



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**INTERPRETACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE
PRODUCCIÓN DE METANO MEDIANTE EL
PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA EN FUNCIÓN
DE DIFERENTES METABOLITOS**

T E S I S

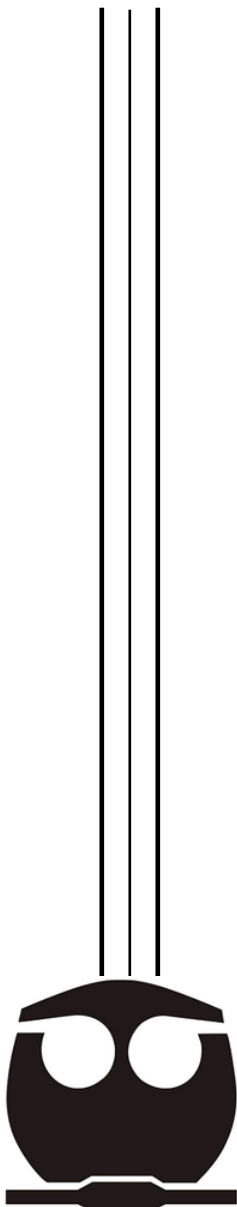
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

P R E S E N T A:

LUIS EDUARDO GALICIA ALVARADO

CDMX 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 ASIGNADO:

Presidente: GUTIÉRREZ LARA MARÍA RAFAELA
Vocal: DURAN MORENO ALFONSO
Secretario: GONZÁLEZ BARCELÓ ÓSCAR (ASESOR)
1^{er}. Suplente: BERNAL GONZÁLEZ MARISELA
2^{do}. Suplente: ANDRACA AYALA GEMA LUZ

Lugar donde se realizó la tesis:
INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

SUSTENTANTE

DR. OSCAR GONZÁLEZ BARCELÓ

LUIS EDUARDO GALICIA ALVARADO

AGRADECIMIENTOS

Tesis realizada gracias al Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica UNAM-PAPIIT- IT101320 - Biorrefinería para producción de ácidos grasos volátiles, biogás y digestato a partir de residuos sólidos orgánicos urbanos

Al proyecto del Área Estratégica 2 del Clúster de Biocombustibles gaseosos SENER-CONACYT 247006. Convocatoria S0019-2014-05. En el subproyecto aprobado a Dr. Simón González Martínez con recursos para reactores de metanogénesis y equipo para cuantificación de metano.

Contenido

1	CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Objetivo General	2
1.2	Objetivos Particulares	2
1.3	Alcances	2
2	CAPÍTULO 2. PRINCIPIOS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA	3
2.1	Definición de Digestión Anaerobia.....	3
2.2	Etapas de la digestión anaerobia	3
2.2.1	Hidrólisis.....	3
2.2.2	Acidogénesis.....	3
2.2.3	Acetogénesis	4
2.2.4	Metanogénesis.....	4
2.2.5	Metanógenos	5
3	CAPÍTULO 3. FACTORES QUE AFECTAN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA	7
3.1	La termodinámica de las reacciones involucradas en la digestión anaerobia.....	7
3.2	Estabilidad del reactor en el proceso de digestión anaerobia	9
3.2.1	pH	9
3.2.2	Alcalinidad	11
3.2.3	Temperatura.....	12
3.2.4	Ácidos Grasos Volátiles	12
4	CAPÍTULO 4. MODELOS CINÉTICOS	13
4.1	Teoría cinética de Michaelis – Menten	13
4.2	Métodos para obtención de constantes cinéticas de Michaelis-Menten.....	17
4.3	Modelo de Gompertz.....	19
4.4	Inhibición por sustrato.....	21
4.5	Cinética de Haldane-Andrews.....	22
5	CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA.....	24
5.1	Preparación de disoluciones	25
5.2	Lavado de lodos	26
5.3	Equipo utilizado para la medición de biogás producido	26
5.4	Montaje de los reactores.....	27
5.5	Inyección de disoluciones a los reactivos.....	28
5.6	Medición de la producción y composición de biogás.	29
5.7	Medición de parámetros analíticos.....	30
5.8	Obtención de parámetros cinéticos.	30
6	CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32

6.1	Curvas de producción específica de metano	32
6.2	Ajuste con el modelo de Gompertz modificado.....	38
6.3	Cálculo de la rapidez de producción de metano.....	42
6.4	Obtención de parámetros cinéticos de Michaelis – Menten.....	47
6.5	Ecuación de Monod.....	56
6.6	Pruebas analíticas	59
6.7	Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	59
6.8	Rendimientos.....	65
6.9	pH en los reactores	69
6.10	Alcalinidad en los reactores	72
7	CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....	75
8	CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA.....	76
9	CAPÍTULO 9. ANEXOS.....	80

