiraba material inorgánico), repitiéndose dos veces para reducir la cantidad a aproximadamente 200 kg (ver figura 4.2). Luego se procedió al empaque de las muestras en bolsas plásticas herméticas, especiales para congelar alimentos. El empaque se realizó de forma manual a fin de poder separar materiales plásticos, metales, piedras y madera, los cuales son considerados elementos contaminantes de la FORSU. Las bolsas que contenían la FORSU fueron rotuladas y posteriormente almacenadas a -20 °C, para parar los procesos de degradación y así conservar la composición de la FORSU.



Figura 4-2. FORSU después de someterse al método de cuarteo, lista para ser almacenada.

4.2. Etapa 1. Caracterización de la FORSU e identificación de metabolitos

Esta etapa busca determinar la composición de FORSU al realizar determinaciones fisicoquímicas que permitan evaluar el comportamiento de la FORSU al ser sometida a un proceso de fermentación, para esta etapa no se busca evaluar la selectividad de la fermentación al modificar alguna variable operacional, sino que la fermentación ocurra sin control de pH para observar las tendencias sobre qué metabolitos se generan y en qué proporción.

4.2.1. Caracterización de FORSU

Debido a la heterogeneidad en la composición de la FORSU y a la variedad de tamaño de los residuos, y para garantizar su homogeneidad, se utilizó el siguiente esquema para la reducción de tamaño y aumentar la homogeneidad de la FORSU (Campuzano, 2015; Campuzano y González-Martínez, 2015; Figueroa-Escamilla, 2018). La FORSU fue inicialmente triturada utilizando una licuadora industrial, marca International, modelo LI-5. Posterior a la trituración, la FORSU fue extrudida utilizando un molino de carne (Extrusor) marca Advance RH, modelo MOLAI –22, con diámetro de orificio del cedazo de 8 mm (Figura 4-3). Una vez homogenizada la muestra se realizó la determinación de los siguientes parámetros: Demanda Química de Oxígeno (DQO), carbohidratos solubles en agua (CSA), sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), pH, ácidos grasos volátiles (AGV), nitrógeno Kjeldahl (NK) y grasas y aceites. Los métodos analíticos utilizados se detallan en la sección 4.2.

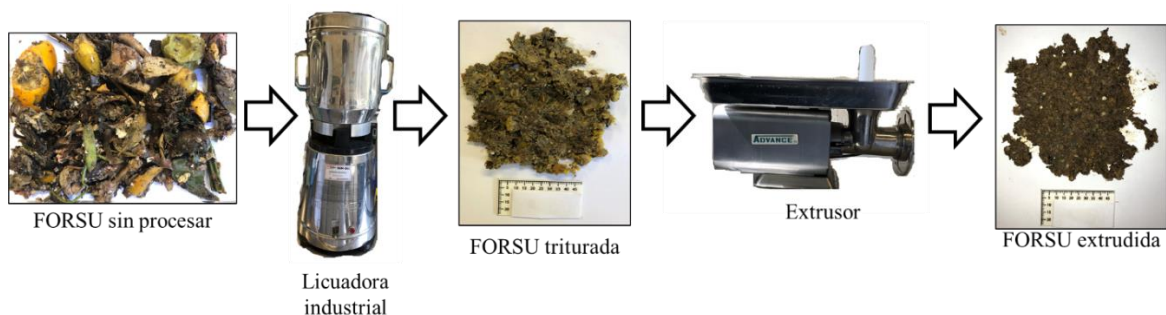


Figura 4-3. Esquema de proceso de molienda de FORSU

4.2.2. Identificación de metabolitos a partir de una fermentación sin control de pH

Para el montaje se utilizó un reactor batch de 2L, temperatura de 35°C y sin control de pH, al cual se le adicionó 400 g de FORSU y 400 de agua, para obtener una concentración de 10% de SV en el reactor, bajo esta condición de sólidos no se presentan procesos de inhibición por exceso de sustrato (Hartmann y Ahring, 2006; Moretto et al., 2019; Wu et al., 2017), al iniciar la experimentación para generar condiciones anaerobias se hizo pasar un flujo de nitrógeno 1mL/s por 60 segundos. Cada tres días se abría el reactor, se tomaba una muestra de 50 ml, la cual se centrifugaba a 3600 RPM durante 7 minutos y luego el sobrenadante se filtraba por una malla de 0.45 μm y por cromatografía se cuantifican los metabolitos.

4.3. Etapa 2. Cinética de metanización de metabolitos puros

Para esta etapa se evaluó ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láctico, etanol y metanol, debido a que en la anterior etapa se observó que son los que mayor presencia tenían en la fermentación de FORSU sin control de pH, además en otros trabajo se observa presencia de estos metabolitos (Jiang et al., 2013; Yamaguchi et al., 1989; Zhao et al., 2016; Zheng et al., 2015) y excluyendo al ácido acético, los demás metabolitos son intermediarios directos para la acetogénesis para su posterior metanización. Para realizar la evaluación cinética se trabajó con 5 concentraciones en el rango de 0.3 a 1.5 $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{L}$, las cuales son similares a las concentraciones que se ingresan a un reactor metanogénico de escala piloto (Jiang et al., 2013; Zheng et al., 2015).

4.3.1. Cinética de metanización y montaje

Para la realización de la cinética de metanización de los diferentes metabolitos, bajo condiciones mesofílicas se utilizó un dispositivo de medición de metano AMPT del Bioprocess Control (Bioprocess Control AB, 22363 Lund, Suecia). Este dispositivo consiste en un baño de temperatura constante (35 °C) para 15 reactores, con motores de agitación para cada reactor y el componente de medición de biogás unido a un ordenador que obtura de manera constante la producción de biogás. Los reactores son de 500 mL en volumen y el volumen de trabajo es de 400 mL. En cada reactor, se colocaron 8 g_{SV} de lodos anaeróbicos. Los frascos estaban llenos con 100 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.4 N a pH 7, el volumen restante se llenaba con agua de la llave. Se tomaron muestras de gas diarias y se analizaron utilizando un cromatógrafo de gas.

El lodo anaeróbico fue tomado de un reactor UASB de una gran fábrica de cerveza en la ciudad de Toluca. Se realizó el lavado de los lodos anaerobios para la remoción de los posibles metabolitos o sustrato que puedan contener debido a su origen y de esta manera asegurar que el estudio realizado contemple sólo la actividad del sustrato de interés e inóculo. Tal procedimiento consta de 3 lavados

que consisten en agregar 200 mL agua de la llave a 300 ml de lodos para su posterior centrifugación a una rapidez de 3600 RPM durante 7 minutos; después se retira el sobrenadante. Este procedimiento se repite tres veces. Al final se determinaron sus sólidos volátiles que fueron de 81 ± 5 g_{SV}/kg inóculo.

A cada reactor se añadió 1 mL de solución de micronutrientes; los productos químicos y sus concentraciones en mg/l fueron FeCl₃·4H₂O, 2000; MnCl₄·H₂O, 2000; ZnCl₂, 500; CoCl₂·6H₂O, 30; CuCl₂·2H₂O, 50; H₃BO₃, 50; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 90; NiCl₂·6H₂O, 50; EDTA, 1000. Con el fin de evitar falta de micronutrientes en los reactores (Campuzano y González-Martínez, 2015). Cuando los reactores contenían el inóculo, solución de fosfatos y solución de micronutrientes, se cerraron con su motor de agitación y para asegurar las condiciones anaerobias, se hizo pasar a través del reactor un flujo de nitrógeno 1mL/s por 30 segundos para desplazar el volumen de cabeza compuesto por aire.

4.3.2. Inyección de metabolito

Para cada metabolito se realizaron 5 disoluciones de tal forma que al adicionar 1 mL de la disolución en el reactor se lograran las concentraciones requeridas. Las concentraciones que se requerían dentro de los reactores fueron 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 y 1.5 g_{DQO}/L para cada metabolito. Para agregar el sustrato al reactor, se optó por inyectar la disolución del metabolito correspondiente cuando los reactores estuvieran completamente cerrados y conectados al medidor de biogás. La inyección se realizó a través del puerto de toma de muestras de biogás. Se optó por este procedimiento debido a que, si se agregara el metabolito al reactor durante el montaje, podría llevar a la pérdida de información de la producción de biogás, puesto que en el momento de agregar el metabolito al inóculo comenzaría a efectuarse la reacción. En la figura 4.4 se presenta el montaje y la forma de inyección de las soluciones con metabolitos puros.

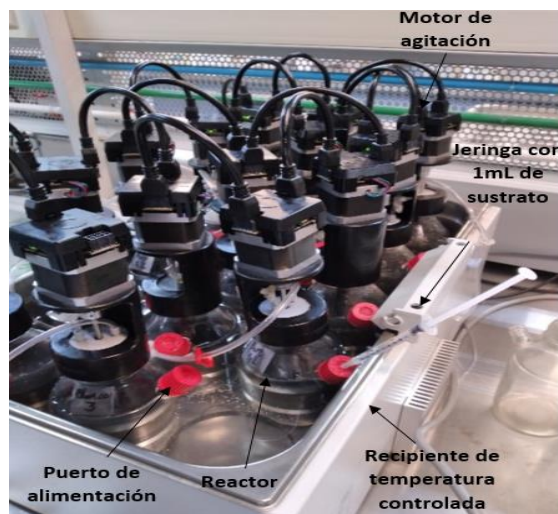


Figura 4-4. Montaje e inyección para metabolitos puros.

4.4. Etapa 3. Fermentación controlada de la FORSU de la CDMX

4.4.1. Experimento exploratorio. Fermentación de FORSU con diferentes inóculos a pH 4

Para este experimento exploratorio se fermentó FORSU a condiciones de pH de 4 para fomentar la formación de ácido láctico y etanol que, como se mencionó en los antecedentes, presentan los ΔG° más bajos, y en investigaciones como la de Pipyn y Verstraete, (1981); Prayoon Fongsatitkul et al.,

(2012); C. Wu et al., (2015) al realizar fermentaciones etanólicas y/o lácticas presentaron un beneficio en la etapa de metanización. Para lograr que la fermentación logre ser selectiva a etanol y ácido láctico se utilizó levaduras como un inóculo etanólico y lodos de UASB como un inóculo láctico, y además se fermentó con los microorganismos autóctonos provenientes de la misma FORSU. Se trabajó con lodos de la misma planta cervecera que se describe en la segunda etapa de metodología y se trabajó con una levadura liofilizada de pan marca Riopan, México, la cual utiliza como cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, sus características fueron 954 ± 5 gST/kg y 731 ± 8 gsv/kg.

4.4.1.1. Montaje de reactor de fermentación batch

Se operó un reactor de vidrio de 3L con un volumen útil de 1.5 L, que cuenta con sistema de agitación de dos aspas, una chaqueta para control de temperatura y cuenta con un control de pH (electrodo de pH, controlador y bombas de adición de base o ácido, ver figura 4-5), el reactor operó como un reactor batch completamente mezclado con un volumen semilla de 0.1 L queda aproximadamente un tiempo de retención de sólidos de 1.1 días. Para el controlador de pH se ajustó el intervalo de operación de 4-4.1 como pH permitidos de operación, en el caso de que el pH bajara de 4 se encendía la bomba de sosa (2M) y en caso de que el pH sobrepasara 4.1 se encendía la bomba de ácido fosfórico (2M).

Para elaboración de sustrato diariamente se elaboraba 1.5 L de una mezcla de FORSU y agua para obtener una concentración de sólidos volátiles de 4% SV que corresponde a 40 gsv/L (la adecuación de la FORSU es igual al realizado en la sección 4.2.1.), bajo esta condición de sólidos se pueden presentar mayor tasa de generación de metabolitos debido a la dilución con la que opera el sistema (Dahiya et al., 2018; Komemoto et al., 2009; Y. Wu et al., 2015). Luego se tomaban 100 ml para la caracterización del sustrato y la cuantificación de metabolitos iniciales.

Este experimento presentó 3 fases experimentales con una duración de 6 días cada una, las cuales están distribuidas de la siguiente manera: 1) fermentación sin inóculo, 2) con *Saccharomyces cerevisiae* y 3) con lodos de UASB. La inoculación solo se realizó al inicio de la operación de las fases 2 y 3, y se adicionaron 10 gsv/L de cada inóculo para iniciar con una concentración igual para cada inóculo (Wu et al., 2017).

Las determinaciones para dar seguimiento a la etapa de fermentación fueron DQOt y DQO soluble, se determinó el contenido de AGV en el reactor y ácido láctico, sólidos totales, volátiles y fijos tanto para el sustrato como para el digestato, en la sección 4-2 se detallan como se realizó cada técnica analítica.

4.4.1.2. Metanización de FORSU fermentada a pH 4 con diferentes inóculos

Esta etapa tiene como objetivo evaluar la producción de metano del digestato producto de la fermentación, así como los diferentes inóculos a pH 4 en función de la concentración sustrato (FORSU fermentada). El sustrato correspondió al digestato que se recolectó el último día (día 6) de cada fase. El inóculo para la metanización fueron lodos de UASB, de la cervecera Grupo Modelo. Las concentraciones de sustrato a evaluar fueron 1.25, 2.5, 5.0 y 10 gsv/L, el montaje se realizó de igual forma al presentado en la sección 4.3.1. De forma resumida, en un reactor 500 ml se colocaba el sustrato, el inóculo y 100 mL de solución buffer de fosfatos, luego se llenaba con agua hasta lograr los 400 ml y se conectaba al medidor de biogás Bioprocess Control AMPTS para realizar una metanización por 30 días. De manera diaria se cuantificaba la composición de biogás y al finalizar la metanización se cuantificaron los metabolitos presentes.



Figura 4-5. Reactor de fermentación

4.4.2. Fermentación de FORSU con control de pH y tiempo de reacción

A partir de los resultados de las etapas anteriores y literatura, esta etapa experimental busca determinar el efecto del pH (4, 5 y 6) y del tiempo de reacción (TR, 1, 3 y 6 días) en un reactor fermentativo (batch) de FORSU, con el objetivo de analizar cómo se modifica la selectividad de la fermentación al someterla a diferentes condiciones de pH y tiempos de reacción, en el experimento exploratorio se observó que a concentraciones altas de sustrato (FORSU fermentada) la metanización se inhibe por generación de propiónico, para ello en esta etapa se propuso realizar una separación de la fracción líquida y sólida, obteniendo una fracción de fácil degradación, rica en metabolitos como lo es la fracción líquida y una fracción compleja, rica en material lignocelulósico como la fracción sólida, estas dos fracción serán sometidas a metanización. Además, al tiempo de reacción de 6 días se tomó una muestra del reactor para realizar una prueba de extracción de ADN para realizar una identificación molecular y observar como el cambio de pH afecta a las comunidades microbianas.

La FORSU que se utilizó se le realizó el mismo proceso de adecuación al descrito en la sección 4.2.1.

4.4.2.1. Montaje de reactor con control de pH y tiempo de reacción (tiempo de fermentación)

Se operó el reactor presentado en la figura 4-5, el reactor operó como un reactor batch completamente mezclado. Para el controlador de pH se ajustó el intervalo de operación de más o menos 0.1 unidades de pH como rango de pH permitidos en la operación, los pH de operación fueron 4, 5 y 6, en el caso de que el pH bajara más 0.1 unidades de pH se enciende la bomba de sosa (2M) y en caso de que el pH sobrepasara 0.1 de pH se encendía la bomba de ácido fosfórico (2M).

El reactor operó una concentración de sólidos volátiles de 4% SV/L para evitar inhibición por producto en la fermentación, (Wu et al., 2017). Para ver el efecto del tiempo de reacción en la fermentación se tomaron muestras los días 1, 3 y 6 donde se extrajo 1 L del contenido, el cual se centrifugó para separar la fracción líquida y sólida, en la figura 4-6 se esquematiza el proceso de centrifugación y se puede observar cómo quedaban la fracción sólida y líquida, luego se procedía a su caracterización y metanización de forma inmediata para evitar cambios en la composición, las pruebas a realizar son DQO, sólidos totales, sólidos volátiles, AGV y alcoholes, ácido láctico.

En los días 1, 3 y 6, se sometió la FORSU fermentada a procesos de centrifugación a 3600 rpm por 7 minutos para separar la fracción líquida de la fracción sólida, luego se pasó a un proceso de metanización mesofílico (35 °C), para ello, del litro de muestra, se tomaron 0.8 L, se centrifugaron para la separación de sólidos y líquidos, se tomó una muestra para la caracterización de cada fracción.

Para la fracción líquida las pruebas realizadas fueron DQO, sólidos totales, sólidos volátiles, carbohidratos, AGV, alcoholes y ácido láctico, para la fracción sólida las pruebas realizadas fueron DQO, sólidos totales, sólidos volátiles, total Kjeldahl, grasas y aceites, y carbohidratos.

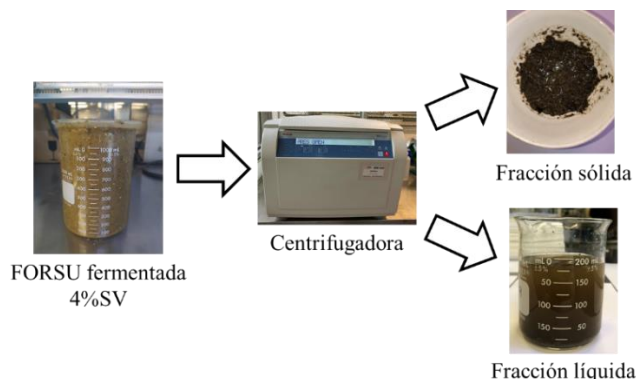


Figura 4-6. Esquema de centrifugación para FORSU fermentada

4.4.2.2. Metanización de fracción líquida y sólida de la FORSU fermentada

La fracción líquida y la sólida no se sometieron a refrigeración para conservación, para luego realizar la prueba de metanización, se realizó la prueba de metanización en el momento en que se retiró del reactor fermentativo y se centrifugó para evitar que los procesos biológicos sigan generando cambios en las muestras, debido a que a una temperatura de 4 a 7 °C solo ralentizan los procesos biológicos. Por esta razón la prueba de metanización inició sin una previa caracterización, para la prueba de metanización se utilizaron diferentes volúmenes de la fracción líquida y diferentes masas de la fracción sólida para lograr los cambios de concentración de sustrato en la metanización. Los volúmenes por evaluar para la fracción líquida fueron 25, 50, 100 y 150 ml y las masas a evaluar para la fracción sólida fueron 4, 8, 16 y 24 g (como peso húmedo de sólido previamente centrifugado).

Para el montaje de la prueba se realizó el mismo esquema presentado en la sección 4.3.1. Se utilizaron reactores de 400 ml de volumen útil, los cuales se llenaron de la siguiente manera, 100 ml de solución buffer de fosfatos a 0.4 M, 1 ml de solución de micronutrientes, 8 g SV de inóculo y la muestra de sustrato a evaluar, se llenó con agua de la llave hasta llegar a los 400 ml.

4.4.2.3. Determinación de comunidades microbianas

Para determinar el cambio en la distribución de la microbiota al someterla a un proceso de fermentación con control de pH (rango de pH 4, 5 y 6), se tomó una muestra de FORSU sin fermentar. La muestra se tomó después de realizar el cuarteo de la FORSU, se tomaron 4 kg, se procesaron como se muestra en la figura 4-3, y se tomó una muestra para realizar la identificación molecular. En el caso de la FORSU fermentada se tomó muestra para cada pH en el tiempo de reacción de 6 días, esto es para dar un mayor tiempo de exposición a la FORSU y los cambios sean más marcados. En el caso de la FORSU sin fermentar se evaluó la diversidad para bacterias y para eucariotas, y para la FORSU fermentada se evaluó solo para bacterias. Además, se tomó muestra de los lodos anaerobios que se utilizaron para realizar las pruebas de metanización, con el fin de determinar las comunidades existentes y su diversidad al ser utilizado como inóculo, de igual manera se evaluó la diversidad de bacterias y además se evaluó la diversidad de archeas.

La extracción de ADN se realizó con el paquete de extracción DNeasy® PowerSoil® Pro-Kit, el cual se especializa en la extracción de muestra sólidas, en el caso del procedimiento, se siguieron todos los pasos que especifica el kit. Con todas las extracciones de ADN de las muestras de FORSU e inóculo se llevaron a secuenciar al laboratorio MacroGen Inc. (Corea del Sur). Con los resultados de secuenciación se procedió a la limpieza de datos, determinar sus abundancias relativas y finalmente

realizar sus respectivas graficas. Los softwares y primers utilizados para limpieza, depuración y visualización de datos de secuenciación se detallan en la sección 4.3.

4.5.Determinaciones analíticas

En la Tabla 4-1 se presentan las técnicas usadas para la caracterización y determinación de los diferentes parámetros evaluados durante la experimentación. Estas determinaciones permitieron conocer las características de la FORSU, de la fracción líquida, de la fracción sólida, del inóculo y dar seguimiento a la operación de los reactores y cinética de metanización. Para las determinaciones de DQO, NK, y carbohidratos de la FORSU y de los digestatos se utilizó una cantidad conocida de la muestra finamente triturada (0.1 a 0.2 mm, lograda con una macerador de tejidos manual) se diluyó con un volumen conocido de agua destilada y se trató como un agua residual concentrada.

Tabla 4-1 Métodos analíticos

Determinación	Método
Humedad	Gravimetría, se obtiene por diferencia entre la masa inicial y los sólidos totales determinados (APHA, 2540 B).
Sólidos totales (ST)	Gravimetría. Sólidos secados a una temperatura de 103 a 105°C (APHA, 2540- B).
Sólidos volátiles (SV) y fijos (SF)	Gravimetría. Sólidos previamente secados a 103-105°C e incinerados a 550°C (APHA, 2540-E).
DQO	Fotometría. Digestión por reflujo cerrado a 150°C con reactivos preparados, lectura a 600 nm (APHA, 5220-D).
DQO disuelta (DQOd)	La muestra fue previamente filtrada como filtro de celulosa de 0.45 µm, desde este paso se trató como una muestra para DQO. (APHA, 5220-D).
Nitrógeno Kjeldahl (NK)	Titulación. Digestión ácida con catalizador de selenio por el método de Wieninger (Merck, 2009) y posterior neutralización, destilación y titulación con H ₂ SO ₄ 0.02N (APHA, 4500-NH3 C y 4500-NH3 E).
Hidratos de carbono	Fotometría con fenol y sulfato de hidracina a 490 nm por el método colorímetro de Dubois (Dubois et al., 1956).
Grasa y aceites	Gravimetría. Extracción con éter y posterior evaporación (Método Soxhlet modificado de APHA, 5520-D).
pH	Medido con potenciómetro Thermo Scientific Orion 2 star.
Composición de metabolitos	La cuantificación de metanol, etanol y los AGV (ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico) se determinaron mediante un cromatógrafo de gases (HP 5890 GC System) equipado con detector de ionización de llama (FID), columna Stabilwax – DA 30mx0.25mmx0.25µm, con hidrógeno como acarreo con un flujo de 60mL/min.
Ácido láctico	Para determinación de ácido láctico se utilizó la técnica colorimétrica con FeCl ₃ , solución de FeCl ₃ 0.2% p/v tiempo de reacción de 15 min. La muestra se filtró previamente utilizando filtros de celulosa de 0.22 µm.
Composición de biogás (CO ₂ y CH ₄)	Cromatógrafo de gases (SRI 8610c) equipado con detector de conductividad térmica, columna de acero inoxidable empacada con sílica gel (8600-PK1A), helio como gas de arrastre con flujo de 27 mL/min. Inyección de 0.5 ml de biogás a las siguientes condiciones: 1 min a 50 °C, incremento 50 °C/min hasta 100 °C y se mantiene por 1 min. La temperatura del detector es de 150 °C.

4.6. Modelación y software

4.6.1. Modelo Michaelis & Menten

Este modelo se utilizó para determinar los parámetros cinéticos de metanización para los metabolitos puros y para la fracciones líquida y sólida de la FORSU fermentada a diferentes pH y tiempos de reacción (ver figura 4-1).

El modelo de Michaelis y Menten se sostiene por la hipótesis que propone una reacción donde un sustrato (S) reacciona con una enzima (E) para formar un intermediario, llamado complejo enzima-sustrato, que a su vez genera un producto (P) regenerando la enzima libre (Ecuación 1). Bajo ciertas suposiciones, Michaelis y Menten desarrollaron la ecuación correspondiente (Ecuación 2). Para el análisis cinético de esta investigación se seleccionó el modelo de Michaelis y Menten (Ecuación 2) porque permite realizar cálculos utilizando tanto la concentración inicial de sustrato como la tasa de producción de metano inicial (Choi et al., 2017; Gonzalez-Gil et al., 2018). Esto es especialmente importante cuando la concentración de sustrato durante el tiempo de reacción no se puede medir con precisión. Además, de acuerdo con los mecanismos de la metanogénesis, la determinación de la concentración de sustrato durante el tiempo de reacción no puede brindar información confiable ya que la acetogénesis de algunos metabolitos representa varias posibles reacciones simultáneas. En esta investigación, la cinética se determinó utilizando como producto al metano, como parámetro de reacción que se puede medir con confianza.



$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad (2)$$

donde v = tasa de reacción ($\text{NmL}_{\text{CH}_4}/\text{L} \cdot \text{d}$)

V_{max} = tasa de reacción máxima posible ($\text{NmL}_{\text{CH}_4}/\text{L} \cdot \text{d}$),

S = concentración de sustrato ($\text{g}_{\text{DQO}}/\text{L}$)

K_m = constante de Michaelis y Menten ($\text{g}_{\text{DQO}}/\text{L}$).

Los resultados experimentales pueden ajustarse utilizando la linealización del modelo de Michaelis y Menten propuesto por Lineweaver y Burk (Ecuación 3). Graficando $1/v$ contra $1/S$ es posible obtener una línea recta con una pendiente igual a K_m/V_{max} y una intersección correspondiente a $1/V_{max}$. Para determinar la velocidad de las curvas de metanización para cada sustrato y cada concentración se utilizó el software Excel, y de igual manera se utilizó este software para graficar la ecuación 3 y calcular los parámetros K_m y V_{max} para cada metabolito y sustrato.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

4.6.2. Modelo de Gompertz

El modelo de Gompertz modificado (modelo de regresión no lineal, ecuación 4) se utilizó para identificar parámetros importantes en la metanización, como la tasa máxima de producción, el rendimiento máximo de metano o producción específica y el tiempo de latencia (lag phase), del experimento exploratorio de la etapa 3 (ver figura 4-1), se tomó este modelo pues las curvas de metanización presentaron comportamiento diaúxico y el modelo de Gompertz puede homogenizar los comportamientos diaúxicos a un comportamiento de una sola fase de generación de metano,

puesto que es un modelo que corresponde a una función sigmoidea descriptiva en la que se relaciona la producción de metano en el reactor con los parámetros anteriormente mencionados.

$$Y_{(t)} = P_{max} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{max} \cdot e}{P_{max}} \cdot \lambda - t \right] \right\} \quad (4)$$

donde Y (t) = producción acumulada de metano (mL/g_{SV})

t = tiempo (días)

P = potencial máximo de producción de metano (mL / g_{SV})

R_{max} = la tasa máxima de producción de metano (mL / g_{SV} / d)

λ = la fase de retraso (días)

e = la constante matemática número de Euler = 2.7183.

El ajuste del modelo se realizó mediante el software Statistica 7.0, minimizando el error entre los valores simulados y los valores experimentales. El grado de ajuste se determinó mediante el factor de correlación al cuadrado (R²).

4.6.3. Softwares para análisis de biología molecular

El ADN extraído se almacenó a -20 °C, posteriormente fue enviado a Macrogen Inc., Corea del Sur, para su secuenciación. Los genes 16S rRNA y 18S rRNA se utilizaron para la caracterización de comunidades bacterianas, eucarióticas y de archeas. Las bibliotecas de amplicones de 16S rRNA y 18S rRNA se crearon y secuenciaron utilizando una plataforma Illumina MiSeq (Illumina). Los primers para bacterias fueron 16S (V3-V4) para las regiones Bakt_341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) y Bakt_805R(GACTACHVGGGTATCTAATCC), para eucariotas los primers fueron ITS para las regiones ITS1 (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) y ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) y los primers para archeas fueron Arc para las regiones 787F (ATTAGATACCCSBGTAGTCC) y 1059R (GCCATGCACCWCCTCT) (Alcántara-Hernández et al., 2017; Jiménez-Ocampo et al., 2021; Serrano-Meza et al., 2022). Macrogen Inc. obtuvo los datos de secuenciación y los recibimos como datos sin procesar, luego realizamos los análisis bioinformáticos.

El análisis bioinformático se realizó con el software Qiime2, versión 2021.8 (Bolyen et al., 2019), Las librerías de genes 16S rRNA bacteriano, 16S rRNA de archeas y las de ITS se procesaron de manera independiente. Para la generación de alineamiento de las secuencias forward, reverse y la generación de contigs se utilizó DADA2 en Qiime 2021.8; con este mismo, se removieron las secuencias quiméricas (Callahan et al., 2016). Se realizó la asignación taxonómica de las variantes de secuencia de amplicones (ASV: Amplicon Sequence Variants) resultantes con la base de datos de referencia Silva 138 (Quast et al., 2013). Se utilizaron parámetros predeterminados Qiime2 2021.8 para depuración final y obtención de gráficos.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de la FORSU

En esta sección se presentan los resultados de la etapa 1 de la metodología correspondiente a la caracterización de la FORSU, en la Tabla 5.1 se muestran los parámetros fisicoquímicos de la FORSU y se comparan con otras investigaciones que han utilizado como sustrato la FORSU de la estación de transferencia de Coyoacán. La FORSU utilizada presentó un 27.5% como sólidos totales, de los cuales 76.3% corresponden a sólidos volátiles, la relación SV/ST es similar a la reportada por las otras investigaciones, las variaciones reportadas pueden deberse a la heterogeneidad de la FORSU, pero se observa que, del total de sólidos, una gran parte son compuestos carbonosos los cuales pueden ser susceptibles a una degradación biológica.

La FORSU es ácida, presentó un pH de 5.5 y una concentración de AGV de 35.6 g_{DQO}/kg_{sv}, esto se debe a que desde el momento de ser desechados, principalmente los desechos de comida, empiezan una degradación (Nilsson et al., 2018), se observa a partir de los trabajos de Castellón-Zelaya (2021), Ossa-Arias (2020) y este trabajo, que esta degradación es similar puesto que los contenidos de carbohidratos solubles en agua y AGV son similares.

Tabla 5-1. caracterización de la FORSU de la estación de transferencia de Coyoacán, CDMX

Referencia	pH	ST g/kg	SV g/kg	SV/ST	DQO g/kg _{sv}	DQOd g/kg _{sv}	CSA g _{DQO} /k g _{sv}	AGV g _{DQO} /k g _{sv}
Este trabajo	5.5	275±3.2	210±3.4	0.76	1780±14	623±12	303±5	35.6±3
(Ossa-Arias, 2020)	5.3	278±3.0	206±3.6	0.74	1871±12	NR	NR	44±0.1
(Figueroa- Escamilla, 2018)	NR	291±3.1	228±3.0	0.78	1294±60	NR	NR	NR
(Campuzano, 2015)	NR	297±4.0	223±4.1	0.75	1363±15	NR	274±7	NR
(Castellon- Zelaya, 2021)	5.2	275±2.0	221±2.0	0.8	1427±13	540±53	275±6	36±3

La DQO es un parámetro importante, no solo para la caracterización, sino para el seguimiento o modelación de procesos biológicos, pero en investigación o procesos poco se utiliza o se reporta, a diferencia de los sólidos, esto se debe principalmente al proceso de adecuación de la FORSU (biomasa heterogénea) para realizar la prueba analítica. La FORSU de este trabajo presentó una DQO de 1780±14 g/kg_{sv}, lo que la ubica como un valor alto ya que supera a tres de los valores reportados y solo está por debajo del trabajo de Ossa-Arias (2020).

Aunque no se presenta similitud en los datos de DQO, si se presenta una similitud en sus relaciones, por ejemplo, Castellón-Zelaya (2021) reporta que de la DQO total el 38 % es disuelta (DQOd) y a su vez, el 51 % (CSA/DQOd) corresponde a carbohidratos solubles en agua (CSA), para este trabajo el 35% de la DQO total es disuelta y su relación con los carbohidratos solubles en agua es del 48%. En el trabajo de Campuzano (2015) la relación de carbohidratos solubles en agua con respecto a la DQO total es de 20%, para este trabajo es del 17%. Esto es importante porque la cantidad de materia que va a estar disponible (DQOd) en la fermentación es significativa y de esa proporción, casi la mitad son carbohidratos solubles en agua y, como se observó en los antecedentes, los carbohidratos son los sustratos primarios de las fermentaciones, la otra mitad pueden ser proteínas, lípidos y compuestos lignocelulósicos que en los trabajos de Campuzano (2015) y Figueroa-Escamilla (2018) detallan esta composición.

En comparación con una de las biomásas lignocelulósicas altamente utilizadas para procesos de fermentación y metanización directa como es el maíz, en la cual presenta una relación $\text{gCAS/kg}_{\text{DQO}}$ en el rango de 87 a 301 $\text{gCAS/kg}_{\text{ST}}$ (Kazemi et al., 2022; Yaashikaa et al., 2022), esta amplitud en el rango depende del tipo de maíz y sobre todo de su tiempo de cosecha (entre menos maduro mayor su contenido de carbohidratos solubles en agua), en el caso del FORSU de este trabajo es de 231 $\text{gCAS/kg}_{\text{ST}}$, lo que implica una reducción solo del 23% en términos de carbohidratos con los valores más altos reportados para el maíz, nuevamente esto hace que la FORSU sea un sustrato con un gran susceptibilidad a fermentar.

5.2. Identificación de metabolitos en fermentación sin control de pH

En esta sección se presentan los resultados sobre la segunda parte de la primera etapa de la metodología, cuyo objetivo fue determinar que metabolitos se generaron en la fermentación de FORSU sin control de pH.

La Figura 5-1 muestra los metabolitos producidos durante la fermentación de FORSU y sus concentraciones correspondientes. Los metabolitos que estaban presentes fueron metanol, etanol y ácidos acético, propiónico, butírico y láctico durante la fermentación de FORSU. También se detectaron trazas de ácidos isobutírico, valérico e isovalérico, pero solo por debajo de los límites de confianza del cromatógrafo. En el día cero, la FORSU fresca tuvo una concentración de metabolitos totales de 7.9 $\text{g}_{\text{DQO/L}}$, donde el ácido láctico presenta la mayor concentración relativa, seguido del etanol. En el día uno se observó una gran generación de etanol. En el día tres, las concentraciones de todos los metabolitos aumentaron a un total de 29.5 $\text{g}_{\text{DQO/L}}$ donde predomina el etanol, seguido del ácido láctico y el ácido acético. Para el día seis se presentó un aumento en la generación de etanol y acético, pero hubo una disminución en la concentración del láctico. Las concentraciones relativas de metanol y ácidos propiónico y butírico se mantienen en torno a 1.5 $\text{g}_{\text{DQO/L}}$. En el día seis, las concentraciones relativas de metanol, etanol y ácidos acético, propiónico y butírico no cambiaron en comparación con el día tres; solo el ácido láctico aumentó significativamente de 8.6 a 12.5 $\text{g}_{\text{DQO/L}}$. En el día nueve, se pueden observar cambios significativos: el ácido acético aumentó considerablemente a medida que disminuyó el ácido láctico y el etanol aumentó a 11.1 $\text{g}_{\text{DQO/L}}$. Los otros metabolitos no mostraron cambios significativos en comparación con el día seis. En la medida en que aumenta la producción total de metabolitos el pH desciende.

En la Fig. 5-1 se utilizó la DQO soluble total para corroborar la suma de los diferentes metabolitos detectados. Las diferencias menores entre la suma de los metabolitos y la DQO soluble total incluyen las pequeñas concentraciones de ácidos como isobutírico, valérico e isovalérico, junto con trazas de otras sustancias no identificadas.

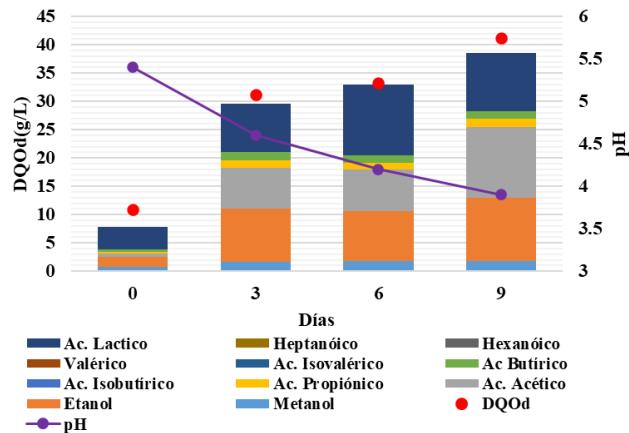


Figura 5-1. Producción de metabolitos sin control de pH

García-Aguirre et al., (2017b) en su trabajo de fermentación para diferentes biomazas fermento FORSU por 10 días y la producción total de metabolitos fue de 11.3 g_{DQO}/L, que es muy baja en comparación a la obtenida en este trabajo, esto se debe a que los investigadores descartan la generación de etanol y ácido láctico y no se cuantifican. Castellón-Zelaya y González-Martínez, (2021) en su trabajo fermentaron FORSU a un 10 % de ST por 15 días y se observó un comportamiento similar en cuanto al pH, en los tres primeros días se presentó una caída importante del pH y a partir de los días 5 hasta el día 15 el pH osciló entre 4.5-3.8 unidades de pH, en cuanto a la producción de metabolitos presentó una alta generación de láctico llegando a su máximo en el día seis, el etanol y acético presentaron concentraciones similares. Castellón-Zelaya y González-Martínez (2021) y Zhao et al. (2016) en sus trabajos afirman que la caída de pH se debe principalmente a la alta generación de láctico en los primeros tres días de fermentación donde se genera hasta 85% del total.

La generación de metabolitos de tres o más carbonos producto de la fermentación, en este trabajo se mantuvo constante (figura 5-1 ver propiónico y butírico), en estas fermentaciones se ha observado que tardan en generarse en reactores, más de 10 días de fermentación y están asociados a un agotamiento de carbohidratos simples, por cual los conjuntos microbianos deben degradar sustratos más complejos y es más difícil llegar a tener como productos etanol, ácido acético y láctico (Castellón-Zelaya y González-Martínez, 2021a; García-Aguirre et al., 2017b; Jiang et al., 2013; M. Zheng et al., 2015)

Con base en este experimento, los metabolitos seleccionados para la metanización y posterior análisis cinético fueron los AGV acético, propiónico y butírico; los alcoholes fueron metanol y etanol. El ácido láctico también resultó en cantidades significativas como resultado de la fermentación de FORSU.

5.3. Cinética de metanización de metabolitos puros

En esta sección se presentan los resultados correspondientes a la segunda etapa de la metodología, se analizaron las curvas de metanización de cada metabolito de estudio, se determinó su producción específica y se aplicó el modelo de Michaelis y Menten para determinar los parámetros cinéticos de cada metabolito. Los metabolitos para estudiar son los ácidos acético, propiónico, butírico, láctico y los alcoholes metanol y etanol.

5.3.1. Curvas de producción de metano

La figura 5-2 muestra las curvas de producción de metano para los metabolitos seleccionados en diferentes concentraciones. Las reacciones se consideraron terminadas cuando la pendiente de la curva de producción de metano cambió drásticamente y mostró una pendiente similar o cercana a la del inóculo (blanco). Esto es evidente para los ácidos acético, láctico, butírico y etanol, pero no para el ácido propiónico y el metanol. El comportamiento de las curvas de metanol y ácido propiónico no permitió una interpretación concluyente.

La Figura 5-3 muestra las curvas de producción de metano donde se restó el inóculo de las curvas de la Fig. 5-2. La Figura 5-3 muestra que el etanol y el ácido acético son los únicos sustratos donde la producción endógena de metano no se ve afectada por los metabolitos acumulados: Las pendientes de todas las curvas después del día 2 son paralelas y horizontales, por esta razón se utilizaron las curvas de la figura 5-2 para los análisis posteriores.

La tabla 5-2 muestra la distribución de DQO para la acetogénesis cuando el metano se produce simultáneamente a través de vías acetotróficas y/o hidrogenotróficas. La Tabla 5-2 representa el balance teórico para la acidogénesis de un gramo de DQO de los diferentes sustratos, las reacción corresponde a la de la tabla 3-1 y en última columna se presenta la concentración promedio de metano en el biogás que se obtuvo en la prueba de metanización cada sustrato (metabolito puro, valor experimental).

Luego de la metanización de cada sustrato, se determinaron las sustancias solubles remanentes para conocer la tasa de remoción del sustrato y los productos de las transformaciones durante la metanización. La Tabla 5-3 sintetiza todas las pruebas y los metabolitos remanentes y producidos durante la metanización de cada sustrato. Las filas del lado izquierdo de la Tabla 5-3 muestran las concentraciones inicial y final de los sustratos. Las filas del lado derecho de la Tabla 5-3 muestran las concentraciones de las sustancias restantes después de la metanización. Esto permite ver si el metabolito pudo ser degradado de manera parcial o total, los productos que se generaron, y ver si se produjo efecto negativo en la acetogénesis al aumentar la concentración de sustrato, todo esto de acuerdo con las reacciones de la Tabla 3-1. La primera línea de la Tabla 5-3 indica que el blanco, que contenía solo inóculo lavado, provocó la solubilización de sustancias endógenas. La concentración inicial de sustrato es cero, pero la DQO soluble al final de la metanización fue de 224 mg/L. La DQO soluble final para todos los demás sustratos es mayor que la DQO del blanco.

Tabla 5-2 Balance de materia para reacciones de acidogénesis de un gramo de DQO para diferentes sustratos

Sustrato	Reacciones Tabla 3-1	Producción acetotrófica CH ₄	Producción hidrogenotrófica CH ₄	CH ₄ en el biogás (%)
Ácido acético	1	1	0	75±2
Etanol	3	0.67	0.33	82±1
Ácido láctico	5	0.59	0.41	72±3
	6	0.22 hacia acetato 0.78 hacia propionato	0	
Ácido propiónico	4	0.57	0.43	75±5
Ácido butírico	8	0.8	0.2	75±2
Metanol	10	1	0	83±3

Con la información anterior se procede a realizar una descripción detallada de los procesos de acetogénesis y metanización para los metabolitos de estudio.

5.3.1.1. Ácido acético

La producción de CH_4 comienza inmediatamente después de la inyección del sustrato en los reactores y aumenta hasta alcanzar una pendiente máxima después de unas pocas horas (figura 5-2). La fase de retraso, o tiempo de latencia, se describe como el tiempo requerido por el sustrato para ocupar los sitios activos en la enzima o para saturar la superficie de la enzima. De acuerdo con las características del sustrato y del complejo enzimático, la velocidad de reacción aumenta a medida que se ocupan los sitios activos de la enzima (Henze et al., 2015). La velocidad de producción de metano a partir del ácido acético alcanza un máximo identificado como una línea recta. Durante la metanización del acetato no se produce hidrógeno. Si el acetato es el único sustrato disponible para los metanógenos, no se puede esperar la producción de metano hidrogenotrófico (reacción 14 en la Tabla 3-1). Por lo tanto, el biogás debe tener una concentración igual de 50% de CO_2 y CH_4 .

La Tabla 5-2 muestra que el metano del ácido acético se produce a través del metabolismo acetotrófico puesto que no existe generación de hidrógeno. La Tabla 5-3 muestra que el ácido acético se consumió por completo en todas las concentraciones probadas y no se produjeron otros subproductos. Dogan et al., (2005) estudiaron las inhibiciones y evaluaron la concentración de ácido acético sobre la producción específica de metano. Sus resultados son similares a los de esta investigación: la producción de metano comienza rápido y, para las concentraciones de 1 y 2 g/L, la reacción requirió 14 y 18 horas. Para 20 g/L la reacción requirió diez días.

El acetato es el sustrato de referencia para la metanización. A diferencia de los otros sustratos probados, el ácido acético no necesita sufrir acetogénesis antes de transformarse en metano. La acetogénesis requiere la energía indicada en la Tabla 3-1 para las diferentes reacciones. Este es el punto principal de esta investigación: la acetogénesis es la clave para la producción de CH_4 , y la presión parcial de hidrógeno juega un papel importante en la acetogénesis (Figura 3-1). Los metanógenos usan ácido acético directamente para producir CH_4 y dióxido de carbono, y no se desperdicia energía en otras transformaciones. La relación entre CH_4 y CO_2 es equimolar por lo que la fracción en el biogás debería ser 0.5 pero se obtuvo un porcentaje 75% (tabla 5-2), esto se debe al equilibrio de carbonatos que al operar a pH 7 de manera teórica la fracción de carbonatos estaría como 0.2 como H_2CO_2 y el resto como bicarbonato en la fase acuosa, como se observa la reacción de metanización de acetato genera alcalinidad, la cual por el equilibrio de carbonatos se va a mantener como bicarbonato y solo una pequeña fracción saldría como CO_2 por el equilibrio entre la fase acuosa (H_2CO_2) y la fase gas (CO_2), lo que implicaría una mayor riqueza en el biogás.

5.3.1.1. Etanol

Las curvas para el etanol no presentan una fase de retraso e, independientemente de las concentraciones de sustrato, comienzan y terminan como una línea recta. El final de la producción de metano se puede observar cuando las curvas cambian repentinamente de pendiente para seguir un camino casi paralelo al inóculo. Durante la producción de metano, las pendientes aumentaron con la concentración de sustrato. La producción de metano a partir de etanol, correspondiente a la mayor concentración, finalizó 12 horas más rápido que el ácido acético a la misma concentración. El etanol necesita someterse a acetogénesis para ser consumido por los metanógenos acetotróficos (reacción 33 en la Tabla 3-1).

Según las curvas de la Figura 5-2, la acetogénesis del etanol es muy rápida y no se puede identificar como una etapa limitante al proceso de metanización del etanol. Como la acetogénesis del etanol produce hidrógeno, se puede esperar una metanización hidrogenotrófica, pero, como se observa en la Figura 5-2, este proceso debe ser rápido para evitar que la presión parcial de hidrógeno suba y limite la acetogénesis del etanol. Por lo cual la vía acetotrófica e hidrogenotrófica se están realizando al mismo tiempo en las curvas de metanización de etanol.