Índice de Figuras

Figura 2.1	Esquema de los pasos de biodegradación de materia orgánica compleja (Mata-Alvarez, 2002).....	6
Figura 3.1	Efecto de la presión parcial de H ₂ en ΔG en la conversión de algunos productos intermediarios (Azbar, 2001).....	9
Figura 4.1	Variación de las concentraciones de los reactantes de una reacción enzimática (Bisswanger, 2017)	14
Figura 4.2	Representación esquemática de la curva hiperbólica de tasa de consumo de sustrato de acuerdo con cinética de reacción de Michaelis y Menten (Valsaraj y Melvin, 2018).....	16
Figura 4.3	De izquierda a derecha se presentan las gráficas de Eadie, Lineweaver-Burk y Hanes.....	18
Figura 4.4	Gráfica de Eisenthal-Cornish-Bowden.....	19
Figura 5.1	Diagrama de procedimiento experimental	24
Figura 5.2	Sistema Automático de Prueba de Potencial de Metano (AMPTS, por sus siglas en inglés).....	27
Figura 5.3	Inyección del sustrato al reactor.....	29
Figura 6.1	Gráficas de producciones específicas de metano (PEM) por parte de la mezcla sustrato más inóculo	33
Figura 6.2	Gráficas de producción específica de metano (PEM) por parte del sustrato	35
Figura 6.4	Gráficas de ácido acético para comparar la determinación de la rapidez específica entre cálculo de la pendiente y el modelo de Gompertz	43
Figura 6.5	Gráficas de ácido acético para cálculo de la rapidez específica de producción de metano.	44
Figura 6.6	Gráficas de ácido láctico para cálculo de la rapidez específica de producción de metano.	45
Figura 6.7	Diagrama de Linewaver – Burk para la producción de metano por parte de ácido acético.....	48
Figura 6.8	Diagramas de Linewaver – Burk para la producción de de metano por parte del sustrato.....	49
Figura 6.9	Gráficas de la ecuación de Michaelis – Menten para la producción de metano por parte del sustrato	52
Figura 6.10	Gráficas de la ecuación de Michaelis – Menten para la producción de metano por parte del sustrato	55
Figura 6.11	Gráfica de la ecuación de Haldane para el ácido propiónico	58
Figura 6.12	Demando Química de Oxígeno total en cada reactor	59
Figura 6.13	Demando Química de Oxígeno correspondiente al sustrato en cada reactor	60
Figura 6.14	Remoción de DQO. Concentraciones iniciales representada por la suma de la barra sin relleno y DQO al final (De acuerdo con prueba analítica)	63
Figura 6.15	Porcentaje de remoción de DQO.....	64
Figura 6.16	Gráfica de rendimiento de metano con datos obtenidos experimentalmente.	68
Figura 6.17	Gráfica de rendimiento de metano con datos obtenidos mediante el modelo de Gompertz.....	69

Figura 6.18 pH correspondiente a cada reactor. pH inicial (rojo) y pH final(azul)	70
Figura 6.19 Alcalinidad correspondiente a bicarbonatos y a ácidos grasos volátiles en cada reactor	74

Figura A. 1 Parámetros obtenidos con el modelo modificado de Gompertz para las curvas de producción de metano por parte del sustrato e inóculo	81
Figura A. 2 Diagramas de Lineweaver – Burk para la producción de sustrato e inóculo	83
Figura A. 3 Diagramas de Lineweaver – Burk para la producción de sustrato e inóculo utilizando ajuste por modelo de Gompertz modificado	84
Figura A. 4 Diagramas de Lineweaver – Burk para la producción de sustrato utilizando ajuste por modelo de Gompertz modificado	85
Figura A. 5 Curva de calibración para pruebas de DQO	87

Índice de tablas

Tabla 3.1 Reacciones importantes en la fermentación en ausencia de sulfato y nitrato (Azbar, 2001)	8
Tabla 5.1 Matriz de experimentación	31
Tabla 6.1 Parámetros obtenidos con el modelo modificado de Gompertz para las curvas de producción de metano por parte del sustrato.	40
Tabla 6.2 Rapidez de producción específica de metano por parte del sustrato.	46
Tabla 6.3 Datos para la linealización con el modelo de Lineweaver - Burk	48
Tabla 6.4 Constantes de Michaelis – Menten para la producción de metano por parte del sustrato, obtenidas mediante Lineweaver – Burk y ajuste no lineal.....	50
Tabla 6.5 Constantes de Michaelis – Menten para la producción de metano por parte del sustrato e inóculo, obtenidas mediante Lineweaver – Burk y ajuste no lineal	53
Tabla 6.6 Parámetros obtenidos mediante la ecuación de Monod para la producción de metano por parte del ácido propiónico	57
Tabla 6.7 Rapidez experimental y estimada del ácido propiónico, mediante el modelo de Monod	58
Tabla 6.8 Rendimiento de cada reactor en la producción de metano.	67
Tabla 6.9 Valores de pKa de los sustratos utilizados en cada reactor.	71
Tabla 6.10 Alcalinidad de bicarbonatos y ácidos grasos volátiles.....	73

Tabla A. 1 Parámetros obtenidos con el modelo modificado de Gompertz para las curvas de producción de metano por parte del sustrato e inóculo	80
Tabla A. 2 Rapidez de producción específica de metano por parte del sustrato.....	82
Tabla A. 3 Calibración del espectrofotómetro.....	86
Tabla A. 4 Curva de calibración para pruebas de DQO	88
Tabla A. 5 Volúmenes obtenidos en la determinación de alcalinidad	90
Tabla A. 6 Valores de pH en cada reactor	91

Lista de símbolos utilizados en la ecuación de Michaelis - Menten

$[S]$ – *Concentración del sustrato*

$[E]$ – *Concentración de enzima libre*

$[ES]$ – *Concentración del complejo enzima – sustrato*

$[P]$ – *Concentración del producto*

$[E]_0$ – *Concentración inicial de la enzima*

v – *Rapidez de producción*

V_{max} – Rapidez máxima de reacción

K_m – Constante de Michaelis – Menten

k – constantes cinéticas de rapidez

Lista de símbolos utilizados en la ecuación del Modelo de Gompertz

PM – Producción acumulada de metano

PM_{max} – Producción acumulada de metano

t – Tiempo en el que se registra la producción de metano

R_{max} – Rapidez máxima de producción de metano o tasa de crecimiento absoluta

L – Tiempo de latencia

e – Base del logaritmo natural $e = 2.7118$

Lista de símbolos utilizados en las ecuaciones de Monod, Haldane – Andrews y Michaelis – Menten con inhibición por sustrato:

μ – Tasa de crecimiento específica de los microorganismos

μ_{max} – Tasa de crecimiento específica máxima de los microorganismos

$\hat{\mu}$ – Tasa máxima de crecimiento específico en ausencia de inhibición

$\hat{\mu}_{max}$ – Tasa máxima de crecimiento específico alcanzable con inhibición

K_s – Constante de media velocidad o de saturación

K_i – Constante de inhibición

S_m – Concentración de sustrato a tasa máxima de crecimiento con inhibición

\hat{V} – Rapidez máxima de producción específica en ausencia de inhibición

\hat{V}_{max} Rapidez máxima de producción específica en presencia de inhibición

1 CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

En el mundo desarrollado en el que vivimos, los residuos se convierten en un problema de salud. Los grandes productores de desperdicios se encuentran bajo estrictas regulaciones para la disposición de éstos. Toda disposición de un residuo tiene un costo tanto económico, como humano. La digestión anaerobia se ha propuesto como solución tratar los residuos de forma limpia, sostenible y productiva. En cuanto a la resolución del problema ambiental, la digestión anaerobia remueve el potencial contaminante de residuos orgánicos, produce y captura el biogás, el cual puede ser utilizado como una fuente de energía renovable, además al retener y concentrar los nutrientes en los materiales, los convierte en un fertilizante de alta calidad. (Pullen et al., 2015).

Los ácidos grasos volátiles (AGV) son productos intermediarios importantes en la producción de metano, la concentración de éstos afecta la eficiencia de la fermentación. Bajo condiciones estables de operación, las tasas de producción y de consumo de AGV son similares, por lo que se tiene poca acumulación. Debido a la complejidad del proceso y a la carga orgánica en la alimentación, el proceso puede presentar inestabilidad en los digestores, teniendo como consecuencia la acumulación de AGV, que a su vez afectará la cantidad de microorganismos productores de metano, provocará una caída de pH y consecuentemente en la tasa de degradación del ácido acético y el rendimiento de metano (Wang et al., 2009).

En la fermentación de materia orgánica están involucradas las acciones de las bacterias acidogénicas y arqueas metanogénicas, que debido a las diferentes características fisiológicas, necesidades nutricionales y sensibilidad a las condiciones del medio en las que se pueden desarrollar, es difícil mantener estabilidad entre los microorganismos acidogénicos y metanogénicos (Zhang et al., 2008). Debido a estas diferencias, la estabilidad entre estos microorganismos falla comúnmente cuando se lleva a cabo la digestión anaerobia en una sola etapa, teniendo como consecuencia la acumulación de ácidos grasos volátiles, inestabilidad en el reactor y bajos rendimientos de metano (Wu et al., 2015).