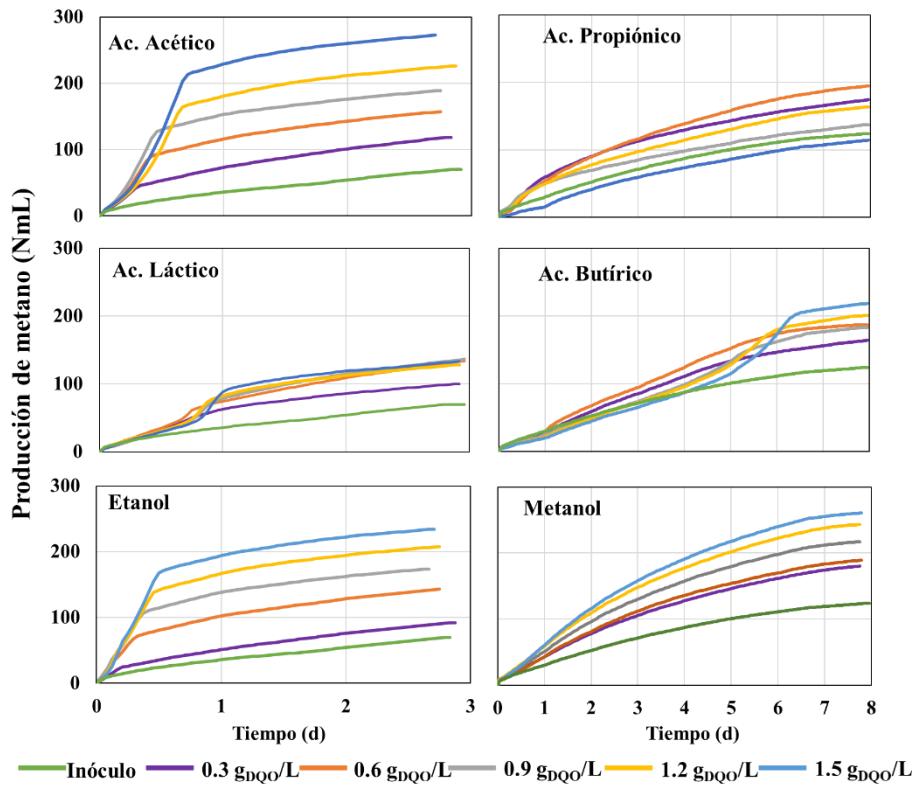


Figura 5-2. Curva de producción de metano para cada metabolito

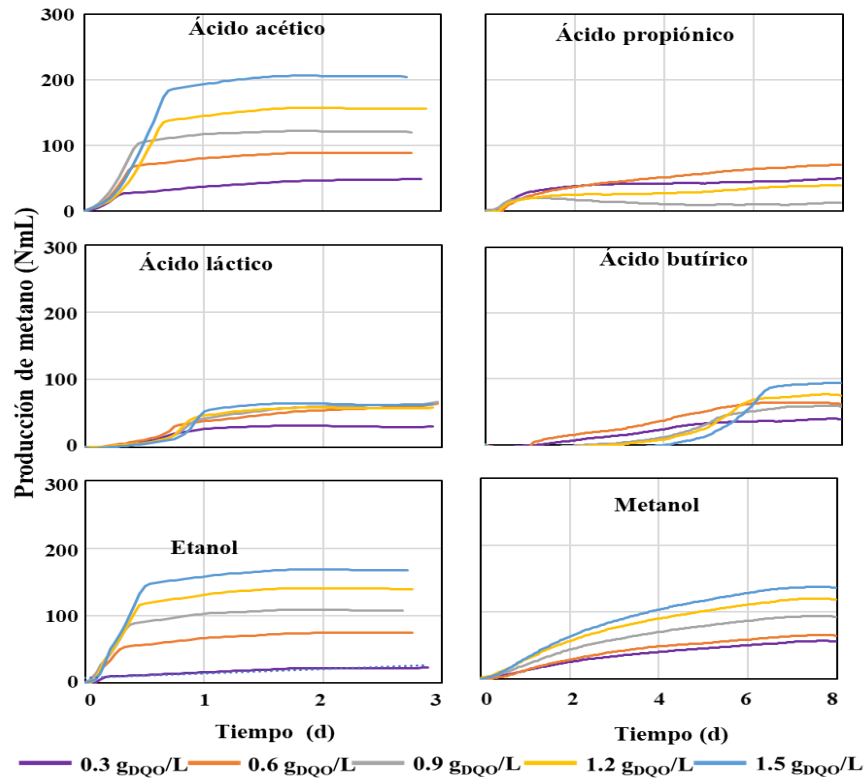


Figura 5-3. Curvas de metanol para cada metabolito restando el inóculo

Tabla 5-3 DQO y metabolitos presentes después de la metanización de sustratos puros

Sustrato	DQO disuelta (mg/L)			Metabolitos presentes después de la metanización (DQOd, mg/L, o remoción %)								
	Inicial	Final	Suma de metabolitos*	Met	Et	Ace	Prop	i-But	But	i-Val	Val	Lac
Inóculo		224±11	87	<10	<20	17±2	19±1	<10	14±2	13±1	23±1	<50
Metanol (Met)	300	233±9	159	87%	<20	15±3	25±2	<10	27±5	12±6	41±7	<50
	600	262±8	98	94%	<20	15±4	13±3	<10	10±1	10±1	13±1	<50
	900	373±4	88	94%	<20	11±1	11±2	<10	<10	10<	14±2	<50
	1200	376±2	191	92%	<20	24±7	19±2	<10	15±1	14±2	20±1	<50
	1500	552±4	257	89%	<20	28±2	16±1	<10	13±1	12±1	17±3	<50
Etanol (Et)	300	245±4	34	<10	>94%	10±1	11±1	<10	<10	<10	13±1	<50
	600	272±6	76	<10	91%	<10	10±2	<10	<10	<10	13±1	<50
	900	267±7	35	<10	>97%	10±1	11±1	<10	<10	<10	14±2	<50
	1200	260±2	10	<10	>98%	<10	<10	<10	<10	<10	10±1	<50
	1500	383±4	53	<10	98%	<10	11±4	<10	<10	<10	16±3	<50
Ácido acético (Ace)	300	298±8	0	<10	<20	>97%	<10	<10	<10	<10	<10	<50
	600	269±4	16	<10	<20	>98%	<10	<10	<10	<10	16±3	<50
	900	259±6	10	<10	<20	>99%	<10	<10	<10	<10	10±2	<50
	1200	276±4	94	<10	<20	99%	18±9	<10	13±6	17±7	28±14	<50
	1500	271±3	10	<10	<20	>99%	<10	<10	<10	<10	10±2	<50

*Suma de metabolitos: la suma de concentración de los metabolitos presentes después de la metanización de estudio

i-but: Isobutírico, i-Val: iso valérico, Val: valérico

Continuación Tabla 5 3 DQO y metabolitos presentes después de la metanización de sustratos puros

Sustrato	DQO disuelta (mg/L)			Metabolitos presentes después de la metanización (DQOd, mg/L, o remoción %)								
	Inicial	Final	Suma de metabolitos*	Met	Et	Ace	Prop	i-Butyr	But	i-Valer	Valer	Lac
Inóculo		224±11	87	<10	<20	17±2	19±1	<10	14±2	13±1	23±1	<50
Ácido propiónico (Prop)	300	472±10	25	<10	<20	12±4	>97%	<10	<10	<10	13±3	<50
	600	811±16	11	<10	<20	<10	88%	<10	<10	<10	11±1	<50
	900	1202±16	631	<10	<20	21±4	58%	40±9	15±1	153±30	20±1	<50
	1200	1432±22	1008	<10	<20	41±10	38%	56±11	16±7	126±35	21±7	<50
	1500	1844±16	1400	<10	<20	21±1	25%	70±13	13±4	142±29	22±8	<50
Ácido Butírico (But)	300	433±8	133	<10	<20	20±8	64±9	<10	96%	21±7	17±8	<50
	600	391±22	179	<10	<20	<10	14±3	<10	73%	<10	<10	<50
	900	793±19	321	<10	<20	<10	17±5	40±2	72%	16±4	<10	<50
	1200	943±12	510	<10	<20	10±2	19±5	75±6	69%	39±7	<10	<50
	1500	1070±21	626	<10	<20	<10	17±6	72±11	67%	45±8	<10	<50
Ácido láctico (Lac)	300	227±9	15	<10	15±2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>83%
	600	606±9	27	<10	12±2	0.01<	15±1	<10	<10	<10	<10	>92%
	900	657±11	97	<10	16±2	<10	66±2	<10	<10	15±1	<10	>94%
	1200	967±16	155	<10	15±4	<10	117±9	<10	<10	23±9	<10	>95%
	1500	1186±12	669	<10	78±1	25±9	456±29	34±13	<10	63±19	13±5	>97%

*Suma de metabolitos: la suma de concentración de los metabolitos presentes después de la metanización de estudio

i-but: Isobutírico, i-Val: isovalérico, Val: valérico

Lo anterior se corrobora con la Tabla 5-3, donde se muestra un consumo casi total de etanol, demostrando que los reactores, aun a la concentración más alta, siempre presentaron una presión parcial de hidrógeno en la cual la acetogénesis de etanol se produce; como metabolitos presentes al finalizar la metanización de etanol están cantidades insignificantes de acetato y ácido isovalérico.

Según la Tabla 5-2, dos tercios del metano provienen de la metanización acetotrófica y un tercio de la metanización hidrogenotrófica. La metanización de etanol presentó una fracción de metano en el biogás del 82% (ver tabla 5-2) más alta que la del acético, esto se debe a la acción de las archeas hidrogenotróficas que, al consumir alcalinidad, desplazan el equilibrio de carbonatos, lo que implicaría menos salida de CO₂ a la fase gas y además, al ser etanol el metabolito intermediario, el 0.33 de la DQO alimentada (tabla 5-2) se va para la vía hidrogenotrófica, lo que implicaría un alto consumo de alcalinidad.

5.3.1.2. Ácido láctico

La producción de metano durante las primeras horas es baja, cercana al inóculo y, después de 16 horas, la producción aumenta significativamente, y la reacción finaliza aproximadamente a las 24 horas (Figura 5-2). Como se muestra en la Tabla 3-1, la acetogénesis a partir del ácido láctico puede seguir tres caminos diferentes: 1) acetogénesis que solo se produce acetato, 2) la formación de propiónico y acetato y 3) la formación de butirato, la ruta que permite mayor recuperación energética es la 2 (ver tabla 3-1) y como se observa en la tabla 5-3, la concentración de propionato después de la metanización aumenta al aumentar la concentración inicial de ácido láctico. Con esto es posible afirmar que en las primeras 16 horas principalmente ocurrió la reacción 2 de láctico, que consiste en la formación de propionato y acetato, donde la DQO se distribuye principalmente a propionato y una pequeña fracción se transforma en acetato (ver tabla 5-2), como por esta reacción no hay generación de hidrógeno por lo que el propionato puede pasar por acetogénesis hasta que se acumule hidrógeno por la misma acetogénesis del propiónico y se deja de consumir, lo cual conlleva a una acumulación de acetato, hidrógeno u otros intermediarios y una baja producción de metano después de las 16 horas donde el láctico se agotó como sustrato principal y el sistema inició el consumo de acetato, es en este momento donde se observa un aumento en la tasa de generación de metano (ver figura 5-2). A concentraciones iniciales de 300-600 mg_{DQO}/L de láctico al finalizar la metanización se presentó una baja concentración de propiónico lo cual implicaría que en este rango de concentración se presentó una conversión solo a acetato. Todo esto significa que la reacción de metanización de láctico no es eficiente a concentraciones de sustrato más altas.

La fracción de metano en el biogás es de 0.72 (tabla 5-2), en la reacción de lactato a propionato y acetato (reacción 7 de la tabla 3-1) no hay formación de hidrógeno solo formación de alcalinidad pero la acetogénesis de propionato sí genera hidrógeno, sin embargo, como se mencionó, el propionato se acumuló y por ende el hidrógeno, lo que implica que el propionato afecta el funcionamiento de las hidrogenotróficas, lo cual hace que se acumule hidrógeno en el sistema y al no presentarse metanización hidrogenotrófica la fracción de metano en el biogás debería ser casi igual a la de acético, que es lo que sucedió. Con lo anterior se concluye que en los reactores principalmente hubo una metanización por vía acetotrófica.

Detman et al.,(2018) y Vasmara et al., (2021) trabajaron en el tratamiento anaerobio de aguas residuales ricas en lactosa y lactato, concluyen que la acetogénesis del lactato produce ácido propiónico, provocando inhibición en el sistema biológico, para reducir el efecto recomiendan trabajar con cargas orgánicas más bajas para bajar la concentración final de propiónico y aumentar la formación de acetato. El comportamiento de las curvas de producción de CH₄ a partir de lactato en Y. Yang et al., (2015) es similar a las de esta investigación. Informan que el CH₄ del lactato tuvo una fase de adaptación pronunciada, con una duración de entre 1.5 y 2 días, y después una rápida y corta producción de CH₄, la producción en volumen de metano fue de 65 NmL para 1.33 g_{DQO}/L para esta investigación fue mayor con un valor de 133 NmL para 1.5 g_{DQO}/L.

5.3.1.3. Ácido propiónico

Durante las primeras 20 horas, la tasa de producción de CH_4 fue similar para todas las concentraciones, excepto para la prueba de $1.5 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$, que presenta una producción de CH_4 menor que el blanco (Figuras 5-2 y 5-3). La acetogénesis a partir de propionato tiene un ΔG° positivo y produce el triple de hidrógeno (reacción 12 en la Tabla 3-1) que el resto de las reacciones, este hidrógeno que debe consumirse para reducir la presión parcial de hidrógeno y hacer factible la reacción de acetogénesis (Figura 3-1). La tabla 5-3 muestra que, a mayores concentraciones iniciales de propiónico, durante la prueba de metanización se produce una acetogénesis incompleta, formándose ácidos isobutírico, butírico, isovalérico y valérico. La utilización del ácido propiónico como sustrato es insuficiente y su consumo disminuye al aumentar la concentración inicial.

Al realizar un balance de masa en términos DQO para propiónico con las concentraciones de la tabla 5-3 tenemos que el consumo de propiónico en términos de DQO fue el siguiente 120, 210, 209, 182 y $150 \text{ mg}_{\text{DQO}}$ para las concentraciones 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 y $1.5 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$ respectivamente, a la concentración más baja se presentó un consumo total del metabolito, luego a las concentraciones iniciales de 0.6 y $0.9 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$ el consumo es similar, lo que implicaría que al consumir esta cantidad de propiónico se logran presiones parciales de hidrógeno que impiden la acetogénesis del propionato, al seguir aumentando la concentración inicial del metabolito su consumo disminuye rápidamente, si solo se presentara inhibición por producto (hidrógeno), al aumentar la concentraciones iniciales del metabolito se debería llegar al mismo consumo de masa de DQO, pero no es así, lo que implica que el ácido propiónico afecta negativamente a las hidrogenotróficas y este efecto se pronuncia a concentraciones iguales o mayores que $1.2 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$. El metano generado en las curvas de la figura 5-2 es por vía acetotrófica, debido a la inhibición de las hidrogenotróficas que no actuaron en gran medida, por ende, el consumo de alcalinidad por parte de estas fue bajo, lo que llevó a presentar un porcentaje de metano en el biogás igual al del acético, que fue de 75% (tabla 5-2).

Lata et al., (2002) y Wainaina et al., (2019) reportan esta misma observación puesto que el ácido propiónico se acumula, inhibe la metanización y promueve la formación de ácidos isobutírico e isovalérico, que también pueden inhibir el proceso. El ácido propiónico es bien conocido como agente inhibidor (Mata-Alvarez, 2002), Han et al., (2020) trabajaron con residuos de alimentos, concluyendo que el ácido propiónico reduce la actividad metanogénica cuando las concentraciones están por encima de $0.45 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$. Wang et al., (2009) estudiaron los efectos de diferentes concentraciones de ácido propiónico sobre los metanógenos y concluyeron que se logra una inhibición completa para concentraciones superiores a $900 \text{ mg}/\text{L}$ de ácido propiónico ($1.4 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$).

5.3.1.4. Ácido butírico

En las curvas para butírico (figura 5-2) se observa que a concentraciones menores o iguales a $0.6 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$ la producción de metano es progresiva, a concentraciones superiores o iguales 0.9 se presenta una etapa de baja generación y después de 4 días de reacción, una etapa de alta generación. La etapa limitante es la acetogénesis porque no se observa un comportamiento lineal desde el momento de inyección. En los primeros días las curvas son similares al inóculo, después del primer día de metanización a concentraciones menores o iguales a $0.6 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$, el acetato e hidrógeno generado van siendo transformados en metano por lo que la producción es progresiva, en sus correspondientes curvas no se logra diferenciar las dos etapas (acetogénesis y metanización). A concentraciones superiores o iguales a $0.9 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$ en los primeros 4 días se presenta la acetogénesis con baja generación de metano por parte de hidrogenotróficas para que la reacción de acetogénesis ocurra pero la generación de hidrógeno supera a las hidrogenotróficas por lo que se acumula hidrógeno y se deja de consumir butirato, esto se corrobora ya que al aumentar la concentración inicial de butírico en los reactores disminuye el consumo del mismo (tabla 5-3), después de que se para el consumo de butírico e hidrógeno, empieza un consumo rápido del acetato generado a partir del día 4 al 6 de reacción, que se observa como una recta. Al igual que el acético, la fracción de metano en el biogás es de 0.75 (tabla

5-2) lo que implicaría que el hidrógeno generado en la etapa de acetogénesis casi no se consumió en su totalidad, en el caso del butírico la vía acetotrófica representa el 80% de la DQO alimentada (tabla 5-2).

Utilizando concentraciones iniciales de ácido butírico de 3 a 20 g_{DQO}/L, Dogan et al., (2005) observaron un comportamiento similar en las curvas de producción de CH₄. A medida que aumentaba la concentración inicial, el tiempo de latencia aumentaba entre 20 y 100 horas. Después de esta etapa que ellos denominan la aclimatación, el CH₄ se produce rápidamente, como lo observado en esta investigación (ver Fig. 5-2). Zhang et al., (2019) trabajaron con reactores discontinuos mesófilos para determinar la concentración de inhibición de CH₄ al 50% (C50%) con ácido butírico como sustrato. El ácido butírico alcanza C50% en una concentración de 0.73 g/L (1.3 g_{DQO}/L), en la misma investigación presentan curvas similares de producción de metano a las de este trabajo; para los casos en los que la concentración de sustrato fue menor, la producción de CH₄ aumentó con la concentración de sustrato, pero a medida que la concentración de sustrato aumentó a 1.2 g_{DQO}/L y más, se excedió el C50%. Concluyen que la acetogénesis del ácido butírico fue un paso limitante y además la investigación sugiere que el ácido butírico puede actuar como un inhibidor de los metanógenos.

Excepto por la concentración de sustrato más baja, la Tabla 5-3 muestra que el ácido butírico no se eliminó por completo, pues el consumo de ácido butírico disminuyó al aumentar la concentración inicial del mismo. Como producto de la acetogénesis, se produjeron pequeñas cantidades de ácidos propiónico, isobutírico e isovalérico. Se observaron concentraciones más altas de ácidos isobutírico e isovalérico para las concentraciones de ácido butírico más altas.

5.3.1.5. Metanol

En las curvas de metanol (figura 5-2) se observa que la etapa limitante es la acetogénesis debido a que la producción de metano no es tan rápida como la del etanol, pero el acetato generado se consume, no se acumula porque no se observa un periodo donde no se presente producción de metano o un periodo de latencia, por ende, en las curvas no se logra diferenciar los procesos acetogénicos de los de metanización. En el proceso de metanización del metanol no existe la vía hidrogenotrófica (tabla 3-1, reacciones 13 y 14) porque no hay generación de hidrógeno, aun así, se presentó un porcentaje de metano de 83% en el biogás (ver tabla 5-2) y a partir de los resultados de los otros metabolitos sabemos que esto solo se logra si se presenta consumo de alcalinidad. La reacción directa de metanol a metano (tabla 3-1, reacción 14), aunque puede ocurrir, no da explicación a la alta riqueza de metano en el biogás porque solo genera alcalinidad, por lo cual la riqueza de metano debería estar asociada a la formación del acético (tabla 1 reacción 13), donde se observa que la reacción de acidogénesis de metanol presenta un consumo de alcalinidad para generación de acetato, el cual luego pasa al proceso de metanización, está es la vía de reacción que se presentó debido a que presenta un consumo de alcalinidad, lo cual da una explicación al alto porcentaje de metano en el biogás. Y de la tabla 5-3 observamos que en todas las concentraciones iniciales de metanol se presentaron un consumo cercano al 90% de metabolito lo que implicaría un alto consumo de alcalinidad. Florencio et al., (1995) realizó su estudio en reactores un UASB para la remoción de metanol, la determinación de su producción específica la realizó para un sistema en continuo con datos de 60 días de operación y operando con una solución de buffer de fosfatos para mantener pH 7, logró un porcentaje de 82% de metano en el biogás, concluye que el alto porcentaje se debe al equilibrio de carbonatos y además a la solución buffer de fosfatos porque al operar el reactor con una solución buffer de carbonatos el porcentaje baja a 74% similar al alcanzado por el ácido acético en este trabajo.

5.3.2. *Determinación de la producción específica de metano*

La producción final de CH₄ para cada metabolito de la figura 5-2 se consideró en el punto de inflexión, donde las pendientes cambian, tiende a la producción del inóculo y dan por terminada la reacción.

Con estos puntos se construyó la figura 5-4, donde se representan gráficamente la producción final de CH₄ de cada prueba frente a la DQO alimentada. La tabla 5-4 presenta los resultados derivados de la figura 5-4: La producción específica de CH₄ (pendiente), la producción endógena de CH₄ (ordenada al origen) y la producción del inóculo experimental en el tiempo promedio que terminó la reacción para cada metabolito. Los coeficientes de correlación se obtuvieron a partir de 5 valores. La producción específica teórica de CH₄ es, para todos los casos, de 350 NL/kg_{DQO} (Henze et al., 2015).

En la figura 5-4, la producción de CH₄ endógeno puede ser diferente del blanco porque, como se muestra en la figura 5-4 (también en la figura 5-3), la producción de CH₄ endógeno, después de consumir el sustrato, depende de la complejidad del sustrato y las reacciones de acetogénesis correspondientes (ver también Tabla 3-1). Estos valores indican que cada sustrato afecta a los microorganismos de manera diferente y modifica sus rutas metabólicas durante y después de que se consume el sustrato (sección 5.31.), algunos generaron diferentes productos durante la metanización y otros no se consumieron en su totalidad.

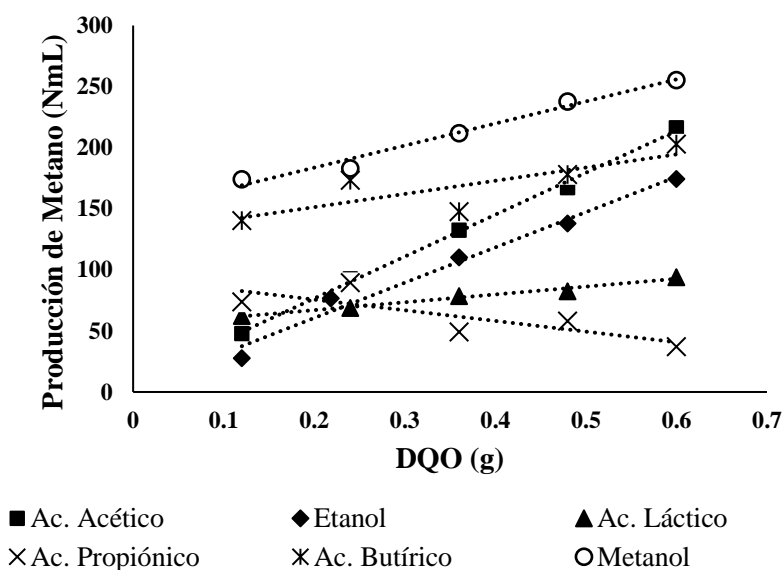


Figura 5-4. Producción específica de metano para cada metabolito a partir de diferentes masas de sustrato

Como se mencionó anteriormente, el inóculo se comportó de manera diferente dependiendo del sustrato (ver tabla 5-4). En el caso de ácido acético y etanol su ordenada al origen es cercana a cero, lo que implica que, desde el punto de la inyección del sustrato hasta llegar al punto donde se termina la reacción (punto de inflexión) la generación de metano ocurre solo por el sustrato y no se presenta una producción endógena de metano por parte del inóculo y además la producción experimental del reactor con solo inóculo en el mismo momento donde termina la reacción para estos metabolitos había generado 23 y 19 NmL de metano, respectivamente. Para el ácido láctico, butírico y metanol sus interceptos no están cercanos a cero y además sus ordenadas al origen están relativamente cercanas al volumen de metano generado por el inóculo (valor experimental), lo que implicaría que en estos metabolitos a diferencia del acético y etanol, sí presentaron producción de metano por sustrato como endógena. Y como caso particular el propiónico presentó una tendencia negativa lo que reafirma su comportamiento como inhibidor

Tabla 5-4. Producción específica, producción por el inóculo y coeficiente de correlación

Metabolito	Prod. esp. CH ₄ (pendiente) (NL/kg _{DQO})	Prod. esp. CH ₄ (otros autores) (NL/kg _{DQO})	Ordenada al origen (NmL)	Coeficiente de correlación R ²	Prod. CH ₄ por inóculo (NmL)
Ác. acético	343	365*, 203**	7.9	0.9976	23±5 (18 h)
Etanol	296	127***	0.92	0.9901	19±4 (12 h)
Metanol	181	283****	147.5	0.9793	129±10 (7 d)
Ác. butírico	108	237*, 105**	129.7	0.6662	120±8 (6.2 d)
Ác. propiónico	-87	107*, 185**	93.1	0.6466	81±6 (2 d)
Ác. láctico	64	59**	54.2	0.9820	42.3±5 (24 h)

Prod. esp. CH₄: producción específica de metano, Pro. CH₄ por inóculo: la producción del inóculo experimental.

*Dogan et al., (2005), **Y. Yang et al., (2015), ***Tatton et al., (1989), **** Florencio et al., (1995) se tomó el dato que trabajo con solución buffer de fosfatos.

Los coeficientes de correlación más bajos para los ácidos propiónico y butírico confirman la dificultad que presentaron los reactores al tratar de consumir estos sustratos. La producción de CH₄ varía según los tiempos de adaptación y/o las vías metabólicas cambiantes durante la acetogénesis y la producción de CH₄.

Los sustratos con mayor producción específica de CH₄ fueron ácido acético y etanol con 343 y 296 NL/kg_{DQO}, esto corresponde puesto que el ácido acético es el metabolito directo y en el caso de etanol se ha observado que durante la digestión anaeróbica mejora significativamente el transporte de electrones y que se pueden alcanzar mejores rendimientos de metano (Feng et al., 2021).

El ácido láctico a partir del análisis termodinámico, es un metabolito que en comparación al resto de metabolitos (excepto acético), presenta una energía libre de Gibbs de -8.4 kJ/mol en la acetogénesis (ver tabla 3-1) pero su producción específica de metano es la más baja de todos los metabolitos debido a que las reacciones alternas del láctico en condiciones anaerobias limitan la formación directa de acético y promueven la formación conjunta de propionato y acetato, lo cual baja el rendimiento de metano ya que como se ha observado el propiónico se comporta como inhibidor, afectando principalmente a las hidrogenotróficas que son necesarias para la acetogénesis del mismo.

El ácido butírico tiene una producción específica de 108 NL/kg_{DQO}. La tabla 5-3 muestra que, a medida que aumenta la concentración inicial de ácido butírico, el sistema no puede consumir todo el sustrato y queda butirato en el sistema. Pero para todas las concentraciones ensayadas, se consumió aproximadamente el 70% del ácido butírico lo que implicaría haber obtenido una mayor producción de metano para cada concentración, pero no fue así, Dogan et al., (2005) trabajó con propiónico y afirma que en la metanización de ácido butírico entre 60-70% de la DQO se va a procesos anabólicos y el resto a catabolismo (producción de metano).

Dogan et al., (2005) determinó la producción específica de metano de ácido acético, propiónico y butírico, a diferentes concentraciones (1–25 g/L de metabolito) en reactores batch de 1 L, utilizó como inóculo lodos de UASB a una concentración de 145 g/L, la forma de determinar la producción específica fue diferente a la presentada en este trabajo, por cada concentración obtuvieron una producción específica (NmLCH₄ producido/g_{DQO}), las mayores producciones específicas fueron: ácido acético 365 NmL/g_{DQO} a una concentración de 3 g/L, ácido butírico 237 NmL/g_{DQO} a una concentración de 5 g/L y ácido propiónico 107 NmL/g_{DQO} a una concentración de 1 g/L. La tendencia obtenida para los 3 compuestos es igual a la de este trabajo, el acético presenta la producción específica más alta y cercana al teórico (350 NL/kg_{DQO}), seguido del butírico pero es 2.2 más alto que el reportado en este trabajo y por último, el ácido propiónico que en este trabajo presentó una pendiente negativa debido a que la producción de metano disminuye al aumentar la concentración de metabolito, en el trabajo de Dogan et al., (2005) al aumentar la concentración por encima de 1.5

$\text{g}_{\text{DQO}}/\text{L}$ de ácido propiónico, la producción específica de metano también disminuye, para que inicie la metanización se presenta periodos de latencia en el rango de 6-10 días en todas las concentraciones iniciales.

Y. Yang et al., (2015) en su trabajo evaluaron la producción específica de metano de los siguientes metabolitos: acetato, propionato, butirato y lactato en un rango de concentraciones de 0.25 g/L a 4g/L, en reactores batch de 500 ml de volumen útil, 300 ml de inóculo, el inóculo fueron lodos de una PTAR aerobios digeridos por 20 días en condiciones anaerobias y buffer de carbonatos (el rango de pH de los reactores entre el pH inicial y final fue de 7.5-8). Las producciones específicas de metano fueron 203, 185, 150, 59 $\text{NL}/\text{kg}_{\text{DQO}}$ para acetato, propionato, butirato y lactato respectivamente. Los resultados presentan grandes diferencias con los de este trabajo, solo el lactato presenta una similitud (ver tabla 5-4), la producción del acetato es mucho menor al determinado en este trabajo y por Dogan et al., 2005 que es cercano al teórico, para el ácido propiónico bajo las condiciones de operación al aumentar la concentración aumenta la producción de metano, estas diferencias se pueden deber al inóculo que con 20 días de digestión no se logró una completa adaptación a la condiciones anaerobias.

La producción específica del etanol alcanzó 296 $\text{NL}/\text{kg}_{\text{DQO}}$, superior a los resultados de Tatton et al., (1989), quienes trabajaron con cultivos mixtos y una combinación de tres especies productoras de metano. El metanol presentó una producción específica de CH_4 de 181 $\text{NL}/\text{kg}_{\text{DQO}}$, superior a los ácidos butírico, propiónico y láctico; el consumo de metanol estuvo cerca del 90% en todas las concentraciones probadas, y el consumo disminuyó con el aumento de la concentración inicial (tabla 5- 3). Florencio et al., (1995), utilizando un reactor UASB continuo y evitando la acumulación de AGV lograron 283 $\text{NL}/\text{kg}_{\text{DQO}}$, que es una producción superior a la alcanzada en este trabajo, esto pudo deberse a la adaptación del inóculo que utiliza, Florencio et al., (1995) utilizaron un inóculo adaptado por seis meses a degradar metanol.

5.3.3. *Determinación de parámetros cinéticos*

La tabla 5-5 muestra los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las curvas de la figura 5-3. Primero se determinó la tasa de generación inicial de metano para cada curva, luego se realizó el ajuste mediante la linealización de Lineweaver-Burk del modelo de Michaelis y Menten, todo se realizó con el software Exel (ver sección 4.3).

Aunque el ácido acético es el sustrato de referencia para la metanización, la V_{max} es la más baja de todos los sustratos probados con 668 $\text{NmL}_{\text{CH}_4}/\text{L}\cdot\text{d}$ y la K_m más baja con 1.2 $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{L}$ (con la excepción del ácido propiónico). Choi et al., (2017) y Gonzalez-Gil et al., (2018) indican que la K_m puede interpretarse como un indicador de la afinidad entre sustrato y enzima o grupo de enzimas, en el caso de esta investigación sería la afinidad del sustrato al inóculo para para generación de metano: a mayor afinidad, menor valor K_m .

El etanol presenta una V_{max} alta con 1928 $\text{NmL}_{\text{CH}_4}/\text{L}\cdot\text{d}$ y una K_m baja. Zou et al., (2020) y (2019) utilizando isótopos de etanol, observaron que el etanol aumenta la actividad de los microorganismos hidrogenotróficos. A excepción del acetato, ningún otro AGV presentó este comportamiento. Una fermentación etanólica previa a desechos alimentarios mejoró la metanización al reducir los tiempos de reacción y aumentar el rendimiento de CH_4 . También observaron que la actividad hidrogenotrófica era importante debido a que el 40 % del CH_4 se producía a través de esta vía metabólica. Otra característica vital de la fermentación etanólica es que no provoca acidificación, y los reactores de digestión anaerobia pueden operar con mayores tasas de carga orgánica (Wang et al., 2009; Yu et al., 2018a; Z. Zhao et al., 2016). Feng et al., (2021) analizan las ventajas del etanol como sustrato durante la metanización y concluyen que el etanol provoca una mejor transferencia directa de electrones entre especies, lo que permite una mayor recuperación de energía para los microorganismos, más que el ácido acético o cualquier otro tipo de sustrato, y los rendimientos de CH_4 son mayores.

Tabla 5-5. Parámetros cinéticos de las curvas de la figura 5-2, de acuerdo con el método de linealización de Lineweaver-Burk

Sustrato	Pendiente	Ordenada al origen	Corr. Coeff. R ²	V _{max} (NmL _{CH₄} /L·d)	Km g _{DQO} /L
Metanol	0.0151	0.0005	0.9992	1934	29.2
Etanol	0.0010	0.0005	0.9938	1928	2.0
Ác. acético	0.0017	0.0015	0.9796	668	1.2
Ác. butírico	0.0139	0.0005	0.971	2136	29.8
Ác. láctico	0.0019	0.0009	0.9791	1001	1.9
Ác. propiónico *	-0.0007*	0.0131*	0.9478*	76*	-*

*Aunque se presentó un comportamiento lineal, Km es negativa lo cual no tiene una explicación fenomenológica, por eso no se calcula.

El metanol presenta un valor de V_{max} similar al etanol, pero un valor significativamente mayor para Km con 29.2 g_{DQO}/L, correspondiendo con las curvas de la figura 5-2, donde el etanol requiere un tiempo menor que el metanol para terminar la reacción. Las curvas del etanol son líneas rectas desde el principio hasta el final, lo que indica un valor de Km bajo. En cambio, las curvas de metanol presentan la forma típica donde Km tiene valores más altos. Yamaguchi et al., (1989) observaron que la metanización directa de metanol con *Methanosarcina sp.* requirió 30 días para que el inóculo se adaptara. También concluyeron que, en un sistema combinado con AGV y los alcoholes, no se produce la metanización directa a partir del metanol.

En el caso de ácido láctico presenta una velocidad relativamente más alta que el acético y un Km similar, se tomaron las pendientes de la zona de alta generación de metano (figura 5-2) que para este caso fue en el rango de 14 a 24 horas, su combinación de parámetros es buena pero como se observó en la sección anterior, las reacciones alternas de lactato dificultan la metanización.

El ácido butírico presenta los valores más altos de V_{max} (2136 NmL_{CH₄}/L·d) y Km (29.8 g_{DQO}/L). Al igual que con el metanol, la figura 5-2 muestra que las curvas de CH₄ del ácido butírico presentan el comportamiento típico correspondiente a una Km alta. El inicio de la producción de CH₄ acetotrófico requirió más de cuatro días. Los primeros días fueron necesarios para que ocurrieran las reacciones acetogénicas y luego comenzó la producción de CH₄ del acetato generado.

La metanización a partir de ácido propiónico muestra una inhibición (figura 5-2) pues la metanización a las concentraciones de trabajo produce valores más bajos que el inóculo. Además, cuando se representan con el modelo de Lineweaver-Burk, las concentraciones siguen una línea recta, pero con pendiente negativa.

Lawrence y Mccarty, (1969) utilizaron ácidos acético, propiónico y butírico en un reactor continuo de 6 L. Las concentraciones de sustrato fueron 1.5, 3.0 y 3.1 gCOOH/L. El inóculo fue lodo anaeróbico y el tiempo de retención fue de 25 días. Propusieron evaluar la cinética de consumo de sustrato de Monod y relacionarla con el crecimiento de la biomasa. Bajo una concentración de 1.5 gCOOH/L, el ácido butírico se consumió más rápido que los otros dos ácidos. Estos resultados difieren de los de esta investigación: la figura 5-2 muestra que el ácido butírico requiere aproximadamente 6 días para terminar la reacción y el ácido acético requiere solo 18 horas. A diferencia de Lawrence y Mccarty, (1969) esta investigación indica que el ácido butírico y propiónico inhiben la metanización a altas concentraciones.

La figura 5-5 compara los parámetros cinéticos calculados que se muestran en la tabla 5-5 con los valores experimentales para la metanización de los diferentes sustratos. Las líneas punteadas indican el comportamiento de cada metabolito por el modelo de Michaelis-Menten y los marcadores indican los valores observados. Estos resultados prueban que el modelo de Michaelis-Menten se puede

utilizar con éxito para simular la metanización de sustratos originados durante la fermentación de FORSU.

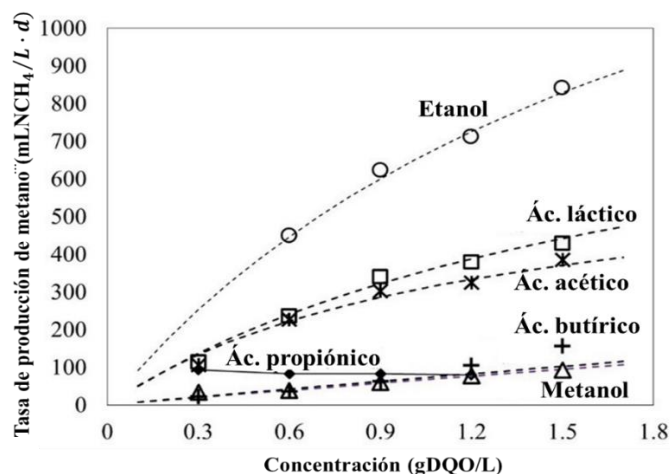


Figura 5-5 Tasa de producción vs concentración inicial de sustrato, comparación entre modelo (línea punteada) y datos experimentales (marcadores)

5.3.4. Evaluación de pH inicial y final en la metanización

En la figura 5-6 se presenta una comparación entre el pH inicial y el pH final después de la prueba de metanización. El pH inicial (I en la figura 5-6) es el pH antes de la inyección de sustrato y además es el promedio de las 5 concentraciones. El rango de pH inicial para todos los sustratos y concentraciones estuvo dentro de 6.97-6.99, por lo cual se considera que todos los reactores operaron bajo las mismas condiciones.

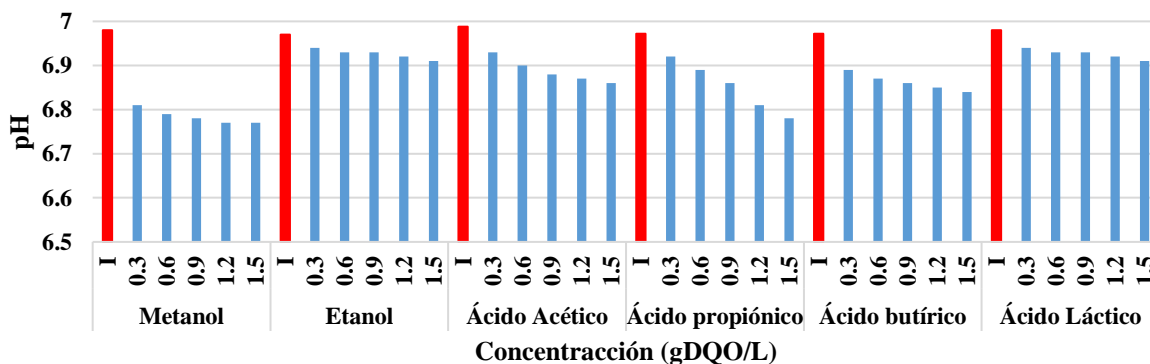


Figura 5-6 Comparación entre el pH inicial (rojo) y pH final (azul) de la metanización para cada sustrato y concentración.

El comportamiento de metanol presentó el cambio más brusco desde la concentración más baja, la caída fue de aproximadamente 0.17 unidades de pH, y después en la medida que aumentó la concentración de metanol el pH descendió de forma gradual hasta llegar a un valor 6.77, el salto puede deberse al alto consumo de alcalinidad en la etapa de acetogénesis (tabla 3-1). Florencio et al., (1995) evaluaron el efecto de la alcalinidad en la degradación metanol en un reactor UASB alimentado con agua sintética una carga de 10gCOD/L·d, para ello probaron diferentes alcalinidades bicarbonáticas, sin adición de alcalinidad bicarbonato y con buffer de fosfatos en el agua sintética de alimentación, buscando un pH neutro. Los reactores que operaron sin alcalinidad y con buffer de

fosfatos presentaron los cambios más grandes de pH pasando de 7 a 6.2 a próximamente, además el reactor que operó con buffer de fosfatos logra una remoción de casi el 100% del metanol y baja formación de AGV. Este comportamiento es similar a los resultados de este trabajo, el metanol presentó los cambios más altos de pH, un consumo alto de metanol y una baja formación de AGV, aunque se observa formación de ácido acético y butírico (tabla 5-3). Además Florencio et al., (1995) propone que al no a ver alcalinidad bicarbonática de manera directa (solución buffer de carbonatos), el CO₂ generado en el proceso entra en equilibrio con el medio acuoso para la formación alcalinidad bicarbonática y el metanol utiliza la alcalinidad para realizar el proceso de acetogénesis (ver tabla 3-1), lo que conlleva a que el biogás que sale del reactor sea más rico en metano, aproximadamente en un 82%, el porcentaje de metano obtenido en este trabajo para metanol fue de 83% (tabla 5-2).

El ácido acético, etanol, butírico y láctico presenta un comportamiento en la caída de pH de forma gradual en donde no se presentan cambios bruscos en el pH, ningún metabolito logra presentar un pH menor a 6.8. El ácido propiónico no presenta un cambio brusco al inicio como el metanol, sino descensos graduales, pero de gran magnitud, y en la concentración de 1.5 g_{DQO}/L el descenso es de aproximadamente 0.2 unidades de pH. Que comparado con el resto de los metabolitos es el que más afecta al pH.

5.4. Fermentación de FORSU con diferentes inóculos a pH 4, experimento exploratorio

En esta sección se analizarán los resultados correspondientes a la tercera etapa de la metodología en particular al experimento exploratorio que consiste en una fermentación con diferentes inóculos que son: lodos de UASB, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y microorganismos autóctonos, y un control de pH que se ajustó a 4 con el fin de disminuir la generación AGV y aumentar la selectividad hacia etanol y ácido láctico. Como se mencionó en los antecedentes, estos metabolitos pueden presentar efectos positivos en la metanización.

5.4.1. Fermentación con diferentes inóculos

La Figura 5-7 muestra los diferentes metabolitos producidos durante la fermentación de FORSU con diferentes inóculos y microorganismos autóctonos, y el grado de fermentación total que se calcula como la DQO de los metabolitos sobre la DQO disuelta del sistema por 100 (el anterior cálculo se puede realizar para los metabolitos de forma individual). La operación semicontinua de los reactores resultó en un tiempo de retención de sólidos (TRS) de 1.1 d. La prueba tomó seis días para cada inóculo, y todos los días se tomaron muestras para ácido láctico, AGV y alcoholes. A medida que la FORSU fresca se recolectaba en origen y se transportaba a la estación de transferencia, pasaron varias horas, por lo que se esperaba una fermentación baja durante este tiempo; los productos de esta fermentación se presentan como FORSU en el día cero con 5.9 ± 0.7 g_{DQO}/L donde el ácido láctico y el etanol son los componentes principales. Se detectaron pequeñas concentraciones de ácido acético en la FORSU fresca. El resto de los metabolitos presentaron picos por debajo del límite de detección por lo que no se incluyeron en la gráfica.

Para microorganismos autóctonos, el grado de fermentación es bajo durante los dos primeros días, y luego aumenta drásticamente hasta casi el 100%, producto de la alta generación de ácido láctico en el sistema, lo que indica que en el volumen semilla lo que se transfería eran microorganismos lácticos; después de eso, el grado de fermentación disminuye lentamente al 70% al final de la prueba. El etanol representa el primer día al 34 % del total de la DQO, permaneció sin cambios el segundo día y luego disminuyó constantemente hasta alcanzar un valor final del 15 %. A diferencia de los otros metabolitos, el ácido acético representó casi un 10 % de metabolitos generados en el sistema. Aunque

cada día se reponía el 93% del volumen de reacción, los microorganismos aumentaron su actividad durante la prueba. El ácido láctico fue la fermentación predominante con un porcentaje cercano a 56%. La DQO de metabolitos producto de la fermentación de FORSU en el día cero fue de 6.9 g/L y aumentó a 20 g/L en el día 4 (figura 5-7).

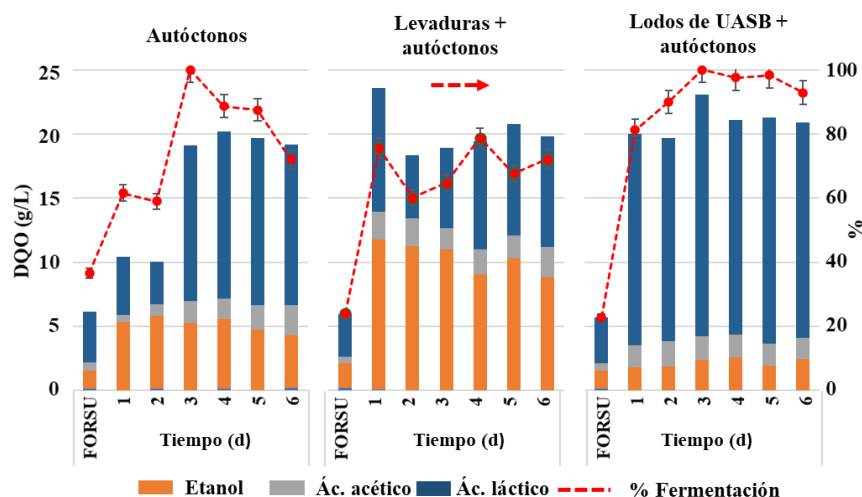


Figura 5-7. Producción de metabolitos para cada inóculo de trabajo

Con una fermentación inducida por levaduras y microorganismos autóctonos se presentó la mayor concentración de etanol que se alcanzó el primer día con 12 g_{DQO}/L y luego disminuyó hasta 8.5 g_{DQO}/L en el día 6. La concentración de ácido acético no varió significativamente durante los seis días, manteniendo valores entre 2.0 y 2.5 g_{DQO}/L (figura 5-7). El grado de fermentación total osciló entre 60 y 80%. El etanol representó el primer día un 37 % sobre el total de la DQO, y luego disminuyó lentamente a un 32 % el último día. El ácido láctico aumentó el primer día para disminuir el segundo, y luego volvió a aumentar gradualmente hasta el día 6 representando de un 21% en el día 2 a un 34% en el día 6. El ácido acético permaneció casi sin cambios durante todo el experimento, con un promedio de 7%. Estos resultados muestran que la levadura no se reprodujo lo suficiente como para aumentar su concentración y mantenerse en el volumen semilla y se lavó lentamente del reactor. Al principio, hubo una concentración máxima de levadura y el etanol aumentó rápidamente, pero, con el tiempo, la concentración y las tasas de fermentación etanólica disminuyeron a medida que la levadura se eliminaba del sistema y se recuperaban las comunidades ácido lácticas.

La fermentación con lodos de UASB y microorganismos autóctonos presentaron el siguiente comportamiento: el etanol se mantuvo a valores entre 1.6 y 2.3 g_{DQO}/L desde el día uno hasta el día seis. El mismo comportamiento y valores se observaron para el ácido acético. La producción de ácido láctico presentó un máximo de 19.6 g_{DQO}/L al tercer día. Las concentraciones de ácido láctico no muestran tendencia ya que la concentración se mantiene sin cambios significativos a lo largo del tiempo experimental (figura 5-7).

El grado de fermentación total con lodos UASB y microorganismos autóctonos es el más alto de las tres fermentaciones. El grado de fermentación total en el primer día aumentó rápidamente a 81%; en el día tres, alcanzó el 100 % y luego disminuyó lentamente hasta el 93 % al final de la prueba. La fermentación de ácido láctico fue la fermentación dominante. Las tasas de fermentación de ácido acético y etanol se mantuvieron bajas, con valores promedio cercanos al 10% durante los seis días de la prueba. Bajo estas condiciones se promueve la fermentación del ácido láctico. Con lo anterior se pueden afirmar que los lodos de UASB son un inóculo selectivo a la generación de ácido láctico.

Los productos más importantes de las fermentaciones fueron el etanol y el ácido láctico, que corresponden a casi el 90% del total de productos; el otro 10% era ácido acético. Para el ácido láctico, la mayor producción fue del 80% de los metabolitos totales, correspondiente a la fermentación con lodo de UASB, luego con los microorganismos nativos logrando un 63% y finalmente con la levadura donde se alcanzó un 41%. La mayor producción de etanol se obtuvo con levadura como inóculo con 50% del total de metabolitos producidos, luego con autóctonos con 28% y finalmente con lodo UASB con 12%. Al igual que los resultados de J. Zheng et al., (2015), esta investigación observó que, durante la fermentación de residuos de frutas y verduras con levadura, la concentración de etanol disminuyó levemente a medida que aumentó la concentración de ácido láctico.

Independientemente del inóculo y las condiciones de operación (a TRS de 1.1 d y pH constante a 4.1), el ácido acético no fue la fermentación dominante para ninguno de los inóculos ni para microorganismos autóctonos. Para los tres casos, la generación fue aproximadamente la misma después de seis días. Jankowska et al., (2015) evaluaron un reactor bajo TRH de 5, 10 y 15 d y pH de 4 a 12, y concluyeron que, bajo pH 4 y 5, y TRH de 5, la producción de AGV disminuye dramáticamente a pH inferiores a 6. Wu et al., (2017) trabajaron con un reactor para fermentar residuos de comida operando a pH 3 y 4, lograron selectividad para etanol y muy baja para ácido acético. Cheah et al., (2019) evaluaron la fermentación a pH 4 y solo determinaron AGV, el ácido acético representó el 67% de todos los AGV con una concentración 2.9 g_{DQO}/L con trazas de ácidos butírico y caprónico. La producción promedio de ácido acético en esa investigación fue de 2.15 g_{DQO}/L, similar en este trabajo

Soomro et al., (2020) evaluaron la fermentación de FORSU sin control de pH y, lamentablemente, no analizaron para etanol y ácido láctico, descartan la formación de estos dos metabolitos en la fermentación de FORSU. Concluyen que, a valores de pH de 4, la fermentación se detiene y, después de tres días de no presentarse generación, tuvo lugar la fermentación butírica. Gameiro et al., (2016) estudiaron fermentaciones FORSU sin inóculo bajo diferentes valores de pH e informaron que la fermentación ácida se detuvo a un pH de 4 con una tasa de fermentación total del 15%, dominando las fermentaciones lácticas.

Luego de estudiar la fermentación de desechos de alimentos (verduras y frutas) bajo valores de pH de 4, 5 y 6, a 37°C, J. Zheng et al., (2015) concluyen que a pH 4, el grado de fermentación del etanol fue del 97.5 % y el resto fue ácido acético. Wu et al., (2017) trabajaron con un CSTR a 35°C, TRH de 3 d, y pH de 4 a 7, utilizando como sustrato restos de alimentos; reportan que a pH 4 la fermentación fue 88% a etanol y el resto ácido acético. Las anteriores investigaciones difieren de los resultados de este trabajo, pero esto se debe a que no se determinó ácido láctico como producto de la fermentación de FORSU, si se retirara el ácido láctico de la figura 5-7, tendríamos un dominio de la fermentación etanólica, de lo anterior se puede afirmar la importancia en un sistema fermentativo de FORSU, de analizar la producción de la terna etanol, ácido acético y láctico.

Según la literatura, existen dos rutas metabólicas para la producción de ácido láctico: la ruta homofermentativa y la ruta heterofermentativa (Ec. 5 y 6, Wu et al., 2017). Los productos de la fermentación homoláctica son principalmente ácido láctico, y los de la fermentación heteroláctica son cantidades equimolares de CO₂, lactato y acetato o etanol (Kandler, 1983). Las concentraciones promedio para los 6 días de fermentación se presentan en la tabla 5-6 para ácido acético, etanol y ácido láctico en el caso de la fermentación con microorganismos autóctonos fueron 30±5, 51±6 y 132±4 mMol, respectivamente; en el caso de la fermentación con levadura más autóctonos, los valores fueron 32±4, 108±10 y 98±15 mMol, respectivamente; el último caso, la fermentación con lodo UASB + autóctonos reportó 28±2, 22±3 y 178±11 mMol, respectivamente. La relación de ácido láctico a etanol o ácido acético durante la fermentación con microorganismos autóctonos fue, superior a uno, demostrando que bajo esta fermentación no se presentó una producción equimolar de ácido láctico con etanol o ácido acético lo que implica que bajo estas condiciones la producción de láctico

se realizó por una fermentación homoláctica principalmente, lo mismo aplicaría para la fermentación con lodos de UASB. Durante la fermentación con levaduras + autóctonos, la concentración molar de etanol y ácido láctico es similar, y la proporción de ácido láctico a etanol es de 0.91, lo que indicaría heterofermentación, pero *Saccharomyces cerevisiae* fermenta solo a etanol, por lo cual en el sistema debió haber participación simultánea de microorganismos etanólicos (*Saccharomices cerevisiae*) y lácticos presentes durante el proceso, ya que se produjeron cantidades equimolares de etanol y ácido láctico (tabla 5-7).

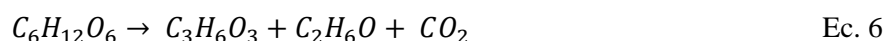


Tabla 5-6 Concentración promedio de metabolitos de los seis días de fermentación (mMol/L).

Fermentación con	Ácido láctico	Etanol	Ácido acético
Microorganismos autóctonos	132±4	51±6	30±5
Levaduras + autóctonos	98±15	108±10	32±4
Lodos de UASB + autóctonos	178±11	22±3	28±2

La tabla 5-7 muestra la DQO total y soluble al final de las pruebas de fermentación de 6 días para los tres casos. En los tres casos, la DQO total disminuyó durante los seis días alrededor del 9% en la fermentación con lodos UASB, un 14% para la fermentación con microorganismos autóctonos. Simultáneamente, la DQO soluble aumentó en los tres casos: 16% para la fermentación con levaduras + autóctonos, 9% para microorganismos autóctonos y 5% para lodos de UASB + autóctonos.

Además, de la Tabla 5-7, los sólidos totales disminuyeron en un 21% para la fermentación con microorganismos autóctonos y 4% para las fermentaciones con levaduras + autóctonos y lodos de UASB + autóctonos. Para la fermentación con microorganismos autóctonos, los sólidos volátiles disminuyeron en un 25%, 19% para levaduras + autóctonos y 10% para lodo UASB + autóctonos. La disminución de sólidos indica tasas de hidrólisis más bajas para los tres casos y se pueden observar en la tabla. Kandylyis et al., (2016) reportan procesos hidrolíticos deficientes cuando el pH es bajo, especialmente por debajo de 5.5, donde la actividad enzimática también es muy baja e inhibe el metabolismo microbiano. Gameiro et al., (2016) confirman que la fermentación a pH 4 desactiva los procesos hidrolíticos pues inhibe los procesos de exoenzimas que afectan a los procesos hidrolíticos.

Un punto importante es que la fermentación con lodos de UASB + autóctonos, aunque presentó los grados de fermentación más altos es decir, logró transformar casi toda la DQO disuelta en metabolitos de interés, de la tabla 5-7 se observa que no logró hidrolizar y a su vez liberar DQO disuelta lo que puede limitar al sistema puesto que solo pudo fermentar el material disuelto que previamente se encontraba con la FORSU cruda, en cambio las fermentación con microorganismos autóctonos y con levaduras + autóctonos, aunque no logran grados de fermentación tan altos como los lodos de UASB si tienen la capacidad de hidrolizar y generar DQO disuelta, que puede, a mayores tiempo de retención hidráulica o de sólidos, transformarse en productos de interés y presentar producciones más altas de metabolitos.

Tabla 5-7 DQO, sólidos y tasas de hidrólisis, promedio de los seis días de fermentación

Inóculo	DQO (g/L)				Sólidos (g/L)				Tasa	Tasa
	Inicial		Final		Inicial		Final		hidrólisis	hidrólisis
	Total	Dis.	Total	Dis.	ST	SV	ST	SV	(g _{DQO} /kg _{ST} ·d)	(g _{DQO} /kg _{DQO} ·d)
Micro. autóct.	75±10	23±3	64±6	25±2	52±4	40±4	41±5	30±2	35	24
Lev + autóct.	82±6	25±1	74±7	29±2	54±5	42±4	52±4	34±3	66	44
UASB+ autóct.	74±3	22±1	68±6	23±1	54±6	42±4	52±2	38±1	12	9

Micro. autóct.: microorganismos autóctonos; Lev: levaduras; UASB: lodos de UASB, Dis: disuelta.

5.4.2. Metanización de digestatos previamente fermentados

En esta sección se analizan los resultados de las pruebas de metanización de la FORSU después de seis días de fermentación (digestato) con los diferentes inóculos y microorganismos autóctonos; se analizó la producción de metano de los digestatos resultantes a partir de variar las concentraciones iniciales de sustrato en los reactores de metanización (Figura 5-8). Se usó FORSU cruda sin fermentar punto de referencia y comparación, y la prueba se realizó durante 30 días. Como observación general, la producción de metano aumentó con el aumento de la concentración de sustrato, pero se observó inhibición a concentraciones de sustrato más altas. En la figura 5-9 se presenta la producción específica de metano calculada por una regresión lineal y en la tabla 5-8 los resultados de la linealización, la pendiente representa la producción específica y la ordenada al origen la producción endógena por parte de inóculo.

La metanización de FORSU cruda sin fermentar se realizó para referenciar cuánto metano se puede obtener directamente de la metanización del FORSU cruda. La figura 5-8 muestra las curvas de producción de metano durante 30 días. La curva de color verde es el inóculo, y las otras curvas indican una producción creciente de metano al aumentar la concentración inicial del sustrato (digestato). Durante los primeros días la producción de metano es rápida, luego la tasa de producción disminuye mostrando una segunda etapa, típica de la fermentación y acetogénesis (Jojoa-Unigarro y González-Martínez, 2021). La Figura 5-9 y tabla 5-8 indican que la producción final de metano es directamente proporcional a la concentración inicial de sustrato con un buen coeficiente de correlación.

Al igual que en el caso anterior, la producción de metano de la FORSU fermentada con microorganismos autóctonos comenzó rápidamente y luego disminuyó para mostrar una fase de retraso prolongada (comportamiento diaúxico) para las dos concentraciones más altas. La mayor concentración de sustrato presenta una producción paralela a la del inóculo en los primeros días de metanización y, después de aproximadamente diez días, aumentó significativamente para terminar la producción de metano al día 27. Los valores finales después de 30 días son similares a los de la FORSU cruda sin fermentar. La Figura 5-9 muestra un comportamiento lineal entre la producción final de metano y la concentración inicial de sustrato. Estos últimos valores son casi los mismos que los de la producción final de metano de FORSU cruda sin fermentar (figura 5-8).

Para la FORSU fermentada con levaduras y microorganismos autóctonos, a las dos concentraciones iniciales de sustrato más bajas (1.25 y 2.5 gSV/L) fueron similares a los dos casos discutidos previamente. Las dos concentraciones más altas (5 y 10 gSV/L) tuvieron patrones diferentes, lo que indica una inhibición del sustrato. El caso de 5 gSV/L presentó una producción de metano similar a la concentración de 1.25 gSV/L, considerando que la prueba de 30 días no fue suficiente para la reacción. Para el caso de 10 gSV/L, a los tres días se detuvo la reacción y, a los diez días, se reactivó

repentinamente la producción de metano; desafortunadamente, un problema con la celda de reacción impidió el monitoreo de metano después del día 22. La Figura 5-9 se muestra enmarcado en un círculo rojo un triángulo que representa a la condición 5 gSV/L, se observa una caída en la generación de metano para los otros casos de estudio, bajo esta condición se mantiene un comportamiento lineal con respecto a la masa inicial de sustrato.

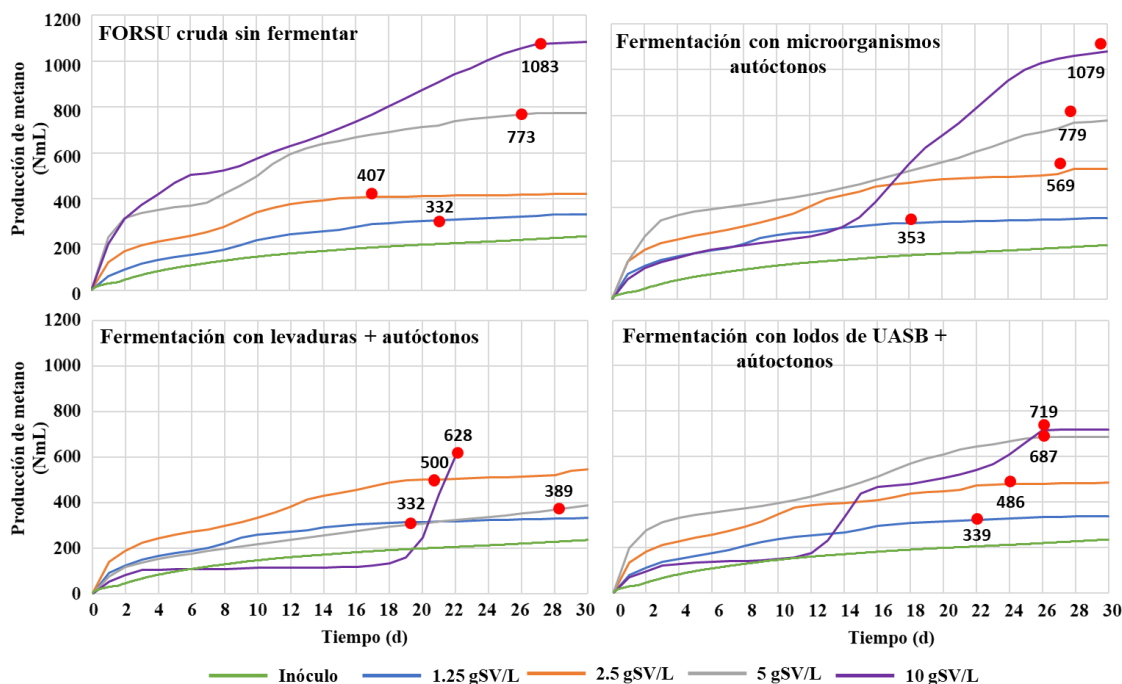


Figura 5-8 Curvas de producción de metano de digestato y FORSU cruda sin fermentar

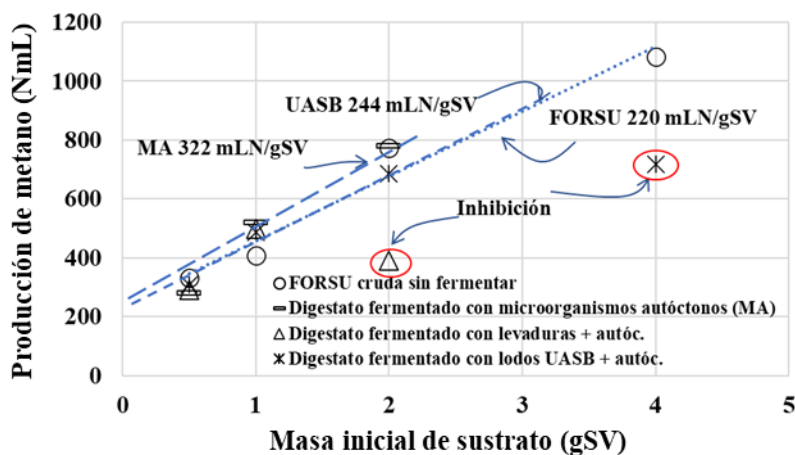


Figura 5-9. Producción específica para digestatos y la FORSU cruda sin fermentar. MA (microorganismos autóctonos)

Al igual que en los casos anteriores, la producción de metano de FORSU fermentada con lodos de UASB más microorganismos autóctonos durante los primeros dos días fue rápida y luego decreció considerablemente a tasas similares al blanco durante varios días para luego aumentar. Solo la producción de metano de la concentración de sustrato inicial más alta se detuvo después de tres días y luego comenzó de nuevo repentinamente el día 12 para detenerse nuevamente al día 17; y aumentó

nuevamente al día 20 para detenerse el día 26. Las dos concentraciones de sustrato más bajas continuaron produciendo metano al mismo ritmo que el inóculo después del día 12. La producción específica de metano muestra en la tabla 5-8.

Tabla 5-8 Resultados de la linealización para determinar la producción de metano de los digestatos y FORSU cruda sin fermentar

Digestato	Pendiente (Prod. Esp. CH ₄ , NmL/gSV)	Ordenada al origen	Corr. Coef. R ²
FORSU cruda sin fermentar	220	235	0.9639
Fermentado con microorganismos autóctonos	322	150	0.972
Fermentado con levaduras + autóctonos	420*	NA	NA
Fermentado con lodos de UASB + autóctonos	244	209	0.9771

*se obtiene a partir de 2 valores; Prod. Esp. CH₄: producción específica de metano.

Durante los primeros siete días, todas las curvas de la Figura 5-8 muestran un comportamiento similar. El digestato de la fermentación con levadura más microorganismos autóctonos presenta la menor producción de metano durante los primeros siete días. En general, a medida que aumenta la concentración de sustrato, la producción de metano varía según el tipo de sustrato. Las curvas de producción de metano muestran dos etapas, en la primera etapa se utiliza hasta que se agota el sustrato disuelto disponible principalmente en el líquido, luego entre la primera etapa y segunda etapa existe un periodo de latencia en donde se está hidrolizando y fermentando para generar buenos metabolitos que den paso a la segunda etapa de generación de metano.

Se observa una inhibición evidente para la concentración de 10 gSV/L pues la producción de metano se detiene después de tres días para los digestatos producto de la fermentación con levadura más autóctonos y lodos UASB más autóctonos. En el caso de la levadura más autóctonos, la producción de metano no genera durante 17 días y, desafortunadamente, una falla en la celda del contador de metano no permitió seguir el desarrollo posterior de la curva. En el caso de lodos UASB más autóctonos tardó 11 días en reactivarse con un aumento repentino en la producción de metano; la curva indica inestabilidad hasta el final del experimento (ver figura 5-8).

A partir de la tabla 5-8 se observa que los R² son altos cercanos a la unidad, lo que significa que la producción de metano de la FORSU sin fermentar y del digestato fermentado con microorganismos autóctonos es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y no se pudo detectar inhibición.

La producción específica de metano, obtenida a través de la figura 5-9, considera solo las tres concentraciones de sustrato más bajas por qué, como se ve en las figuras 5-8 y 5-9, los valores finales para las pruebas de 4 gSV son, excepto para el FORSU cruda sin fermentar, más bajos de lo esperado. La inhibición es la causa de este comportamiento. En el caso de la fermentación con levadura más autóctonos solo se considera los dos valores más bajos que se comportan consistentemente con los demás casos. Los valores que no encajan en las líneas son más bajos de lo esperado, lo que es consistente con una inhibición. En secciones posteriores se demostrará que esta inhibición es causada por el ácido propiónico.

La Tabla 5-8 muestra la producción específica de metano calculada a partir de la Figura 5-9. Teóricamente, el intercepto corresponde a la producción de metano por el inóculo. Jojoa-Unigarro y González-Martínez, (2021) demostraron que la producción endógena de metano del inóculo depende fuertemente del sustrato, lo que puede llevar a una interpretación errónea, el considerar la producción endógena como una constante. Al analizar las ordenadas al origen de la Figura 5-9, y considerando

el error analítico, las intersecciones calculadas de FORSU cruda sin fermentar y fermentada con lodo UASB más autóctonos son cercanas (209 y 235 NmL de metano). El digestato de FORSU fermentada con microorganismos autóctonos es menor (150 NmL de metano) que los otros dos, lo que indica una menor producción de metano endógeno, esto puede deber en caso la FORSU cruda sin fermentar a que no tiene una previa fermentación, por lo cual no ha sufrido procesos hidrolíticos y estos procesos se tendrán que realizar en los reactores de metanización lo cual implica mayor requerimiento energético para el inóculo.

5.4.2.1. Discusión de resultados

La Tabla 5-9 compara los resultados obtenidos en esta investigación con los de otros autores. En la mayoría de los casos, las producciones de metano son similares entre los autores y, en algunos casos, la producción es mayor. Las principales discrepancias en los valores informados en la Tabla 5-9 se basan en el origen y la composición de los desechos. Al trabajar con FORSU de la misma fuente que esta investigación, Figueroa-Escamilla y González-Martínez (2021) informan cantidades más altas de compuestos lignocelulósicos de desechos de jardín incluidos en la composición de FORSU. Los autores citados en la Tabla 5-9 trabajaron principalmente con residuos de frutas y verduras que contenían cantidades más elevadas de azúcares y otras sustancias fácilmente biodegradables. A diferencia de esta investigación donde se probaron diferentes variables, varios de estos autores determinaron el rendimiento de metano con base en condiciones operativas limitadas; en algunos casos reportan valores de residuos líquidos donde los tiempos de retención hidráulica (HRT) fueron relativamente bajos (Ganesh et al., 2014; Bouallagui et al., 2004; Rajeshwari et al., 2001). Estos últimos autores reportan una producción de metano de 300 a 350 NL/kg_{SV}, cercanas a la de esta investigación de 322 NL/kg_{SV} para FORSU fermentada con microorganismo autóctonos y no se realizó una separación de la fracción líquida de la sólida.

Trabajando con un CSTR y tasas de carga orgánica relativamente bajas en proceso de digestión anaeróbica de una y dos etapas, Baldi et al. (2019) obtuvieron las mayores tasas de producción de metano con 694 y 705 NL/kg_{SV}, respectivamente, donde el valor más alto corresponde a la digestión anaerobia en dos etapas. Estos valores son muy superiores a los reportados por Campuzano y González-Martínez (2016) y a los obtenidos en esta investigación.

Baldí et al. (2019), Ma et al. (2020) y Valentino et al. (2021) evaluaron el proceso de digestión anaeróbica en dos etapas y compararon sus resultados con la producción de metano en una etapa utilizando como sustrato los desechos de alimentos. Es importante señalar que los resultados informados en la Tabla 5-9 contienen variables de proceso similares a las de esta investigación. Por ejemplo, todos los valores se obtuvieron a temperatura mesófila y el TRH fue de 15 a 30 días. Algunos autores reportan resultados de experimentos por lotes y otros de CSTR. Comparando los resultados del proceso de una etapa, el proceso de dos etapas logra un aumento en la producción de metano entre 0.5 y 10%. Esta investigación logró un aumento del 30% cuando las concentraciones de sustrato eran relativamente bajas debido a que la inhibición causada por concentraciones más altas de sustrato redujo la producción de metano e incrementó la etapa de latencia la cual a una concentración de 10 gSV/L puede durar entre 10 a 17 días para luego volver a metanizar.

El trabajo de Yu et al. (2018) reporta producciones de metano inferiores a esta investigación (184 - 196 NL/kg_{SV}). Las principales diferencias son que Yu et al. (2018) trabajaron a 37°C en lugar de 35°C, y el tiempo de reacción fue de 20 días en lugar de 30 días. La conclusión general del autor es que un proceso de dos etapas es más flexible que un proceso de una etapa. Para lograr una mayor producción de metano, la metanización debe realizarse con tasas de carga orgánica más bajas, independientemente del inóculo utilizado para la fermentación. Las mayores producciones de metano se consiguen con reactores continuos, seguidos de semicontinuos y, finalmente, con sistemas discontinuos.

Tabla 5-9 Comparación de la producción específica y condiciones de operación de fermentación de residuos orgánicos

Autores	Sustrato (residuos)	Inóculo, condiciones de operación	Metanogénesis	Producción de metano (NL/kg _{SV})
Este trabajo	FORSU con residuos de jardinería	Inóculo: Levaduras, Reactor batch, TR 24 h, 35°C, pH 4	Batch, 35°C, TR 30 d	62
		Inóculo: Lodos UASB, Reactor batch, TR 24 h, 35°C, pH 4	Batch, 35°C, TR 30 d	101
		Inóculo: organismos nativos, Reactor batch, TR 24 h, 35°C, pH 4	Batch, 35°C, TR 30 d	196
		Sin fermentación	Batch, 35°C, TR 30 d	217
Ma et al., (2020)	Comida	Etanólica, Inóculo: levaduras, Reactor batch, TR 24 h, 35°C	Semicontinua, 37°C, TRH 20 d 5.5gVS/L*d	203
		Sin fermentación	Semicontinua, 37°C, TRH 20 d 5.5gVS/L*d	184
Yu et al., (2018a)	Comida y cosecha de maíz	Etanólica, Inóculo: levaduras, Reactor batch, TR 24 h, 35°C	Batch, 35°C, Inóculo/sustrato ratio 3 (VS), tiempo de digestión: 38 días	280
Ganesh et al., (2014)	Frutas y vegetales	AGV, acética, Reactor batch, TRS 5 a 10 días, separación de líquido y sólido, solo se metaniza la fracción líquida	CSTR, TRH 30 d, 37°C, 7.0 g _{SV} /L*d	300
Bouallagui et al., (2004)	Frutas y vegetales	AGV, acética, TR 21 h, 35°C, separación de líquido y sólido, solo se metaniza la fracción líquida	Batch ASBR, TR 21 h, 35°C, 1.29 g _{DQO} /L*d, TRS 10 d	320
Rajeshwari et al., (2001)	Supermercado	AGV, acética, TRH 40 h, 35°C. Separación de líquido y sólido, solo se metaniza el líquido	UASB, TRH 16 h, 37°C, 19.6 g _{DQO} /L*d	350
Shen et al., (2013b)	Frutas y vegetales	CSTR, AGV, TRH 10 d, 37°C	TRH 10 d, 37°C, 4.0 g _{SV} /L*d	351
		Sin fermentación	TRH 30 d, 37°C, 4.0 g _{SV} /L*d	328
Baldi et al (2019)	Comida	Inóculo: organismos nativos, Reactor CSTR, TRH 3 d, 35°C. OLR: 14.2 kg _{SV} /m ³ *d	Reactor CSTR, TRH 12.8 d, 35°C. OLR: 2.5 kg _{SV} /m ³ *d	704.6
		Sin fermentación	Reactor CSTR, TRH 17 d, 35°C. OLR: 2.5 kg _{SV} /m ³ *d	694

*NL/kg_{DQO}

Utilizando desechos de maíz, frutas y vegetales en un proceso de dos pasos, Schievano et al. (2014) señalan que las ventajas del proceso en dos etapas radican en una mejor recuperación energética; informan un aumento del 23 al 43 % en la recuperación de energía en comparación con el proceso de un solo paso cuando se opera con tasas de carga orgánica más bajas. Bajo un pH de 6.6, Valentino et al. (2021) concluyen que en estas condiciones predominan las fermentaciones de ácido propiónico y valérico, representando ambos ácidos el 50% de los metabolitos totales. También concluyen que la metanogénesis después de la fermentación debe realizarse con tasas de carga orgánica más bajas para permitir la absorción de los ácidos propiónico y valérico a través de la acetogénesis.

5.4.3. Modelación por Gompertz

Para el modelo de Gompertz, el metano producido (Figura 5-8) se transformó en producción específica de metano al dividir el metano producido por la masa inicial de sustrato usando el programa Statistica 7.0, se trazó un ajuste no lineal de Gompertz (Figura 5-10) con el fin de que los parámetros P_{max} , R_{max} y λ (Ec. 4), sean específicos, es decir en función de sólidos volátiles, como se puede ver en la figura 5-10 al trabajar con la producción específica cambia la tendencia de las curvas.

De acuerdo con el modelo de Gompertz, la Tabla 5-10 muestra la producción específica de metano de acuerdo con la concentración inicial de sustrato de los diferentes digestatos fermentados y FORSU cruda sin fermentar. P_{max} es el rendimiento máximo de metano o la producción específica de metano; R_{max} es la tasa máxima de producción de metano y λ es el tiempo de latencia. De los resultados se observa que la producción específica de metano es inversamente proporcional a la concentración de sustrato para todos los sustratos probados, lo anterior ocurre tanto en los datos experimentales como en los valores calculados. Para cada uno de los digestatos probados, la mayor producción de metano corresponde a la concentración de 1.25 g_{SV}/L. La mayor producción de metano corresponde a la fermentación con microorganismos autóctonos con 707 NL/kg_{SV}, y representa solo un 6% más que la producción de metano de la FORSU sin fermentar a la misma concentración inicial de sustrato.

El comportamiento de la producción específica de metano para FORSU más levaduras fue con 1.25 g_{SV}/L y generó 662 NL/kg_{SV}; al aumentar la concentración de sustrato a 2.5 g_{SV}/L, la producción de metano disminuyó significativamente a 547 NL/kg_{SV} y a una concentración de sustrato de 5 g_{SV}/L, la producción específica de metano cae a 223 NL/kg_{SV}. Es donde se presenta la mayor caída en la producción de metano y aunque a una concentración de 10 no se pudo concluir la experimentación se observa de la figura 5-8 que a esta concentración desde el día 3 se presenta una inhibición por exceso de sustrato pues se observa que el comportamiento es una horizontal y genera menos metano que el inóculo entre los días 2 al 20. A una concentración de sustrato de 1.25 g_{SV}/L, el digestato de la fermentación con lodos UASB más autóctonos, produjo 698 NL/kg_{SV}, a la igual que los otros sustratos la producción específica descende, al aumentar la concentración de sustrato a una concentración de 10 g_{SV}/L se alcanza un producción específica de 180 NL/kg_{SV}.

Utilizando el modelo de Gompertz modificado, la Figura 5-10 compara los valores calculados con los experimentales. Los coeficientes de correlación están entre 0.98 y 0.99 (tabla 5-10). Comparando P_{max} con los valores experimentales, el modelo sobreestima entre 0.5 a 14%, este porcentaje se reduce cuando se opera a concentraciones bajas de sustrato que presentaron una sola etapa de metanización, en cambio al aumentar la concentración presentan un comportamiento diaúxico (más de una fase de metanización) lo que interfiere en la exactitud del modelo. Solo para la producción de metano a partir del digestato producido con lodos USAB más autóctonos, el modelo sobreestima entre un 37 a 49% esto corresponde a los valores para las dos concentraciones de sustrato más altas. Similar es el comportamiento de FORSU cruda sin fermentar en la concentración más alta, donde la sobreestimación es del 41%. Estos resultados indican que los ajustes realizados por el modelo de

Gompertz modificado se ajustan mejor a las concentraciones más bajas de sustrato, independientemente del caso.

El modelo de Gompertz es una función sigmoidea, y se ajusta mejor cuando la digestión anaeróbica consta de un solo paso o etapa de generación de metano. En las concentraciones más altas de 5 y 10 g_{SV}/L, la figura 5-10 muestra que las curvas ajustadas no pasan cerca de todos los datos experimentales y tiende a mostrar los datos como una línea recta. Lo que lleva al modelo a sobre estimar los valores de P_{max}, pero también puede indicar que para estas concentraciones el tiempo de metanización no fue suficiente para degradar a la totalidad del sustrato.

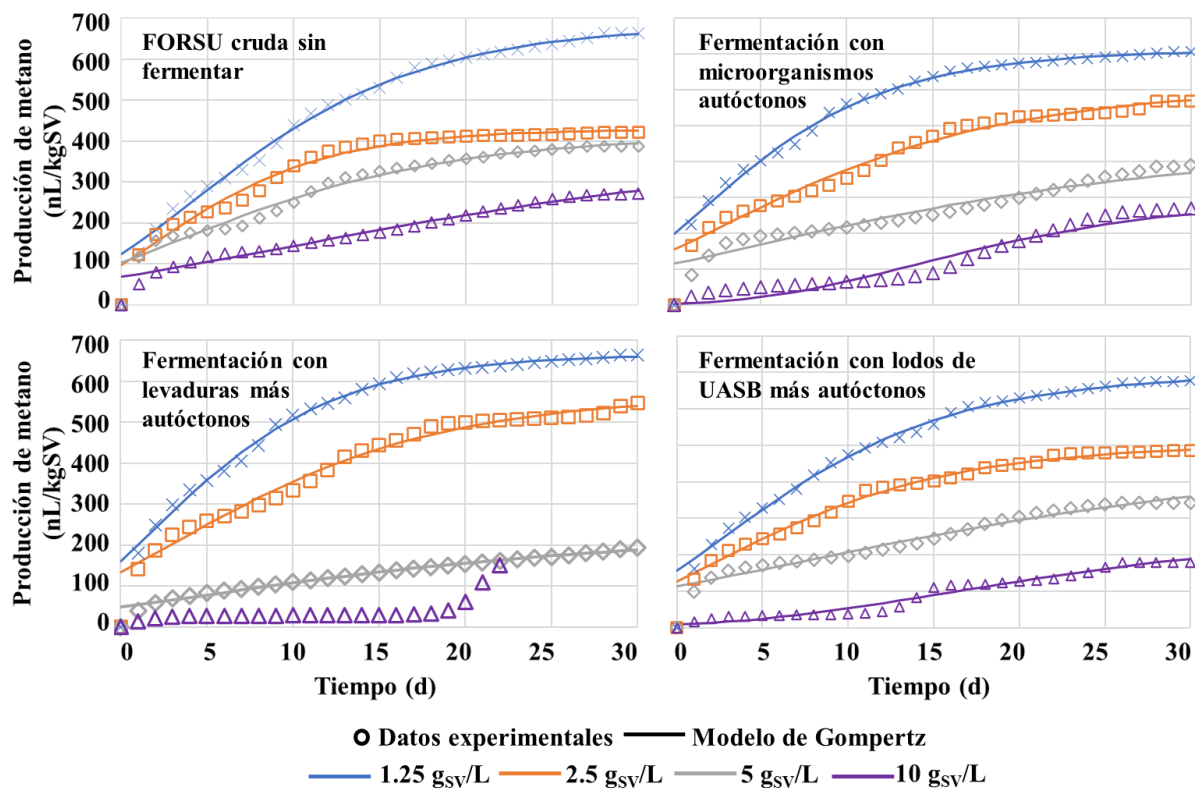


Figura 5-10. Ajuste del modelo Gompertz a los datos experimentales de metanización de digestatos fermentados con diferentes inóculos

El comportamiento de la tasa de producción de metano (R_{max}) disminuye al aumentar la concentración de sustrato (Tabla 5-10). Las curvas de la Figura 5-10 muestran que la producción de metano durante los primeros días es más rápida a medida que disminuye la concentración inicial de sustrato en los reactores metanogénicos. Solo para el digestato producto de la fermentación con levaduras + autóctonos para la concentración más alta origina que la producción de metano se pare completamente. Se puede concluir que los tres de digestatos fermentados con microorganismos autóctonos, levaduras y lodos de UASB producen metano más rápido que el FORSU sin fermentar a concentraciones iniciales de sustrato más bajas, esto se puede deber al alto contenido de metabolitos que contiene los digestatos en su fracción líquida, producto de la hidrólisis y fermentación que ocurrió en la reactor fermentativo, este material orgánico de fácil degradación biológica que serían los primeros en utilizarse en la metanización acelerando la generación de metano en los primeros días de la prueba.

Tabla 5-10 producción específica de metano y parametros de modelos de Gompertz

Fermentación con	Concentración de sustrato (g _{sv} /L)	PEM (NL/kg _{sv})	Valores obtenidos por Gompertz			
			Pmax (NL/kg _{sv})	Rmax (NL/kg _{sv} ·d)	λ (d)	R ²
Microorganismos autóctonos	1.25	707	710,4	114,4	-4,7	0,9980
	2.5	569	604,2	64,0	-6,5	0,9937
	5	389	441,6	29,4	-10,5	0,9846
	10	270	301,5	33,0	4,8	0,9802
Levaduras + autóct.	1.25	664	667,0	110,1	-3,9	0,9980
	2.5	547	567,5	64,1	-5,6	0,9939
	5	195	223,2	16,1	-8,2	0,9951
	10	157	NA	NA	NA	NA
Lodos de UASB + autóct.	1.25	677	696,7	92,5	-4,5	0,9982
	2.5	486	503,2	64,1	-5,4	0,9964
	5	344	471,1	26,3	-11,5	0,9890
	10	180	268,2	20,7	3,2	0,9812
FORSU cruda sin fermentar	1.25	663	684,6	89,5	-3,5	0,9981
	2.5	422	428,5	76,7	-3,4	0,9920
	5	387	417,2	45,3	-6,1	0,9922
	10	271	383,5	21,5	-8,1	0,9933

PEM: producción específica de metano, autóct: microorganismos autóctonos.

El tiempo de latencia es fundamental para la evaluación del proceso de digestión anaeróbica. Refleja el tiempo que requieren los microorganismos para adaptarse a las nuevas condiciones, incluido el nuevo sustrato. La tabla 5-10 muestra que todos los valores de λ tienen un valor negativo, a excepción de los experimentos con una concentración de sustrato de 10 g_{sv}/L para el digestato fermentado con microorganismos autóctonos y con lodos de UASB, lo anterior indica que los microorganismos comenzaron a producir metano inmediatamente después de ponerse en contacto con el sustrato. Según Chu y Barnes (2016), los valores negativos corresponden a un inóculo bien adaptado y un sustrato fácilmente biodegradable. Los valores positivos en los casos de fermentación con autóctonos, lodos de UASB y levaduras (aunque en la tabla no se presenta el tiempo de latencia correspondiente a levaduras, puesto que no se pudo calcular de la figura 5-10, se observa que levaduras más autóctonos presentan un tiempo de latencia cercano a 17 días) con lo que se puede concluir que los tres digestatos fermentados al contener un alto contenido de metabolitos y altas concentraciones iniciales de estos sustratos en la metanización pueden generar una inhibición por exceso de sustrato lo que puede generar rutas metabólicas que no benefician a la metanización (esto se ampliara en la siguiente sección), solo la FORSU cruda sin fermentar presentó un tiempo de latencia negativo; su bajo contenido de metabolitos al inicio de la metanización no provocarían una inhibición.

5.4.4. Metabolitos remanentes después de la metanización

Tras la metanización de los diferentes digestatos fermentados, se realizó una cuantificación de los metabolitos remanentes después de la metanización a los 30 días del ensayo. La figura 5-11 muestra las concentraciones relativas, como DQO, frente a las concentraciones iniciales de sustrato, como SV. Se identificaron metanol, etanol y los ácidos acético, propiónico, butírico e isobutírico, metabolitos como ácido valérico, hexanóico, heptanóico, láctico y metanol, aunque se cuantificaron, no se observó presencia de estos después de 30 días de metanización.

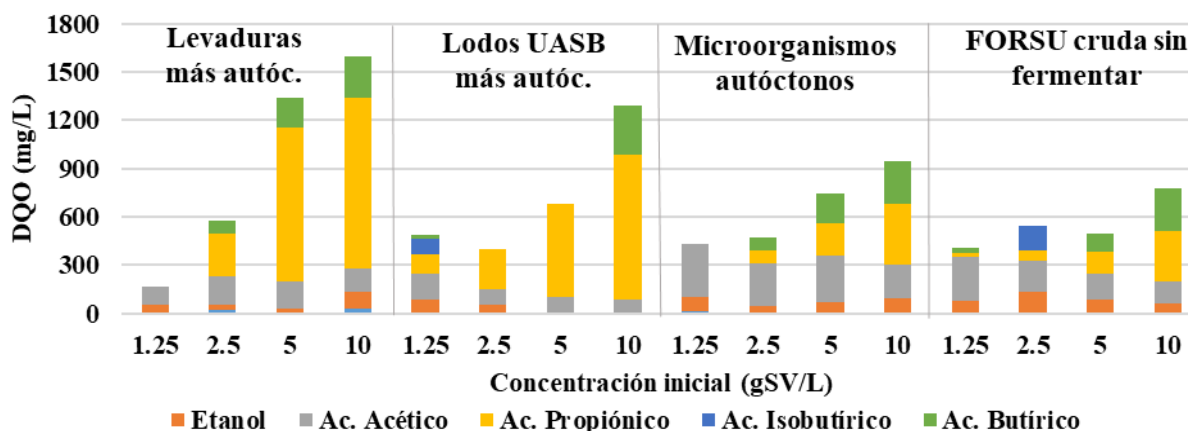


Figura 5-11. Metabolitos remanentes después de la metanización.

La FORSU cruda se sometió a metanización para tener una referencia. La producción de ácido acético disminuye inversamente con la concentración de sustrato, y la producción de ácidos propiónico y butírico aumentó con la concentración de sustrato. El etanol se mantuvo relativamente bajo independientemente de la concentración inicial de sustrato. El digestato de la fermentación con microorganismos autóctonos produjo las concentraciones más altas de ácido acético. La producción de ácido acético fue inversamente proporcional a la concentración inicial de sustrato y los ácidos propiónico y butírico aumentaron con el aumento de la concentración de sustrato, con producciones similares a la FORSU cruda sin fermentar.

Para el digestato generado por levaduras más autóctonos se observaron bajas concentración finales de ácido acético y etanol, el ácido butírico a partir de la concentración de 2.5 g_{SV}/L aparece y aumenta de manera proporcional con la concentración de sustrato, el ácido propiónico empieza aparecer a partir de 1.25 g_{SV}/L con una concentración de 264 mg_{DQO}/L pero al aumentar la concentración la formación de propiónico aumenta a 958 mg_{DQO}/L, esto permite entender porque la disminución de la generación de metano (figura 5-8) y en la producción específica puntual (figura 5-10). En la etapa experimental con metabolitos puros se observa que la acetogénesis es la etapa limitante de la metanización de ácido propiónico y a concentraciones superiores a 300 mg_{DQO}/L de propiónico ya se presentaban inhibiciones y se determinó que bajo condiciones anaerobias el ácido láctico tiende a formación de ácido propiónico y esta aumenta al aumentar la concentración inicial de este metabolito. Según Sheng et al 2018 en su estudio de metanización en dos etapas, afirma que, si en la primera etapa se genera una alta concentración de metabolitos y no se adecua la carga orgánica del reactor de metanización para recibir altas concentraciones de AGV y alcoholes, se pueden presentar inhibiciones por sustrato o acidificación del reactor.

Para el caso del digestato fermentado con lodos de UASB más autóctonos, se observó que el ácido propiónico tiene un aumento proporcional a la concentración inicial de sustrato, pero al igual que el digestato fermentado con levaduras las concentraciones de propiónico comparadas con las fermentaciones con microorganismos autóctonos y FORSU cruda sin fermentar son más altas, el ácido butírico solo se presentó a una concentración de 10 g_{SV}/L, el etanol se presentó a las concentraciones más bajas.

La figura 5-11 muestra que al final de la metanización, la concentración de ácido propiónico aumentó drásticamente con la concentración de sustrato, y las mayores concentraciones se presentan en 5–10g_{SV}/L para levaduras más autóctonos y a 10 g_{SV}/L para lodos de UASB, que de las figuras 5-8 y 5-10, claramente sus curvas tienen producciones inferiores al inóculo y a partir de la modelación de Gompertz se presentan bajas producciones y tiempos de latencia positivos. Con lo anterior se puede

afirmar que se presentó en los reactores a las concentraciones más altas una inhibición por exceso de sustrato que condujo a una acumulación de propiónico. En algunos trabajos observaron que al trabajar reactores de metanización de residuos sólidos en continuo o discontinuo con altas cargas orgánicas o concentración de sustrato altas, estos presentaban una disminución en la producción específica de metano y al evaluar los metabolitos generados aumentaba de manera significativa la generación de ácido propiónico en el sistema (Han et al., 2020; Shen et al., 2013b; Wainaina et al., 2019; Wang et al., 2009; Yu et al., 2018a). Además, a partir de la metanización del ácido láctico (puro) se sabe que la tendencia a transformarse en ácido propiónico bajo condiciones anaerobias aumenta al aumentar su concentración inicial, que es lo que sucedió en esta fase experimental, ya que en la fermentación bajo los dos inóculos y sin inóculo se presentó un dominio en la generación de ácido láctico el cual, en los reactores de metanización y bajo las altas concentraciones de iniciales de sustrato, siguió su ruta hacia la generación de ácido propiónico, que se acumula, afectando principalmente a las hidrogenotróficas (Fernández-Domínguez et al., 2020; Han et al., 2020; Lata et al., 2002), lo que tiene como consecuencia, frenar la acetogénesis y por ende produce una acumulación de metabolitos (AGV, etanol y ácido láctico) llevando a una acidificación del sistema.