Diversos autores han propuesto llevar a cabo el proceso de digestión anaerobia en dos etapas en el cual se separa la etapa fermentativa y la etapa metanogénica. Por ejemplo, Zhao et al. (2016), estudiaron el efecto de la pre-fermentación etanólica en la digestión anaerobia, indicando que el sistema no presentó acidificación, se incrementaron los rendimientos de metano en un 49.6% y que las concentraciones de los ácidos volátiles (propionato y acetato) eran menores, en comparación con un reactor de control el cual no recibió una pre-fermentación. Wu et al. (2015), mencionan que la pre-fermentación alcohólica reduce los problemas de acidificación y que a su vez benefician al crecimiento de los metanógenos.

La cinética y los parámetros estequiométricos son fundamentales para el modelamiento de tratamiento anaeróbico de aguas residuales y digestión de lodos. Las ecuaciones del tipo de Monod y sus modificaciones han sido utilizadas para describir todas las reacciones que involucran cinética de crecimiento (Yang et al., 2015). En el presente trabajo se aborda la digestión anaerobia desde un punto de vista cinético, utilizando diferentes modelos para su descripción a partir de los resultados de la producción de metano de reactores anaerobios con volumen de 400 mL dentro del rango de temperatura mesofílico (35°C). Los reactores

utilizan como sustratos ácido acético, etanol, ácido láctico, ácido butírico, metanol y ácido propiónico, compuestos químicos que son productos comunes en la etapa de acidogénesis. Teniendo como propósito el conocer que sustrato es el más adecuado para buscar una selectividad hacia la fermentación de ese compuesto, de manera que el proceso de digestión anaerobia sea más rápido y se obtenga una mayor remoción de DQO y producción de metano.

1.1 Objetivo General

Determinar el tipo de fermentación con la que se logra una mayor rapidez de producción de metano, utilizando como sustrato metabolitos intermediarios en el proceso de digestión anaerobia.

1.2 Objetivos Particulares

Determinar los parámetros cinéticos de la digestión anaerobia utilizando teorías de cinética de reacción.

Determinar el efecto de la concentración sobre la rapidez de producción de metano utilizando distintos productos de la fermentación.

Describir las cinéticas de las reacciones de producción de metano mediante los modelos de Gompertz, Michaelis – Menten y Haldane

1.3 Alcances

- Las reacciones se efectuarán en reactores anaerobios a una temperatura de 35°C a escala laboratorio en las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA), ubicado en el edificio 5 del Instituto de Ingeniería, UNAM.
- Se utilizará como inóculo, lodos anaerobios granulares provenientes de un reactor UASB de la planta de tratamiento de aguas residuales de grupo Cuauhtémoc Moctezuma-Heineken, Toluca.
- Los sustratos de alimentación a los reactores anaerobios serán reactivos químicos de fórmula conocida (ácido acético, ácido láctico, ácido butírico, ácido propiónico, metanol y etanol) a diferentes concentraciones.

2 CAPÍTULO 2. PRINCIPIOS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA

2.1 Definición de Digestión Anaerobia

La digestión anaerobia representa un sistema ecológico donde varios grupos de microorganismos actúan en la conversión de materia orgánica compleja en metano, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno, agua, amoníaco, además de nuevas células. La descomposición de materia orgánica se considera usualmente en dos fases; la primera en la que un grupo de bacterias facultativas y anaerobias mediante el proceso de hidrólisis y fermentación, convierten los compuestos orgánicos complejos como lo son carbohidratos, proteínas y lípidos, en compuestos más simples, principalmente ácidos grasos volátiles (AGV), así como CO₂ y gases de hidrógeno; la segunda etapa consiste en la conversión de los ácidos orgánicos e hidrógeno, en metano y dióxido de carbono, llevada a cabo por un grupo de microorganismos llamados metanógenos (De Lemos, 2007).

2.2 Etapas de la digestión anaerobia

La figura 2.1 muestra un esquema de la ruta metabólica de la digestión anaerobia a partir de compuestos orgánicos de cadena larga, como lo son proteínas, lípidos y carbohidratos, hasta los productos finales, metano y dióxido de carbono.

La degradación anaerobia de la materia orgánica es un proceso de varios pasos de diversas reacciones con la participación de diferentes grupos microbianos (Henze et al., 2008). Este proceso ocurre en cuatro etapas sucesivas, las cuales se mencionan a continuación:

2.2.1 Hidrólisis

Los microorganismos no son capaces de asimilar materia orgánica particulada. Por lo tanto, la primera fase en la digestión anaerobia consiste en la hidrólisis de la materia compleja (polímeros orgánicos) a compuestos más simples (monómeros o dímeros) capaces de cruzar la barrera celular de ciertos microorganismos para ser degradados. La hidrólisis es llevada a cabo por exo-enzimas, las cuales son producidas por bacterias acidogénicas. Los productos de la hidrólisis son utilizados como sustrato para este tipo de microorganismos (Henze et al., 2008).

Durante el proceso enzimático de la hidrólisis, las proteínas son hidrolizadas a aminoácidos, los polisacáridos a azúcares simples y los lípidos a ácidos grasos de cadena larga (De Lemos, 2007).