La acidificación de los reactores se corrobora al analizar el pH final de los reactores de metanización después de 30 días, ver figura 5-12, se observa que a las concentraciones de levaduras 5 y 10 g_{SV}/l y para lodos de UASB a 10 g_{SV}/L en donde se presentó la mayor acumulación de metabolitos principalmente propiónico y butírico presentan pH finales inferiores a 6.5, en donde ya los sistemas metanogénicos pueden presentar inhibiciones parcial o completas (Harikishan, 2008; Mata-Alvarez, 2002; Tyagi et al., 2018). Para el resto de las concentraciones de sustrato se observa que los pH finales están muy cercanos al neutro, pH que se obtuvo por agregar la solución buffer, pero observa una tendencia en donde si se aumenta la concentración del sustrato en la etapa de metanización el pH final tiende a disminuir.

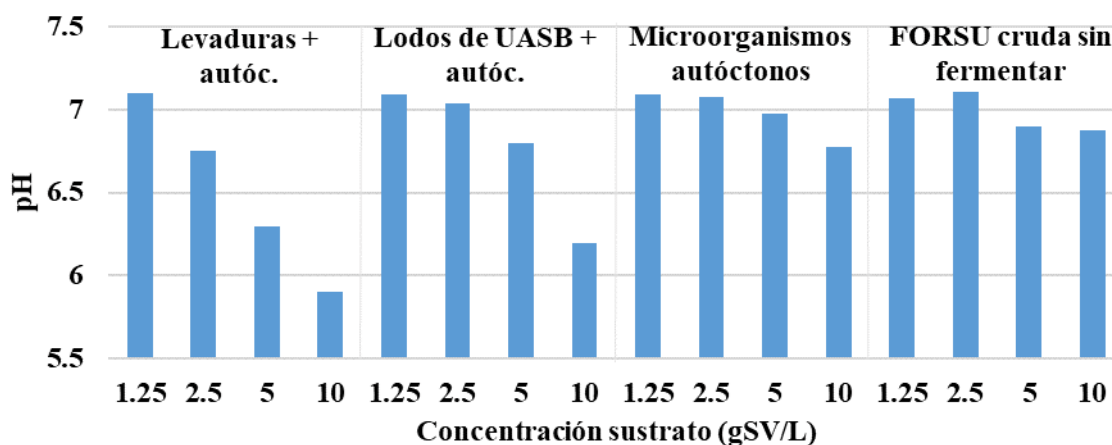


Figura 5-12 pH final después de la metanización de digestatos fermentados con diferentes inóculos

5.5. Fermentación de FORSU con control de pH y tiempo de fermentación

En esta sección se presentan los resultados de la etapa 3 de la metodología, que corresponde a la evaluación en la selectividad en un reactor fermentativo con control del pH y tiempo de fermentación, para esto se trabajó con 3 pH que fueron 6, 5 y 4 y con 3 tiempos de fermentación que fueron 1, 3 y 6 días de fermentación. Se determinó el efecto de la separación de la fracción líquida y sólida del digestato fermentado en la etapa de metanización. Además, se realizó un balance de masa para determinar la producción específica del proceso.

5.5.1. Composición de las fracciones sólida y líquida de los digestatos fermentados

En la figura 5-13 se presenta la composición de los diferentes digestatos (antes de la centrifugación) a partir de DQO, sólidos totales y volátiles, se observa que tanto la DQO, sólidos totales y volátiles presentan un comportamiento descendiente en la medida que aumenta el tiempo de fermentación (TF). En términos de DQO se observa disminución a pH 6 y 4 y no se presentaron cambios importantes a pH 5, según De Clercq et al., (2016) y Lecker et al., (2017) afirma que aunque DQO puede brindar mucha información en sistemas que presentan biomazas heterogéneas puede ocurrir que no se observen diferencias significativas por lo que recomienda evaluar a la par el comportamiento de sólidos. En el caso de los sólidos volátiles para pH 6 la mayor remoción se presenta en el tiempo de fermentación de un día, para pH 5 la mayor remoción se presentó al TF de 3 días y para pH 4 la remoción es paulatina. Las pérdidas que se presentan se deben principalmente a la generación de biogás, producto de la fermentación y principalmente a dióxido de carbono, producto principal de la fermentación. Con lo anterior se observa que en los diferentes pH si se presentó una hidrólisis del sustrato en términos de sólidos volátiles, el efecto de pH y tiempo de fermentación sobre la hidrólisis se analizará en la siguiente sección.

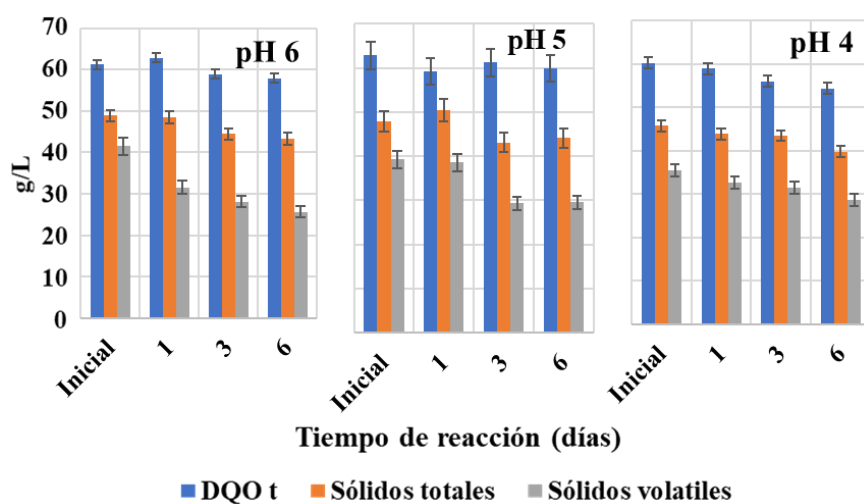


Figura 5-13. Composición de diferentes digestatos generados a pH 6, 5 y 4 y tiempo de fermentación de 1, 3 y 6 días

5.5.1.1. Composiciones de las fracciones sólidas

En la tabla 5-11 se presenta la composición en términos de DQO, sólidos totales y volátiles de las fracciones sólidas de los digestatos generados para cada pH y tiempo de fermentación (TF). En términos de la DQO a pH 6 y TF 6 se logró la menor remoción con un 24%, en cambio a pH 5 y 4 se logró una remoción de 30 y 34 %, respectivamente. Respecto al comportamiento de los sólidos totales y volátiles se observa que, a cualquier pH, en la medida que se aumenta el TF, estos disminuyen. La remoción de sólidos volátiles se puede considerar como un indicativo de la remoción de materia orgánica que fue para el pH 6 de 24%, pH 5 de 28% y para pH 4 de 21%. Aunque se presentó remoción de sólidos totales producto de la degradación de los sólidos volátiles no se observa una tendencia marcada en la relación SV/ST al operar con diferentes pH pero sí se observa que al aumentar tiempo de fermentación existe una ligera tendencia a disminuir la relación de SV/ST. Hafid et al., (2016); Yan et al., (2011b) y Zhang et al., (2005a) trabajaron con residuos de verduras, frutas y de cocina para la generación de etanol y AGV, a unas concentraciones entre 5-8% de SV en reactores fermentativos y evaluaron el pH como variable principal, en el rango de pH de 5.5-6.5 se encuentra la remoción más alta de sólidos totales. Aunque Hafid et al., (2016) afirma que a pH cercanos a 4 en los 8 días que duró la fermentación presentó una remoción de sólidos volátiles baja, en comparación

a pH superiores, si solo se compara los dos primeros días de fermentación en este trabajo, pH 4 presenta remoción alta.

Tabla 5-11. DQO, sólidos volátiles y totales de la fracción sólida de los digestatos generados y tasas de hidrólisis

Fermentación		DQO	ST	SV	SV/ST	Tasa de hidrólisis	
pH	TF	g/kg	g/kg	g/kg		g _{DQO} /kgDQO·d	g _{DQO} /kgST·d
6	Inicial	236	161	134	0.83	NA	NA
	1	211	137	113	0.83	103	151
	3	184	135	103	0.76	64	98
	6	178	128	102	0.80	11	16
5	Inicial	246	163	144	0.88	NA	NA
	1	200	142	122	0.86	188	283
	3	172	127	113	0.89	69	97
	6	155	134	103	0.77	33	44
4	Inicial	229	165	145	0.88	NA	NA
	1	189	148	125	0.85	173	240
	3	164	144	118	0.82	68	87
	6	151	134	115	0.86	25	29

Al evaluar las tasas de hidrólisis de la tabla 5-11, se observa que, al aumentar el tiempo de fermentación, disminuye la tasa de hidrólisis para todos los pH de fermentación, esto se debe a que al inicio el sistema contiene una alta cantidad de materia orgánica de fácil hidrólisis y en la medida que aumenta el tiempo de fermentación en el sistema solo queda material más complejo y su hidrólisis es más difícil o necesita más tiempo (Mata-Alvarez, 2002). Se observa que las tasas de hidrólisis más altas se presentaron a pH 5, seguido de 4 y la más bajas a pH 6. Aunque no se tiene un consenso sobre el efecto pH en la hidrólisis, se sabe que al disminuir el pH a valores de 4, los sistemas enzimáticos tienden a disminuir su cinética o los microorganismos para la producción de exoenzimas (Gameiro et al., 2016; Kandyliis et al., 2016), pero otras investigaciones señalan que al trabajar en fermentación con control de pH por debajo de 5.5 se presenta un ataque ácido al material orgánico por parte de protones liberados en el medio acuoso, por lo que se presentan tasas de hidrólisis altas, y se recomienda trabajar en el rango de 5-5.5 para tener el efecto enzimático y un ataque ácido en el sistema (Cheng y Brewer, 2021; Naik et al., 2021; Zhou et al., 2021).

En la figura 5-14 se presenta el comportamiento de carbohidratos, grasas y nitrógeno Kjeldahl en las fracciones sólidas de los digestatos fermentados. En el caso de los carbohidratos la mayor remoción se presentó a pH 4 con un 68%, para pH 5 y 6 fue de 53% y 54%. En términos de grasa y aceites a pH 6 y un TF de 1 día se logró 17%, a un TF de 3 días aumentó a 62% y en TF 6 aumentó a 68%, para pH 5 se logra un 16% de remoción, este aumenta a 45% con TF 3 y con TF 6 se logró 65% de remoción de grasas y aceites, y con pH 4 se logra a TF 1 día un 42% hasta lograr un 58% con TF de 6 días. Con lo anterior es posible afirmar que a pH de 6 y 5 se logran mayores remociones en la fermentación al llegar a un tiempo de fermentación de 6 días, pero la degradación de grasas y aceites empieza a partir de un TF de 3 días, en cambio a pH 4 se logra una menor remoción al día 6 pero esta empieza desde un TF de un día. La remoción de proteínas (nitrógeno Kjeldahl) para todos los pH presentó un comportamiento similar en donde no hay un consumo importante, pero para todos los pH se alcanza una remoción entre 15-20% cuando se llega un TF de 6 días.

Investigaciones sugieren que la trabajar a pH en el rango de 4-5.5 se aumenta la solubilidad de carbohidratos, debido a que el medio ácido aumenta la solubilidad y permite un ataque ácido a los

carbohidratos más complejos (Cheng y Brewer, 2021; Naik et al., 2021; Sawatdeenarunat et al., 2015). Además, en trabajos sobre fermentaciones a partir de biomásas principalmente de residuos de comida, FORSU, vegetales y frutas, los cuales se componen de los tres grupos de macromoléculas (carbohidratos, proteínas y lípidos), afirman que el primer grupo a degradar y en mayor proporción son los carbohidratos, logrando porcentajes entre un 60-90%, luego le siguen la grasas y aceites donde se pueden lograr remociones de entre 45-70% de la grasas presentes en los residuos pero en términos de proteínas son el último sustrato a utilizar pues es principalmente utilizado para formación de nuevos microorganismos es decir, procesos anabólicos (Alibardi y Cossu, 2016; Bouallagui et al., 2004; Cheng y Brewer, 2021; Ganesh et al., 2014; Rajeshwari et al., 2001)

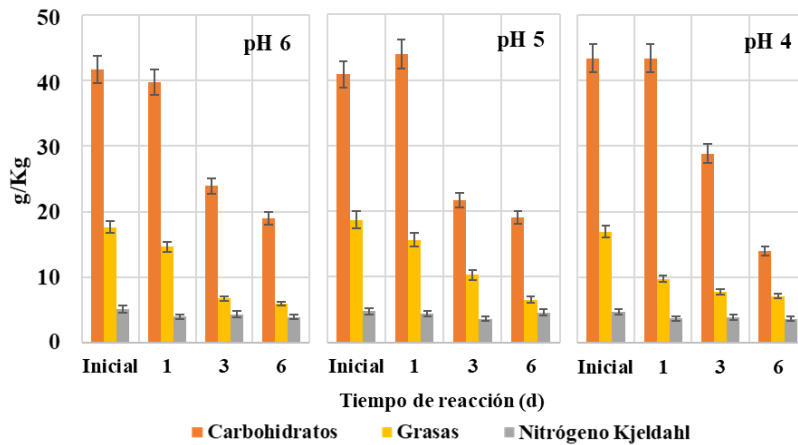


Figura 5-14. Comportamiento de carbohidratos, grasas y nitrógeno Kjeldahl en la fracción sólida de los diferentes digestatos fermentados a diferentes pH y tiempo de fermentación.

En la figura 5-15 se presenta la distribución de la DQO, carbohidratos y sólidos volátiles entre la fracción sólida y líquida de los diferentes digestatos que obtuvieron para pH 6, 5 y 4 y los tiempos de fermentación de 1, 3 y 6 días, el marcador representa el valor total del reactor y la barras la distribución como fracción. Al analizar DQO se observa que, para todo pH, la g_{DQO}/kg_{SV} se mantuvo relativamente constante en 1600-1850 g/kg_{SV} y no se presentan cambios significativos al variar el tiempo de fermentación. Como se mencionó con anterioridad, al aumentar el tiempo de fermentación se presentó remoción tanto de DQO como de SV, pero a partir de la gráfica 5-15 observamos esta remoción debió ser proporcional puesto que el digestato producto de la fermentación siempre mantuvo constante su concentración g_{DQO}/kg_{SV} . Si analizamos la distribución de la DQO observamos que, aunque no existen variaciones importantes en la DQO, sí se presentan cambios en distribución de la DQO entre la fracción sólida y líquida, al inicio para cualquier pH se observa que DQO está un 70-78% en la fracción sólida pero al aumentar el tiempo de fermentación la DQO se traslada de la fracción sólida a la líquida producto de hidrólisis, los mayores cambios se presenta a un TF de un día, como se observó en la tabla 5-11 es donde se presentaron las tasas de hidrólisis más altas. Para tiempo de fermentación de 6 días la fracción líquida representaba entre 41-47% de DQO del sistema.

El comportamiento de los carbohidratos en el reactor de fermentación presentó, en la medida que aumentaba el tiempo de fermentación, un descenso de la concentración de carbohidratos por kg de sólidos volátiles. En general no se observan diferencia entre fermentar a pH 6, 5 o 4, al finalizar llegan a una concentración cercana a los 115-130 g de carbohidratos/ kg_{SV} , pero a pH 5 con TF de 3 días se llega al máximo consumo debido a que al aumentar a un tiempo de fermentación de 6 días no hay un cambio significativo en la concentración de carbohidratos en el sistema. La remoción de carbohidratos en el sistema se debe a la fermentación que transforma los carbohidratos en productos (metanol, etanol, ácido acético, ácido láctico etc.). Al analizar la distribución de los carbohidratos se observa que al inicio alrededor de un 48-55% de los carbohidratos se encuentra en la fracción líquida,

esto es similar a los resultados de las investigaciones de Alibardi y Cossu, (2016); Castellón-Zelaya y González-Martínez, (2021); Edwiges et al., (2020) y Li et al., (2017) donde determinan que entre 40-60 % de carbohidratos son solubles en agua para biomazas como residuos de comida, vegetales, frutas o FORSU, para un tiempo de fermentación de un día se observa el mayor consumo de carbohidratos de la fracción líquida, siendo pH 5 donde se logra una remoción de 80% de los carbohidratos presentes en la fracción líquida. Existen dos casos similares que son el paso de TF 1 a TF 3 a un pH de 5 y el paso de TF 3 a TF 6 a un pH de 4, en estos dos casos observamos un aumento en la distribución de carbohidratos en la fracción líquida, este tipo de comportamiento en la distribución de carbohidratos representa que en estos periodos de tiempo primaron los procesos hidrolíticos y se presentó una disminución en la fermentación (Balat, 2011; Ballesteros et al., 2010; Taghizadeh-Alisaraei et al., 2019; Yan et al., 2011b).

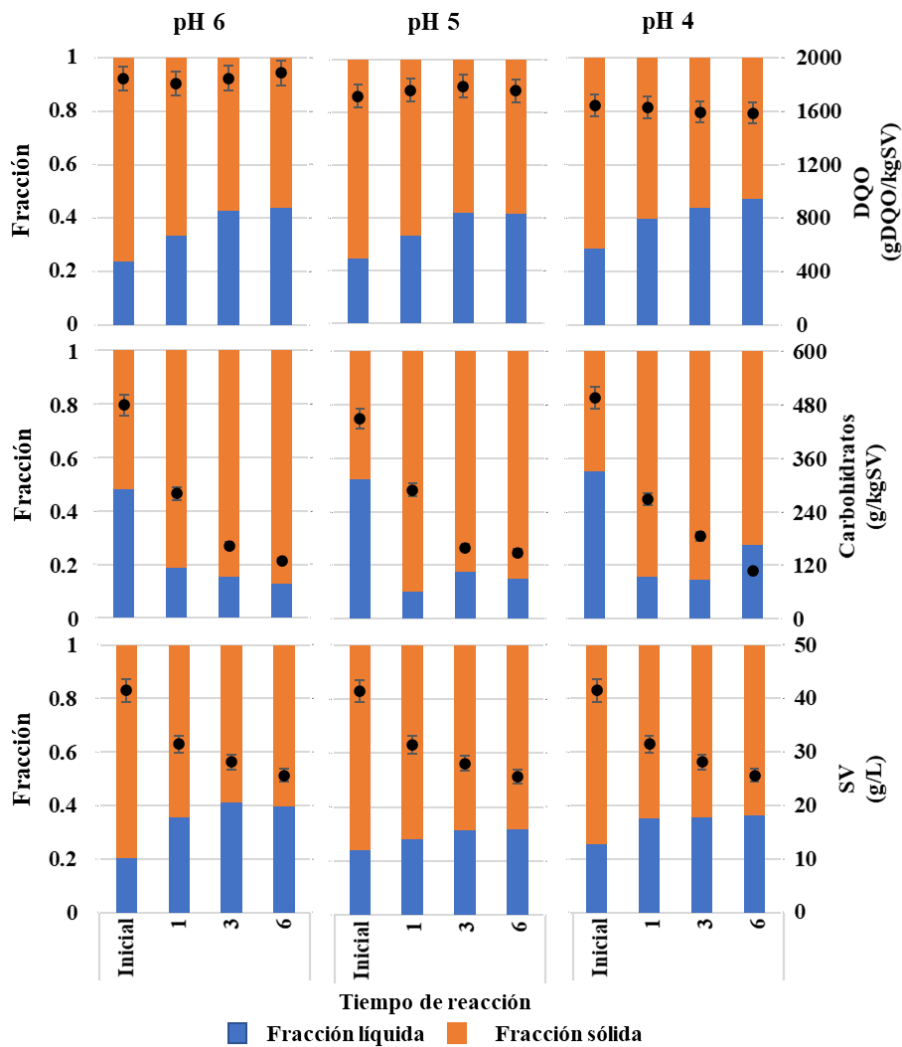


Figura 5-15 Distribución de DQO, carbohidratos y solidos volátiles (SV) en la fracción sólida y líquida de los digestatos generados.

En los sólidos volátiles se observa que la remoción del contenido de sólidos volátiles en el sistema en función del tiempo de fermentación no presenta diferencias importantes y al igual que en los carbohidratos la mayor remoción se presenta a un tiempo de fermentación de un día, en términos de la distribución se observa un comportamiento ascendente sobre el contenido de sólidos volátiles en la fracción líquida al aumentar el tiempo de fermentación similar a de la DQO casi llegando a un

comportamiento asintótico a un tiempo de fermentación de 6 días. A pH 6 se alcanza un 40% de sólidos volátiles en la fracción líquida a un tiempo de 3 días, en cambio a pH 4 y un tiempo de fermentación de un día se logra un 37% de los SV en la fracción líquida, pero a un TF de 6 días solo se logra alcanzar un 38%. En general y tomando en cuenta las tres distribuciones se puede afirmar que, con solo 3 días, independientemente del pH, se logra la mayor transferencia de DQO, carbohidratos y sólidos volátiles desde la fracción sólida hacia la fracción líquida producto de la hidrólisis.

5.5.1.2. Composición de las fracciones líquidas

En la tabla 5-12 se presenta la composición en términos de DQO, DQO filtrada (DQOf, se filtró con una membrana de poro 0.45 μ), DQO particulada (resta entre DQO y DQOf), carbohidratos, sólidos totales y sólidos volátiles de la fracción líquida de los digestatos generados para cada pH y tiempo de fermentación. La fracción líquida inicial representa a la mezcla inicial al 4% de FORSU y agua, con un tiempo de contacto y agitación de 5 min, y luego se procede a centrifugar. En general para cada pH se observa que la DQO y DQOf en el sistema logra un punto de máxima y después empieza a disminuir, para todos los pH esto se logra a TF de 3 días. La centrifugación realiza una muy buena separación de la fracción sólida de la líquida porque entre 80-97% de DQO de la fracción líquida es filtrada lo que nos indica que en la fracción líquida solo una pequeña cantidad de materia orgánica es particulada y necesitaría de un proceso de hidrólisis previo. El comportamiento es similar al de la DQO, pero a diferencia de la fracción sólida si se presenta una tendencia con la relación de SV/ST en donde disminuye al aumentar el tiempo de reacción en la fermentación.

La fermentación inicia con un alto consumo de carbohidratos prácticamente para un TF de un día los carbohidratos en la fase líquida se han consumido en un 95% aproximadamente, si se contrasta con la figura 5-14, las fracciones sólidas en términos de carbohidratos no presentan cambios para TF de un día. Lo que indica que en el reactor de fermentación independientemente del pH al día 1 solo se consumen los carbohidratos presentes en la fracción líquida mientras se realiza un ataque hidrolítico a la fracción sólida y este ataque se ve reflejado después de un TF de 3 días, donde se presenta el mayor cambio en la composición de carbohidratos de la fracción sólida.

Tabla 5-12. DQO, sólidos volátiles y totales de la fracción líquida de los digestatos generados

Fermentación	DQO	DQOf	DQO p	Carbohidratos	ST	SV	SV/ST	
pH	TF	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L		
6	Inicial	23	20	3	12.0	14	11	0.74
	1	24	23	1	2.1	25	14	0.58
	3	28	27	1	0.9	24	15	0.61
	6	27	24	2	0.5	24	13	0.54
5	Inicial	21	19	2	11.7	14	12	0.87
	1	29	27	2	1.4	21	14	0.64
	3	28	27	1	1.1	23	12	0.52
	6	28	25	3	0.8	20	12	0.59
4	Inicial	21	19	2	12.3	15	11	0.77
	1	27	19	7	1.8	23	14	0.63
	3	28	27	1	1.1	23	14	0.61
	6	27	26	1	1.1	20	13	0.67

La relación entre los carbohidratos y la DQOf (g carbohidratos/gDQOf) independientemente de pH al inicio de la fermentación es de 0.62 ± 0.02 , que es valor medio alto ya que el rango puede estar entre 0.4-0.75 para otras biomásas lignocelulósicas (Dahiya et al., 2018; Hassan et al., 2018; Moncada B

et al., 2016), de la tabla se observa como esta relación disminuye hasta valores 0.05 ± 0.01 lo que indica que, sin importar el pH, se presentó una importante fermentación de carbohidratos; sobre los productos de la fermentación se analizarán en la siguiente sección.

5.5.2. Generación de metabolitos en la fermentación con control de pH (6, 5 y 4) y tiempo de fermentación (1, 3 y 6 días)

En la figura 5-16 se presenta la generación de metabolitos para cada pH y tiempo de fermentación (FT), además se presentan la DQO filtrada (DQOf) de la fracción líquida y el grado de fermentación como porcentaje, el grado de fermentación es una relación la DQO de metabolitos sobre DQOf. La DQO inicial es similar para cada tratamiento de pH se puede afirmar que el sustrato fue similar para todos los experimentos, en general el comportamiento de DQOf se llega a un máximo y luego empieza a disminuir, para pH 6 y 4 se logra a un TF de 3 días y para pH 5 se logra a TF 1.

La fermentación de FORSU a pH 6 presentó una alta formación de acético a TF de 1 día y va disminuyendo al aumentar TF, se presentó una gran generación de butírico a TF de 3 días y disminuye en TF de 6 días, pero al mismo tiempo se observa que aumenta la concentración de acético, esto se puede deber a los procesos de acetogénesis del butírico. El etanol se generó a TF 1 y disminuye al aumentar el tiempo de fermentación. El ácido láctico no presentó una alta generación. Como se observa, la suma de metabolitos es similar a la DQOf lo que implica que en su totalidad son metabolitos, esto se ve reflejado en el grado de fermentación que desde un TF de 1 día logró 95% y para TF mayores es casi del 100%. C. Wu et al., (2015) trabajó con residuos de comida y evaluó que pasa con la selectividad en la fermentación al pasar un reactor semicontinuo de pH 5 a pH 7, a pH 5 la selectividad es acética con trazas de propiónico y butírico, al cambiar de pH a 6 se presenta un pico de butírico alcanzando un 60% del total de metabolitos, el resto es principalmente acético y al pasar a pH 7 siguen dominando el acético y butírico pero un 15% es de ácido propiónico, para esta investigación no se tomó en cuenta el láctico ni el etanol. Wu et al., (2017) fermentó residuos de comida a pH 6 por 24 días en un reactor batch, el etanol se generó en el primer día y desaparece al día 5, cuando disminuye el butírico aumenta el acético pero la proporción durante la fermentación es más equitativa para los dos metabolitos que está entre 40-45%, el resto se lo reparten ácido propiónico y valérico.

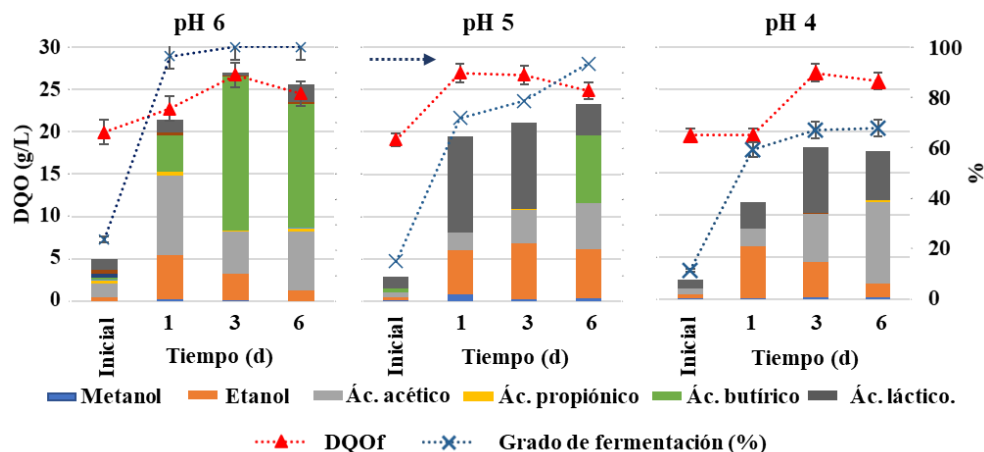


Figura 5-16. Generación de metabolitos, DQO filtrada (DQOf) y grado de fermentación (%).

La fermentación de FORSU a pH 5 fue selectiva a acético, etanol y láctico. La mayor generación de ácido láctico se presentó a TF 1 y al aumentar el TF, la concentración va disminuyendo en la medida que aumenta acético y butírico, el ácido láctico puede transformarse a butírico y acético. La mayor

generación de etanol se consigue a TF de 1 día, la máxima concentración a TF 3, pero a diferencia de pH 6, no se observó una disminución con el tiempo de fermentación, por lo cual los procesos acetogénicos de etanol son mínimos a pH 5. El acético se generó mucho menos en comparación a pH 6. El grado de fermentación aumenta al aumentar el TF, logrando a TF de 6 días un grado de fermentación de 97%.

La fermentación de FORSU a pH 4 fue selectiva a acético, etanol y láctico, se observa que el láctico presentó un comportamiento similar al de pH 5, la concentración disminuye con el tiempo de fermentación, pero es más pronunciado el cambio. En el caso de etanol se generó la mayor cantidad en TF de 1 día, debido a los procesos acetogénicos que están degradando el etanol a tiempos de fermentación mayores. El etanol en TF de 1 día presentó en la misma concentración que pH 5 y TF de un 1 día, pero los procesos acetogénicos sobre el etanol se observan desde TF 3 con una disminución del 30%. El ácido acético al día 1 presentó una baja concentración, pero aumenta con el TF, debido a la acetogénesis del etanol y ácido láctico. Además, a pH 4 se presentaron los grados de fermentación más bajos logrando a TF de 6 días, un 68% de fermentación de la DQO f, con lo anterior a pH 4 no solo se ven afectados los procesos hidrolíticos sino también los procesos fermentativos, al igual que en el experimento exploratorio que se trabajó a este mismo pH, tal vez se necesite de más tiempo para transformar en su totalidad la DQO f en metabolitos de interés.

M. Zheng et al., (2015) evalúan la fermentación de residuos de frutas y vegetales a pH 4, 5 y 6 por 48 horas a temperatura de 35°C, no determinan ácido láctico, concluyen que bajo un pH de 4 la fermentación en el 95% es etanol y el resto es acético, a pH 5 la fermentación arranca siendo etanólica, pero luego aumenta la generación de acético en la medida que se reduce el etanol y se presentan los ácidos propiónico y butírico. A pH 6 se presentó una fermentación etanólica y acética en las primeras 24 horas, pero después domina las fermentaciones butíricas sobre las acéticas y etanólicas. En este trabajo las fermentaciones butíricas a pH 6 se presentaron a un tiempo de 3 días de fermentación. Tang et al., (2017) evaluó en la fermentación el efecto de pH (4, 5 y 6) a condiciones mesofílicas de residuos de comida por 12 días, no evalúan etanol, concluyen que a pH 6 domina la fermentación butírica sobre a láctica, a pH 5 se presenta la mayor generación de láctico inicial pero a diferencia de este trabajo, logra mantenerse en el tiempo por 10 días con reducciones mínimas, a pH 4 la fermentación láctica no es tan rápida pero a partir del día 4 aumenta la generación de láctico logrando superar a la fermentaciones acéticas a partir del día 8. Concluyen que el pH adecuado para aumentar la generación de láctico es pH 5.

5.5.3. *Producción de metano de las fracciones líquida, sólida de los digestatos y del proceso*

En las figuras 5-17 y 5-18 se presenta la producción de metano de las fracción líquidas y sólidas de los digestatos fermentados. Para la fracción líquida se trabajó con volúmenes constantes que fueron de 25, 50, 100 y 150 ml de líquido y para la fracción sólida se trabajó con masas constantes que fueron de 4, 8, 16 y 24 g de masa húmeda después de la centrifugación. En general para la fracción líquida a las diferentes condiciones y con volúmenes iniciales de sustrato de 25 ml y 50 ml presentan una sola etapa de generación y el mismo comportamiento, pero difiere el volumen de metano generado al final de la prueba.

Para las fracciones líquidas a pH 6 a 100 y 150 ml de sustrato presentaron dos etapas de generación, la primera se genera en las primeras 24 horas, en el caso de TF 1, la segunda etapa se da de forma inmediata en el día 1 hasta el día 8 luego se estabiliza la producción. Para TF 3 y 6 presentan un comportamiento diaúxico, al igual que TF 1, la primera generación de metano se produce en 24 horas, luego se presentó una etapa de latencia con baja generación de metano en donde se están dando procesos acetogénicos y en el día 5 empieza la segunda etapa de generación y termina en el día 10. A

pH 6, como lo mencionamos anteriormente, se presentó selectividad a ácido butírico y el comportamiento en la producción de metano corresponde al estudio con metabolitos puros, el ácido butírico cuando se metaniza a concentraciones superiores de 0.9 g_{DQO}/L de ácido butírico presenta una etapa de acetogénesis y la metanización que comienza en el día 5 de iniciada la prueba. Para este experimento ya solo con adicionar 25 ml de la fracción líquida se alcanza una concentración de 0.9-1.1 g_{DQO}/L de butírico y en la figura 5-17 si se compara pH 6, TF 3 y TF 6 días con TF 1 se observa que a los volúmenes de sustrato más pequeño para TF 3 y TF 6 presentan generaciones más lentas producto de las altas concentraciones de ácido butírico en el sistema.

En las curvas de generación de metano para los digestatos fermentados a pH 5 y a los diferentes tiempos de fermentación, se observa que a TF 1 el sistema no logró estabilizarse para los volúmenes más altos, 14 días metanización no fueron suficientes para que en el reactor se estabilizara la generación de metano (lo logró a los 25 días de metanización), esto se debe a la alta concentración de ácido láctico inicial, más adelante se observara que bajo esta misma condición, al finalizar la metanización el metabolito predominante es el ácido propiónico, lo que ocasionó procesos inhibitorios en el sistema. Al disminuir la concentración de ácido láctico en la fermentación para tiempos de fermentación de 3 y 6 días (ver figura 5-17), observamos que en la prueba metanización si logran estabilizarse en los 14 días de la prueba, en los volúmenes más altos de sustrato no se observa un comportamiento diaúxico marcado, como se ve en la metanización de los digestatos fermentados a pH 6 (donde existe un periodo de baja generación de metano). Para la metanización del digestato fermentado a pH 5 y TF de 3 días se logró en la primera etapa de metanización (aproximadamente 36 h) el 57% de volumen generado en toda la prueba.

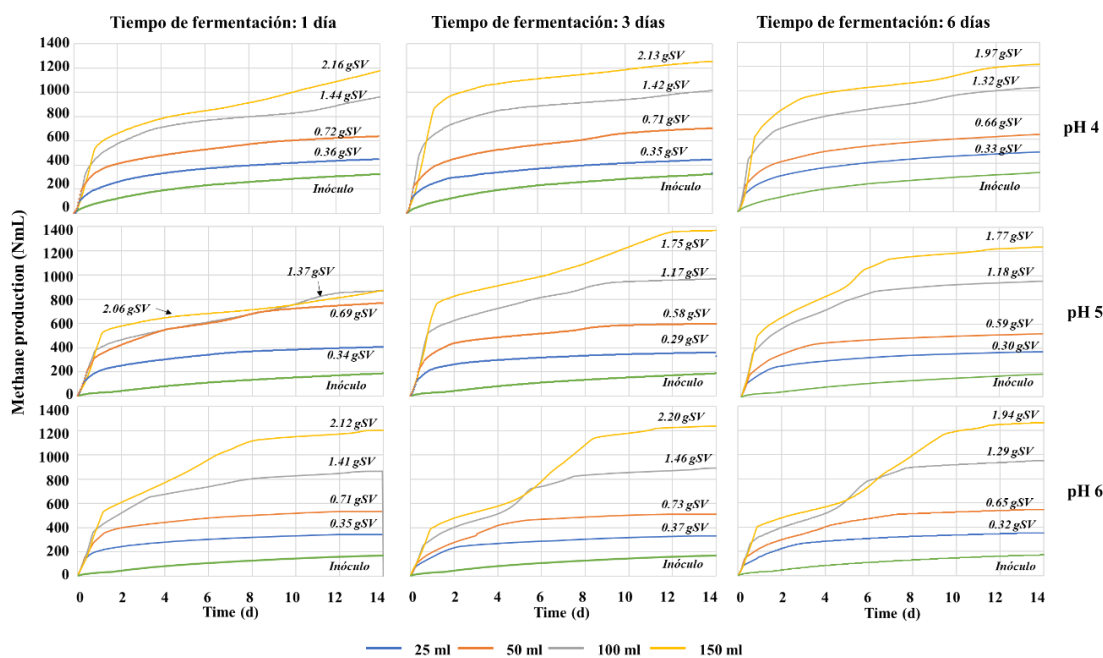


Figura 5-17. Producción de metano de la fracción líquida del digestato fermentado a pH 6, 5 y 4, y tiempos de fermentación de 1, 3 y 6 días.

Para la FORSU fermentada a pH 4, en general observamos que independiente al volumen inicial de sustrato, no se presenta un comportamiento diaúxico y en la primeras 36 horas (1.5 días) se genera una cantidad importante de metano (entre 75-85 % del total), solo para la FORSU a TF de 1 día, a los volúmenes más altos no se logró que la generación se estabilizara, la producción continuo hasta el día 25, al igual que en pH 5 bajo esta condición la concentración de ácido láctico inicial es alta, lo cual pudo provocar la acumulación de propiónico en el reactor de metanización.

Se observa en la figura 5-17 que al disminuir el pH de la fermentación en la metanización provoca que el comportamiento diaúxico vaya desapareciendo y se produzca más metano en la primera etapa. Begum et al., (2017); Kvesitadze et al., (2011) y Lavagnolo et al., (2018) trabajaron con FORSU en sistema fermentación-separación-metanización y evaluaron el efecto del pH en la fermentación en un rango de 5 hasta 11 unidades de pH, concluyen que el pH que mejor beneficia a la fermentación son los pH neutros debido a que presentaron la mayor conversión de DQO a productos o mayor producción de H₂ pero el pH en la fermentación que más beneficia a la metanización está en el rango de 5-5.5, en donde se observaron mayores tasas de generación de metano. Lo anterior es similar a lo presentado en este trabajo, si se observa la figura 5-16 el grado de fermentación disminuye al disminuir el pH, pero de la figura 5-17 observamos que al bajar el pH se genera una sola etapa de generación de metano con una producción alta de metano.

La metanización de las fracciones sólidas (figura 5-18) en general, al aumentar la masa de sustrato, aumenta el volumen generado de metano, a excepción de pH 4 (TF 1, 3 y 6) y pH 5 (TF 1 y TF 3) en donde a 24 g de sustrato, en los reactores no se logró estabilizar la producción de metano en el tiempo que duró la prueba, se observó que la curva presentó una pendiente positiva, lo que indica que 28 días no fueron suficientes para la estabilización de los reactores a esta condición. Además se observa que al aumentar el TF para cualquier pH disminuye la etapa de latencia entre la primera etapa de generación y la segunda del comportamiento diaúxico, esto se debe a que a mayor tiempo de fermentación, el sólido es más hidrolizado y en la etapa metanización se reducen los tiempos de hidrólisis y fermentación, ya que el sólido ha sido previamente pretratado (Fongsatitkul et al., 2012; Lindner et al., 2014). A un pH de 6 y 5 no se presentan diferencias marcadas en la generación de la primera etapa de metanización que ronda entre 200-400 NmL de metano, en cambio a pH 4, la generación de metano aumenta a un 300-500 NmL (se tomó como punto de comparación 4 días de metanización).

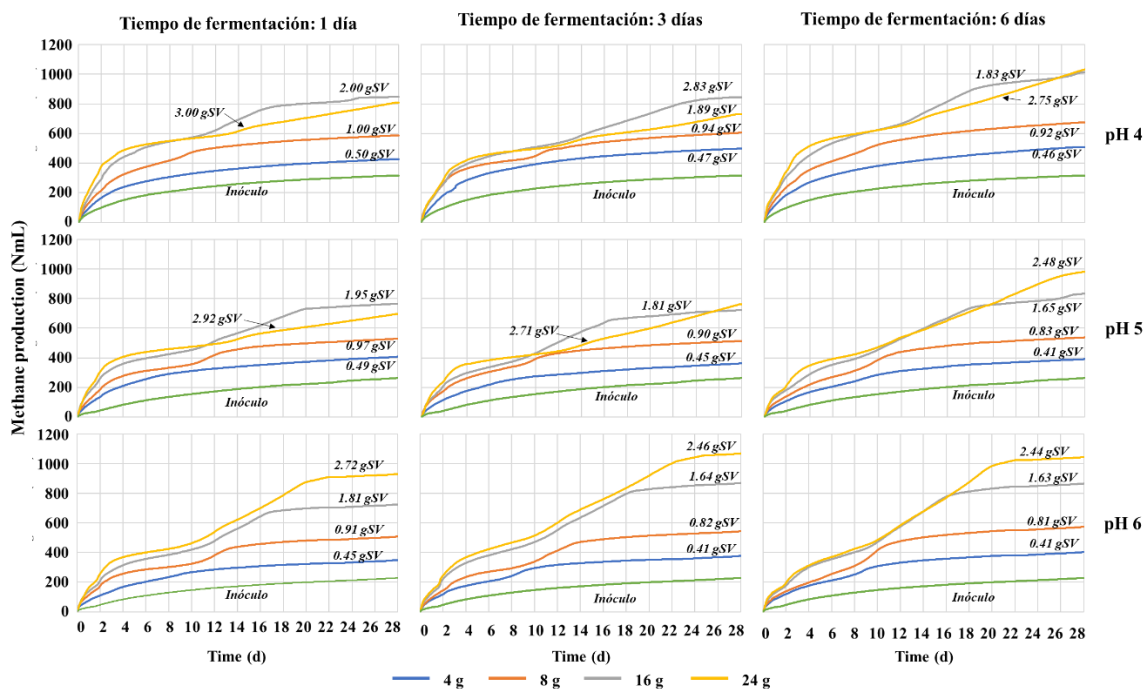


Figura 5-18. Producción de metano de la fracción sólida del digestato fermentado a pH 6, 5 y 4, y tiempos de fermentación de 1, 3 y 6 días

En la figura 5-19 se presentan la regresión lineal del volumen generado al terminar la prueba de metanización versus la masa alimentada en términos de sólidos volátiles, en donde la pendiente es la

producción específica y la ordenada al origen es la producción por el inóculo, La línea en color verde de la figura 5-19 representa la FORSU cruda sin fermentar que presentó una producción específica de 353 NL/kg_{sv}.

El comportamiento de la producción específica para las fracciones líquidas de la FORSU fermentada se observa que en todas las combinaciones supera a la FORSU cruda sin fermentar (ver figura 5-19), el aumento más pequeño se presentó para la fracción del digestato fermentado a pH 4 y TF de 1 día que logró un aumento de 12.5%, en cambio el mejor resultado se logró con la fracción de la FORSU fermentada a pH 5 y TF de 3 días donde se consiguió un aumento de 72%. Se observa que el mejor pH de fermentación es pH 5, donde se lograron producciones específicas superiores a los 600 NL/kg_{sv}, esto se logró a un TF de 3 y 6 días, a un TF de 1 día lo que se observó es que la alta concentración de ácido láctico provocó una inhibición al transformarse en ácido propiónico cuando se adicionaron 150 ml de la fracción al reactor de metanización (ver figura 5-19). El efecto de pH en la fermentación que provocó mejores producciones específicas sobre la fracción líquida es pH 5, seguido de pH 6 y por último pH 4. El efecto tiempo de fermentación donde se logró la mayor producción específica se logró a un TF de 3 días donde se obtuvieron los máximos para pH 5 y 4, para pH de 6 el máximo se logró a un TF de 6 días.

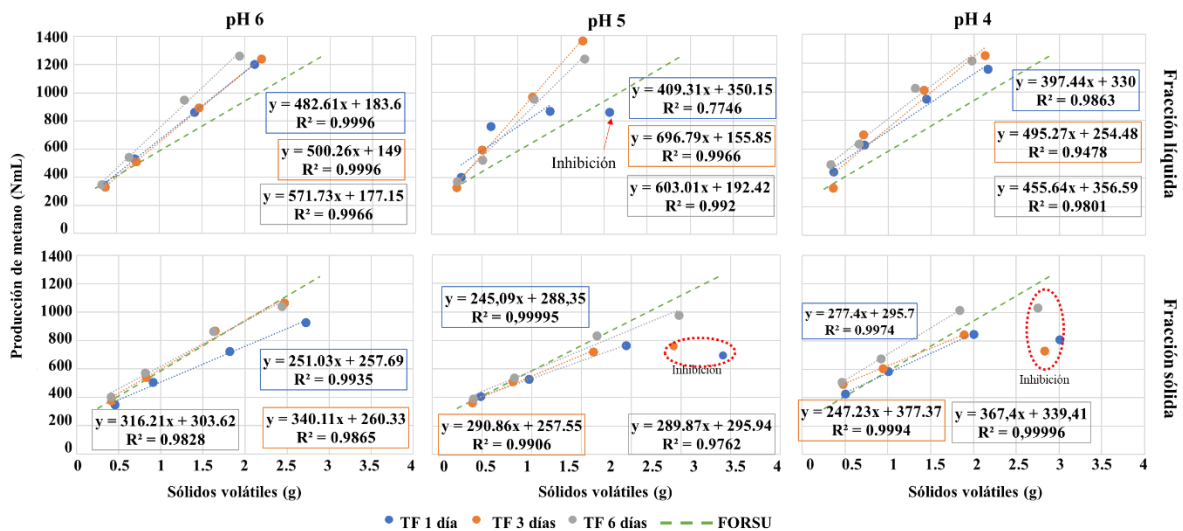


Figura 5-19. Producción específica en función a masa alimentada de sólidos volátiles para FORSU fermentada a diferentes pH y tiempos de fermentación.

En cuanto al efecto de pH en la fermentación sobre la fracción sólida en la metanización, se observa que a pH 5 lograron menores producciones específicas de metano a diferencia de pH 6 y 4, pero esto se debe a su correspondiente fracción líquida que presenta las mayores producciones específicas, lo que implica una reducción en la capacidad de metanización del sólido. El efecto del tiempo de fermentación o tiempo de fermentación (TF) no presentó una tendencia marcada a pH 5 con TF de 3 y 6 días la producción no cambia prácticamente, a pH 4 con TF de 1 día presenta un valor de 277 NL/kg_{sv}, este disminuye con TF de 3 días y aumenta con TF de 6 días a 367 NL/kg_{sv}. En el estudio de biomasa lignocelulósicas para un proceso de digestión anaerobia Sawatdeenarunat et al., (2015) evalúa casi 15 biomasa lignocelulósicas (FORSU, residuos de cosecha como arroz, maíz, trigo, paja, etc.) determina que sus producciones específicas de metano van en el rango de 41-301 NL/kg_{sv} sin ningún pretratamiento, a partir de esto es posible ver que los resultados de la fracción sólida de los digestatos fermentados presentan altas producciones específicas de metano, ya que sus producciones específicas son cercanas al valor máximo presentado en el trabajo resumen de Sawatdeenarunat et al., (2015). Por lo cual se puede concluir que aún con un proceso de fermentación seguido de un proceso

de extracción de la fracción líquida, la fracción sólida sigue presentado una gran capacidad de metanización en comparación con otras biomásas lignocelulósicas.

En la tabla 5-13 se presenta la concentración de ácido propiónico para cada reactor y además en negrita se marca los valores que en la figura 5-19 se señalan como inhibición o que en las figuras 5-17 y 5-18 se observa que no se estabilizaron en los días que duró la metanización. En general para la metanización de fracción líquida y sólida se observa que al aumentar el sustrato aumenta la concentración promedio de ácido propiónico. Para la fracción líquida del digestato fermentado a pH 5, TF 1 y un volumen de sustrato de 150 ml, se observa que presentó una concentración de ácido propiónico mucho mayor al promedio correspondiente, esto explicaría el por qué en la figura 5-17 su producción no logra estabilizarse en los 14 días. En el caso de las fracciones sólidas se presentan concentraciones superiores de ácido propiónico a pH 5 y 4 con adición de 24 g de sustrato y como se observó en la fase de experimentación con metabolitos puros a concentraciones superiores a 600 mg_{DQO}/L de propiónico el sistema presenta grados de inhibición importantes (ver figura 5-19), las concentraciones finales de los metabolitos restantes se encuentran en el Anexo 2.

Tabla 5-13. Concentración final de ácido propiónico (mg_{DQO}/L) después de la metanización

pH	Sustrato adicionado	Tiempo de fermentación (días)			Sustrato adicionado	Tiempo de fermentación (días)		
		1	3	6		1	2	3
		Fracción Líquida				Fracción sólida		
6	25 mL	10	8	9	4 g	NA	46	52
	50 mL	19	20	22	8 g	129	134	127
	100 mL	45	52	60	16 g	246	237	251
	150 mL	85	96	76	24 g	365	289	374
5	25 mL	12	9	NA	4 g	58	69	72
	50 mL	23	21	23	8 g	141	132	128
	100 mL	38	47	51	16 g	198	231	227
	150 mL	250	68	81	24 g	989	945	896
4	25 mL	7	NA	6	4 g	35	42	NA
	50 mL	NA	23	28	8 g	48	56	63
	100 mL	54	62	58	16 g	209	198	223
	150 mL	82	68	78	24 g	875	896	887

Para determinar la producción específica del proceso, se plantea en las ecuaciones 7-9 del balance de masa que permite calcular la producción específica de metano del proceso completo, esto se realiza debido a que fracciones líquidas solo contienen una fracción de los sólidos volátiles del sistema de fermentación y la fracción sólida puede aportar una gran cantidad de metano al sistema. En la tabla 5-13 se encuentran los resultados del balance y además el aumento correspondiente cuando se compara con la metanización FORSU cruda sin fermentar (la producción específica de metano para FORSU cruda sin fermentar es de 353 NL/kg_{SV}). El proceso de centrifugación se operó con una masa inicial de 800 g donde la fracción sólida resultante era 29±3 % y como líquido salía el 71±3 % como masa, a partir de esto y con los sólidos volátiles, se realizó el balance para obtener la producción específica del proceso.

$$M_{T.SV} * PEM_P = m_{FL.SV} * PEM_{FL} + m_{FS.SV} * PEM_{FS} \quad (7)$$

Donde:

$M_{T.SV}$ = Masa total de sólidos volátiles que entra a la centrifugación

PEM_p = Producción específica de metano del proceso

$m_{FL.SV}$ y $m_{FS.SV}$ = Masa de sólidos volátiles en la fracción líquida (FL) y en la fracción sólida (FS)

PEM_{FL} y PEM_{FS} = Producción específica de la fracción líquida y sólida

$$PEM_p = \frac{m_{FL.SV}}{M_{T.SV}} * PEM_{FL} + \frac{m_{FS.SV}}{M_{T.SV}} * PEM_{FS} \quad (8)$$

Si $\frac{m_{FL.SV}}{M_{T.SV}} = f_{FL}$ y $\frac{m_{FS.SV}}{M_{T.SV}} = f_{FS}$; f = fracción de distribución de sólidos volátiles para FL y FS

$$PEM_p = f_{FL} * PEM_{FL} + f_{FS} * PEM_{FS} \quad (9)$$

De la tabla 5-13 se observa que la producción de metano por sólidos volátiles a un tiempo de fermentación de 1 día a cualquier pH, el proceso fermentación-centrifugación-metanización no logra producir más metano que la metanización de FORSU en una sola etapa, los porcentajes son negativos. A partir de TF de 3 días en la fermentación se logra sobrepasar la producción de FORSU cruda sin fermentar y logra incrementos entre el 10 al 19%. A TF 6 y pH 6 se logra producción específica similar al de pH 5 y TF 3 cercana a 418 NL/kg_{SV} de metano, siendo las producciones específicas más altas.

Tabla 5-14. Producción específica de metanol del proceso

pH	TF	Fracción	f_{FL} o f_{FS}	Aporte en producción específica ($f_x * PEM_x$)	PEM_p	% aumento
	1	L	0,35	171	333	-0,06
		S	0,65	162		
6	3	L	0,41	206	406	0,15
		S	0,59	200		
	6	L	0,40	227	418	0,18
		S	0,60	191		
	1	L	0,28	115	291	-0,17
		S	0,72	176		
5	3	L	0,31	219	418	0,19
		S	0,69	200		
	6	L	0,32	191	389	0,10
		S	0,68	198		
	1	L	0,35	139	319	-0,09
		S	0,65	180		
4	3	L	0,35	176	335	-0,05
		S	0,65	159		
	6	L	0,36	165	399	0,13
		S	0,64	234		

* TF: tiempo de fermentación

Además, se observa que los aportes de la fracción líquida y sólida para cada condición de trabajo son casi equivalentes, aunque se observa un aporte relativamente más alto para la fracción líquida, solo a pH 4 y TF de 6 días la fracción sólida aporta más que la líquida. Con lo anterior observamos que, aunque el pH juega un papel importante en el proceso, los mayores cambios se generan en función al tiempo de fermentación, esto se corroboró con un análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo (software Excel), los resultados se presentan en el Anexo 1-1, el valor F para la

variable pH es menor que su valor crítico para F, lo que representa que el pH no genera cambios significativos en la generación de metano del proceso y en cambio el valor F para la variable tiempo de fermentación es mayor a su valor crítico para F, lo que representa que el tiempo de fermentación sí genera cambios significativos en la generación de metano.

En estudios anteriores sobre la digestión anaerobia de la FORSU de Coyoacán, CDMX, Campuzano y González-Martínez, (2015) determinaron que la producción específica de metano de la FORSU logra alrededor de 541 ± 14 NL/kg_{SV} de metano, siendo superior al encontrado en este trabajo que es de 353 NL/kg_{SV}, una de las diferencias en los trabajos es el tamaño de partícula puesto que en este trabajo se operó a una tamaño promedio de 8 mm en cambio Campuzano y González-Martínez, (2015) trabajaron a tamaños menores a 3 mm. Si se compara con los trabajos de Castellón-Zelaya y González-Martínez, (2021b) y Ossa Arias, (2020) que realizaron pruebas de potencial con el mismo tamaño de partícula (8 mm) presentaron los siguiente valores de 339 y 318 NL/kg_{SV} respectivamente, los cuales son similares al presentado en este trabajo. En el trabajo de Castellón-Zelaya y González-Martínez, (2021a) trabajó en el ensilado de FORSU (fermentación seca) para su posterior metanización, a condiciones mesofílicas logró una producción de 438 NL/kg_{SV} de la FORSU ensilada, que es relativamente más alta que la mayor producción que se logró en este trabajo que es de 418 NL/kg_{SV}, la diferencia se debe a la forma en cómo se determina la producción específica, en esta investigación la producción específica corresponde a un rango de concentración que es de 1 a 10 gSV/L de sustrato, en cambio en la investigación de Castellón-Zelaya es puntual y corresponde al ensilado con la concentración más baja y a la metanización con la concentración más baja de sustrato. Como se observó en el experimento exploratorio, al calcular la producción específica puntual a la concentración más baja de sustrato se encuentran las producciones específicas más altas y estas disminuyen al aumentar la concentración de sustrato en la metanización, este mismo comportamiento lo encontró Castellón-Zelaya y González-Martínez, (2021a).

Realizar una comparación de los resultados de la tabla 5-13 con otros trabajos es complicado en términos de producción específica, debido a que esta depende mucho de la composición del sustrato (no es la misma FORSU), en general para trabajos con residuos sólidos urbanos se suele trabajar con residuos de frutas, vegetales y de restaurantes o combinaciones de ellas. Por esta razón se va a comparar el porcentaje de aumento en la producción específica de una digestión anaerobia en 2 etapas (con o sin separación de las fracciones líquida y sólida) con una digestión anaerobia en una sola etapa utilizando la misma biomasa. Para el proceso donde se fermenta (con reactores completamente mezclados o de lecho donde el lecho es la biomasa), se separa y solo se metaniza la fracción líquida se presentan aumentos en comparación a una sola etapa de 35-50% en términos de producción específica de metano (Bacab et al., 2020; Fezzani y Cheikh, 2010; W. Li et al., 2017; Lindner et al., 2014; Majhi y Jash, 2016; Shen et al., 2013b; Wu et al., 2016; Yang et al., 2013), si se fermenta y se metaniza la fracción líquida y sólida juntas, el aumento es del 10 al 30 % (Dogan et al., 2012; Fongsatitkul et al., 2012; Giuliano et al., 2014; Pavan et al., 2000; Sridevi et al., 2015) que están dentro de los porcentajes de este trabajo. En los trabajos que solo se metanizó la fracción líquida, no toman en cuenta la pérdida de sólidos volátiles al no metanizar esta fracción sólida que, como vemos en la tabla 5-13, la fracción sólida puede contener entre el 60 hasta 73% de sólidos volátiles, al no tener en cuenta los SV de la fracción sólida, la producción específica de metano aumenta pero si se dividen los porcentajes en un factor de 3 debido a que la fracción líquida puede contener solo un tercio de los sólidos volátiles, el porcentaje de aumento en la producción específica de metano de la fracción líquida, se vuelve ligeramente menor a metanizar las dos fracciones.

Un punto para destacar es que cuando solo se metaniza la fracción líquida del digestato fermentado, el tiempo de fermentación o tiempo de retención hidráulico es de 2 a 6 días, en cambio cuando solo se metaniza (sin fermentar) el tiempo va de 22-35 días, lo que implica una reducción importante del tiempo de operación. En los casos donde se fermenta y se metaniza sin separar las fracciones, el tiempo de metanización es de 10 a 18 días y sin fermentación los tiempos son de 22-40 días (Fezzani y

Cheikh, 2010; W. Li et al., 2017; Lindner et al., 2014; Majhi y Jash, 2016; Shen et al., 2013b). Con lo anterior se concluye que una previa fermentación reduce los tiempos de operación de la metanización, aun en trabajos donde se logró un bajo aumento en la producción específica del proceso (10-12%), se logra una reducción de entre el 75-80% del tiempo de metanización (Fongsatitkul et al., 2012; Pavan et al., 2000). A continuación, se realizará un análisis de la producción específica si solo se metaniza la fracción líquida por 2 días y la sólida por 8 días.

En la tabla 5-15 se presenta el porcentaje (%) de metano generado hasta la primera fase de generación para la fracción líquida y sólida, para la fracción líquida se tomó como 2 días en donde la mayoría de las curvas han terminado la primera fase de generación (ver figura 5-17), como valor total se tomó el volumen generado a los 14 días y en caso de la fracción sólida se tomaron 8 días como tiempo en el que termina la primera de generación de metano (ver figura 5-18). En general observamos que la fracción líquida en solo 2 días de metanización puede alcanzar entre 50-75% de volumen total que se generó a los 14 días y en caso de la fracción sólida en 8 días de metanización genera entre 51-69% de volumen total. Para pH 6 observamos que, en la fracción líquida, al aumentar el tiempo de fermentación (TF), disminuye el volumen generado en la primera fase y para el pH de 4 y 5 logran el mayor porcentaje a un TF de 3 días alcanzando un 69 y 75% respectivamente. Para el caso de la fracción sólida independiente de pH, al aumentar el TF disminuye el % de volumen generado en la primera fase, los mejores resultados se presentan a un pH de 4 y TF de 1 y 3 días donde se alcanzan un porcentaje de 69 y 66%.

Tabla 5-15. Porcentaje generado de metano en la primera fase de metanización

pH de fermentación	Tiempo de fermentación (días)	Fracción líquida	Fracción sólida
		% generado de CH ₄ en la 1° fase	% generado de CH ₄ en la 1° fase
6	1	64±11	56±9
	3	52±14	53±9
	6	49±12	51±9
5	1	59±6	64±7
	3	69±8	60±9
	6	53±17	53±9
4	1	59±4	69±3
	3	75±6	66±7
	6	65±4	64±7

Con lo anterior se observa que se puede reducir el tiempo de metanización y operar en tiempos cortos de metanización logrando alcanzar altas generaciones de metano, esto implicaría que, si se trabaja en reactores batch, aumenta la cantidad de biomasa a tratar y por ende aumenta la producción de metano, y en el caso de procesos en continuo implicaría una reducción del volumen de los reactores de metanización. En la tabla 5-16 se presenta la producción específica del proceso cuando la fracción líquida se metaniza por 2 días y la fracción sólida por 8 días. Se observa que la mejor condición en términos de generación de metano es a pH 5 con un tiempo de fermentación de 3 días, logrando 272 NL/kg_{sv}, alcanzando un 65% de la producción específica si metaniza a 14 días la fracción líquida y 28 días sólida, si analizamos su composición de metabolitos, en esta condición fue donde la fracción líquida presentó mayor concentración de etanol (figura 5-16).

Tabla 5-16. Producción específica de metano en la primera etapa de metanización para la fracción líquida y sólida

pH	NL/kg _{sv}		
	TF 1 día	TF 3 días	TF 6 días
6	201	212	209
5	181	272	206
4	207	237	257

5.5.4. Análisis cinéticos de las fracciones líquida y sólida de los digestatos generados a pH 6,5 y 4 y tiempo de fermentación de 1, 3 y 6 días

Como se planteó al final de la anterior sección, no es necesario de tiempos tan largos en la metanización, ya que solo con la primera fase de generación de metano se logra obtener entre 50-75% del metano generado en los 14 días para la fracción líquida y en los 28 días para la fracción sólida, en este capítulo se evalúa la cinética de metanización de la primera fase de generación de metano para determinar los parámetros cinéticos de las fracciones líquida y sólida de los digestatos generados, y en el caso de la fracción líquida evaluar sus cambios en la tasa de generación (V_{max}) con respecto a la composición de metabolitos de las diferentes fracciones líquidas obtenidas. El modelo que se utiliza es el modelo Michaelis & Mente.

En la figura 5-20 se presentan los resultados de la modelación con (x) se representan los resultados experimentales y con una línea el modelo de Michaelis & Mente, la línea verde representa la FORSU cruda sin fermentar, sus parámetros cinéticos son V_{max} 1428 NmL/L-d y su K_m 5.6 g_{sv}/L y en las tablas 5-17 y -518 se presentan los valores de V_{max} y K_m que se utilizaron para la modelación cinética de la fracción líquida y sólida, respectivamente. Los parámetros cinéticos se obtuvieron por el método de linealización de Lineweaver y Burk utilizando Excel, software de análisis numérico.

De la figura 5-20 observamos que la cinética de la fracción líquida aumenta al disminuir el pH de la etapa de fermentación, a pH 4 la cinética casi se triplica independientemente del tiempo de fermentación, el efecto de tiempo de fermentación para la fracción líquida se ve más fuerte en tiempos de fermentación de 1 a 3 días, llegando a la máxima tasa a un tiempo de fermentación de 3 días, a un TF de 6 días no se observan cambios importantes, en general el modelo de Michaelis & Mente presentó un buen ajuste a los datos experimentales. Con la información de la tabla 5-17, se observa que a pH 6 se presentan las velocidades más bajas y aumentan al disminuir el pH, logrando el máximo a pH 4 y TF de 6 días, al realizar un análisis de varianza de dos factores con una sola muestra se obtiene que el pH de la fermentación produce un efecto sobre el cambio de V_{max} (el valor F del pH es mayor que F_c , ver Anexo 1-2), en cambio la variable tiempo de fermentación no genera efectos estadísticamente considerables en la V_{max} . Al analizar el comportamiento K_m de la fracción líquida se observa que a pH 5 y 4 al aumentar el tiempo de fermentación (TF) tiende a aumentar el valor de K_m en cambio para pH 6 tiende a disminuir.

La cinética de la fracción sólida se ajusta a un modelo de Michaelis & Mente (figura 5-20), entre pH 6 y 5 no se observan diferencias significativas, las mayores tasas de generación de metano (V_{max}) se presentan a un pH de 4, por lo que disminuir el pH de fermentación aumenta las tasas de generación de metano. Además se observa que al aumentar el tiempo de fermentación disminuye la cinética de las curvas tanto en el modelo como en los datos experimentales de la fracción sólida del digestato fermentado, esto se debe porque al aumentar los días de fermentación la fracción sólida acumula material orgánico de difícil degradación, la cual se metanizará, pero con tasas de metanización más bajas. A pH 4 se observa un comportamiento diferente, su cinética más baja se logra a un TF de 3 días.

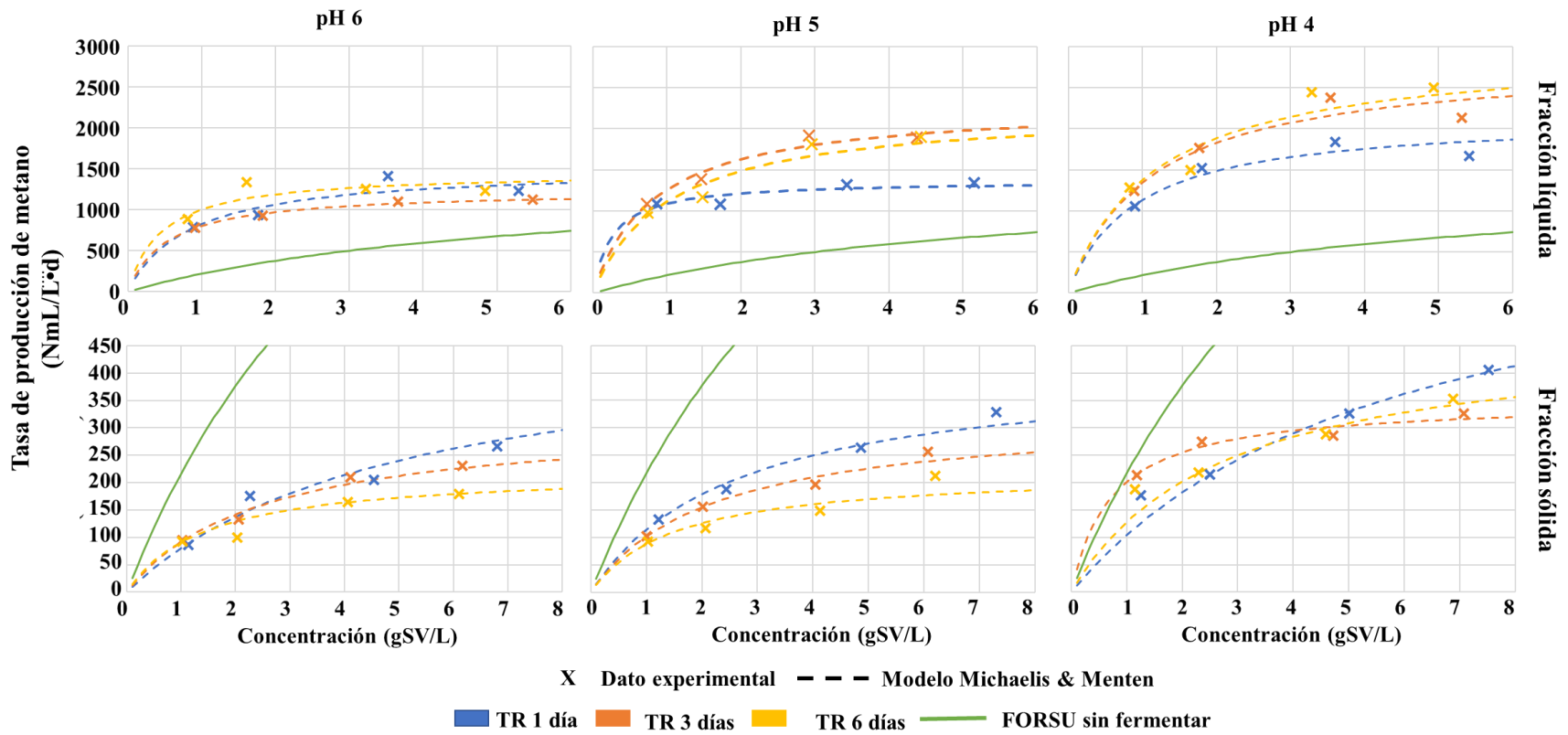


Figura 5-20. Comparación entre los datos experimentales y el modelo de Michaelis & Mente para la fracción líquida y sólida de los diferentes digestatos generados.

Al analizar los parámetros cinéticos correspondientes a las fracciones sólidas (tabla 5-18), se observa que entre pH 6 y 5 la tasa de generación de metano no presenta grandes diferencias, pero si se presenta a pH 4. Los mayores cambios se observan al cambiar el tiempo de fermentación independientemente del pH. A un TF de 1 día presentan las mayores tasas de generación de metano y estas disminuyen al aumentar TF, a excepción de pH 4 y TF de 6 días, donde la Vmax aumenta. Lo anterior se corrobora al realizar un análisis de varianza de dos factores con una sola muestra (ver anexo 1-3) donde se observa que el valor F para tiempo de fermentación es mayor al Fc, lo que implica que la variable tiempo de fermentación en la fermentación produce un efecto sobre la metanización de la fracción sólida del digestato fermentado, en cambio la variable pH (su F<Fc) lo que implica que la variable pH en la fermentación no genera un efecto estadísticamente considerable en la metanización de la fracción sólida. El Km de la fracción sólida se comporta inversamente proporcional al tiempo de fermentación (excepto para pH 4), lo que indica que la afinidad del sustrato al inóculo en la metanización aumenta al aumentar el tiempo de fermentación en la etapa de fermentación.

Tabla 5-17. Parámetros cinéticos de la fracción de líquida

	Vmax (NmL/L*d)			Km (gsv/L)		
	TF 1 día	TF 3 días	TF 6 días	TF 1 día	TF 3 días	TF 6 días
pH 6	1512	1232	1454	0,8	0,5	0,5
pH 5	1366	2306	2248	0,3	0,8	1,0
pH 4	2146	2846	2974	0,9	1,1	1,2

Tabla 5-18. Parámetros cinéticos de la fracción sólida.

	Vmax (NmL/L*d)			Km (gsv/L)		
	TF 1 día	TF 3 días	TF 6 días	TF 1 día	TF 3 días	TF 6 días
pH 6	479	317	222	5,0	2,5	1,4
pH 5	414	326	222	2,6	2,2	1,5
pH 4	717	349	479	5,9	0,7	2,8

Al comparar los parámetros cinéticos de la fracción sólida de los diferentes digestatos generados (ver tabla 5-17) con los parámetros de la FORSU cruda sin fermentar, se observa una disminución del 50 al 84% de la tasa de generación de metano (Vmax), en trabajos como Dogan et al., (2012); Fongsatitkul et al., (2012) y Giuliano et al., (2014) afirman que este comportamiento se debe a la extracción de la fracción líquida, lo que implica la pérdida de materia orgánica de fácil metanización. En cambio al analizar la afinidad del sustrato con el inóculo para la generación de metano (Km) se observa una reducción del 11 hasta 84% en la magnitud de Km, lo que implica un aumento en la afinidad (valores bajos de Km, mayor afinidad), Zhang et al., (2005b) en el trabajo de pretratamiento de residuos sólidos con ácidos para aumentar la hidrólisis, observó que la fracción sólida después de pretratamiento ácido con un tiempo de contacto superiores a 2-5 días, presentaron antes de la metanización mayor hidrólisis que la fracción sólida original sin fermentar.

Al realizar una comparación entre los parámetros cinéticos de las fracciones líquidas del digestato con los parámetros de la FORSU cruda sin fermentar, en términos de Vmax a pH 6 solo se presentan aumento de 2-6 %, en cambio a pH 5 y 4 se logran aumentos de 50-108%. Zhang et al., (2005b) afirma que en un sistema de digestión anaerobia de dos etapas a partir de residuos, el rango de pH donde se logran mejores rendimientos de metano se encuentra entre 4-5.5 unidades de pH, esto

coincide con una alta generación de ácido acético y etanol que según Ma et al., (2020) y Wu et al., (2017) afirman que las fermentaciones etanólicas y acéticas previas a la etapa de metanización aumentan las tasas de generación metano.

Aunque no existen trabajos previos que evalúen el efecto del pH en la fermentación sobre la cinética de metanización de FORSU, en los trabajos de Bacab et al., (2020); Fezzani y Cheikh, (2010); W. Li et al., (2017); Majhi y Jash, (2016) y Yang et al., (2013) trabajan en sistemas de fermentación-separación de la fracción líquida-metanización utilizando como sustratos FORSU, residuos de frutas y/o de vegetales, afirman que este tipo de sistema permite una reducción importante del tiempo de operación debido a que en un sistema de una sola etapa, el tiempo de fermentación o tiempo de retención de sólidos puede ser superior o igual a los 21 días, en cambio en un sistema en dos etapas con separación de la fracción líquida, se puede lograr tener entre 8 a 12 días de operación, que se distribuyen de la siguiente manera: 3 a 5 días en la fermentación y 5-9 días de metanización, esto se debe a la rápida metanización de la fracción líquida que genera pico de generación de metano en tiempos cortos. Lo anterior se puede explicar a partir de los resultados de K_m de la tabla 5-17, la fracción líquida no solo presenta altas tasas de generación de metano a pH 5 y 4, sino que su afinidad es muy alta (a valores bajos de K_m , mayor afinidad), la FORSU cruda sin fermentar presenta un K_m de 5.6 g_{sv}/L para la cinética de metanización, si se toma la fracción líquida del digestato fermentado a pH 4 y tiempo de fermentación de 6 días, que presenta la afinidad más baja entre las fracciones líquidas con un K_m de 1.2 g_{sv}/L , pero representa un aumento del 80% en la afinidad entre el sustrato y el inóculo a la generación de metano (una reducción del 80% del valor de K_m).

Como observamos, el pH en la etapa de fermentación genera un efecto sobre la etapa de metanización de la fracción líquida, esto se debe a que principalmente el pH afecta la selectividad en la fermentación (ver sección 5.5.2.) generando diferentes metabolitos a pH 6, 5 y 4. La concentración de metabolitos producto de la fermentación y como se observó en la experimentación con metabolitos puros, estos sí afectan de manera directa a la acetogénesis y metanización (ver sección 5.3). En la figura 5-22 se presenta la composición de cada metabolito como fracción (DQOm/DQOf, DQOm: DQO del metabolito y DQOf: DQO filtrada, ver sección 5.2.2.) para cada fracción líquida analizada, y su correspondiente tasa de generación de metano (V_{max} , ver tabla 5-17). La línea punteada negra permite observar la tendencia de los datos experimentales. Solo se seleccionaron los metabolitos que presentaron fracciones por encima de 0.1 en el caso del propiónico y metanol presentaron fracciones menores a 0.02.

El comportamiento de la V_{max} presenta una tendencia proporcional al aumentar la fracción de ácido acético en la fracción líquida, en caso del etanol se observa un comportamiento casi horizontal, lo que implica que aumentar el etanol en la composición de la fracción líquida no afectó la metanización. Estos resultados difieren de los encontrados en la sección 5.2. sobre metabolitos puros, el ácido acético y etanol son los metabolitos que mayor efecto positivo presentaron tanto en la producción específica como la V_{max} , esta divergencia se puede deber a la interacción del resto de metabolitos como el ácido butírico y láctico que puede generar efectos negativos en la acetogénesis y metanización (ver sección 5.2). Pero cuando se observa la fracción de ácido acético más etanol la pendiente es mayor y presenta un comportamiento proporcional a la V_{max} de las fracciones líquidas, en el trabajo de Yu et al., (2018b) y N. Zhao et al., (2016) trabajaron con residuos de frutas y verduras (no hay separación de la fracción líquida) afirman que cuando se presentan fracciones en la composición mayores a 0.4 de acético más etanol, se presentó un aumento en las tasa de generación de metano pasando de aproximadamente de 1000-1250 $NmL/L \cdot d$ a 2000-2400 $NmL/L \cdot d$. Feng et al., (2021) estudiaron el papel del etanol en la transferencia de electrones en la metanización, afirma que el etanol mejora la transferencia de electrones para las hidrogenotróficas, además observaron que el etanol induce a un mejor consumo del acetato por parte de las acetotróficas. De lo anterior se puede reafirmar que las fermentaciones acéticas y etanólicas en una etapa de fermentación pueden generar efectos positivos en la posterior etapa de metanización.

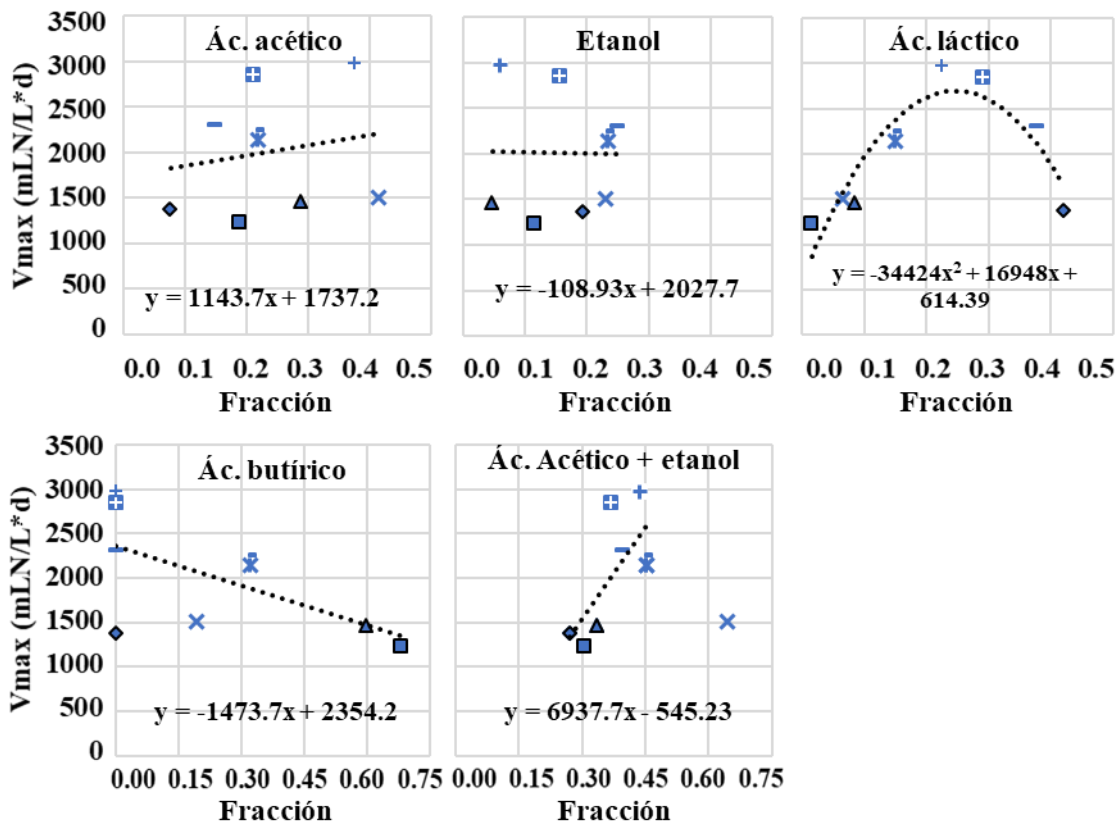


Figura 5-21. Fracción de metabolito vs tasa de generación de metano (Vmax)

El comportamiento del ácido láctico en la figura 5-22, presenta un comportamiento de una parábola invertida logrando los máximos valores de Vmax a fracciones de ácido láctico cercana a 0.25. En los experimentos con ácido láctico puro se observó que a bajas concentraciones se consume todo el ácido láctico y se presenta poca generación de ácido propiónico, en cambio a altas concentraciones entre un 50-65% del ácido láctico se transforma en ácido propiónico, el cual se acumula afectando los procesos de metanización. N. Zhao et al., (2016) trabajaron en la digestión anaerobia de residuos de comida con una pre-fermentación selectiva a láctico y otra selectiva a etanol a partir de agregar organismos lácticos y etanólicas, el ácido acético representó alrededor del 10% del total de la DQO disuelta. Concluyen que para una fermentación láctica que logra una fracción de 0.5 para láctico, 0.2 para etanol, al metanizar el digestato se presentó acumulación de ácido propiónico y una generación de 1.75 L de metano, en cambio en la fermentación etanólica se logró una fracción de 0.4 para etanol, 0.15 de láctico y una generación de 2.80 L de metano.

El comportamiento de del ácido butírico en la figura 5-22 presenta una tendencia inversamente proporcional, al aumentar la fracción de butírico en la fracción líquida disminuye los valores de Vmax. Como se mencionó en la sección 5.2 el ácido butírico puro presenta una etapa acetogénesis muy prologada de aproximadamente de 5 días y después inicia la metanización, además puede comportarse como un inhibidor a concentraciones superiores a 1.3gDQO/L (Zhang et al., 2019). A las condiciones de pH 6 e independiente del tiempo de fermentación se logran fracciones altas (0.2 a 0.7) de ácido butírico en la fracción líquida del digestato generado y al ser metanizadas se presentaron los valores bajos de Vmax (ver tabla 5-17).

5.5.5. Determinación de comunidades microbianas

En esta sección se evalúan en una primera parte las comunidades microbianas presentes en la FORSU cruda sin fermentar y de los lodos de UASB (utilizados como inóculo), con el fin de conocer el estado inicial de las comunidades, tanto de la FORSU como del inóculo metanogénico utilizado en la investigación, y en una segunda parte se evalúa el efecto del pH en fermentación sobre las comunidades microbianas presentes en los digestatos resultantes.

5.5.5.1. FORSU cruda sin fermentar y lodos de UASB

En la figura 5-23 se presenta la composición y estructura de las comunidades microbianas para la FORSU cruda sin fermentar y para los lodos de UASB. Para la FORSU cruda sin fermentar se analizaron los reinos Bacteria y Eucaria (en la sección de metodología se detalla el primer que se utilizó para especificar el análisis a hongos) en el caso del inóculo, se analizaron las comunidades pertenecientes al reino Bacteria y Archeae. De los círculos de la figura 5-23, el central representa el reino y cada círculo superior representa el nivel taxonómico superior hasta llegar a género. Los géneros tienen marcada su abundancia relativa con respecto al reino. En general observamos una mayor diversidad en el reino Bacteria tanto para la FORSU como para los lodos UASB. A continuación, se realiza un análisis de la figura y para cada nivel taxonómico que se mencione entre paréntesis se colocó su respectiva abundancia relativa de secuencias (ARS) con respecto al reino taxonómico.

Comunidades microbianas del reino Bacteria para FORSU cruda sin fermentar

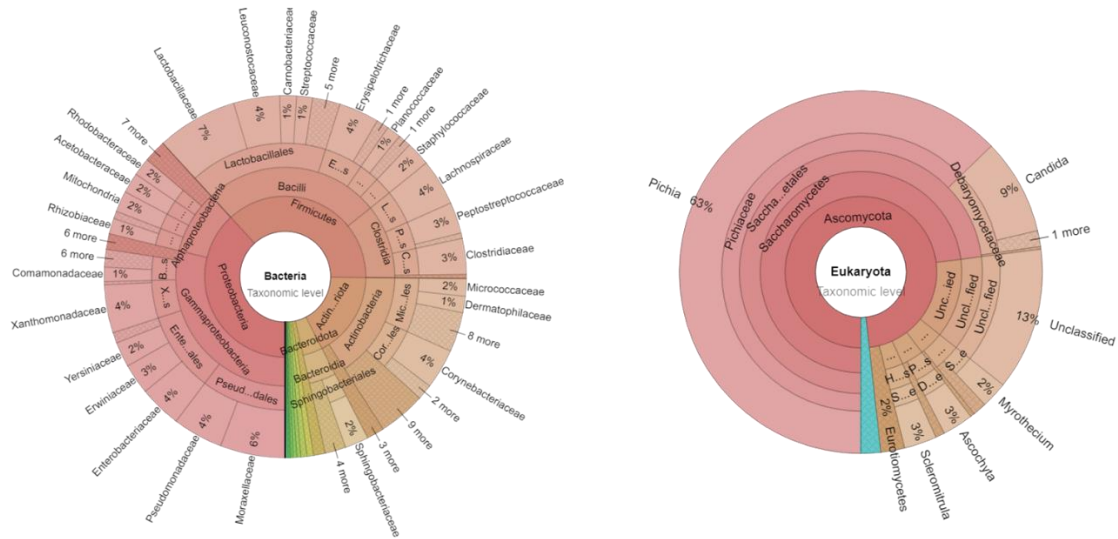
Las comunidades microbianas para reino Bacteria de la FORSU cruda sin fermentar presentan una gran diversidad en cuestión de géneros, ninguno supera 10% en términos de abundancia relativa de secuencias (ARS), si analizamos el filo (círculo superior al de Bacteria), se observan 3 filos dominantes que son *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteriota* que representan el 92% ARS, y de forma individual representan 38%, 37% y 17% de ARS, respectivamente. Entre la *Proteobacteria* encontramos a la clase *Gammaproteobacteria* que presenta el 75% de *Proteobacteria*, además encontramos 2 órdenes importantes que son *Enterobacterales* y *Pseudomonadales* donde encontramos géneros muy conocidos como *Enterobacter* (2%), *Pseudomonas* (4%) y *Acinetobacter* (5%), que de igual forma hacen parte de los géneros más abundantes. En general las bacterias pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria* son bacterias con una gran capacidad hidrolítica y fermentativa principalmente a la generación de AGV (Setiyawan, 2013).

En filo *Firmicutes* presentó dos clases que son *Clostridia* (11%) y *Bacilli* (26%), la clase *Clostridia* son microorganismos principalmente acidogénicos y acetogénicos, en caso de *Bacilli* se encontró que el orden más abundante es *Lactobacillales* (17%) que son microorganismos principalmente hidrolíticos y productores de ácido láctico, entre los géneros que se encontraron está *Lactobacillus* (7%) que es el género más abundante y es principalmente homoláctico (Bergey's Manual®, 2009). En el caso del filo *Actinobacteriota* en su mayoría son de la clase *Actinobacteria*, en términos de géneros pertenecientes a esta clase en la figura se observa que en su mayoría tienen ARS menores o igual a 1%, solo *Corynebacterium* presenta una ARS de 4%, en general los microorganismos pertenecientes a la clase *Actinobacteria* participan en el proceso de acidogénesis y acetogénesis (Detman et al., 2018; Setiyawan, 2013).

Aunque realizar una comparación sobre la composición y estructura de las comunidades microbianas de la FORSU, es difícil debido a la heterogeneidad, a la composición y al origen de los residuos. Si se comparan solo filos se encuentran similitudes, pero presentan diferencias en términos de sus abundancias relativas de secuencias y géneros encontrados. Tonanzi et al., (2018) trabajaron residuos de comida de un campus de investigación en Roma, Italia, los filos que se encontraron en el sustrato fueron *Actinobacteriota*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* (en orden de mayor a menor

abundancia). En el caso de Jiménez-Ocampo et al., (2021) trabajaron con los residuos del mercado municipal de la ciudad de Querétaro, México; los filos más importantes que se encontraron en el sustrato fueron *Firmicutes*, *Protobacteria*, *Bacteroidetes* y *Sinergistetes* (en orden de mayor a menor abundancia).

FORSU cruda sin fermentar



Lodos de UASB

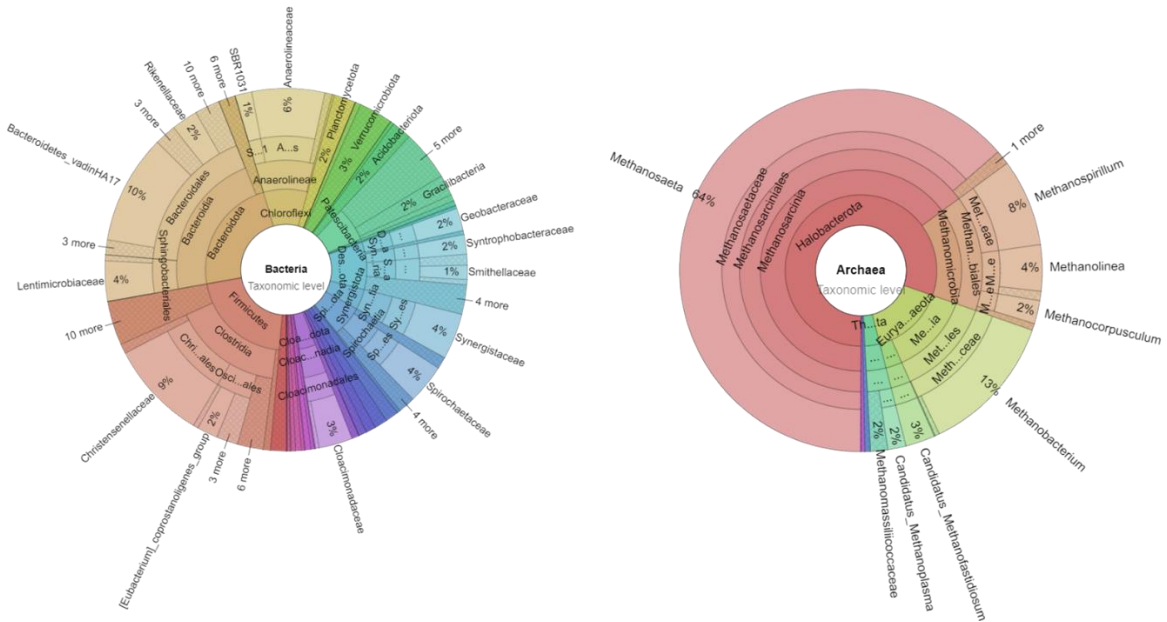


Figura 5-22. Composición y estructura de las comunidades para la FORSU cruda sin fermentar (Bacteria y Eucaria) y para lodos de UASB (Bacteria y Archaea).

Comunidades microbianas del reino Eucaria para FORSU cruda sin fermentar

Las comunidades microbianas para el reino Eucaria de la FORSU cruda sin fermentar presenta un dominio casi completo del filo *Ascomycota* que representan 98% del reino Eucaria y componen una

de la divisiones más abundantes de los hongos, en este filo encontramos a la clase *Saccharomycetes* (74%), los cuales su metabolismo parte de monosacáridos y algunos disacáridos (*Saccharo* significa azúcar), y el género más abundante es *Pichia* que tiene grades rendimientos a la producción de etanol y algunas especies de este género pueden producir metanol, el género *Pichia* es muy utilizado en la producción de etanol a partir de sustrato con alta composición lignocelulósica (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008; Demiray et al., 2018; Dubey et al., 2012). El siguiente género más abundante es *Candida* (9%); presenta una gran capacidad hidrolítica y puede producir alcoholes, acetato y piruvato (Klinke et al., 2009). Un 13% de las secuencias no se lograron clasificar a niveles superiores a filo, pero se sabe que son *Ascomycota*. El 14 % de ARS restante se reparten en clases como *Sordariomycetes* (4%), *Dothideomycetes* (4%) y *Leotiomycetes* (3%), donde se encuentran los géneros *Myrothecium* (2%), *Ascochyta* (3%) y *Scleromitrla* (3%) que pueden utilizar sustratos diferentes a azúcares y además se asocian como patógenos o generan putrefacción de plantas (Baite y Dubey, 2018; Fujinawa et al., 2020), lo que implica degradación de compuestos lignocelulósicos.

Al evaluar las abundancias relativas de los dos reinos (Bacteria y Eucaria) para la FORSU cruda sin fermentar, es posible concluir que la FORSU viene desde su origen con comunidades microbianas con una capacidad hidrolítica (tanto de bacterias como de hongos) y fermentativa, del reino Bacteria hacia la generación de AGV, y láctico y por el reino Eucaria, a la generación de alcoholes, principalmente etanol a partir de monosacáridos (azúcares). Esto implica que al agotarse los monosacáridos y disacáridos (carbohidratos simples) la fermentación etanólica termina, esto se corrobora con lo observado en este trabajo, independientemente del pH. El mayor consumo de carbohidratos en la fracción líquida se da a un tiempo de fermentación de un día (ver figura 5-15) coincidiendo con la mayor producción de etanol (ver figura 5-16); posteriormente, al aumentar el tiempo de fermentación, se consume el etanol o se mantiene constante, pero ya no se genera.

Comunidades microbianas del reino Bacteria para lodos de UASB (inóculo metanogénico)

Las comunidades microbianas para reino Bacteria de los lodos UASB utilizados como inóculo para las pruebas de metanización presentan una gran diversidad. Entre los filos de mayor abundancia se encuentran *Bacteroidota* (23%), *Firmicutes* (21%), *Chloroflexi* (9%), *Desulfobacterota* (9%), *Patiscibacterota* (7%) y *Spirochaetota* (6%). En el filo *Bacteroidota* (o *Bacteroidetes*) se encuentra el orden *Bacteroidales*, los cuales son abundantes en los sistemas UASB sobre todo cuando se presenta producción de metano a partir de acetato por la archea *Methanosaeta* (Gunnigle et al., 2015). Este filo puede realizar tanto actividad hidrolítica y fermentativa, principalmente ácida y acetogénica (Bergey's Manual®, 2010). En el filo *Firmicutes* se encuentra la clase *Clostrida* (16%) que son organismos principalmente acidogénicos (Bergey's Manual®, 2009). Los filos *Chloroflexi* y *Desulfobacterota* ocupan un 18 % ARS y son principalmente organismos sulfato reductores que también tienen presencia en sistemas UASB (Fan et al., 2022). En general se observa que lodos de UASB por sus dos filos más abundantes tiene capacidad hidrolítica, fermentativa y acetogénica.

Enitan et al., (2019) realizó un estudio taxonómico a los lodos de UASB de una cervecería, de mayor a menor abundancia. Los filos que encontraron fueron *Firmicutes* (32%), *Bacteroidota* (28%), *Synergistetes* (5.38%) y *Proteobacteria* (4.29%). Los resultados son similares a los del presente trabajo, en particular con los filos de mayor abundancia relativa. Las mismas similitudes se presentan con lo reportado por Beraud-Martínez et al., (2021) donde los principales filos en los lodos UASB de cervecería son *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Euryarchaeota*, *Thermotogae*, *Actinobacteria* y *Chloroflexi*, la diferencia más significativa es que el filo *Proteobacteria* en este trabajo solo representó el 1% ARS y el 20% en el trabajo de Beraud-Martínez et al., (2021).