2.2.2 Acidogénesis

En esta etapa, los productos solubles de la hidrólisis son difundidos dentro de las células bacterianas a través de su membrana para posteriormente ser fermentados anaeróbicamente. Los productos de la acidificación comprenden una variedad de compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Por ejemplo, los ácidos grasos volátiles, como lo son el acetato, propionato

y butirato; metanol, etanol, ácido láctico, amoníaco y sulfuro de hidrógeno, así como hidrógeno y dióxido de carbono (Mata-Álvarez, 2002; Henze et al., 2008).

Los microorganismos fermentativos son usualmente designados como acidificadores o acidogénicos, debido a que transforman compuestos neutros como los azúcares y proteínas en ácidos grasos volátiles y ácido carbónico, principalmente. Por lo tanto, el proceso es nombrado acidogénesis (Henze et al., 2008).

2.2.3 Acetogénesis

Durante esta etapa, los ácidos grasos de cadena corta diferentes al acetato, así como lactato, etanol, metanol, son convertidos en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por bacterias acetogénicas. El metabolismo de este tipo de bacterias es inhibido por la concentración de hidrógeno (De Lemos, 2007).

De acuerdo con Henze et al. (2008) estudios llevados a cabo en transformaciones acetogénicas dan a conocer el requerimiento de una relación estrecha entre los microorganismos acetogénicos productores de hidrógeno y microorganismos metanogénicos consumidores de hidrógeno. Debido a que varias reacciones en esta etapa son desfavorables termodinámicamente, se requiere de bajos niveles de hidrógeno en el medio.

Además del efecto inhibitorio en los acetógenos, la formación de hidrógeno provoca el incremento del pH en medio acuoso. Sin embargo, el hidrógeno presente puede ser consumido mediante dos formas: a través de microorganismos metanogénicos, los cuales convierten el hidrógeno y el dióxido de carbono en metano; y a través de la formación de acetato mediante microorganismos homoacetogénicos. (De Lemos, 2007)

2.2.4 Metanogénesis

La metanogénesis es la fase final en el proceso general de la degradación de compuestos orgánicos en metano y dióxido de carbono. Es sólo en esta etapa cuando la demanda química de oxígeno del influente se convierte a una fase gaseosa que deja el sistema reactante (Henze et al., 2008). Los metanógenos son anaerobios obligados, con un espectro de sustratos pequeño, algunos sólo pueden utilizar sustratos tales como metilaminas, metanol, formato, hidrógeno, dióxido de carbono o monóxido de carbono (De Lemos, 2007).

Tanto el grupo de microorganismos acetoclásticos como los hidrogenotróficos son de alta importancia en el curso de la digestión anaerobia, debido a que son responsables del consumo de hidrógeno producido en anteriores fases, manteniendo un pH en el medio acuoso, favorable para las reacciones de producción que efectúan las bacterias acidogénicas y acetogénicas (Mata Álvarez, 2002).

2.2.5 Metanógenos

Los metanógenos cumplen dos funciones primordiales en los sistemas anaerobios, producen gas con baja solubilidad (metano) que permite la remoción de carbón del ambiente y además mantienen una presión suficientemente baja de H_2 , que permite un medio adecuado para las bacterias encargadas de la fermentación y producción de ácidos para producir más productos solubles, como el ácido acético (Henze et al., 2008).

De acuerdo con su afinidad por el sustrato, así como el grado de producción de metano, los microorganismos metanogénicos son divididos en dos grupos principales (De Lemos, 2007):

- Metanógenos acetoclásticos

Son aquellos que utilizan acetato para la formación de metano. Estos son responsables entre un 60 y 70% de toda la producción de metano.

- Metanógenos hidrogenotróficos

Son aquellos que sólo utilizan hidrógeno y dióxido de carbono para la producción de metano.