Comunidades microbianas del reino Archaeas para lodos de UASB (inóculo metanogénico)

Las comunidades microbianas para reino Archaea de los lodos UASB utilizados como inóculo para las pruebas de metanización, se observa que todo el reino se divide en tres filos que son *Halobacterota* (80%), *Euryarchaeota* (16%) y *Thermoplasmata* (3%). Del filo *Halobacterota* se observan dos clases que son *Methanosarcinia* (65%) y *Methanomicrobia* (15%), *Methanosarcinia* contiene el género más abundante que es *Methanosaeta* que representa el 64% y son acetotróficas. En el caso de *Methanomicrobia* se presentan a los siguientes géneros *Methanospirillum*, (8%), *Methanolinea* (4%) y *Methanocorpusculum* (2%), los cuales tienen metabolismo hidrogenotrófico (Bergey's Manual®, 2015; De Mandal et al., 2020; Sakai et al., 2012). En el filo *Euryarchaeota* el género dominante es *Methanobacterium* (13%), el cual presenta un metabolismo hidrogenotrófico (Alcántara-Hernández et al., 2017). A partir de la información anterior es posible afirmar que los lodos de UASB utilizados para las pruebas de metanización en este trabajo, la ruta acetotrófica está dominada únicamente por el género *Methanosaeta* y representaría el 64% del metabolismo metanogénico; en cambio, la vía hidrogenotrófica está más diversificada en cuanto a géneros (4 géneros identificados) y en total representan 27% de metabolismo metanogénico.

Alcántara-Hernández et al., (2017) evalúa lodos de UASB de una cervecería y encuentra que los géneros con mayor abundancia son *Methanosaeta*, *Methanolinea*, *Methanobacterium* y *Methanospirillaceae*. Al igual que en este trabajo *Methanosaeta* presentan la mayor abundancia; el género hidrogenotrófico de mayor abundancia es *Methanolinea*, lo que difiere con este trabajo, ya que fue *Methanobacterium* el género hidrogenotrófico más abundante.

5.5.5.2. Efecto del pH de fermentación sobre las comunidades bacterianas de los digestatos generados a un tiempo de fermentación de 6 días

En la figura 5-24 se presenta el comportamiento de diversidad taxonómica para la FORSU cruda sin fermentación (FORSUc) y de los diferentes digestatos fermentados a diferentes pH (6, 5 y 4). Para ellos se tomó muestra del digestato a un tiempo de reacción o fermentación de 6 días. En la metodología se detallan los primeros (16 s) utilizados para identificación molecular del reino bacteria.

Como se mencionó en la sección anterior, en términos de género la FORSU cruda sin fermentar (FORSUc) presentan una gran diversidad, pero en términos de filo en la figura 5-24 se observan 4 filos importantes *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidota* tanto para FORSUc y los diferentes digestatos. En general, se observa tanto para filos, clases y géneros que al disminuir el pH en la fermentación de 6 a 5 y por último a 4 existe una disminución de la diversidad taxonómica, alcanzando a pH 4 solo 2 géneros dominantes pertenecientes a dos filos diferentes (*Firmicutes* y *Proteobacteria*).

El comportamiento del filo *Firmicutes* logra las mayores abundancias relativas de secuencias (ARS) en la FORSU cuando se fermenta a pH 6 y 5, logrando un 85% a pH 5 y presenta una gran caída a pH 4 con 32% ARS. El comportamiento del filo *Proteobacteria* presenta una disminución de su ARS al fermentar la FORSU a pH de 6 y 5, pero a pH 4 se convirtió en el filo dominante con una ARS de 68%. En caso del filo *Actinobacteriota* tiene presencia a pH 6 (14%) y pH 5 (5%) y el filo *Bacteroidota* solo tiene presencia en la FORSUc (4%) y pH 6 (17%).

El comportamiento de la clase *Alphaproteobacteria* asociada al género *Acetobacter* tiene mínima presencia con ARS menores a 1% a pH 6 y 5, y en FORSUc, en cambio a pH 4 se dispara la abundancia de *Acetobacter*. El género *Acetobacter* está asociado principalmente a la transformación del etanol a ácido acético bajo condiciones aerobias pero presenta un metabolismo facultativo (puede ser acidogénico o acetogénico), aunque en procesos de digestión anaerobia de residuos de frutas, verduras o de residuos de comida no se ha observado grandes abundancias (ARS inferiores al 2%), en cambio en procesos fermentativos de frutas, verduras o residuos de comida se ha observado ARS en los rangos de 20-45% (Higashiura et al., 2014; Nguyen et al., 2022; Papalexandratou et al., 2013;

Serrano-Meza et al., 2022). Si se observa el comportamiento sobre la producción de metabolitos en la fermentación a diferentes pH (ver figura 5-16), se observa que a pH 4 las mayores concentraciones de ácido acético se presentaron después de tiempo de fermentación de un día, lo que implica que el género *Acetobacter* es responsable de la acetogénesis del etanol y ácido láctico generado al primer día de fermentación. Para los pH 6 y 5 los responsables de la acetogénesis pueden estar asociados a las clases *Clostridia*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidia* que a partir de su metabolismo pueden participar en la acidogénesis y en la acetogénesis (Bergey's Manual®, 2010, 2009).

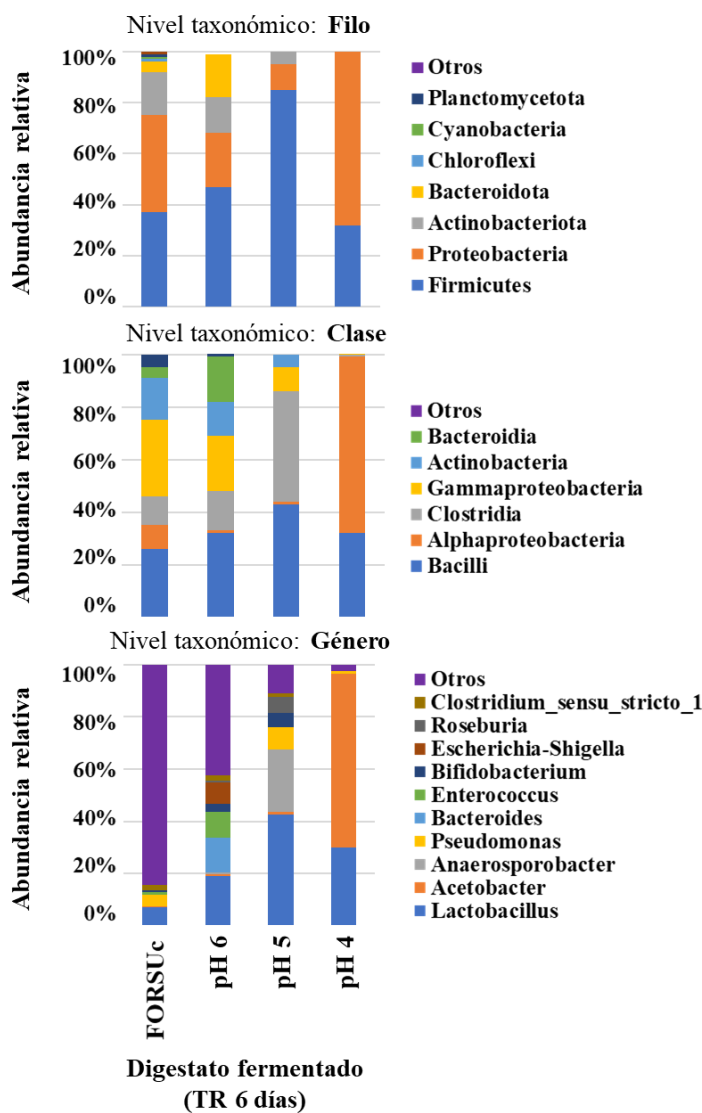


Figura 5-23 Comportamiento de la diversidad taxonómica para filo, clase y género para FORSUc y los digestatos generados a pH 6, 5 y 4.

El comportamiento del género *Lactobacillus* que pertenece a la clase *Bacilli*, en términos de ARS de mayor a menor se presentó en los digestatos fermentados a pH 5 un 43%, a pH 4 con un 30%, a pH 6 con un 19% y por último con FORSUc un 7%. Con lo anterior y asociado a la producción de ácido láctico (ver figura 5-16) se observa el mismo comportamiento; la mayor producción se da con el digestato fermentado a pH 5, luego a pH 4 y por último pH 6. De Groof et al., (2021) trabajaron con fermentaciones selectivas a partir de residuos de comida variando la carga orgánica y tiempo de

retención hidráulico, toda la experimentación se realizó a pH 4, se tomó la muestra después de 60 días de operación y la ARS para *Lactobacillus* estuvo entre 20-45%, en cambio en el trabajo de Wu et al., (2016) analizaron la digestión anaerobia en dos etapas, la primera etapa fermentativa trabajo en el rango de pH de 4.6-4.8 y después de 38 días de operación del reactor fermentativo alcanzo una ARS de 90%. En trabajos que utilizaron especies de *Lactobacillus* como inóculo para producir ácido láctico a partir de residuos de comida se determinó que el rango óptimo de pH en donde se genera la mayor producción de láctico esta entre 4.5-5.5 unidades de pH (Dreschke et al., 2015; Ohkouchi y Inoue, 2006; X. Wang et al., 2011; Wang et al., 2014).

6. Conclusiones

1. A la afirmación de la hipótesis, promover una fermentación etanólica y láctica de FORSU permite aumentar la producción específica de metano en una posterior etapa de metanización, es posible concluir con los resultados de la investigación que es falso, principalmente debido a la acetogénesis parcial del ácido láctico que produce mayoritariamente ácido propiónico, el cual se acumula y genera una inhibición en el sistema de metanización, pero en el caso del etanol es diferente, este metabolito permite aumentar la producción específica de metano y la tasa de generación de metano.

La hipótesis es verdadera en la siguiente condición para la fracción líquida de digestato fermentado: cuando la concentración de ácido láctico es menor a 1.5 gDQO/L y si representa menos de 25% de todos los metabolitos, se observó que la acetogénesis parcial del ácido láctico tiende a disminuir y se presenta un acetogénesis directa del ácido láctico, lo que permite tener tasas de generación de metano altas en el reactor de metanización.

2. Las variables tiempo de reacción, pH e inóculo fueron las variables de análisis en la etapa de fermentación, las dos variables que más afectaron la selectividad de la fermentación de FORSU fueron el tiempo de reacción y el pH. A pH de 4 y 5 con tiempo de reacción menores a 3 días se incentivan las fermentaciones etanólicas y lácticas, en cambio a pH de 6 y tiempos de reacción menores a 3 días se incentiva la generación de ácido acético y finalmente a tiempos superiores a 6 días aumenta la generación de ácido butírico.

En el caso del inóculo, éste sí afecta la selectividad de la fermentación de FORSU, pero con el tiempo los microorganismos autóctonos de la FORSU dominan el metabolismo y la selectividad, principalmente porque el inóculo se diluye como lo que le sucedió a la levadura.

3. En un sistema de fermentación de FORSU sin control de pH y utilizando los microorganismos autóctonos, los productos de mayor a menor abundancia son ácido láctico, etanol, ácido acético, propiónico, butírico y metanol. Al realizar la prueba de metanización a cada metabolito puro se puede concluir que: el ácido acético presentó la producción específica de metano más alta con 343 NL/kg_{DQO} y una tasa de generación relativamente baja de XXX; el etanol presentó la segunda producción específica de metano con XXX, pero una tasa de generación de metano 3 veces mayor a la del ácido acético (XXX); el ácido láctico, aunque es el único metabolito que presenta un ΔG° negativo en la acetogénesis, este beneficio no se vio reflejado en una alta producción específica de metano, ni en una alta tasa de generación de metano, esto se debe a que el ácido láctico presentó una acetogénesis parcial; finalmente para los metabolitos metanol y ácido butírico, se observó que la acetogénesis de estos son la etapa limitante de la metanización, ocasionando una baja producción específica de metano.
4. La separación de las fracciones líquida y sólida del digestato fermentado de FORSU, permite obtener una fracción líquida rica en metabolitos de fácil metanización que le permite en solo dos días obtener entre un 60-75% del metano de la fracción, lo que implica altas tasas de

generación de metano. En el caso de la fracción sólida que, aunque se le ha retirado materia orgánica de fácil degradación, sigue presentando una alta generación de metano, en solo 8 días de metanización se genera aproximadamente entre un 50-65% del metano total de la fracción y a su vez este representa entre un 40-50% del metano al sumar lo generado por las dos fracciones.

A continuación, se detallan otras conclusiones para cada etapa experimental

Etapa. Cinéticas de metanización de metabolitos puros

- Se determinó la producción de metano endógeno para los sustratos, y se pudo concluir que, bajo estas condiciones, los diferentes sustratos afectan la producción de metano endógeno de manera diferente. Durante la metanización a partir de ácido acético y etanol, no se observó producción endógena de metano.
- Con la excepción del ácido propiónico, la V_{max} de los otros metabolitos es mayor que la del ácido acético. Según la producción específica de metano, los valores cinéticos de Michaelis y Menten y los tiempos de reacción, el ácido acético y el etanol pueden considerarse como los mejores metabolitos para la producción de metano.

Etapa. Fermentación de FORSU con diferentes inóculos a pH 4, experimento exploratorio

- La fermentación de FORSU con microorganismos autóctonos y lodos UASB + autóctonos producen principalmente ácido láctico, representando un 60 y 80% del total de DQO, respectivamente. La FORSU fermentada con levadura + autóctonos produjo principalmente etanol con un 50% de la DQO disuelta.
- La producción de metano de los digestatos producto de las fermentaciones aumenta con la disminución de la concentración de sustrato.
- La mayor producción de metano se obtuvo con el digestato de FORSU fermentado solo con microorganismos autóctonos, seguido del digestato fermentado con lodos UASB + autóctonos. La producción específica de metano más baja corresponde a la FORSU cruda sin fermentar, pero a concentraciones altas de sustrato logra producir la misma cantidad que la FORSU fermentada con microorganismos autóctonos.
- La producción de metano partir de FORSU cruda sin fermentar no fue inhibida; las concentraciones de ácidos propiónico y butírico después de la metanización de 30 días fueron las más bajas de los cuatro casos.

Etapa. Fermentación de FORSU con control de pH (4, 5 y 6) y tiempo de reacción (1, 3 y 6 días)

- Todas las fracciones líquidas presentan producciones específicas de metano más altas que la FORSU cruda sin fermentar (353 NL/kg_{SV}), logrando un máximo de 697 NL/kg_{SV} bajo condiciones de fermentación de pH 5 y 3 días de tiempo de fermentación. Bajo esta condición de fermentación se logró la mayor producción de etanol.
- La cinética de metanización de la fracción líquida demuestra que, al disminuir el pH durante la fermentación, aumentan las tasas de generación de metano y que con 3 días de tiempo de reacción es suficiente para alcanzar las máximas tasas de generación de metano.
- La cinética de metanización de la fracción sólida demuestra que, al disminuir el pH de fermentación, aumentan las tasas de generación de metano de las fracciones sólidas.

- El efecto de la fracción del ácido láctico en la composición de la fracción líquida sobre la V_{max} de metanización muestra que, si la fracción de ácido láctico es superior a 25% de la DQO disuelta, la V_{max} tiende a disminuir.
- Al disminuir el pH de fermentación, disminuye la diversidad microbiana en filo, clase y género.
- La generación de etanol se debe a las levaduras presentes en la FORSU y no por las bacterias presentes en ella, esto implica que, al agotarse los carbohidratos simples, las levaduras dejan de producir etanol. En el experimento independiente del pH a un tiempo de fermentación de un día se producía todo el etanol y al aumentar el tiempo de fermentación se consumía el etanol por acetogénesis. Además, en el análisis de identificación molecular, no se encontraron bacterias productoras de etanol.

7. Referencias

- Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G., 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett* 30, 1515–1524. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9728-z>
- Agneessens, L.M., Ottosen, L.D.M., Andersen, M., Berg Olesen, C., Feilberg, A., Kofoed, M.V.W., 2018. Parameters affecting acetate concentrations during in-situ biological hydrogen methanation. *Bioresour. Technol.* 258, 33–40. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.02.102>
- Al Seadi, T., Owen, N., Hellstrom, H., Kang, H., 2013. Source Separation of MSW, IEA Bioenergy. <https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2014.07.029>
- Alamanou, D.G., Malamis, D., Mamma, D., Kekos, D., 2015. Bioethanol from Dried Household Food Waste Applying Non-isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation at High Substrate Concentration. *Waste and Biomass Valorization* 6, 353–361. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9355-6>
- Alcántara-Hernández, R.J., Tas β, N., Carlos-Pinedo, S., Dur An-Moreno, A., Falc, L.I., 2017. Microbial dynamics in anaerobic digestion reactors for treating organic urban residues during the start-up process. *Lett. Appl. Microbiol.* 64, 438–445. <https://doi.org/10.1111/lam.12734>
- Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., Ahmad Asad, S., 2014. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *Sci. World J.* 2014.
- Alibardi, L., Cossu, R., 2016. Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Manag.* 47, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.049>
- Alibardi, L., Cossu, R., 2015. Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials. *Waste Manag.* 36, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.019>
- Atasoy, M., Eyice, O., Schnürer, A., Cetecioglu, Z., 2019. Volatile fatty acids production via mixed culture fermentation: Revealing the link between pH, inoculum type and bacterial composition. *Bioresour. Technol. J.* 292, 121889. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121889>
- Azbar, N., Ursillo, P., Speece, R.E., 2001. Effect of process configuration and substrate complexity on the performance of anaerobic processes. *Water Res.* 35, 817–829.
- Bacab, F.C., Gamboa, E.E., Espinoza, J.E.R., Leal-Bautista, R.M., Tussell, R.T., Maldonado, J.D., Canché, B.C., Alzate-Gaviria, L., 2020. Two Phase Anaerobic Digestion System of Municipal Solid Waste by Utilizing Microaeration and Granular Activated Carbon. *Energies* 13, 933. <https://doi.org/10.3390/EN13040933>
- Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>
- Baite, M.S., Dubey, S.C., 2018. Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* causing blight of chickpea in India. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 102, 122–127. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2018.01.001>
- Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers. Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Ballesteros, M., Sáez, F., Ballesteros, I., Manzanares, P., Negro, M.J., Martínez, J.M., Castañeda, R., Oliva Dominguez, J.M., 2010. Ethanol production from the organic fraction obtained after thermal pretreatment of municipal solid waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161, 423–431. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8877-4>
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., 2010. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 6, 77–93. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Barampouti, E.M., Mai, S., Malamis, D., Moustakas, K., Loizidou, M., 2019. Liquid biofuels from the organic

- fraction of municipal solid waste: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 298–314. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.005>
- Begum, S., Rao Anupoju, G., Bhargava, S.K., Jegatheesan, V., Eshtiaghi, N., 2017. Evaluation of single and two stage anaerobic digestion of landfill leachate: Effect of pH and initial organic loading rate on volatile fatty acid (VFA) and biogas production A R T I C L E I N F O. *Bioresour. Technol. J.* 251, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.069>
- Beraud-Martínez, L.K., Gómez-Gil, B., Franco-Nava, M.Á., Almazán-Rueda, P., Betancourt-Lozano, M., 2021. A metagenomic assessment of microbial communities in anaerobic bioreactors and sediments: Taxonomic and functional relationships. *Anaerobe* 68. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2020.102296>
- Berg, J.M., Stryer, L., Tymoczko, J.L., 2007. *Bioquímica*, versión es. ed. Reverté, España.
- Bergey's Manual®, 2015. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.GBM00504>
- Bergey's Manual®, 2010. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 2nd ed, Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68572-4>
- Bergey's Manual®, 2009. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, Systematic Bacteriology. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K. Bin, Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A. V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hoof, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 2019 378 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bouallagui, H., Torrijos, M., Godon, J.J., Moletta, R., Ben Cheikh, R., Touhami, Y., Delgenes, J.P., Hamdi, M., 2004. Two-phases anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes: bioreactors performance. *Biochem. Eng. J.* 21, 193–197. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2004.05.001>
- Braguglia, C.M., Gallipoli, A., Gianico, A., Pagliaccia, P., 2018. Anaerobic bioconversion of food waste into energy: A critical review. *Bioresour. Technol.* 248, 37–56. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.145>
- Bühlmann, C.H., Mickan, B.S., Tait, S., Renton, M., Bahri, P.A., 2020. Lactic acid from mixed food wastes at a commercial biogas facility: Effect of feedstock and process conditions. *J. Clean. Prod.* 284, 125243. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125243>
- Buxton, D.R., Russell, J.R., 1988. Lignin Constituents and Cell-Wall Digestibility of Grass and Legume Stems. *Crop Sci.* 28, 553. <https://doi.org/10.2135/cropsci1988.0011183x002800030026x>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 2016 137 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Campuzano, Á.R., 2015. Lixiviación de residuos sólidos orgánicos urbanos para incrementar la rapidez de producción de biogás 137.
- Campuzano, R., González-Martínez, S., 2016. Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Manag.* 54, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>
- Campuzano, R., González-Martínez, S., 2015. Extraction of soluble substances from organic solid municipal waste to increase methane production. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.042>

- Castellon-Zelaya, M., 2021. Ensilado de residuos sólidos orgánicos urbanos para la producción de biogás. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Castellón-Zelaya, M.F., González-Martínez, S., 2021a. Silage of the organic fraction of municipal solid waste to improve methane production. *Water Sci. Technol.* 83, 2536–2548. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.148>
- Castellón-Zelaya, M.F., González-Martínez, S., 2021b. EFFECTS OF SOLIDS CONCENTRATION AND SUBSTRATE TO INOCULUM RATIO ON METHANE PRODUCTION FROM ORGANIC MUNICIPAL SOLID WASTE. *Detritus* 15, 3. <https://doi.org/10.31025/2611-4135/2021.15096>
- Castillo, E.F., Cristancho, D.E., A, V.A., 2006. Study of the operational conditions for anaerobic digestion of urban solid wastes. *Waste Manag.* 26, 546–556. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.06.003>
- Cekmecelioglu, D., Uncu, O.N., 2013. Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of pretreated kitchen wastes for enhancing bioethanol production. *Waste Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.003>
- Chandel, A.K., Es, C., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, V., Ravindra, P., 2007. Economics and environmental impact of bioethanol. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 2 2, 14–32.
- Chang, H.N., Kim, N., Kang, J., Jeong, C.M., 2010. Biomass-derived Volatile Fatty Acid Platform for Fuels and Chemicals. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-3070-8>
- Cheah, Y.-K., Vidal-Antich, C., Dosta, J., Mata-Álvarez, J., 2019. Volatile fatty acid production from mesophilic acidogenic fermentation of organic fraction of municipal solid waste and food waste under acidic and alkaline pH. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019 2635 26, 35509–35522. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-05394-6>
- Chen, R.M., Wu, J.J., Lee, S.C., Huang, A.H., Wu, H.M., 1999. Increase of Intestinal Bifidobacterium and Suppression of Coliform Bacteria with Short-Term Yogurt Ingestion. *J. Dairy Sci.* 82, 2308–2314. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75479-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75479-2)
- Cheng, F., Brewer, C.E., 2021. Conversion of protein-rich lignocellulosic wastes to bio-energy: Review and recommendations for hydrolysis + fermentation and anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 146, 111167. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2021.111167>
- Choi, B., Rempala, G.A., Kim, J.K., 2017. Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Sci. Reports* 2017 71 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17072-z>
- Choi, J., Ahn, Y., 2015. Biohydrogen Fermentation from Sucrose and Piggery Waste with High Levels of Bicarbonate Alkalinity. *Energies* 2015, Vol. 8, Pages 1716-1729 8, 1716–1729. <https://doi.org/10.3390/EN8031716>
- Dahiya, S., Kumar, A.N., Shanthi Sravan, J., Chatterjee, S., Sarkar, O., Mohan, S.V., 2018. Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. *Bioresour. Technol.* 248, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.176>
- Davidsson, Å., Gruvberger, C., Christensen, T.H., Hansen, T.L., Jansen, J. la C., 2007. Methane yield in source-sorted organic fraction of municipal solid waste. *Waste Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.02.013>
- De Baere, L., 2000. Anaerobic digestion of solid waste: State-of-the-art. *Water Sci. Technol.* 41, 283–290. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0082>
- De Clercq, D., Wen, Z., Fan, F., Caicedo, L., 2016. Biomethane production potential from restaurant food waste in megacities and project level-bottlenecks: A case study in Beijing. *Renew. Sustain. Energy Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.323>
- De Groof, V., Coma, M., Arnot, T., Leak, D.J., Lanham, A.B., 2021. Selecting fermentation products for food waste valorisation with HRT and OLR as the key operational parameters. *Waste Manag.* 127, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.04.023>
- De Mandal, S., Laskar, F., Panda, A.K., Mishra, R., 2020. Microbial diversity and functional potential in wetland ecosystems. *Recent Adv. Microb. Divers.* 289–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821265-3.00012-8>
- Demichelis, F., Fiore, S., Pleissner, D., Venus, J., 2018. Technical and economic assessment of food waste valorization through a biorefinery chain. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 94, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.064>
- Demiray, E., Karatay, S.E., Dönmez, G., 2018. Evaluation of pomegranate peel in ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Energy* 159, 988–994. <https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2018.06.200>
- Demirci, A., Pometto, A.L., 1992. Enhanced production of (-)-lactic acid by mutants of *Lactobacillus*

- delbrueckii ATCC 9649. *J. Ind. Microbiol.* 11, 23–28. <https://doi.org/10.1007/BF01583728>
- Deng, Y.J., Wang, S.Y., 2016. Synergistic growth in bacteria depends on substrate complexity. *J. Microbiol.* 2016 541 54, 23–30. <https://doi.org/10.1007/S12275-016-5461-9>
- Deronzier, G., Ginestet, P., Audic, J.M., 2002. Operating conditions for the determination of the biochemical acidogenic potential of wastewater. *Water Res.* 36, 2337–2341.
- Detman, A., Mielecki, D., Pleśniak, Ł., Bucha, M., Janiga, M., Matyasik, I., Chojnacka, A., Jędrysek, M.-O., Błaszczak, M.K., Sikora, A., 2018. Methane-yielding microbial communities processing lactate-rich substrates: a piece of the anaerobic digestion puzzle *Biotechnology for Biofuels*. *Biotechnol Biofuels* 11, 116. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1106-z>
- Doublein, D., Steinhäuser, A., 2008. *Biogas from Waste and Renewable Resources*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. <https://doi.org/10.1002/9783527621705>
- di Bitonto, L., Antonopoulou, G., Braguglia, C., Campanale, C., Gallipoli, A., Lyberatos, G., Ntaikou, I., Pastore, C., 2018. Lewis-Brønsted acid catalysed ethanolysis of the organic fraction of municipal solid waste for efficient production of biofuels. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.110>
- Díaz-Báez, M., Espinita Vargas, S., Molina Pérez, Francisco, ;, 2002. *Digestión Anaerobia una aproximación a la tecnología*, 1^o. ed.
- Dionisi, D., Anderson, J.A., Aulenta, F., Mccue, A., Paton, G., 2015. The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90, 366–383. <https://doi.org/10.1002/jctb.4544>
- Dogan, E., Demirer, G.N., Oksel, G.€, Demirer, N., 2012. Biogas generation by two-phase anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *J. Renew. Sustain. Energy* 4, 63131. <https://doi.org/10.1063/1.4769203>
- Dogan, T., Orhan, I., Nilgun, A.O., Bahar, K.I., 2005. Inhibition of Volatile Fatty Acid Production in Granular Sludge from a UASB Reactor. *J. Environ. Sci. Heal.* 40, 633–644. <https://doi.org/10.1081/ESE-200046616>
- Dong, H., Yue, L., Cheng, J., Xia, R., Zhou, J., 2022. Microbial electrochemical degradation of lipids for promoting methane production in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 345, 126467. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126467>
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., 2010. Bioresource Technology Semi-dry mesophilic anaerobic digestion of water sorted organic fraction of municipal solid waste (WS-OFMSW). *Bioresour. Technol.* 101, 2722–2728. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.007>
- Dreschke, G., Probst, M., Walter, A., Pümpel, T., Walde, J., Insam, H., 2015. Lactic acid and methane: Improved exploitation of biowaste potential. *Bioresour. Technol.* 176, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.136>
- Dubey, A.K., Gupta, P.K., Garg, N., Naithani, S., 2012. Bioethanol production from waste paper acid pretreated hydrolyzate with xylose fermenting *Pichia stipitis*. *Carbohydr. Polym.* 88, 825–829. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.01.004>
- Edwiges, T., Frare, L.M., Lima Alino, J.H., Triolo, J.M., Flotats, X., Silva de Mendonça Costa, M.S., 2020. Methane potential of fruit and vegetable waste: an evaluation of the semi-continuous anaerobic mono-digestion. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 41, 921–930. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1515262>
- Enitan, A.M., Kumari, S., Swalaha, F.M., Odiyo, J.O., Bux, F., 2019. Microbiota of a Full-scale UASB Reactor Treating Brewery Wastewater Using Illumina MiSeq Sequencing. *Open Microbiol. J.* 13, 1–9. <https://doi.org/10.2174/1874285801913010001>
- Faloye, F.D., Gueguim Kana, E.B., Schmidt, S., 2014. Optimization of biohydrogen inoculum development via a hybrid pH and microwave treatment technique – Semi pilot scale production assessment. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 5607–5616. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2014.01.163>
- Fan, Q., Fan, X., Fu, P., Li, Y., Zhao, Y., Hua, D., 2022. Anaerobic digestion of wood vinegar wastewater using domesticated sludge: Focusing on the relationship between organic degradation and microbial communities (archaea, bacteria, and fungi). *Bioresour. Technol.* 347, 126384. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126384>
- Fan, Z., Lynd, L.R., 2007. Conversion of paper sludge to ethanol. I: Impact of feeding frequency and mixing energy characterization. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 30, 27–34. <https://doi.org/10.1007/s00449-006-0091-y>
- Farouk, R., Li, L., Wang, Y., Li, Y., Melak, S., 2020. Influence of pretreatment and pH on the enhancement of

- hydrogen and volatile fatty acids production from food waste in the semi-continuously running reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 3729–3738. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2019.07.236>
- Feng, D., Guo, X., Lin, R., Xia, A., Huang, Y., Liao, Q., Zhu, Xianqing, Zhu, Xun, Murphy, J.D., 2021. How can ethanol enhance direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion? *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107812>
- Feng, K., Li, H., Zheng, C., 2018. Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresour. Technol.* 270, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.035>
- Fernández-Domínguez, D., Astals, S., Peces, M., Frison, N., Bolzonella, D., Mata-Alvarez, J., Dosta, J., 2020. Volatile fatty acids production from biowaste at mechanical-biological treatment plants: Focusing on fermentation temperature. *Bioresour. Technol. J.* 314, 123729. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123729>
- Fezzani, B., Cheikh, R. Ben, 2010. Two-phase anaerobic co-digestion of olive mill wastes in semi-continuous digesters at mesophilic temperature. *Bioresour. Technol.* 101, 1628–1634. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.09.067>
- Figueroa-Escamilla, L., 2018. INFLUENCIA DE COMPUESTOS LIGNOCELULÓSICOS CONTENIDOS EN RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS MUNICIPALES SOBRE LA PRODUCCIÓN BIOGÁS. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Florencio, L., Field, J.A., Lettinga, G., 1995. Substrate competition between methanogens and acetogens during the degradation of methanol in UASB reactors, *War. Res.*
- Fongsatitkul, P., Panagiotis, E., David G, W., 2012. Two-phase anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: estimation of methane production. *Waste Manag. Res.* 30, 720–726. <https://doi.org/10.1177/0734242X11429987>
- Forster, T., 2005. Digestión Anaerobia Termofílica Seca De Residuos Sólidos Urbanos: Estudio De Las Variables Del Proceso En El Arranque Y Estabilización Del Bio-Reactor. *Dep. Ing. Química, Tecnol. Aliment. y Tecnol. del Medio Ambient. Dr. por la.*
- Fujinawa, M.F., Pontes, N. de C., Borel, F.C., Halfeld-Vieira, B. de A., de Goes, A., Morandi, M.A.B., 2020. Biological control of gray mold and *Myrothecium* leaf spot in begonias. *Crop Prot.* 133, 105138. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2020.105138>
- Gameiro, T., Lopes, M., Marinho, R., Vergine, P., Nadais, H., Capela, I., 2016. Hydrolytic-Acidogenic Fermentation of Organic Solid Waste for Volatile Fatty Acids Production at Different Solids Concentrations and Alkalinity Addition. *Water, Air, Soil Pollut.* 2016 22710 227, 1–16. <https://doi.org/10.1007/S11270-016-3086-6>
- Ganesh, R., Torrijos, M., Sousbie, P., Lugardon, A., Steyer, J.P., Delgenes, J.P., 2014. Single-phase and two-phase anaerobic digestion of fruit and vegetable waste: Comparison of start-up, reactor stability and process performance. *Waste Manag.* 34, 875–885. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.02.023>
- Gao, M.T., Shimamura, T., Ishida, N., Takahashi, H., 2009. Fermentative lactic acid production with a metabolically engineered yeast immobilized in photo-crosslinkable resins. *Biochem. Eng. J.* 47, 66–70. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2009.07.004>
- García-Aguirre, J., Aymerich, E., González-Mtnez. de Goñi, J., Esteban-Gutiérrez, M., 2017a. Selective VFA production potential from organic waste streams: Assessing temperature and pH influence. *Bioresour. Technol.* 244, 1081–1088. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.187>
- García-Aguirre, J., Aymerich, E., González-Mtnez de Goñi, J., Esteban-Gutiérrez, M., 2017b. Selective VFA production potential from organic waste streams: Assessing temperature and pH influence. *Bioresour. Technol.* 244, 1081–1088. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.187>
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trabaly, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., Esposito, G., 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl. Energy* 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2015.01.045>
- Giuliano, A., Zanetti, L., Micolucci, F., Cavinato, C., 2014. Thermophilic two-phase anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of municipal solid waste for bio-hythane production: effect of recirculation sludge on process stability and microbiology over a long-term pilot-scale experience. *Water Sci. Technol.* 69, 2000–2009. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.137>
- Gonzalez-Gil, L., Mauricio-Iglesias, M., Carballa, M., Lema, J.M., 2018. Why are organic micropollutants not fully biotransformed? A mechanistic modelling approach to anaerobic systems. *Water Res.* 142, 115–128. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.05.032>
- Gou, C., Yang, Z., Huang, J., Wang, H., Xu, H., Wang, L., 2014. Effects of temperature and organic loading

- rate on the performance and microbial community of anaerobic co-digestion of waste activated sludge and food waste. *Chemosphere* 105, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.018>
- Gregor, D., Grilc, V., 2012. Anaerobic Treatment and Biogas Production from Organic Waste, in: *Management of Organic Waste*. InTech. <https://doi.org/10.5772/32756>
- Gu, X.Y., Liu, J.Z., Wong, J.W.C., 2018. Control of lactic acid production during hydrolysis and acidogenesis of food waste. *Bioresour. Technol.* 247, 711–715. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.09.166>
- Gunnigle, E., Siggins, A., Botting, C.H., Fuszard, M., O’flaherty, V., Abram, F., 2015. Low-temperature anaerobic digestion is associated with differential methanogenic protein expression. *Res. Lett. – Environmental Microbiol. Low-temperature* 362, 59. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv059>
- Hafid, H.S., Abdul Rahman, N., Md Shah, U.K., Samsu Baharudin, A., Zakaria, R., 2016. Direct utilization of kitchen waste for bioethanol production by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using locally isolated yeast. *Int. J. Green Energy* 13, 248–259. <https://doi.org/10.1080/15435075.2014.940958>
- Hafid, H.S., Nor Aini, A.R., Mokhtar, M.N., Talib, A.T., Baharuddin, A.S., Umi Kalsom, M.S., 2017a. Over production of fermentable sugar for bioethanol production from carbohydrate-rich Malaysian food waste via sequential acid-enzymatic hydrolysis pretreatment. *Waste Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.017>
- Hafid, H.S., Rahman, N.A.A., Shah, U.K.M., Baharuddin, A.S., Ariff, A.B., 2017b. Feasibility of using kitchen waste as future substrate for bioethanol production: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.071>
- Han, S.K., Shin, H.S., 2002. Enhanced acidogenic fermentation of food waste in a continuous-flow reactor. *Waste Manag. Res.* 20, 110–118. <https://doi.org/10.1177/0734242X0202000202>
- Han, Y., Green, H., Tao, W., 2020. Reversibility of propionic acid inhibition to anaerobic digestion: Inhibition kinetics and microbial mechanism. *Chemosphere* 255, 126840. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126840>
- Harikishan, S., 2008. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production, Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. <https://doi.org/10.1002/9780813804545>
- Hartmann, H., Ahring, B.K., 2006. Strategies for the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: an overview. *Water Sci. Technol.* 53, 7–22. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.231>
- Hartmann, H., Ahring, B.K., 2005. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of co-digestion with manure. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.02.001>
- Hassan, S.S., Williams, G.A., Jaiswal, A.K., 2018. Lignocellulosic Biorefineries in Europe: Current State and Prospects. *Trends Biotechnol.* xx, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.002>
- He, M., Sun, Y., Zou, D., Yuan, H., Zhu, B., Li, X., Pang, Y., 2012. Influence of Temperature on Hydrolysis Acidification of Food Waste. *Procedia Environ. Sci.* 16, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.012>
- Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A., Brdjanovic, D., 2015. *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. *Water Intell. Online* 7, 9781780401867–9781780401867. <https://doi.org/10.2166/9781780401867>
- Higashiura, N., Hadano, H., Hirakawa, H., Matsutani, M., Takebe, S., Matsushita, K., Azuma, Y., 2014. Draft genomic DNA sequence of the facultatively methylotrophic bacterium *Acidomonas methanolica* type strain MB58. *FEMS Microbiol. Lett.* 351, 9–13. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12357>
- Hirayama, S., Ueda, R., 2004. Production of optically pure d-lactic acid by *Nannochlorum* sp. 26A4. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004 1191 119, 71–77. <https://doi.org/10.1385/ABAB:119:1:71>
- Ilmén, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P., Penttilä, M., 2007. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 117–123. <https://doi.org/10.1128/AEM.01311-06/ASSET/7F8CE546-5274-40B5-A3B0-BAAD8DA27617/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0010773930004.JPEG>
- Instituto para la Diversificación Ahorro de la Energía, 2007. *Biomasa Digestores anaerobios Biomasa Digestores anaerobios Energía de la Biomasa*.
- Jankowska, E., Chwiałkowska, J., Stodolny, M., Oleskiewicz-Popiel, P., 2017. Volatile fatty acids production during mixed culture fermentation – The impact of substrate complexity and pH. *Chem. Eng. J.* 326, 901–910. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.021>
- Jankowska, E., Chwiałkowska, J., Stodolny, M., Oleskiewicz-Popiel, P., 2015. Effect of pH and retention time on volatile fatty acids production during mixed culture fermentation. *Bioresour. Technol.* 190, 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.096>
- Jenkins, B.M., Williams, R.B., Adams, L.S., Peace, C., Petersen, G., Leary, M., 2008. *Current Anaerobic*

- Digestion Technologies Used for Treatment of Municipal Organic Solid Waste. *Calif. Integr. Waste Manag.* 125, 0.
- Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C., Li, M., 2013. Volatile fatty acids production from food waste: Effects of pH, temperature, and organic loading rate. *Bioresour. Technol.* 143, 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.025>
- Jiménez-Ocampo, U.E., Vargas, A., Moreno-Andrade, I., 2021. Methane production from food waste using a feedback control strategy in a sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* 84, 1969–1980. <https://doi.org/10.2166/WST.2021.370>
- John, I., Muthukumar, K., Arunagiri, A., 2017. A review on the potential of citrus waste for D-Limonene, pectin, and bioethanol production. *Int. J. Green Energy* 14, 599–612. <https://doi.org/10.1080/15435075.2017.1307753>
- Jojoa-Unigarro, G.D., González-Martínez, S., 2021. Kinetic analysis of the methanization of the byproducts from OFMSW fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1002/JCTB.6921>
- Jørgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 6, 119–134. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Kandler, O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49, 209–224. <https://doi.org/10.1007/BF00399499>
- Kandyliis, P., Bekatorou, A., Pissaridi, K., Lappa, K., Dima, A., Kanellaki, M., Koutinas, A.A., 2016. Acidogenesis of cellulosic hydrolysates for new generation biofuels. *Biomass and Bioenergy* 91, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.006>
- Kant, S., Yang, B.Y., 2017. Microbial production of volatile fatty acids : current status and future perspectives. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 16, 327–345. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9431-4>
- Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 569–582. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2005.09.015>
- Kazemi, S.P.H., Dehghani, M., Guillemin, G.J., Gupta, V.K., Lam, S.S., Aghbashlo, M., Tabatabaei, M., 2022. Bioethanol production from food wastes rich in carbohydrates. *Curr. Opin. Food Sci.* 43, 71–81. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2021.11.001>
- Khanal, S.K., 2008. *Anaerobic biotechnology for bioenergy production : principles and applications.* Wiley-Blackwell.
- Klinke, T., Kneist, S., De Soet, J.J., Kuhlisch, E., Mauersberger, S., Förster, A., Klimm, W., 2009. Acid Production by Oral Strains of *Candida albicans* and *Lactobacilli*. *Caries Res.* 43, 83–91. <https://doi.org/10.1159/000204911>
- Komemoto, K., Lim, Y.G., Nagao, N., Onoue, Y., Niwa, C., Toda, T., 2009. Effect of temperature on VFA's and biogas production in anaerobic solubilization of food waste. *Waste Manag.* 29, 2950–2955. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.07.011>
- Kvesitadze, G., Sadunishvili, T., Dudaori, T., Zakariashvili, N., Partskhaladze, G., Ugrekhelidze, V., Tsiklauri, G., Metreveli, B., Jobava, M., 2012. Two-stage anaerobic process for bio-hydrogen and bio-methane combined production from biodegradable solid wastes. *Energy* 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2011.08.039>
- Labatut, R.A., Angenent, L.T., Scott, N.R., 2011. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. *Bioresour. Technol.* 102, 2255–2264. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.035>
- Lata, K., Rajeshwari, K. V, Pant, D.C., Kishore, V.V.N., 2002. Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of tea and vegetable market wastes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18 18, 589–592.
- Lavagnolo, M.C., Giroto, F., Rafieenia, R., Danieli, L., Alibardi, L., 2018. Two-stage anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste e Effects of process conditions during batch tests. *Renew. Energy* 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.039>
- Lawrence, A.W., Mccarty, P.L., 1969. Kinetics of Methane Fermentation in Anaerobic Treatment, *Journal Water Pollution Control Federation.*
- Lay, C.H., Sung, I.Y., Kumar, G., Chu, C.Y., Chen, C.C., Lin, C.Y., 2012. Optimizing biohydrogen production from mushroom cultivation waste using anaerobic mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 16473–16478. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2012.02.135>
- Lecker, B., Illi, L., Lemmer, A., Oechsner, H., 2017. Biological hydrogen methanation – A review. *Bioresour. Technol.* 245, 1220–1228. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.08.176>

- Lee, K.B., 2005. Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media. *Process Biochem.* 40, 1559–1564. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2004.04.017>
- Lee, Y.J., Miyahara, T., Noike, T., 2002. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 694–698. <https://doi.org/10.1002/JCTB.623>
- Li, A., Antizar-Ladislao, B., Khraisheh, M., 2007. Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bioethanol production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 30, 189–196. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0114-3>
- Li, W., Guo, J., Cheng, H., Wang, W., Dong, R., 2017. Two-phase anaerobic digestion of municipal solid wastes enhanced by hydrothermal pretreatment: Viability, performance and microbial community evaluation. *Appl. Energy* 189, 613–622. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2016.12.101>
- Li, X., Chen, Y., Zhao, S., Chen, H., Zheng, X., Luo, J., Liu, Y., 2015. Efficient production of optically pure l-lactic acid from food waste at ambient temperature by regulating key enzyme activity. *Water Res.* 70, 148–157. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.11.049>
- Li, Y., Jin, Y., Borrión, A., Li, H., Li, J., 2017. Effects of organic composition on mesophilic anaerobic digestion of food waste. *Bioresour. Technol.* 244, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.006>
- Liang, S., Gliniewicz, K., Gerritsen, A.T., McDonald, A.G., 2016. Analysis of microbial community variation during the mixed culture fermentation of agricultural peel wastes to produce lactic acid. *Bioresour. Technol.* 208, 7–12. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.02.054>
- Liang, S., McDonald, A.G., Coats, E.R., 2014. Lactic acid production with undefined mixed culture fermentation of potato peel waste. *Waste Manag.* 34, 2022–2027. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2014.07.009>
- Lim, S.J., Kim, B.J., Jeong, C.M., Choi, J. dal rae, Ahn, Y.H., Chang, H.N., 2008. Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. *Bioresour. Technol.* 99, 7866–7874. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.028>
- Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0229-x>
- Lindner, J., Zielonka, S., Oechsner, H., Lemmer, A., 2014. Effect of different pH-values on process parameters in two-phase anaerobic digestion of high-solid substrates. *Environ. Technol.* 36, 198–207. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.941944>
- Loizidou, M., Alamanou, D.G., Sotiropoulos, A., Lytras, C., Mamma, D., Malamis, D., Kekos, D., 2017. Pilot Scale System of Two Horizontal Rotating Bioreactors for Bioethanol Production from Household Food Waste at High Solid Concentrations. *Waste and Biomass Valorization* 8, 1709–1719. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9900-6>
- López-Gómez, J.P., Alexandri, M., Schneider, R., Latorre-Sánchez, M., Coll Lozano, C., Venus, J., 2020. Organic fraction of municipal solid waste for the production of L-lactic acid with high optical purity. *J. Clean. Prod.* 247. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.119165>
- Lucifero, N., 2016. Food Loss and Waste in the EU Law between Sustainability of Well-being and the Implications on Food System and on Environment. *Agric. Agric. Sci. Procedia* 8, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.022>
- Luo, H., Yang, R., Zhao, Y., Wang, Z., Liu, Z., Huang, M., Zeng, Q., 2018. Recent advances and strategies in process and strain engineering for the production of butyric acid by microbial fermentation. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.007>
- Ma, X., Yu, M., Song, N., Xu, B., Gao, M., Wu, C., Wang, Q., 2020. Effect of ethanol pre-fermentation on organic load rate and stability of semi-continuous anaerobic digestion of food waste. *Bioresour. Technol.* 299, 122587. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122587>
- Majhi, B.K., Jash, T., 2016. Two-phase anaerobic digestion of vegetable market waste fraction of municipal solid waste and development of improved technology for phase separation in two-phase reactor. *Waste Manag.* 58, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.09.009>
- Mäki-Arvela, P., Simakova, I.L., Salmi, T., Murzin, D.Y., 2014. Production of lactic acid/lactates from biomass and their catalytic transformations to commodities. *Chem. Rev.* 114, 1909–1971. https://doi.org/10.1021/CR400203V/SUPPL_FILE/CR400203V_SI_001.PDF
- Mata-Alvarez, J., 2002. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. IWA publishing.
- Mataix Verdú, J., 2009. *Nutrición y alimentación humana II. Situaciones fisiológicas y patológicas*, 2nd ed.
- Maurus, K., Ahmed, S., Kazda, M., 2020. Beneficial effects of intermittent feedstock management on biogas and methane production. *Bioresour. Technol.* 304, 123004. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123004>
- Moncada B, J., Aristizábal M, V., Cardona A, C.A., 2016. Design strategies for sustainable biorefineries.

- Biochem. Eng. J. 116, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.009>
- Moretto, G., Valentino, F., Pavan, P., Majone, M., Bolzonella, D., 2019. Optimization of urban waste fermentation for volatile fatty acids production. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.010>
- Murali, N., Fernandez, S., Ahring, B.K., 2017. Fermentation of wet-exploded corn stover for the production of volatile fatty acids. *Bioresour. Technol.* 227, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.012>
- Naik, G.P., Poonia, A.K., Chaudhari, P.K., 2021. Pretreatment of lignocellulosic agricultural waste for delignification, rapid hydrolysis, and enhanced biogas production: A review. *J. Indian Chem. Soc.* 98, 100147. <https://doi.org/10.1016/J.JICS.2021.100147>
- Nghiem, L.D., Köch, K., Bolzonella, D., Drewes, J.E., 2017. Full scale co-digestion of wastewater sludge and food waste: Bottlenecks and possibilities. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 72, 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.062>
- Nguyen, Q.D., Nguyen, T.V.L., Nguyen, T.T.D., Nguyen, N.N., 2022. Effects of different hydrocolloids on the production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* using Hestrin–Schramm medium under anaerobic condition. *Bioresour. Technol. Reports* 17, 100878. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100878>
- Nielfa, A., Cano, R., Vinot, M., Fernández, E., Fdz-Polanco, M., 2015. Anaerobic digestion modeling of the main components of organic fraction of municipal solid waste. *Process Saf. Environ. Prot.* 94, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2015.02.002>
- Nilsson, P.S., Hellman, E., Moestedt, J., 2018. The effect of temperature, storage time and collection method on biomethane potential of source separated household food waste. *Waste Manag.* 71, 636–643. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2017.05.034>
- Ohara, H., 2003. Biorefinery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 474–477. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1383-7>
- Ohkouchi, Y., Inoue, Y., 2006. Direct production of l(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. *Bioresour. Technol.* 97, 1554–1562. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2005.06.004>
- Okamoto, M., Miyahara, T., Mizuno, O., Noike, T., 2000. Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes. *Water Sci. Technol.* 41, 25–32. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0052>
- Ossa-Arias, M. del M., 2020. Efecto de la carga orgánica sobre la producción de metano y características del digestato durante la digestión anaerobia de FORSU. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pagana, I., Morawicki, R., Hager, T.J., 2014. Lactic acid production using waste generated from sweet potato processing. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 641–649. <https://doi.org/10.1111/IJFS.12347>
- Panesar, P.S., Kaur, S., 2015. Bioutilisation of agro-industrial waste for lactic acid production. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 2143–2151. <https://doi.org/10.1111/IJFS.12886>
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O.S., Daniel, H.M., De Vuyst, L., 2013. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa. *Food Microbiol.* 35, 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>
- Pavan, P., Battistoni, P., Cecchi, F., Mata-Alvarez, J., 2000. Two-phase anaerobic digestion of source sorted OFMSW (organic fraction of municipal solid waste): performance and kinetic study. *Water Sci. Technol.* 41, 111–118.
- Peinemann, J.C., Demichelis, F., Fiore, S., Pleissner, D., 2019. Techno-economic assessment of non-sterile batch and continuous production of lactic acid from food waste. *Bioresour. Technol.* 289, 121631. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121631>
- Pipyn, P., Verstraete, W., 1981. Lactate and ethanol as intermediates in two-phase anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1145–1154. <https://doi.org/10.1002/bit.260230521>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rajeshwari, K. V., Lata, K., Pant, D.C., Kishore, V.V.N., 2001. A novel process using enhanced acidification and a UASB reactor for biomethanation of vegetable market waste, *Waste Manage Res.*
- Rao, M.S., Singh, S.P., 2004. Bioenergy conversion studies of organic fraction of MSW: Kinetic studies and gas yield-organic loading relationships for process optimisation. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.013>

- Ren, N., Wang, B., Huang, J.C., 1997. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 54, 428–433. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970605\)54:5<428::AID-BIT3>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970605)54:5<428::AID-BIT3>3.0.CO;2-G)
- Ren, Y., Yu, M., Wu, C., Wang, Q., Gao, M., Huang, Q., Liu, Y., 2018. A comprehensive review on food waste anaerobic digestion: Research updates and tendencies. *Bioresour. Technol.* 247, 1069–1076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.109>
- Roati, C., Fiore, S., Ruffino, B., Marchese, F., Novarino, D., Zanetti, M.C., 2012. Preliminary Evaluation of the Potential Biogas Production of Food-Processing Industrial Wastes, *American Journal of Environmental Sciences*.
- Ruengruglikit, C., Hang, Y.D., 2003. l(+)-Lactic acid production from corncobs by *Rhizopus oryzae* NRRL-395. *LWT - Food Sci. Technol.* 36, 573–575. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00062-8](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00062-8)
- Saha, B.C., Qureshi, N., Nichols, N.N., Cotta, M. a., 2010. Fuel Ethanol Production from Agricultural Residues: Current Status and Future Prospects. *J. Biotechnol.* 150, 12–13. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.08.048>
- Sakai, S., Ehara, M., Tseng, I.-C., Yamaguchi, T., Brä, S.L., Cadillo-Quiroz, H., Zinder, S.H., Imachi, H., 2012. *Methanolinea mesophila* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil, and proposal of the archaeal family *Methanoregulaceae* fam. nov. within the order *Methanomicrobiales*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1389–1395. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.035048-0>
- Sawatdeenarunat, C., Nguyen, D., Surendra, K.C., Shrestha, S., Rajendran, K., Oechsner, H., Xie, L., Khanal, S.K., 2016. Anaerobic biorefinery: Current status, challenges, and opportunities. *Bioresour. Technol.* 215, 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.074>
- Sawatdeenarunat, C., Surendra, K.C., Takara, D., Oechsner, H., Khanal, S.K., 2015. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 178, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.103>
- Schievano, A., Imporzano, G.D., Malagutti, L., Fragali, E., Ruboni, G., Adani, F., 2010. Bioresource Technology Evaluating inhibition conditions in high-solids anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Bioresour. Technol.* 101, 5728–5732. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.032>
- Sekoai, P.T., Ghimire, A., Ezeokoli, O.T., Rao, S., Ngan, W.Y., Habimana, O., Yao, Y., Yang, P., Yiu Fung, A.H., Yoro, K.O., Daramola, M.O., Hung, C.H., 2021. Valorization of volatile fatty acids from the dark fermentation waste Streams-A promising pathway for a biorefinery concept. *Renew. Sustain. Energy Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110971>
- Sekoai, P.T., Mhlongo, S.I., Ezeokoli, O.T., 2019. Progress in the development of methods used for the abatement of microbial contaminants in ethanol fermentations: a review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 2019 184 18, 795–821. <https://doi.org/10.1007/S11157-019-09511-2>
- Serrano-Meza, A., Garzón-Zúñiga, M.A., Moreno-Andrade, I., Barragán-Huerta, B.E., Estrada-Arriaga, E.B., Viguera-Cortés, J.M., García-Olivares, J.G., 2022. Hydrogen and Methane Production from Tequila Vinasses in a Novel Hybrid Reactor Containing Biofilm and Suspended Biomass. *Bioenergy Res.* 1, 3. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10361-6>
- Setiyawan, 2013. Perspectives for Anaerobic Digestion. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1689–1699.
- Shen, D., Yin, J., Yu, X., Wang, M., Long, Y., Shentu, J., Chen, T., 2017. Acidogenic fermentation characteristics of different types of protein-rich substrates in food waste to produce volatile fatty acids. *Bioresour. Technol.* 227, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.048>
- Shen, F., Yuan, H., Pang, Y., Chen, S., Zhu, B., Zou, D., Liu, Y., Ma, J., Yu, L., Li, X., 2013a. Performances of anaerobic co-digestion of fruit & vegetable waste (FVW) and food waste (FW): Single-phase vs. two-phase. *Bioresour. Technol.* 144, 80–85. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.06.099>
- Shen, F., Yuan, H., Pang, Y., Chen, S., Zhu, B., Zou, D., Liu, Y., Ma, J., Yu, L., Li, X., 2013b. Performances of anaerobic co-digestion of fruit & vegetable waste (FVW) and food waste (FW): Single-phase vs. two-phase. *Bioresour. Technol.* 144, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.099>
- Shin, H.S., Youn, J.H., Kim, S.H., 2004. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int. J. Hydrogen Energy* 29, 1355–1363. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.09.011>
- Song, L., Yang, D., Liu, R., Liu, S., Dai, L., Dai, X., 2021. Microbial production of lactic acid from food waste: Latest advances, limits, and perspectives. *Bioresour. Technol.* 345, 126052. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126052>
- Soomro, A.F., Abbasi, I.A., Ni, Z., Ying, L., Liu, J., 2020. Influence of temperature on enhancement of volatile

- fatty acids fermentation from organic fraction of municipal solid waste: Synergism between food and paper components. *Bioresour. Technol. J.* 304, 122980. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122980>
- Sridevi, V.D., Rema, • T, Srinivasan, • S V, 2015. Studies on biogas production from vegetable market wastes in a two-phase anaerobic reactor. *Clean Techn. Env. Policy* 17, 1689–1697. <https://doi.org/10.1007/s10098-014-0883-8>
- Strazzeria, G., Battista, F., Garcia, N.H., Frison, N., Bolzonella, D., 2018. Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *J. Environ. Manage.* 226, 278–288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.039>
- Swings, J., De Ley, J., 1977. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.*
- Taghizadeh-Alisarai, A., Motevali, A., Ghoobadian, B., 2019. Ethanol production from date wastes: Adapted technologies, challenges, and global potential. *Renew. Energy.* <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.048>
- Tan, J., Abdel-Rahman, M.A., Sonomoto, K., 2017. Biorefinery-Based Lactic Acid Fermentation: Microbial Production of Pure Monomer Product. *Adv. Polym. Sci.* 279, 27–66. https://doi.org/10.1007/12_2016_11
- Tang, J., Wang, X.C., Hu, Y., Zhang, Y., Li, Y., 2017. Effect of pH on lactic acid production from acidogenic fermentation of food waste with different types of inocula. *Bioresour. Technol.* 224, 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.111>
- Tatton, M.J., Archer, D.B., Powell, G.E., Parker, M.L., 1989. Methanogenesis from Ethanol by Defined Mixed Continuous Cultures Downloaded from, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.
- Thygesen, A., Tsapekos, P., Alvarado-Morales, M., Angelidaki, I., 2021. Valorization of municipal organic waste into purified lactic acid. *Bioresour. Technol.* 342, 125933. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125933>
- Tonanzi, B., Gallipoli, A., Gianico, A., Montecchio, D., Pagliaccia, P., Di Carlo, M., Rossetti, S., Braguglia, C.M., 2018. Long-term anaerobic digestion of food waste at semi-pilot scale: Relationship between microbial community structure and process performances. *Biomass and Bioenergy* 118, 55–64. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2018.08.001>
- Tyagi, V.K., Fdez-Güelfo, L.A., Zhou, Y., Álvarez-Gallego, C.J., Garcia, L.I.R., Ng, W.J., 2018. Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges. *Renew. Sustain. Energy Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.051>
- Uncu, O.N., Cekmecelioglu, D., 2011. Cost-effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology. *Waste Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.12.007>
- Van der Woude, A.D., Angermayr, S.A., Puthan Veetil, V., Osnato, A., Hellingwerf, K.J., 2014. Carbon sink removal: Increased photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803 in a glycogen storage mutant. *J. Biotechnol.* 184, 100–102. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2014.04.029>
- Vasmara, C., Marchetti, R., Carminati, D., 2021. Wastewater from the production of lactic acid bacteria as feedstock in anaerobic digestion. *Energy* 229, 120740. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.120740>
- Venkata Mohan, S., 2009. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 7460–7474. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2009.05.062>
- Wainaina, S., Kumar Awasthi, M., Taherzadeh, M.J., 2019. Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. *Bioengineered* 10, 437–458. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>
- Wang, C., Zada, B., Wei, G., Kim, S.W., 2017. Metabolic engineering and synthetic biology approaches driving isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* 241, 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.168>
- Wang, Q., Zhao, X., Chamu, J., Shanmugam, K.T., 2011. Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium. *Bioresour. Technol.* 102, 8152–8158. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.06.003>
- Wang, X., Wang, Q.H., Wang, X.Q., Ma, H.Z., 2011. Effect of different fermentation parameters on lactic acid production from kitchen waste by *Lactobacillus* TY50. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 25, 433–438.
- Wang, Y., Tashiro, Y., Sonomoto, K., 2015. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 10–18. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2014.06.003>
- Wang, Y., Yang, Z., Qin, P., Tan, T., 2014. Fermentative L-(+)-lactic acid production from defatted rice bran. *RSC Adv.* 4, 8907–8913. <https://doi.org/10.1039/C3RA46140H>
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., Meng, L., 2009. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield

- and methanogenic bacteria. *biomass and bioenergy* 848–853.
- Wang, Y.F., Tan, L., Wang, T., Sun, Z.Y., Tang, Y.Q., Kida, K., 2017. Production of ethanol from kitchen waste by using flocculating *Saccharomyces cerevisiae* KF-7. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 38, 316–325. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1192224>
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Ryu, H.-W., 2006. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technol. Biotechnol* 44, 163–172.
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G., 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Prog.* 19, 1109–1117. <https://doi.org/10.1021/bp0340180>
- Wu, C., Wang, Q., Yu, M., Zhang, X., Song, N., Chang, Q., Gao, M., Sonomoto, K., 2015. Effect of ethanol pre-fermentation and inoculum-to-substrate ratio on methane yield from food waste and distillers' grains. *Appl. Energy* 155, 846–853. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.04.081>
- Wu, Y., Ma, H., Zheng, M., Wang, K., 2015. Lactic acid production from acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. *Bioresour. Technol.* 191, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.100>
- Wu, Y., Wang, C., Liu, X., Ma, H., Wu, J., Zuo, J., Wang, K., 2016. A new method of two-phase anaerobic digestion for fruit and vegetable waste treatment. *Bioresour. Technol.* 211, 16–23. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.03.050>
- Wu, Y., Wang, C., Zheng, M., Zuo, J., Wu, J., Wang, K., Yang, B., 2017. Effect of pH on ethanol-type acidogenic fermentation of fruit and vegetable waste. *Waste Manag.* 60, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.09.033>
- Xiao, N., Chen, Y., Chen, A., Feng, L., 2014. Enhanced Bio-hydrogen Production from Protein Wastewater by Altering Protein Structure and Amino Acids Acidification Type. *Sci. Rep.* 4, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep03992>
- Yaashikaa, P.R., Senthil Kumar, P., Varjani, S., 2022. Valorization of agro-industrial wastes for biorefinery process and circular bioeconomy: A critical review. *Bioresour. Technol.* 343, 960–8524. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126126>
- Yamaguchi, M., Minami, K., Tanimoto, Y., Okamura, K., 1989. Effects of Volatile Fatty Acids on Methanogenesis of Methanol and of Pregrowth with Methanol on Acetate Utilization by Methanogens, *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING*.
- Yan, S., Li, J., Chen, X., Wu, J., Wang, P., Ye, J., Yao, J., 2011a. Enzymatical hydrolysis of food waste and ethanol production from the hydrolysate. *Renew. Energy.* <https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.08.020>
- Yan, S., Wang, P., Zhai, Z., Yao, J., 2011b. Fuel ethanol production from concentrated food waste hydrolysates in immobilized cell reactors by *Saccharomyces cerevisiae* H058. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 731–738. <https://doi.org/10.1002/jctb.2581>
- Yang, G., Zhang, P., Zhang, G., Wang, Y., Yang, A., 2015. Degradation properties of protein and carbohydrate during sludge anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 192, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.076>
- Yang, Y.-Q., Shen, D.-S., Li, N., Xu, D., Long, Y.-Y., Lu, X.-Y., 2013. Co-digestion of kitchen waste and fruit-vegetable waste by two-phase anaerobic digestion. *Env. Sci Pollut Res* 20, 2162–2171. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1414-y>
- Yang, Y., Chen, Q., Guo, J., Hu, Z., 2015. Kinetics and methane gas yields of selected C1 to C5 organic acids in anaerobic digestion. *Water Res.* 87, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.012>
- Yin, J., Yu, X., Wang, K., Shen, D., 2016. Acidogenic fermentation of the main substrates of food waste to produce volatile fatty acids. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 21713–21720. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.094>
- Yu, M., Gao, M., Wang, L., Ren, Y., Wu, C., Ma, H., Wang, Q., 2018a. Kinetic modelling and synergistic impact evaluation for the anaerobic co-digestion of distillers' grains and food waste by ethanol pre-fermentation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 30281–30291. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3027-6>
- Yu, M., Gao, M., Wang, L., Ren, Y., Wu, C., Ma, H., Wang, Q., 2018b. Kinetic modelling and synergistic impact evaluation for the anaerobic co-digestion of distillers' grains and food waste by ethanol pre-fermentation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 30281–30291. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3027-6>
- Zamri, M.F.M.A., Hasmady, S., Akhiar, A., Ideris, F., Shamsuddin, A.H., Mofijur, M., Rizwanul Fattah, I.M., Mahlia, T.M.I., 2020. A comprehensive review on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 137, 110637. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110637>
- Zhang, B., Zhang, L.-L., Zhang, S.-C., Shi, H.-Z., Cai, W.-M., 2005a. The Influence of pH on Hydrolysis and Acidogenesis of Kitchen Wastes in Two-phase Anaerobic Digestion. *Environ. Technol.* 26, 329–340.

- <https://doi.org/10.1080/09593332608618563>
- Zhang, B., Zhang, L.-L., Zhang, S.-C., Shi, H.-Z., Cai, W.-M., 2005b. The Influence of pH on Hydrolysis and Acidogenesis of Kitchen Wastes in Two-phase Anaerobic Digestion. *Environ. Technol.* 26, 329–340. <https://doi.org/10.1080/09593332608618563>
- Zhang, W., Li, X., Zhang, T., Li, J., Lai, S., Chen, H., 2017. High-rate lactic acid production from food waste and waste activated sludge via interactive control of pH adjustment and fermentation temperature. *Chem. Eng. J.* 328, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.174>
- Zhang, W., Zhang, F., Li, Y.X., Jianxiong Zeng, R., 2019. Inhibitory effects of free propionic and butyric acids on the activities of hydrogenotrophic methanogens in mesophilic mixed culture fermentation. *Bioresour. Technol.* 272, 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.076>
- Zhang, Y., Banks, C.J., Heaven, S., 2012. Anaerobic digestion of two biodegradable municipal waste streams. *J. Environ. Manage.* <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.043>
- Zhao, J., Li, K., Wang, Y., Wang, J., Zhou, S., 2012. Effects of Different Neutralizing Agents on D-(-)-Lactic Acid Fermentation by *Escherichia coli* W. *Adv. Mater. Res.* 463–464, 845–849. <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/AMR.463-464.845>
- Zhao, N., Yu, M., Wang, Q., Song, N., Che, S., Wu, C., Sun, X., 2016. Effect of Ethanol and Lactic Acid Pre-fermentation on Putrefactive Bacteria Suppression, Hydrolysis, and Methanogenesis of Food Waste. *Energy Fuels* 2016, 30, 2982–2989. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b02779>
- Zhao, X., TIAN, T., ZHAO, J., WANG, Y., WANG, J., 2012. Fermentative Production of Optically Pure D-Lactic Acid by Genetically Engineered *Escherichia coli*. *Chinese J. Process Eng.* 6, 989–995.
- Zhao, Z., Zhang, Y., Yu, Q., Dang, Y., Li, Y., Quan, X., 2016. Communities stimulated with ethanol to perform direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate. *Water Res.* 102, 475–484. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2016.07.005>
- Zheng, J., Tashiro, Y., Wang, Q., Sonomoto, K., 2015. Recent advances to improve fermentative butanol production: Genetic engineering and fermentation technology. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2014.05.023>
- Zheng, M., Zheng, Mingyue, Wu, Y., Ma, H., Wang, K., 2015. Effect of pH on types of acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 20, 298–303. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0651-y>
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J.W.C., Zhang, Y., 2018. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.121>
- Zhou, Q., Shen, F., Yuan, H., Zou, D., Liu, Y., Zhu, B., Jaffu, M., 2014. Bioresource Technology Minimizing asynchronism to improve the performances of anaerobic co-digestion of food waste and corn stover. *Bioresour. Technol.* 166, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.074>
- Zhou, Z., Liu, D., Zhao, X., 2021. Conversion of lignocellulose to biofuels and chemicals via sugar platform: An updated review on chemistry and mechanisms of acid hydrolysis of lignocellulose. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 146, 111169. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2021.111169>
- Zou, H., Gao, M., Wang, Q., Zhang, W., Wu, C., Song, N., 2019. Metabolic analysis of efficient methane production from food waste with ethanol pre-fermentation using carbon isotope labeling. *Bioresour. Technol.* 291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121849>
- Zou, H., Gao, M., Yu, M., Zhang, W., Zhang, S., Wu, C., Tashiro, Y., Wang, Q., 2020. Methane production from food waste via mesophilic anaerobic digestion with ethanol pre-fermentation: Methanogenic pathway and microbial community analyses. *Bioresour. Technol.* 297, 122450. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122450>

Anexo 1. Análisis de varianza

Anexo 1.1. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra para producción específica del proceso.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
pH	1761,2848	2	880,642425	0,9830401	0,4495 1253	6,9442719
Tiempo de reacción	13084,766	2	6542,38323	7,3031063	0,0462 1724	6,9442719
Error	3583,3427	4	895,835681			
Total	18429,394	8				

Anexo 2.2. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra para Vmax de la fracción líquida

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F (Fc)
pH	2372355.664	2	1186177.832	9.93556	0.02807 8553	6.94427191
Tiempo de reacción (TR)	518532.5702	2	259266.2851	2.17164	0.22985 0665	6.94427191
Error	477548.6776	4	119387.1694			
Total	3368436.912	8				

Anexo 1.3. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra para Vmax de la fracción sólida

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F (Fc)
pH	68785.64035	2	34392.82017	5.22020	0.076729 452	6.94427191
Tiempo de reacción (TR)	95575.32325	2	47787.66162	7.25329	0.046716 265	6.94427191
Error	26353.66534	4	6588.416335			
Total	190714.6289	8				

Anexo 2. Concentraciones de metabolitos (mg_{DQO}/L) después de la metanización para las fracciones líquida y sólida del digestato fermentados a diferentes pH y tiempos de fermentación

Anexo 2.1 Concentración de ácido acético

pH	Digestato adicionado	Tiempo de fermentación (días)			Digestato adicionado	Tiempo de fermentación (días)		
		1	3	6		1	3	6
Fracción Líquida					Fracción sólida			
6	25 mL	NA	NA	1 NA	4 g	NA	NA	15
	50 mL	NA	NA	NA	8 g	NA	17	17
	100 mL	NA	22	NA	16 g	NA	33	39
	150 mL	NA	NA	NA	24 g	21	NA	13
5	25 mL	21	NA	20	4 g	35	NA	14
	50 mL	23	NA	22	8 g	29	20	24
	100 mL	NA	NA	NA	16 g	NA	35	19
	150 mL	24	NA	NA	24 g	21	NA	NA
4	25 mL	NA	NA	NA	4 g	36	40	33
	50 mL	NA	18	NA	8 g	36	NA	34
	100 mL	NA	17	13	16 g	33	NA	18
	150 mL	NA	20	NA	24 g	NA	NA	33

Anexo 2.2 Concentración de etanol

pH	Digestato adicionado	Tiempo de fermentación (días)			Digestato adicionado	Tiempo de fermentación (días)		
		1	3	6		1	3	6
Fracción Líquida					Fracción sólida			
6	25 mL	NA	NA	NA	4 g	NA	29	NA
	50 mL	NA	NA	25	8 g	NA	NA	15
	100 mL	NA	NA	13	16 g	22	NA	33
	150 mL	20	23	11	24 g	35	32	NA
5	25 mL	NA	NA	NA	4 g	NA	NA	37
	50 mL	NA	NA	NA	8 g	NA	30	20
	100 mL	23	NA	NA	16 g	NA	40	39
	150 mL	NA	18	16	24 g	NA	31	29
4	25 mL	NA	NA	NA	4 g	NA	NA	12
	50 mL	NA	19	10	8 g	NA	36	16
	100 mL	NA	NA	22	16 g	NA	17	35
	150 mL	NA	21	17	24 g	23	35	19

Anexo 2.3 Concentración de metanol

pH	Digestato adicionado	Tiempo de fermentación (días)			Digestato adicionado	Tiempo de fermentación (días)		
		1	3	6		1	3	6
		Fracción Líquida				Fracción sólida		
6	25 mL	NA	NA	18	4 g	25	31	20
	50 mL	NA	NA	13	8 g	34	16	10
	100 mL	NA	NA	13	16 g	35	23	32
	150 mL	10	25	11	24 g	26	27	10
5	25 mL	NA	NA	11	4 g	34	34	14
	50 mL	NA	22	5	8 g	19	28	33
	100 mL	NA	NA	21	16 g	27	26	38
	150 mL	14	19	23	24 g	17	35	34
4	25 mL	NA	NA	15	4 g	23	36	23
	50 mL	15	NA	13	8 g	34	11	28
	100 mL	NA	24	22	16 g	20	12	36
	150 mL	9	14	18	24 g	23	35	19

Anexo 2.4 Concentración de ácido butírico

pH	Digestato adicionado	Tiempo de fermentación (días)			Digestato adicionado	Tiempo de fermentación (días)		
		1	3	6		1	3	6
		Fracción Líquida				Fracción sólida		
6	25 mL	NA	NA	49	4 g	NA	NA	74
	50 mL	NA	32	NA	8 g	87	76	14
	100 mL	44	27	22	16 g	53	68	46
	150 mL	NA	35	55	24 g	19	57	51
5	25 mL	NA	49	37	4 g	NA	NA	39
	50 mL	NA	57	52	8 g	NA	43	54
	100 mL	56	50	19	16 g	87	NA	30
	150 mL	35	16	45	24 g	70	47	11
4	25 mL	NA	48	20	4 g	NA	NA	23
	50 mL	NA	5	50	8 g	69	82	72
	100 mL	48	26	19	16 g	75	72	53
	150 mL	12	52	18	24 g	62	77	16

Anexo 2.5 Concentración de ácido valérico.

pH	Digestato adicionado	Tiempo de fermentación (días)			Digestato adicionado	Tiempo de fermentación (días)		
		1	3	6		1	3	6
		Fracción Líquida				Fracción sólida		
6	25 mL	NA	NA	NA	4 g	NA	NA	NA
	50 mL	NA	NA	NA	8 g	92	NA	96
	100 mL	NA	38	NA	16 g	NA	81	NA
	150 mL	NA	NA	39	24 g	NA	92	NA
5	25 mL	NA	NA	NA	4 g	66	NA	96
	50 mL	NA	NA	NA	8 g	99	66	NA
	100 mL	NA	NA	49	16 g	NA	73	94
	150 mL	41	NA	35	24 g	NA	67	NA
4	25 mL	NA	NA	NA	4 g	84	NA	71
	50 mL	NA	NA	NA	8 g	NA	79	NA
	100 mL	NA	NA	51	16 g	74	NA	NA
	150 mL	NA	26	NA	24 g	61	NA	NA

Anexo 3. Productos de la investigación

Publicación de artículo titulado: **Kinetic analysis of the methanization of the byproducts from OFMSW fermentation**

Autores: German D Jojoa-Unigarro y Simón González-Martínez

Revista: Journal of Chemical Technology & Biotechnology

Fecha de publicación: 14 de septiembre de 2021

DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.6921>

En la siguiente página se anexa el documento completo.

Kinetic analysis of the methanization of the byproducts from OFMSW fermentation

German D Jojoa-Unigarro*  and Simón González-Martínez 



Abstract

BACKGROUND: During anaerobic digestion of wastes, volatile fatty acid (VFA) production has been studied, but little attention has been paid to alcohols and lactic acid. Thermodynamically, lactic acid and alcohols are better substrates to produce methane than other VFA. This research identified the metabolites produced during the fermentation of the organic fraction of municipal solid waste and studied their methanization in a second stage. Analysis of the methane production curves is provided and explained according to Gibb's free energy of acetogenesis and methanogenesis. Based on the Michaelis–Menten model, a kinetic analysis is presented.

RESULTS: The specific methane production of the identified acids and alcohols are acetic acid, 343 NL/kg_{COD}; ethanol, 296; methanol, 181; butyric acid, 108; lactic acid, 64. Lactic and butyric acids present a long adaptation phase followed by a fast and short methane production. Acetic acid and ethanol finished the reaction in less than 16 h. The highest methane production rates (V_{max}) were for butyric acid, methanol, and ethanol with 2136, 1934, and 1928 NmL L⁻¹, respectively. The best affinity (lowest K_m) values were for acetic and lactic acids and ethanol with 1.2, 1.9, and 2.0 g_{COD} L⁻¹.

CONCLUSION: Together, acetic acid and ethanol represent 92% of all fermentation products. No endogenous methane production was observed during the methanization from acetic acid and ethanol. The highest specific methane production belongs to acetic acid (98% of the theoretical) and the lowest corresponds to lactic acid. Except for propionic acid, the methanization of the selected substrates follows the Michaelis and Menten model.

© 2021 Society of Chemical Industry (SCI).

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: ethanol; lactic acid; fermentation; methanization; volatile fatty acids; anaerobic digestion; Michaelis Menten kinetic

INTRODUCTION

Biological methane production through anaerobic digestion is a ripe technology. It is essential in wastewater treatment, sludge stabilization, and in the treatment of organic solid wastes and energetic crops as a renewable energy resource.^{1–3} The whole anaerobic digestion degradation process is divided into four consecutive biological processes⁴: (i) the hydrolysis of complex organic molecules to soluble monomers takes place in the first step; (ii) acidogenesis or fermentation is the process by which the soluble monomers from hydrolysis are converted to alcohols, volatile fatty acids (VFA) — namely acetic, propionic, and butyric acids — along with CO₂ and hydrogen^{5,6}; (iii) acetogenesis is the step where several of the previously produced VFA and alcohols are converted into acetate, which is an essential molecule used by methanogens as substrate; and (iv) methanogenesis is the final step where different archaea can use acetate, CO₂, and hydrogen to produce methane as a final product (Fig. 1).⁷

Most of the literature deals with VFA formation, and little interest is shown in lactic acid and alcohol formation.⁸ Acetate is formed as a fermentation product, and it is an essential intermediary for methane production. During acidogenesis or fermentation, different volatile fatty acids (VFA) and alcohols are produced. Then, these VFA are converted into acetate because acetotrophic methanogens can use acetate as the primary substrate for methane production. When fermentation takes place, and no

methanogenesis is involved, acetogenesis does not take place and alcohols can accumulate.⁸ The simplified diagram proposed by Gujer and Zehnder shows the complexities of anaerobic digestion and the importance of acetogenesis (Fig. 1).⁹

Table 1 shows the reactions involved in methanogenesis, with a particular interest in the intermediary reactions and in acetogenesis.^{5,10–12} Acetotrophic methanization produces methane and bicarbonate; hydrogenotrophic methanization requires hydrogen, protons, and bicarbonate. Both pathways recover energy, making these reactions 'profitable' for the microorganisms. When ethanol is the substrate, acetogenesis is mandatory to produce methane. The reaction requires energy, and it is not spontaneous unless the hydrogen partial pressure (P_{H_2}) decreases because of hydrogenotrophic methanization. Figure 1 shows that Gibb's free energy for ethanol is relatively low, considering that the reaction becomes exergonic at relatively low P_{H_2} . When the P_{H_2} decreases, several reactions are feasible as the Gibb's free energy decreases

* Correspondence to: GD Jojoa-Unigarro, Institute of Engineering, National University of Mexico (Universidad Nacional Autónoma de México), Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, 04510. México. E-mail: gjojoau@ingen.unam.mx

Institute of Engineering, National University of Mexico (Universidad Nacional Autónoma de México), Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, 04510, Mexico

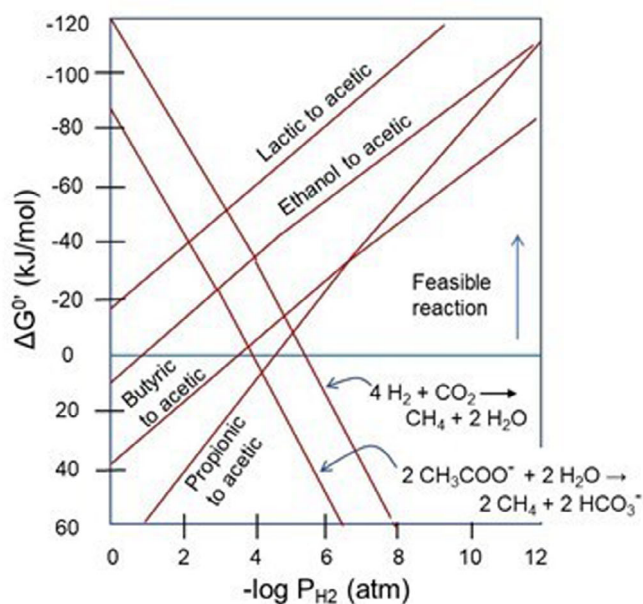
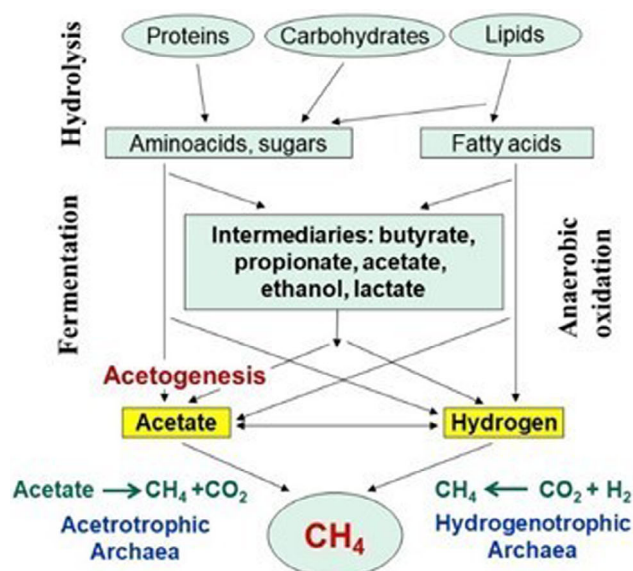


Figure 1. Main transformations during anaerobic digestion, modified, 9 and Gibb's free energy depending on hydrogen partial pressure for acetogenesis and methanogenesis, modified.

(Fig. 1). Like ethanol, acetogenesis of propionate is an endergonic reaction that requires lower P_{H_2} to become exergonic. Acetogenesis of butyrate is also an endergonic reaction when the hydrogen partial pressure is high.

Dissolved hydrogen accumulation makes the acetogenic reactions thermodynamically unfavorable, causing VFA accumulation, a subsequent decrease of the pH, and finally, methanogenesis inhibition. Under anaerobic conditions, H_2 is produced by acidogenic bacteria and is consumed in combination with CO_2 by homoacetogenic bacteria to produce acetate or hydrogenotrophs, both of which can go on to produce methane. This latter pathway represents about 30% of the CH_4 produced in anaerobic digestion. The local H_2 partial pressure can temporarily increase but must remain low enough to avoid inhibition of syntrophic acetogenic bacteria. When the hydrogen partial pressure (P_{H_2}) is

high, VFA production increases, causing a decrease of the pH. The hydrogen partial pressure cannot be directly determined or measured; it can be only calculated considering the involved reactions and the gas pressure in the reaction chamber. It was cite the work of the authors that calculate the hydrogen partial pressure.^{9,10,13,14}

Acetogenesis of ethanol, propionate, and butyrate require relatively low P_{H_2} to be possible. In anaerobic digestion systems, this is possible thanks to the activity of hydrogenotrophic archaea. When the hydrogen production rate from acetogenesis is higher than the consumption rate through hydrogenotrophic methanization, P_{H_2} increases, and the biochemical reactions are inhibited.^{4,9}

Acetogenesis from lactate can run in different directions. The preferable path is the formation of propionate and acetate, as these reactions allow the microorganisms to recover considerable

Table 1. Some important fermentation and methanization reactions.^{5,10-12}

Reaction	ΔG (kJ mol ⁻¹)
1. Acetotrophic methanization $2CH_3COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2HCO_3^-$	-62
2. Hydrogenotrophic methanization $4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135
3. Acetogenesis from ethanol $2C_2H_5COH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 2H^+ + 4H_2$ Further acetotrophic and hydrogenotrophic methanization is possible	+19
4. Acetogenesis from propionate $2CH_3CH_2COO^- + 6H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + H^+ + 6H_2$ Further acetotrophic and hydrogenotrophic methanization is possible	+152
5. Acetogenesis from lactate $2CH_3CHCOO^- \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 2H^+ + 4H_2$ Further acetotrophic and hydrogenotrophic methanization is possible	-8.4
6. Lactate generates propionate and acetate $2CH_3CHCOO^- \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 2H^+$ - Acetotrophic methanization is possible - No hydrogen, no hydrogenotrophic methane formation - Acetogenesis from propionate is possible	-165
7. Lactate generates butyrate $2CH_3CHCOO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 2H^+$ Acetogenesis from butyrate is possible	-56
8. Acetogenesis from butyrate $2CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$ - Further acetotrophic methanization is possible - No bicarbonate, no hydrogenotrophic methane formation	+48
9. Acetogenesis from methanol $8CH_3OH + 4HCO_3^- \rightarrow 6CH_3COO^- + 2H^+ + 12H_2O$ - Further acetotrophic methanization is possible - No bicarbonate, no hydrogenotrophic methane formation	-55
10. Methanogenesis from methanol $4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + HCO_3^- + H^+ + H_2O$ No hydrogen, no hydrogenotrophic methane formation	78

amounts of energy (-165 kJ mol^{-1}) (Table 1, reactions 5 to 7). The second choice is the formation of butyrate with -56 kJ mol^{-1} , and the third one is acetate with -8.4 kJ mol^{-1} . The last possible reaction is the only one producing hydrogen. The formation of ethanol and lactic acid in an acidogenic reactor is preferred over other metabolites when further methanization takes place; these two substances allow higher energy recovery to methanogens.¹⁰ The change in Gibb's free energy for a mol of produced methane from acetic acid is -31 kJ , -32.3 kJ from propionic acid, -32.7 kJ from butyric acid, -68.8 kJ from lactic acid, and -59.5 from ethanol; methanogens prefer lactic acid and ethanol as substrate.¹⁰

Kinetic determinations allow the calculation of specific methane production rates, among other reactions. Through modelling, the effects of concentration and other parameters can be analyzed and used to predict the behavior of reactions, such as methanization, when different substrates are present during anaerobic digestion. The Michaelis–Menten equation has been widely used to estimate the enzyme kinetic parameters from the reaction curves of substrates, known as the progress curve assay. However, this approach works in limited conditions. Even when this condition is satisfied, the identifiability of parameters is not always guaranteed and is often not verifiable in practice. The Michaelis and Menten model is simple and allows the analysis of systems with relatively low complexity, for example, when studying the kinetics of pure substrates degradation.^{15,16}

Classical studies explored the anaerobic degradation of acetate, propionate, and butyrate based on substrate concentration.^{17,18} The complexity of the metabolic pathways during anaerobic digestion does not allow simple analysis using Michaelis–Menten: simultaneous hydrolysis, fermentation, and methanization require more complex models. Methanization of pure substrates simplifies the kinetic analysis.¹⁹ This work proposes that Michaelis–Menten can be used to describe the kinetics of methanization of pure substrates and considers a two-step anaerobic digestion where hydrolysis and fermentation run separately from methanization. Thus, it is essential to know which are products from the fermentation to analyze their methanization. This work's main objective is to analyze the products from the fermentation of the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) and determine the methane production from each.

MATERIALS AND METHODS

The source-separated OFMSW was collected at the Coyoacán transfer station in Mexico City, where sampling was made according to the quartering method.²⁰ Approximately 100 kg from every one of 11 trucks were separated, and about one ton was thoroughly mixed using a skid-steer loader and shovels. After that, the quartering method was applied two times to reduce the amount to approximately 200 kg. Undesired materials, such as plastic bags, stones, and wood, were hand separated; the remaining 'clean' OFMSW was distributed in two-liter freezing bags and frozen at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. OFMSW was characterized for pH, total solids (TS), volatile solids (VS), chemical oxygen demand (COD), VFA, total Kjeldahl (TKN), and ammonia nitrogen ($\text{NH}_4\text{-N}$); organic nitrogen is the product of TKN minus $\text{NH}_4\text{-N}$. All determinations were made according to Standard Methods.²¹

OFMSW fermentation and metabolites production

A 2-L reactor was placed in a water bath at $35 \text{ }^\circ\text{C}$. To manage a 10% TS concentration, 400 mL OFMSW and 400 mL water were placed in the reactor without pH control. The fermentation was

allowed only with the native-occurring microorganisms in OFMSW. Nitrogen gas was used to drain the remaining air. Every three days, a 50 mL sample was taken. The sample was placed in a centrifuge at 3600 RPM for seven minutes, and the supernatant was filtered through a $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ filter membrane. The liquid was then analyzed for VFA and alcohols. The experiment ran for 9 days.

Methanization of pure metabolites

For the methanization of the products from OFMSW fermentation, an automatic biogas recording system was used (AMPTS II, Bioprocess Control, Lund, Sweden). This device consists of a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ temperature-controlled water bath where 15 reaction flasks can be simultaneously operated. The biogas production is recorded using a standard computer. The reaction flasks have a volume of 500 mL, and the volume reaction is 400 mL. Every flask is provided with an individual mixing device. Every flask is filled with 8 g VS anaerobic sludge from the wastewater treatment plant of a large brewery, 100 mL 0.4 M pH 7 phosphate buffer solution, and tap water to reach 400 mL. Before the tests, the anaerobic sludge was centrifuged (at 3600 RPM for 7 min) to remove soluble substances, mixed with tap water to the same original volume, and centrifuged again. The TS was adjusted according to the sludge characteristics and humidity ($78.12 \text{ g}_{\text{VS}} \text{ kg}^{-1}$). One mL of a micronutrient solution was added to every flask for better performance of the microorganisms.²² The concentrations of the micronutrients are, in mg/L, $\text{FeCl}_3\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2000; $\text{MnCl}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 2000; ZnCl_2 , 500; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 30; $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50; H_3BO_3 , 50; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 90; $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50; EDTA, 1000.

Nitrogen gas was allowed for 30 s to remove air from the head volume in every flask to guarantee anaerobic conditions.

Concentration adjustment in every reaction vessel

For every identified metabolite from OFMSW fermentation, solutions with five different concentrations were prepared.¹⁹ The selected concentrations were 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and $1.5 \text{ g}_{\text{COD}} \text{ L}^{-1}$. These concentrations prevent the test from being inhibited by excess substrate. The solutions were prepared to deliver the desired amount of every metabolite by injecting one mL in every flask, considering that the final volume was 400 mL. The injection was made through the port (septum) for biogas sampling. For methane measurement, time zero was when the substrate was injected into the reaction chamber.

Analytical determinations

Dissolved COD was determined after filtering the sample through $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ membrane, and pH was determined according to Standard Methods.²¹ Lactic acid was determined using the spectrophotometric method proposed by Borshchevskaya *et al.*²³ Methanol, ethanol, and VFA (acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric, valeric, and hexanoic acids) were determined using a gas chromatograph (HP 5890 GC System) equipped with flame ionization detector (FID), Stabilwax column - DA, with hydrogen as carrier at a flow rate of 2 mL min^{-1} . The injector and detector temperatures were the same, $220 \text{ }^\circ\text{C}$. The oven temperature ramp was programmed from 40 to $220 \text{ }^\circ\text{C}$ at $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. The sample was previously filtered using $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ cellulose filters, and the injected volume was 0.1 mL.

The biogas composition (CO_2 and CH_4) was determined using a gas chromatograph (SRI 8610c) equipped with a thermal conductivity detector, a stainless steel column packed with silica gel (8600-PK1A), and helium as carrier gas with a flow of 15.7 mL

min⁻¹. The oven and detector temperatures were 50 and 150 °C, respectively. The volume of the sample injected was 5 mL.

Kinetic analysis

The Michaelis and Menten hypothesis proposed a reaction where a substrate (S) reacts with an enzyme (E) to form an intermediary, called the enzyme-substrate complex, which in turn releases a product (P) regenerating the free enzyme (Eqn (1)). Under certain assumptions, Michaelis and Menten developed the corresponding equation (Eqn (2)). For the kinetic analysis in this research, the Michaelis and Menten model (Eqn (2)) was selected because it allows calculations using both the initial substrate concentration and the methane production rate as reaction rate.^{15,16} This is especially important when the substrate concentration over the reaction time cannot be accurately measured. Moreover, according to the mechanisms of methanogenesis, determining the substrate concentration over the reaction time cannot deliver reliable information because the acetogenesis represents several simultaneous possible reactions. In this research, the kinetics were determined using the product, methane, as the reaction parameter that can be confidently measured.



$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad (2)$$

where v = reaction rate (NmL_{CH₄}/L·d), V_{\max} = maximal possible reaction rate (NmL_{CH₄}/L·d), S = substrate concentration (g_{COD} L⁻¹), and K_m = Michaelis and Menten constant (g_{COD} L⁻¹).

The experimental results can be adjusted using the linearization of the Michaelis and Menten model proposed by Lineweaver and Burk (Eqn (2)).¹⁵

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (3)$$

By plotting $1/v$ versus $1/S$, it is possible to obtain a straight line with a slope equal to K_m/V_{\max} and an intercept corresponding to $1/V_{\max}$.

RESULTS AND DISCUSSION

OFMSW from the Coyoacán transfer station in Mexico City had 262 g kg⁻¹ total solids, 205 g kg⁻¹ volatile solids, 389 g_{COD} kg⁻¹, 17 g_{TKN}/kgTS, and 1.6 g_{NH₄-N}/kgTS.