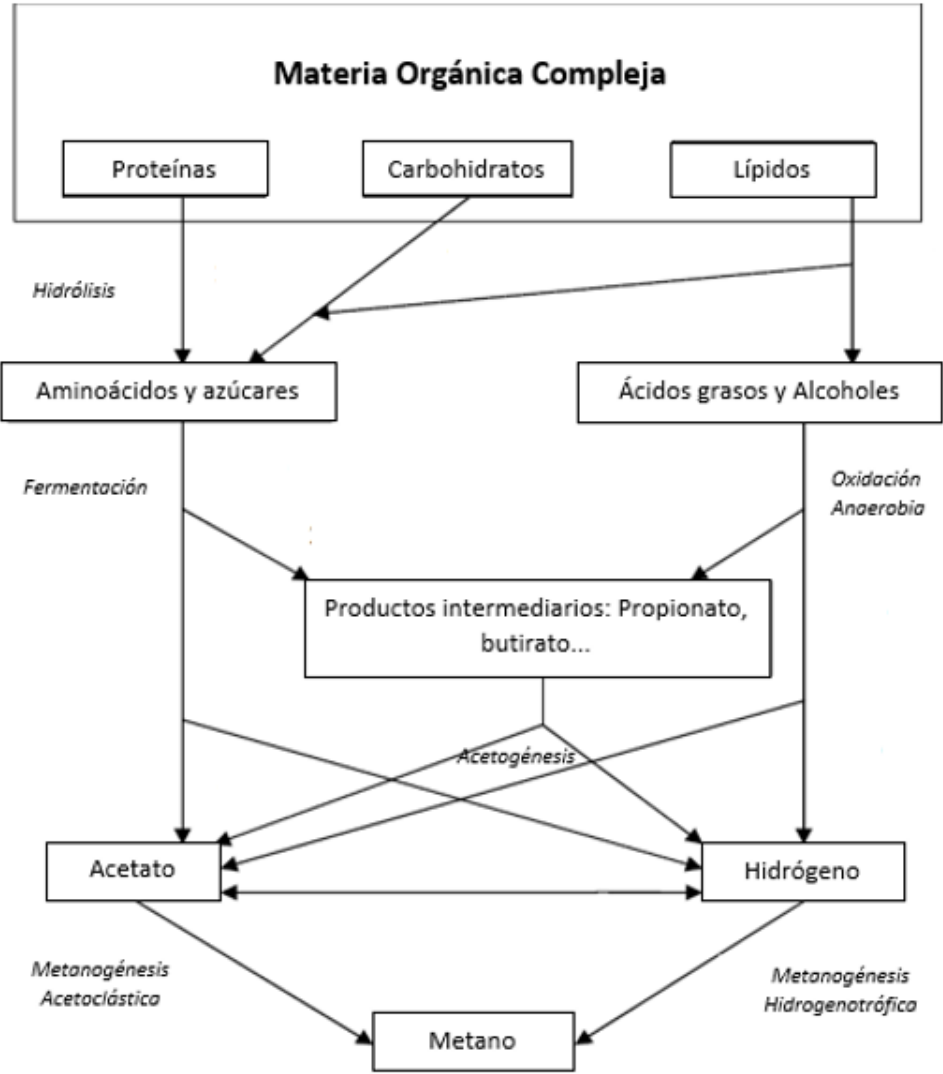


Figura 2.1 Esquema de los pasos de biodegradación de materia orgánica compleja (Mata-Alvarez, 2002)

3 CAPÍTULO 3. FACTORES QUE AFECTAN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

3.1 La termodinámica de las reacciones involucradas en la digestión anaerobia

Los ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente, acetato y propionato, son compuestos intermediarios en la ruta metabólica. Generalmente la rapidez de producción de AGV está relacionada con su rapidez de consumo y su acumulación. Sin embargo, los desequilibrios, a menudo, son encontrados durante la operación o reinicio de los digestores por la complejidad del proceso y las variaciones en la carga orgánica, teniendo como consecuencia, la acumulación de AGV y disminución de pH (Zhang et al., 2008)

Los compuestos con un alto peso molecular son definidos como sustancias complejas, esto quiere decir que son más difíciles de degradar que las moléculas más pequeñas. La facilidad de degradación puede estar relacionada con la ruta metabólica que sigue el sustrato. Por ejemplo, la glucosa que es un compuesto más complejo puede ser convertida a una variedad de intermediarios, los cuales incluyen al propionato, acetato, butirato, lactato y etanol. En consecuencia, varios intermediarios, también deben ser degradados mediante reacciones de óxido-reducción para una completa conversión de glucosa a metano (Azbar et al., 2001).

Todas las reacciones de óxido-reducción pueden ser descritas en términos termodinámicos por el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) (Nicholls, 1982). La tabla 3.1, muestra la variación de energía libre a un pH de 7, presión de 1 atmósfera y temperatura de 25°C, para una gran variedad de reacciones que ocurren en la digestión anaerobia. El H_2 y el CH_4 se encuentran en estado gaseoso, mientras que las otras sustancias están en disolución acuosa.

Aunque la conversión de glucosa a propionato produce el mayor cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG), ver tabla 3.1, a los formadores de ácidos de todos los intermediarios, es el propionato el que presenta una mayor dificultad para la conversión a acetato e hidrógeno. La conversión de propionato es la más sensible a la presión parcial del hidrógeno, mientras que butirato, etanol y lactato son más tolerantes. Azbar et al. (2001) plantea la hipótesis de que los compuestos más complejos presentan mayores dificultades para ser degradados, ya que involucra una serie más compleja de reacciones durante la conversión global a metano.

La termodinámica es un aspecto de gran importancia para el entendimiento de la digestión anaerobia. En la tabla 3.1 se muestran las biorreacciones involucradas en diferentes etapas del proceso, con sus respectivos ΔG . En la ausencia de nitratos y sulfatos, las únicas reacciones de respiración son aquellas de bicarbonato a metano o acetato (Mata-Álvarez, 2002). La conversión de propionato a acetato e hidrógeno es la reacción más difícil de llevar a cabo por tener el ΔG positivo más alto.

El hidrógeno se considera un intermediario importante, ya que en muchas reacciones es un producto, pero se requiere mantener presiones parciales bajas de este compuesto para que las reacciones procedan. La presencia de los consumidores de hidrógeno, es decir, las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, son necesarias para asegurar la factibilidad termodinámica y por lo tanto la conversión de todas las reacciones que producen hidrógeno. Por ejemplo, al

considerar las reacciones de oxidación del propionato, así como del butirato, las reacciones son termodinámicamente imposibles, pero pueden llevarse a cabo si el acetato e hidrógeno (los productos) son removidos del medio; estos productos pueden ser consumidos por los microorganismos acetogénicos e hidrogenotróficos, respectivamente (Mata-Álvarez, 2002).

Tabla 3.1 Reacciones importantes en la fermentación en ausencia de sulfato y nitrato (Azbar, 2001)

Reacción	ΔG (KJ/mol)
$C_6H_{12}O_6 + 3H_2O \rightarrow 3CH_4 + 3HCO_3^- + 3H^+$	-404
Acetato como intermediario	
$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 2acetato^- + 2HCO_3^- + 4H^+ + 4H_2$	-206 (FH)
$2acetato^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2HCO_3^-$	62(MA)
Etanol como intermediario	
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2etanol + 2HCO_3^- + 2H^+$	-226 (FH)
$2etanol + 2H_2O \rightarrow 2Acetato^- + 2H^+ + 4H_2$	+19 (AS)
Lactato como intermediario	
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2lactato^- + 2H^+$	-198 (FH)
$2lactato^- \rightarrow 2acetato^- + 2HCO_3^- + 2H^+ + 4H_2$	-8.4(AS)
$3lactato^- \rightarrow 2propionato^- + acetato^- + HCO_3^- + H^+$	-165 (FH)
$2lactato^- + 2H_2O \rightarrow butirato^- + 2HCO_3^- + 2H_2$	-56(FH)
Butirato como intermediario	
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2butirato^- + 2HCO_3^- + 3H^+ + 2H_2$	-255(FH)
$Butirato^- + 2H_2O \rightarrow 2Acetato^- + H^+ + 2H_2$	+ 48(SA)
Propionato como intermediario	
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2propionato^- + 2H_2O + 2H^+$	-358 (FH)
$2propionato^- + 2H_2O \rightarrow 2acetato^- + 2HCO_3^- + H^+ + 6H_2$	+152 (AS)
Acetato a CH_4	
$2acetato^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2HCO_3^-$	-62(MA)
H_2 a CH_4	
$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-136(MH)
FH: Bacteria fermentativa hidrolítica; AS: Bacteria sintrófica acetogénica; MA: Bacteria metanogénica acetoclástica; MH: Bacteria metanogénica hidrogenotrófica.	

En el aspecto termodinámico, el propionato sólo puede ser convertido a acetato si la presión parcial de H_2 en el reactor anaerobio está entre 10^{-4} atm y 10^{-6} atm, esto puede ser observado en la Figura 3.1. Lo que concuerda con Lettinga et al. (1996) que menciona que para que un digestor metanogénico opere de manera apropiada, la presión parcial del hidrógeno no debe exceder del valor de 10^{-4} atm y usualmente es cercana a 10^{-6} atm. Bajo estas condiciones, el propionato, butirato y etanol comienzan a degradarse y liberan energía al medio. Como puede ser observado, el cambio en la energía libre de las reacciones bioquímicas, la cantidad de energía remanente para las arqueas metanogénicas, depende del producto final de la fase ácida (Pypin et al., 1981)