OFMSW fermentation and products

Figure 2 shows the metabolites produced during OFMSW fermentation and their corresponding concentrations. The gas chromatograph was adjusted to detect methanol, ethanol, and acetic, propionic, butyric, isobutyric, valeric, isovaleric, hexanoic, and heptanoic acids. Separately, lactic acid was determined using a colorimetric procedure. The results in Fig. 2 show that only methanol, ethanol, and acetic, propionic, butyric, and lactic acids were present during the OFMSW fermentation. Traces of isobutyric, valeric, and isovaleric acids were also detected but only under the confidence limits of the chromatograph. At day zero, the fresh OFMSW had a total metabolite concentration of 7.9 g_{COD} L⁻¹, where lactic acid presents the highest relative concentration, followed by ethanol. On day three, the concentrations of all metabolites increased to a total of 29.5 g_{COD} L⁻¹, where ethanol predominates and is followed by lactic acid and ethanol. The

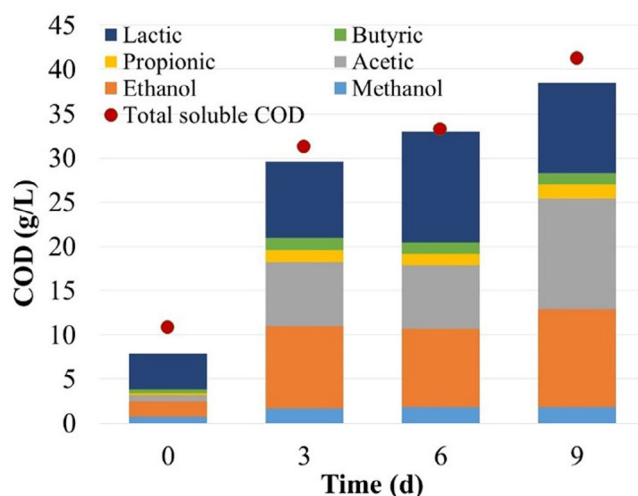


Figure 2. Metabolites production during OFMSW fermentation. No isobutyric, isovaleric, valeric, and hexanoic acids were detected.

relative concentrations of methanol and propionic and butyric acids remain around 1.5 g_{COD} L⁻¹. On day six, the relative concentrations of methanol, ethanol, and acetic, propionic, and butyric acids did not change compared to day three; only lactic acid increased significantly, from 8.6 to 12.5 g_{COD} L⁻¹. On day nine, significant changes were observed: acetic acid increased significantly as lactic acid decreased, and ethanol increased to 11.1 g_{COD} L⁻¹. The other metabolites did not show significant changes compared to day six.

Based on this experiment, the metabolites selected for the methanization, and later kinetic analysis, were the VFA acetic, propionic, and butyric; the alcohols were methanol and ethanol. Lactic acid also resulted in significant amounts as a product of OFMSW fermentation.

In Fig. 2, total soluble COD was used to corroborate the sum of the different detected metabolites. The minor differences between the sum of the metabolites and total soluble COD include the small concentrations of isobutyric, valeric, and isovaleric acids, together with traces of other unidentified substances.

Methane production

Figure 3 shows the methane production curves for the selected metabolites and at different substrate concentrations. The reactions were considered finished when the slope of the methane production curve changed drastically and showed a slope similar or close to the inoculum (blank). This is evident for acetic, lactic, butyric acids and ethanol, but not for propionic acid and methanol. The behavior of methanol and propionic acid curves did not allow a conclusive interpretation. The Supporting Information, Figure S1 shows the methane production curves where the blank was subtracted from the curves in Fig. 3. The Supporting Information, Figure S1 shows that ethanol and acetic acid are the only substrates where the endogenous methane production is not affected by the accumulated metabolites: the slopes of all curves after day 2 are parallel and horizontal. Table 3 shows the resulting accumulated metabolites after the reaction finished, and Fig. 4 shows the intercepts of the calculated endogenous methane production. Lactic acid presents a tendency similar to ethanol and acetic acid with less accurate values. The methanol curves continued producing CH₄ during the whole eight days of the experiment without reaching a recognizable pattern comparable to

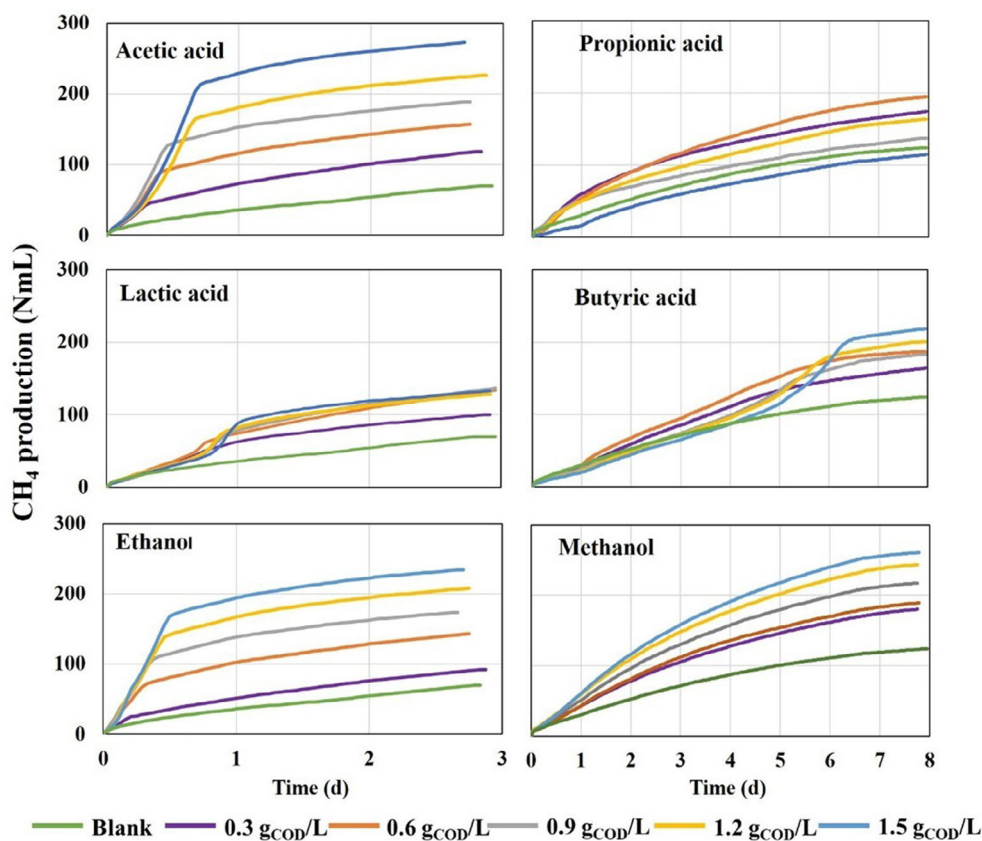


Figure 3. Methane production from different substrates at different initial concentrations.

endogenous CH_4 production. After subtracting the values of the inoculum, propionic acid curves resulted in negative values (substrate CH_4 production is lower than endogenous production) for the three highest concentrations. The lowest concentration, $0.3 \text{ g}_{\text{COD}} \text{ L}^{-1}$, is the only one showing a horizontal tendency after day three and, after Table 3, it is the only one showing complete substrate depletion with no metabolite accumulation. Butyric acid presents inhibition during the first four days for the highest concentrations; the total methane production is lower than the endogenous one, and, after day four, the system recovers, increasing the methane production and reaching parallel tendencies after day 6. Table 3 shows that acetogenesis took place and the resulting metabolites were, after day six, wholly depleted.

Except for propionic and butyric acids, CH_4 production increased with substrate concentration. In the following sections, the substrate-specific cases will be discussed.

Table 2 shows the COD distribution for acetogenesis when methane is simultaneously produced through acetotrophic and/or hydrogenotrophic pathways. Table 2 represents the balance for the acidogenesis of one gram COD of the different substrates and compares it with the average methane concentration in the biogas.

After the methanization of every substrate, the remaining soluble substances were determined to calculate the substrate removal rate and the products of the transformations during methanization. Table 3 synthesizes all the tests and the remaining and produced metabolites during the methanization of every substrate. The rows on the left side of Table 3 show the substrates' initial and final concentrations. The rows on the right side of Table 3 show the concentrations of the remaining substances

after methanization. It was important to detect the degree to which acetogenesis took place for every substrate and concentration, according to the reactions in Table 1.

The first line in Table 3 indicates that the blank, containing only washed inoculum, caused the solubilization of endogenous substances. The initial substrate concentration is zero, but the soluble COD at the end of the methanization was 224 mg L^{-1} . The final soluble COD for all other substrates is higher than the COD for the blank. Some of the values in Table 3 lie under the detection limits of the chromatographic determination, and they are indicated as such.

Acetic acid. The CH_4 production starts slowly, though immediately after the substrate injection in the flask, and it increases to reach a maximum slope after a few hours. The lag phase, or latency time, is described as the time required by the substrate to occupy the active sites in the enzyme or to saturate the enzyme surface. According to the substrate and enzyme complex characteristics, the reaction rate increases as the enzyme active sites get occupied.⁴ The methane production rate from acetic acid achieves a maximum identified as a straight line. During the methanization of acetate, no hydrogen is produced. If acetate is the only substrate available to methanogens, no hydrogenotrophic methane production can be expected (reaction 1 in Table 1). Thus, the biogas should have an equal concentration of 50% of CO_2 and CH_4 .

Table 2 shows that methane from acetic acid is produced through acetotrophic metabolism because no hydrogen was produced. Table 3 shows that acetic acid was consumed completely under all tested concentrations, and no other subproducts were produced. Dogan *et al.*²⁴ studied inhibitions and evaluated the

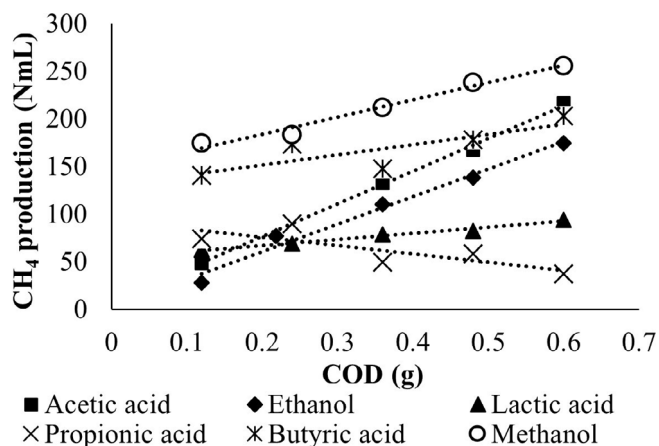


Figure 4. Methane production and COD fed for every substrate.

concentration of acetic acid on the specific methane production. Their results are like those obtained in this research: methane production starts fast, and, for the concentrations of 1 and 2 g L⁻¹, the reaction required 14 and 18 h, respectively. For 20 g L⁻¹, the reaction required 10 days.

Acetate is the reference substrate for methanization. Unlike the other tested substrates, acetic acid does not need to undergo acetogenesis before it is transformed into methane. Acetogenesis requires the energy indicated in Table 1 for the different reactions. This is the main point in this research: acetogenesis is the key for CH₄ production, and hydrogen partial pressure plays an important role (Fig. 1). Methanogens use acetic acid directly to produce CH₄ and carbon dioxide, and no energy is wasted in other transformations. Contrary to the expected 50% CO₂ and CH₄, the final CH₄ concentration in the biogas was 75% (Table 2). Theoretically, as the pH was near 7, the carbonate fraction in the liquid phase should be 0.2 as H₂CO₃, and the rest as bicarbonate. As methanization from acetate generates bicarbonate, the equilibrium is for bicarbonate, and only a small fraction would result in CO₂ and the remaining as CH₄.

Ethanol. The curves for ethanol do not present a lag phase, and, independently of the substrate concentrations, they start and finish as a straight line. The end of the methane production can be observed when the curves change the slope suddenly to follow an almost parallel path to the blank. During methane production, the slopes increased with the substrate concentration. The methane production from ethanol, corresponding to the highest concentration, finished in 12 h. Ethanol needs to undergo acetogenesis to be consumed by acetotrophic methanogens (reaction

3 in Table 1). According to the curves in Fig. 3, acetogenesis is fast, and no lag phase can be identified. As acetogenesis from ethanol produces hydrogen, hydrogenotrophic methanization can be expected but, as observed in Fig. 1, this process needs to be fast to avoid P_{H₂} becoming inhibiting. Table 3 shows that hydrogenotrophic methane formation consumed hydrogen quickly, resulting in almost total ethanol consumption; negligible amounts of acetate and isovaleric acid remained in the solution after the reaction finished. According to Table 2, two-thirds of the methane originated from acetotrophic methanization and one-third from hydrogenotrophic methanization. The 82% methane in the biogas from ethanol is higher than expected. Hydrogenotrophic archaea consume alkalinity, causing the carbonate equilibrium to displace, therefore reducing the CO₂ production.

Lactic acid. Methane production during the first hours is low (near the blank) and, after 16 h, the production significantly increased, and the reaction ends approximately after 24 h (Fig. 3). As shown in Table 1, acetogenesis from lactic acid can follow three different paths, forming propionate as an intermediate, which allows higher energy recovery. One of these reactions simultaneously produces acetic and propionic acids (Table 1). Acetic acid can be converted into methane and carbon dioxide fast, but propionic acid needs to undergo different acetogenesis reactions separately. Acetogenesis from propionic acid requires lots of energy. The energy gain to transform lactic acid into methane is low. Table 3 indicates that the conversion of lactic acid into methane depends on substrate concentration and that lactic acid can only be used entirely at very low concentrations. At higher concentrations, the reaction efficiency decreases, and several other metabolites are produced that cannot be transformed through acetogenesis during the allowed reaction time. This all means that the reaction is not efficient at higher substrate concentrations. Vasmara *et al.*²⁵ and Detman *et al.*²⁶ worked on treating wastewater rich in lactose and lactate and concluded that the acetogenesis of lactate produces propionic acid, causing inhibition in the biological system. Therefore, during the first 16 h, propionate formation dominates (reaction 6 in Table 1) and acetate is secondary, producing little CH₄ from acetate (Fig. 3). After 16 h, propionic acid was consumed, and CH₄ was produced solely from acetate. The 72% CH₄ in the biogas proved that CH₄ formation was acetotrophic (Table 2). The behavior of the CH₄ production curves from lactate in Yang *et al.*¹⁹ is similar to the ones in this research. They report that CH₄ from lactate had a pronounced adaptation phase lasting between 1.5 to 2 days, and that the CH₄ production after seven days was lower (65 NmL for 1.33 g_{COD} L⁻¹) than that of this research (133 NmL for 1.5 g_{COD} L⁻¹).

Table 2. Balance for the acidogenesis of one gram COD of different substrates

Substrate	Reaction in Table 1	Acetotrophic CH ₄ production	Hydrogenotrophic CH ₄ production	Methane in biogas (%)
Acetic acid	1	1	0	75 ± .2
Ethanol	3	0.67	0.33	82 ± 1
Lactic acid	5	0.59	0.41	72 ± 3
	6	0.22 to acetate	0	
		0.78 to propionate		
Propionic acid	4	0.57	0.43	75 ± 5
Butyric acid	8	0.8	0.2	75 ± 2
Methanol	10	1	0	83 ± 3

Table 3. COD and metabolites present after the methanization of the pure substrates

Substrate	Soluble COD (mg L ⁻¹)		Metabolites present after methanization (as soluble COD, mg L ⁻¹ , or removal, %)									
	Initial	final	Meth	Eth	Acet	Propi	i-Butyr	Butyr	i-Valer	Valer	Lactic	
Blank		224 ± 11	<10	<20	17 ± 2	19 ± 1	<10	14 ± 2	13 ± 1	23 ± 1	<50	
Methanol	300	233 ± 9	87%	<20	15 ± 3	25 ± 2	<10	27 ± 5	12 ± 6	41 ± 7	<50	
	600	262 ± 8	94%	<20	15 ± 4	13 ± 3	<10	10 ± 1	10 ± 1	13 ± 1	<50	
	900	373 ± 4	94%	<20	11 ± 1	11 ± 2	<10	<10	10 <	14 ± 2	<50	
	1200	376 ± 2	92%	<20	24 ± 7	19 ± 2	<10	15 ± 1	14 ± 2	20 ± 1	<50	
	1500	552 ± 4	89%	<20	28 ± 2	16 ± 1	<10	13 ± 1	12 ± 1	17 ± 3	<50	
Ethanol	300	245 ± 4	<10	>94%	10 ± 1	11 ± 1	<10	<10	<10	13 ± 1	<50	
	600	272 ± 6	<10	91%	<10	10 ± 2	<10	<10	<10	13 ± 1	<50	
	900	267 ± 7	<10	>97%	10 ± 1	11 ± 1	<10	<10	<10	14 ± 2	<50	
	1200	260 ± 2	<10	>98%	<10	<10	<10	<10	<10	10 ± 1	<50	
	1500	383 ± 4	<10	98%	<10	11 ± 4	<10	<10	<10	16 ± 3	<50	
Acetic acid	300	298 ± 8	<10	<20	>97%	<10	<10	<10	<10	<10	<50	
	600	269 ± 4	<10	<20	>98%	<10	<10	<10	<10	16 ± 3	<50	
	900	259 ± 6	<10	<20	>99%	<10	<10	<10	<10	10 ± 2	<50	
	1200	276 ± 4	<10	<20	99%	18 ± 9	<10	13 ± 6	17 ± 7	28 ± 14	<50	
	1500	271 ± 3	<10	<20	>99%	<10	<10	<10	<10	10 ± 2	<50	
Propionic acid	300	472 ± 10	<10	<20	12 ± 4	>97%	<10	<10	<10	13 ± 3	<50	
	600	811 ± 16	<10	<20	<10	88%	<10	<10	<10	11 ± 1	<50	
	900	1202 ± 16	<10	<20	21 ± 4	58%	40 ± 9	15 ± 1	153 ± 30	20 ± 1	<50	
	1200	1432 ± 22	<10	<20	41 ± 10	38%	56 ± 11	16 ± 7	126 ± 35	21 ± 7	<50	
	1500	1844 ± 16	<10	<20	21 ± 1	25%	70 ± 13	13 ± 4	142 ± 29	22 ± 8	<50	
Butyric acid	300	433 ± 8	<10	<20	20 ± 8	64 ± 9	<10	96%	21 ± 7	17 ± 8	<50	
	600	391 ± 22	<10	<20	<10	14 ± 3	<10	73%	<10	<10	<50	
	900	793 ± 19	<10	<20	<10	17 ± 5	40 ± 2	72%	16 ± 4	<10	<50	
	1200	943 ± 12	<10	<20	10 ± 2	19 ± 5	75 ± 6	69%	39 ± 7	<10	<50	
	1500	1070 ± 21	<10	<20	<10	17 ± 6	72 ± 11	67%	45 ± 8	<10	<50	
Lactic acid	300	227 ± 9	<10	15 ± 2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>83%	
	600	606 ± 9	<10	12 ± 2	0.01 <	15 ± 1	<10	<10	<10	<10	>92%	
	900	657 ± 11	<10	16 ± 2	<10	66 ± 2	<10	<10	15 ± 1	<10	>94%	
	1200	967 ± 16	<10	15 ± 4	<10	117 ± 9	<10	<10	23 ± 9	<10	>95%	
	1500	1186 ± 12	<10	78 ± 1	25 ± 9	456 ± 29	34 ± 13	<10	63 ± 19	13 ± 5	>97%	

The < symbol indicates that these values are under the sensitivity of the analytical method. Final COD is average of three repetitions. Meth, methanol; Eth, ethanol; Acet, acetic acid; Propi, propionic acid; Butyr, butyric acid; i-Butyr, isobutyric acid; Valer, valeric acid; i-Valer, isovaleric acid; Lactic, lactic acid. In gray shades it represents the percentage of metabolite removal.

Propionic acid. During the first 20 h, the CH₄ production rate was similar for all concentrations, except for the 1.5 g_{COD} L⁻¹ test, which presents a lower CH₄ production than the blank (Fig. 3). Acetogenesis from propionate has a positive ΔG° and produces the hydrogen (reaction 4 in Table 1) that must be consumed to reduce P_{H₂} and make the reaction feasible (Fig. 1). Table 3 shows that, at higher substrate concentrations, during the methanization test, incomplete acetogenesis takes place, forming isobutyric, butyric, isovaleric, and valeric acids. The propionic acid uptake is insufficient, and the removal decreases with increasing initial concentration. Under the lowest concentration, almost all propionic acid was removed and, under the highest concentration, only 25% was removed. At higher concentrations, the P_{H₂} increased, inhibiting the overall acetogenesis and, consequently, the hydrogenotrophic methanization. Wainaina *et al.*²⁷ and Lata *et al.*²⁸ report this same observation as propionic acid accumulates, inhibits methanization, and promotes the formation of isobutyric and isovaleric acids (which can also inhibit the process). Propionic acid is well known as inhibiting agent.^{4,29} Han *et al.*,³⁰ working with food wastes, concluded that propionic acid reduces the methanogenic activity when the concentrations are above 0.45 g_{COD} L⁻¹. Wang *et al.*³¹ studied the effects of propionic acid concentrations over methanogens and concluded that complete inhibition was observed for concentrations over 900 mg L⁻¹ (1.4 g_{COD} L⁻¹).

Butyric acid. Figure 3 shows that the highest CH₄ production rate corresponds to 0.6 g_{COD} L⁻¹, followed by 0.3, 0.9, and 1.2 g_{COD} L⁻¹. The 1.5 g_{COD} L⁻¹ curve has similar values to the blank until day 4, where the CH₄ production increased suddenly to finish the reaction on day 6.5. The same can be observed for the 1.2 and 0.9 g_{COD} L⁻¹ curves, only with a lower final CH₄ production. During the first four days, acetogenesis takes place, producing little CH₄ and causing hydrogen to accumulate and butyrate to be consumed slowly. Between days 4 and 6, butyrate and hydrogen consumption stop, and acetate is used rapidly to produce CH₄. The acetotrophic CH₄ production represents 80% of the provided COD, and hydrogenotrophic represents 20% (Table 2).

Using initial concentrations of butyric acid from 3 to 20 g_{COD} L⁻¹, Dogan *et al.*²⁴ observed a similar behavior in the CH₄ production curves. As the initial concentration increased, the latency time increased between 20 and 100 h. After this latency, CH₄ was produced rapidly, as in this research (compare Fig. 3). Zhang *et al.*³² worked with mesophilic batch reactors to determine the 50% (C50%) CH₄ inhibition with butyric acid as substrate. Butyric acid reaches C50% under a 0.73 g L⁻¹ (1.3 g_{COD} L⁻¹) concentration. Zhang *et al.*³² explain a similar behavior of the CH₄ production curves from butyric acid (Fig. 3). For the cases where the substrate

concentration was lower, CH₄ production increased with the substrate concentration but, as substrate concentration increased to 1.2 g_{COD} L⁻¹ and above, the 50% was exceeded. Acetogenesis was a limiting step, and butyric acid acted as an inhibitor to methanogens.

Except for the lowest substrate concentration, Table 3 shows that butyric acid was not completely removed, as the removal decreased with increasing concentration. As a product of acetogenesis, small quantities of propionic, isobutyric, and isovaleric acids were produced. Higher concentrations of isobutyric and isovaleric acids were observed for the higher substrate concentrations.

Methanol. The CH₄ production curves from methanol are different from those of the other substrates. From reactions 9 and 10 in Table 1, it is not possible to differentiate which one is limiting. Reaction 10 indicates that this is the preferred path for CH₄ formation. If acetogenesis took place, the methane formation ran as fast as the direct CH₄ formation from methanol. No hydrogenotrophic methane formation can take place under these conditions. Table 2 shows that the CH₄ concentration in the biogas was 83%, which can occur when, simultaneously, alkalinity is consumed and acetotrophic CH₄ is formed. Table 3 shows that methanol removal increased with initial substrate concentration. Only the highest initial concentration produced higher propionate and lower ethanol and isovaleric acid concentrations. According to the 97% removal corresponding to the highest initial concentration, these intermediary substances were, through acetogenesis, transformed in CH₄. As the removal under all concentrations was above 90%, it is assumed that alkalinity was produced during direct CH₄ production and that it was readily consumed through acetogenesis. No hydrogenotrophic CH₄ production was observed. Florencio *et al.*³³ studied methanization from methanol in continuous UASB reactors and by stabilizing pH at 7 with a phosphate buffer solution; they obtained biogas with 87% methane and concluded that this concentration is a result of the bicarbonate equilibrium because, when using a carbonate buffer solution, the CH₄ in the biogas decreased to 74%.

Determination of the CH₄ specific production

The final CH₄ production for every curve in Fig. 3 was considered at the inflection point, where the production slopes tend to the one of the blank. With these points, Fig. 4 was built. Plotted are the final CH₄ production of every test *versus* the COD fed. Table 4 presents the results derived from Fig. 4: the specific CH₄ production (slope) and the CH₄ production after substrate depletion (intercept). The correlation coefficients were obtained from

Table 4. Specific CH₄ production, or yield, and concentration in the biogas. Coefficients were obtained from 5 values. The theoretical specific CH₄ production is, for all instances, 350 NL/kg_{COD}⁴

Substrate	Specific CH ₄ production (slope) (NL/kg _{COD})	Specific CH ₄ production (other authors) (NL/kg _{COD})	Intercept (NL)	Correlation coefficient, R ²
Acetic acid	343	365 ²⁴ , 203 ¹⁸	7.9	0.9976
Ethanol	296	127 ²⁴	0.92	0.9901
Methanol	181	283 ³¹	147.5	0.9793
Butyric acid	108	237 ²⁴ , 105 ¹⁸	129.7	0.6662
Propionic acid	(-87)	107 ²⁴ , 185 ¹⁸	93.1	0.6466
Lactic acid	64	59 ¹⁸	54.2	0.9820

Florencio *et al.*³³ used a phosphate buffer.

Table 5. Kinetic parameters from the curves in Fig. 3, according to the Lineweaver-Burk linearization method

Substrate	Slope	Intercept	Corr. Coeff. r^2	V_{\max} (NmL/L·d)	K_m g _{COD} L ⁻¹
Methanol	0.0151	0.0005	0.9992	1934	29.2
Ethanol	0.0010	0.0005	0.9938	1928	2.0
Acetic acid	0.0017	0.0015	0.9796	668	1.2
Butyric acid	0.0139	0.0005	0.971	2136	29.8
Lactic acid	0.0019	0.0009	0.9791	1001	1.9
Propionic acid ^a	-0.0007 ^a	0.0131 ^a	0.9478 ^a	76 ^a	— ^a

^a Although the values fall in a straight line, the slope is negative, and K_m cannot be calculated.

5 values. The theoretical specific CH₄ production is, for all instances, 350 NL/kg_{COD}.⁴

In Fig. 4, the slope represents the specific CH₄ production for every substrate, and the intercept is the endogenous CH₄ production. The endogenous CH₄ production can be different from the blank because, as shown in Fig. 4 and Supporting Information, Figure S1, the endogenous CH₄ production (after the substrate was consumed) depends on the substrate complexity and the corresponding acetogenesis reactions (Table 3). These values indicate that every substrate affects the microorganisms differently and modifies their metabolic pathways during and after the substrate is consumed. According to the molecular structure of every substrate, different products were generated during the methanization, and others were not wholly consumed (Table 3).

The values for the intercept in Fig. 4 are different for every substrate. The acetic acid and ethanol intercept is close to zero, indicating that CH₄ production was originated merely by the substrate without the influence of the endogenous production. The intercept values are high for methanol and acetic and butyric acids, indicating that endogenous CH₄ production did occur. The negative slope of propionic acid confirms this substrate as an inhibitor.

Lower correlation coefficients for propionic and butyric acids confirm the activity of hydrogenotrophic microorganisms at different times during the reaction. The CH₄ production varies according to adaptation times and/or changing metabolic pathways during acetogenesis and CH₄ production.

The substrates with the highest specific CH₄ production were acetic acid and ethanol, respectively, with 343 and 281 NL/kg_{COD}. Lactic acid presents the lowest CH₄ production. It has a low energy yield with -8.4 kJ mol⁻¹ for acetogenesis (Table 1). Lactic acid has different reaction possibilities during acetogenesis and, besides acetate, propionate can also be a product. This possibility results in a lower CH₄ yield, but it must be considered that lactate can produce CH₄ after its transformation to propionate or butyrate through acetogenesis (Table 1).

Butyric acid has a specific CH₄ of 108 NL/kg_{COD}. Table 3 indicates that, as the initial concentration increased, the system cannot consume all the substrate, and the final concentration also increased. For all concentrations tested, approximately 70% of the butyric acid was consumed.

The results of Dogan *et al.*²⁴ can be compared with the ones in this research. They determined the specific CH₄ production from acetic, propionic, and butyric acids under initial concentrations between 1 and 25 g L⁻¹ in one-liter batch reactors. They obtained 365 NL/kg_{COD} from acetic acid, 237 NL/kg_{COD} from butyric acid, and 07 NL/kg_{COD} from propionic acid (Table 5). Yang *et al.*¹⁹ evaluated the CH₄ specific production from acetate, propionate, butyrate, and lactate under initial concentrations between 0.25 and

4 g_{COD}/L, and the corresponding specific CH₄ production values were 203, 185, 150, and 59 NL/kg_{COD}, respectively. Most of the results from Yang *et al.*¹⁹ are different from those in this research; only lactate is comparable. The CH₄ production from acetate in this research and that by Dogan *et al.*²⁴ is close to the theoretical value; the values reported by Yang *et al.*¹⁹ are much lower.

Methane from ethanol reached 296 LN/kg_{COD}, which is higher than the results of Tatton *et al.*,³⁴ who worked with continuous cultures of single species and combinations of three methane-producing species. Methanol reports a specific CH₄ production of 181 LN/kg_{COD}, which is higher than those of butyric, propionic, and lactic acids; methanol consumption was near 90% under every concentration tested, and the consumption decreased with increasing initial concentration (Table 3). Using a continuous UASB reactor and avoiding VFA accumulation, Florencio *et al.*³³ managed 283 LN/kg_{COD}. The research of Feng *et al.*³⁵ concludes that the presence of ethanol during anaerobic digestion significantly improves electron transport and that better methane yields can be reached.

Determination of the kinetic parameters

Buffer-controlled methanization prevented pH from affecting the tests. All tests started with pH 7 and finished with slightly lower values. Ethanol finished with pH 6.9, acetic and butyric acids with 6.85, propionic acid with 6.8, lactic with 6.9, and methanol with 6.75.

Table 5 shows the kinetic parameters obtained from the curves in Fig. 3. The adjustment was made using the Lineweaver-Burk

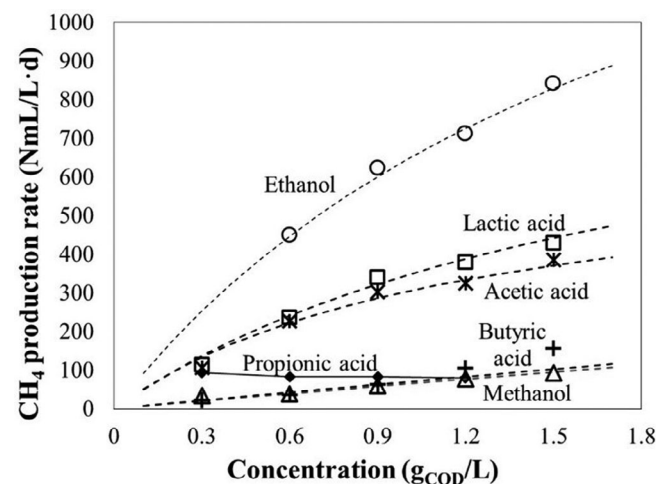


Figure 5. Methane production rate versus initial substrate concentration. Comparison of experimental and calculated values.

linearization of the Michaelis and Menten model. The slopes correspond to the initial CH₄ production.

Although acetic acid is the reference substrate for methanization, V_{max} is the lowest of all the tested substrates, with 668 NmL_{CH₄}/L·d, and the lowest K_m with 1.2 g_{COD} L⁻¹. Choi *et al.*¹⁵ and Gonzalez-Gil *et al.*¹⁶ indicated that K_m can be interpreted as an indicator for the affinity between substrate and enzyme or enzyme group: the better the affinity, the lower the K_m.

Like acetic acid, ethanol presents a high V_{max} (with 1928 NmL_{CH₄}/L·d) and a low K_m. Except for propionic acid, acetic acid reports the lowest V_{max} of all tested substrates and the lowest K_m. Zou *et al.*³⁶ and Zou *et al.*,³⁷ using ethanol isotopes, observed that ethanol increases the activity of hydrogenotrophic microorganisms. Except for acetate, no other VFA presented this behavior. A previous ethanolic fermentation of food wastes improved methanization by reducing the reaction times and increasing the CH₄ yield. They also observed that hydrogenotrophic activity was important, as 40% of the CH₄ was produced through this metabolic pathway. Another vital feature of ethanolic fermentation is that it does not cause acidification, and the AD reactors can operate under higher organic loading rates.^{31,38,39} Feng *et al.*³⁵ analyzed the advantages of ethanol as substrate during methanization and concluded that ethanol causes a better direct interspecies electron transfer, allowing higher energy recovery for the microorganisms than acetic acid or any other type of substrate, and that CH₄ yields are higher.

Methanol presents a V_{max} value similar to ethanol, but it shows a more significant value for K_m with 29.2 g_{COD} L⁻¹; this corresponds with the curves in Fig. 3, where ethanol requires a shorter time than methanol to finish the reaction. The 'curves' of ethanol are straight lines from the beginning to the end, indicating a low K_m value. The methanol curves present the typical form where K_m has a higher value. Yamaguchi *et al.*⁴⁰ observed that direct methanization of methanol with *Methanosarcina sp.* required 30 days for the inoculum to adapt. They also concluded that, for VFA and alcohols combined, direct methanization from methanol does not take place.

Lactic acid has a higher V_{max} than acetic acid and a similar K_m. For the analysis of lactic acid, the slopes for CH₄ production were selected from the highest values, between 14 and 24 h after the reaction begins (Fig. 3). As indicated in Table 1, the reactions where lactic acid is involved as substrate can run in different directions.

Butyric acid presents both the highest V_{max} (2136 NmL/L·d) and K_m (29.8 g_{COD} L⁻¹) values. As with methanol, Fig. 3 shows that the CH₄ curves from butyric acid present the typical behavior corresponding to a high K_m. The start of hydrogenotrophic CH₄ production required more than four days. The first days were needed for acetogenic reactions and then the CH₄ production started.

Methanization from propionic acid shows inhibition (Fig. 3), as methanization under lower concentrations produces lower values than the blank. No further conclusions could be drawn from this substrate. When plotted using the Lineweaver-Burk model, the concentrations follow a straight line but with a negative slope.

Lawrence and McCarty¹⁸ used acetic, propionic, and butyric acids in a 6-L continuous reactor. The substrate concentrations were 1.5, 3.0, and 3.1 g_{COOH} L⁻¹, respectively. The inoculum was anaerobic sludge, and the retention time was 25 days. They proposed to evaluate the Monod kinetics of substrate consumption and to relate it to biomass growth. Under a concentration of 1.5 g_{COOH} L⁻¹, butyric acid was consumed faster than the other two

acids. These results differ from those in this research: Fig. 3 shows that butyric acid requires approximately 6 days to finish the reaction and acetic acid requires only 18 h. Unlike the work by Lawrence and McCarty,¹⁸ this research indicates that propionic acid inhibits methanization at low and high concentrations.

Figure 5 compares the calculated kinetic parameters shown in Table 5 with the experimental values for the methanization of the different substrates. The dotted lines indicate the computed path of the Michaelis–Menten model, and the markers indicate the observed values. These results prove that the Michaelis–Menten model can be successfully used to simulate methanization from substrates originated during the fermentation of OFMSW.

CONCLUSIONS

The main products from OFMSW fermentation were acetic acid and ethanol; together, they represent 92% of all fermentation products. Other products were methanol and propionic and butyric acids.

Methanization from acetic acid and ethanol requires between 6 and 18 h, depending on the initial concentration. Methanization from methanol and butyric acid required more than seven days. Methanization from acetic acid and ethanol was complete, and no byproducts remained after the test. As initial lactic acid concentration increased, propionic acid was formed, and its concentration increased at the end of the test because acetogenesis could not be completed. The CH₄ production from propionic acid decreased with increasing initial concentration, indicating inhibition. During the methanisation of lactic and butyric acids, acetogenesis was identified as a first step where almost no CH₄ was produced; during a second acetotrophic step, CH₄ was produced rapidly.

The endogenous CH₄ production was determined for the substrates, and it could be concluded that, under these conditions, different substrates affect the endogenous CH₄ production differently. During the methanization from acetic acid and ethanol, no endogenous CH₄ production took place. The endogenous CH₄ production from methanol and butyric acid is like that of the blank, indicating that the final product is the sum of both substrate and endogenous productions.

The highest specific CH₄ production belongs to acetic acid with 343 NL/kg_{COD}, 98% of the theoretical value. The specific CH₄ production from ethanol is 296 NL/kg_{COD}, and the lowest value corresponds to lactic acid, with 64 NL/kg_{COD}. Except for propionic acid, the methanization of the selected substrates follows the Michaelis and Menten model. The highest affinity (lower K_m) values were for acetic acid and ethanol, respectively, with 1.2 and 2.0 g_{COD} L⁻¹, and the lower affinity (higher K_m) were for methanol and butyric acid. Except for propionic acid, the V_{max} of the other substrates is higher than that of acetic acid. Based on the specific CH₄ production, Michaelis and Menten kinetic values, and reaction times, acetic acid and ethanol can be considered the best possible substrates for CH₄ production.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported by the Mexican Centre for Innovation in Bioenergy-Cluster for Gaseous Biofuels (Centro Mexicano de Innovación en Bioenergía, Clúster en Biocombustibles Gaseosos) CONACYT project 247006, and the General Directorate for Academic Affairs (Dirección General de Asuntos del Personal

Académico, DGAPA) of the National University of Mexico (UNAM), project IT101320. This research was performed at the Environmental Engineering Laboratory (LIA), Institute of Engineering, National University of Mexico. The graduate scholarship provided by CONACYT is acknowledged. The authors recognize the unconditional support in the laboratory and guidance through the theoretical supervision of Dr. Óscar González-Barceló.

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information may be found in the online version of this article.

REFERENCES

- Shen F, Yuan H, Pang Y, Chen S, Zhu B, Zou D *et al.*, Performances of anaerobic co-digestion of fruit & vegetable waste (FWV) and food waste (FW): single-phase vs. two-phase. *Bioresour Technol* **144**:80–85 (2013) <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.099>.
- Kumar A and Samadder SR, Performance evaluation of anaerobic digestion technology for energy recovery from organic fraction of municipal solid waste: a review. *Energy* **197**:117253 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117253>.
- Li Y, Chen Y and Wu J, Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: a review. *Appl Energy* **240**:120–137 (2019) <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.01.243>.
- Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama GA and Brdjanovic D, *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. IWA Publishing, London, UK (2015, 2008).
- Wu C, Wang Q, Yu M, Zhang X, Song N, Chang Q *et al.*, Effect of ethanol pre-fermentation and inoculum-to-substrate ratio on methane yield from food waste and distillers' grains. *Appl Energy* **155**:846–853 (2015) <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.04.081>.
- Zhou Q, Shen F, Yuan H, Zou D, Liu Y, Zhu B *et al.*, Minimizing asynchronism to improve the performances of anaerobic co-digestion of food waste and corn stover. *Bioresour Technol* **166**:31–36 (2014) <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.074>.
- Bajpai P, Basics of anaerobic digestion process, in *Anaerobic Technology in Pulp and Paper Industry*. Springer Briefs in Applied Sciences and Technology. Springer, Singapore (2017).
- Nana Z, Yu M, Wang Q, Song N, Sh C, Wu C *et al.*, Effect of ethanol and lactic acid pre-fermentation on putrefactive bacteria suppression, hydrolysis, and methanogenesis of food waste. *Energy Fuel* **30**:2982–2989 (2016) <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b02779>.
- Gujer W and Zehnder AJB, Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Sci Technol* **15**:127–167 (1983) <https://doi.org/10.2166/wst.1983.0164>.
- Pipyn P and Verstraete W, Lactate and ethanol as intermediates in two-phase anaerobic digestion. *Biotechnol Bioeng* **23**:1145–1154 (1981) <https://doi.org/10.1002/bit.260230521>.
- Azbar U, Ursillo P and Speece RE, Effect of process configuration and substrate complexity on the performance of anaerobic processes. *Water Res* **35**:817–829 (2001) [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00318-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00318-3).
- Stam AJM, Oude Elferink SJWH and Westermann P, *Biomethanation, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, ed. by Series editor, Scheper T, Volume editor, Ahring BK. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 31–56 (2003).
- Zhu X, Zhou P, Chen Y, Liu X and Li D, The role of endogenous and exogenous hydrogen in the microbiology of biogas production systems. *World J Microbiol Biotechnol* **36**:79 (2020) <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02856-9>.
- Cazier EA, Trably E, Steyer JP and Escudie R, Reversibility of hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in dry anaerobic digestion processes fed with wheat straw and inoculated with anaerobic granular sludge. *Waste Manag* **142**:115–128 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.01.019>.
- Choi B, Rempala GA and Kim JK, Beyond the Michaelis-Menten equation: accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Nat Sci Rep* **142**:115–128 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17072-z>.
- Gonzalez-Gil L, Mauricio-Iglesias M, Carballa M and Lema JM, Why are organic micropollutants not fully biotransformed? A mechanistic modelling approach to anaerobic systems. *Water Res* **142**:115–128 (2018) <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.032>.
- Aguilar A, Casas C and Lema JM, Degradation of volatile fatty acids by differently enriched methanogenic cultures: kinetics and inhibition. *Water Res* **29**:505–509 (1995). [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00179-B](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00179-B).
- Lawrence AW and Mccarty PL, Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment. *J Water Pollut Control Fed* **41**:R1–R17 (1969). Available: <http://www.jstor.org/stable/25036255>.
- Yang Y, Chen Q, Guo J and Hu Z, Kinetics and methane gas yields of selected C1 to C5 organic acids in anaerobic digestion. *Water Res* **87**:112–118 (2015) <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.012>.
- ASTM D5231-92, *Standard Test Method for Determination of the Composition of Unprocessed Municipal Solid Waste*. ASTM International, West Conshohocken, PA (2016).
- Rice EW, Baird RB and Eaton AD eds, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition*. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC (2017).
- Campuzano R and González-Martínez S, Extraction of soluble substances from organic solid municipal waste to increase methane production. *Bioresour Technol* **178**:247–253 (2015) <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.042>.
- Borshchevskaya LN, Gordeeva T, Kalinina AN and Pavlovich S, Spectrophotometric determination of lactic acid. *J Anal Chem* **71**:755–758 (2016) <https://doi.org/10.1134/S1061934816080037>.
- Dogan T, Orhan I, Nilgun AO and Bahar Kasapgil I, Inhibition of volatile fatty acid production in granular sludge from a UASB reactor. *J Environ Sci Health* **40**:633–644 (2015) <https://doi.org/10.1081/ese-200046616>.
- Vasmara C, Marchetti R and Carminati D, Wastewater from the production of lactic acid bacteria as feedstock in anaerobic digestion. *Energy* **229**:120740 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.120740>.
- Detman A, Mielecki D, Plesniak Ł, Bucha M, Janiga M, Matyaszek I *et al.*, Methane-yielding microbial communities processing lactate-rich substrates: a piece of the anaerobic digestion puzzle. *Biotechnol Biofuels* **11**:116 (2018).
- Wainaina S, Lukitawesa, Awasthi MK and Taherzadeh MJ, Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: a critical review. *Bioengineered* **18**:589–592 (2002) <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>.
- Lata K, Rajeshwari KV, Pant DC *et al.*, Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of tea and vegetable market wastes. *World J Microbiol Biotechnol* **18**:589–592 (2002) <https://doi.org/10.1023/A:1016314903817>.
- Mata-Alvarez J, *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes*. IWA Publishing, London, UK (2002).
- Han Y, Green H and Tao W, Reversibility of propionic acid inhibition to anaerobic digestion: Inhibition kinetics and microbial mechanism. *Chemosphere* **255**:126840 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126840>.
- Wang Y, Zhang Y, Wang J and Meng L, Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass Bioenergy* **33**:848–853 (2009) <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.01.007>.
- Zhang W, Zhang F, Li YX and Zeng RJ, Inhibitory effects of free propionic and butyric acids on the activities of hydrogenotrophic methanogens in mesophilic mixed culture fermentation. *Bioresour Technol* **272**:458–464 (2019) <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.076>.
- Florencio L, Field JA and Lettinga G, Substrate competition between methanogens and acetogens during the degradation of methanol in UASB reactors. *Water Res* **29**:915–922 (1995). [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00199-H](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00199-H).
- Tatton MJ, Archer DB, Powell GE and Parker ML, Methanogenesis from ethanol by defined mixed continuous cultures. *Appl Environ Microbiol* **55**:440–445 (1989).
- Feng D, Guo X, Lin R, Xia A, Huang Y, Liao Q *et al.*, How can ethanol enhance direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. *Biotechnol Adv* **291**:107812 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107812>.

- 36 Zou H, Gao M, Wang Q, Zhang W, Wu C and Song N, Metabolic analysis of efficient methane production from food waste with ethanol pre-fermentation using carbon isotope labeling. *Bioresour Technol* **291**: 121849 (2019) <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121849>.
- 37 Zou H, Gao M, Yu M, Zhang W, Zhang S, Wu C *et al.*, Methane production from food waste via mesophilic anaerobic digestion with ethanol pre-fermentation: methanogenic pathway and microbial community analyses. *Bioresour Technol* **297**:122450 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122450>.
- 38 Yu M, Gao M, Wang L, Ren Y, Wu C, Ma H *et al.*, Kinetic modelling and synergistic impact evaluation for the anaerobic co-digestion of distillers' grains and food waste by ethanol pre-fermentation. *Environ Sci Pollut Res* **25**:30281–30291 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3027-6>.
- 39 Zhao Z, Zhang Y, Yu Q, Dang Y, Li Y and Quan Y, Communities stimulated with ethanol to perform direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate. *Water Res* **101**:475–484 (2016) <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.005>.
- 40 Yamaguchi M, Minami K, Tanimoto Y and Okamura K, Effects of volatile fatty acids on methanogenesis of methanol and of pregrowth with methanol on acetate utilization by methanogens. *J Ferment Bioeng* **68**:428–432 (1989) [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(89\)90099-8](https://doi.org/10.1016/0922-338X(89)90099-8).