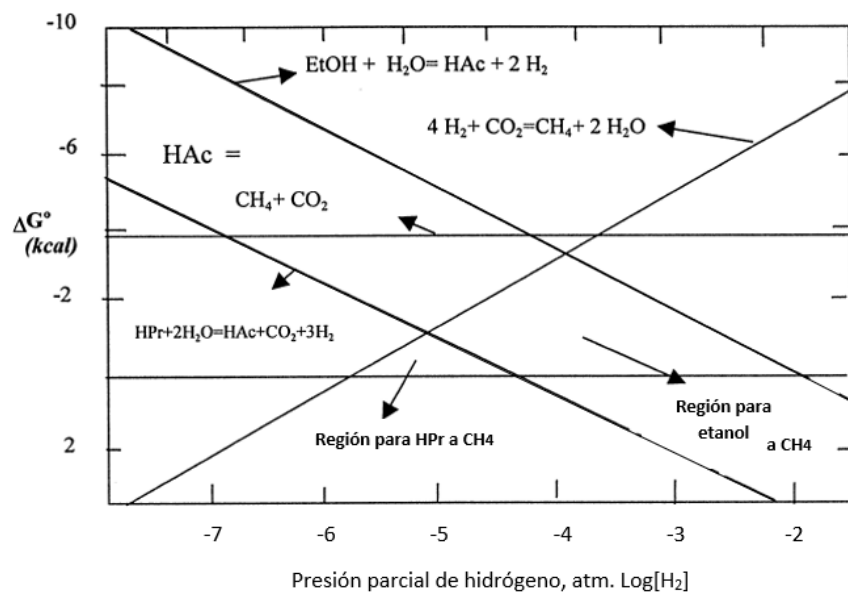


Figura 3.1 Efecto de la presión parcial de H_2 en ΔG en la conversión de algunos productos intermedarios (Azbar, 2001)

3.2 Estabilidad del reactor en el proceso de digestión anaerobia

El pH, la alcalinidad y la concentración de los ácidos grasos volátiles, deben ser considerados como un único indicador de estabilidad de la digestión anaerobia. Además, los valores de estos parámetros tienen que ser evaluados junto con la producción de biogás y su composición expresada en porcentajes de metano y dióxido de carbono; con el propósito de obtener una vasta información acerca de la estabilidad del proceso (Mata-Álvarez, 2002).

3.2.1 pH

El pH da información referente a la estabilidad del medio, debido a que su variación depende de la capacidad amortiguadora del medio en sí mismo. Las variaciones en el pH están

relacionadas con las variaciones de las especies químicas involucradas en la cadena trófica del proceso de digestión anaerobia (Mata-Álvarez, 2002)

En el rango de pH de 6.5 a 7.5 el proceso anaerobio es generalmente estable, el valor del pH es básicamente determinado por la concentración del CO₂ en el medio y por lo tanto por la presión parcial de su fase gaseosa. La operación de un reactor anaerobio con un pH debajo de 6.5 o mayor de 8 puede causar una significativa disminución en la tasa de producción de metano. Además, cambios bruscos pueden ser adversos y la recuperación dependerá del tipo de daño y los microorganismos afectados (De Lemos, 2007).

De acuerdo con De Lemos (2007), el pH afecta el proceso de digestión anaerobia de dos maneras:

- Directa: Afectando la actividad de las bacterias
- Indirecta: Afectando la toxicidad de un número de compuestos

Las bacterias acidogénicas tiene un crecimiento óptimo en un pH de 5-6, con una mayor tolerancia a valores de pH más bajos. El control importante está en eliminar el riesgo de inhibición de las bacterias metanogénicas. Durante la digestión anaerobia de los residuos sólidos, el crecimiento de las bacterias acidogénicas y los metanógenos presentan grandes diferencias entre su crecimiento (De Lemos, 2007)

De acuerdo con Li et al. (2020), las tasas de crecimiento de las bacterias acidificadoras llegan a tener valores de diez a veinte veces mayor comparado con los microorganismos metanógenos. Estas diferencias agravan el desequilibrio entre las especies de microorganismos a tasas altas de carga orgánica, causando una acumulación severa de ácidos grasos volátiles que provocan la disminución del pH, creando un ambiente desfavorable para la actividad microbiana encargada de la producción de metano.

Los microorganismos tienen un crecimiento óptimo en el rango entre pH de 6.6 y 7.4, aunque la estabilidad puede ser alcanzada en la formación de metano en un rango amplio, entre 6 y 8, valores debajo de 6.0 y mayor de 8.3 deben ser evitados, debido a los efectos de inhibición. El pH óptimo depende de los microorganismos presentes en el proceso de digestión, así como el tipo de sustrato. Las bacterias productoras de ácido son menos sensibles al pH que los metanógenos (De Lemos, 2007).

Aunque la determinación del pH es útil, resulta absolutamente deficiente o pobre por si sola. Se debe de relacionar con otros parámetros como alcalinidad, concentración de AGV, producción de biogás y su composición. El pH da información acerca de un proceso inestable con un tiempo de retraso; cuando se registra un pH desfavorable para el proceso de digestión anaerobia, el medio ya habrá perdido su estabilidad. La variación de pH es más lenta que la variación de alcalinidad, por esta razón cuando los cambios en el pH son observados, la alcalinidad del sistema y por lo tanto la capacidad amortiguadora, ya se habrá perdido (Mata-Álvarez, 2002).

3.2.2 Alcalinidad

De acuerdo con Mata-Álvarez (2002), la alcalinidad se define como la capacidad de un medio para neutralizar un ácido. Dicho de otra manera, es la capacidad para amortiguar los cambios de pH causados por la adición o incremento de ácidos en el medio. Resulta de la presencia de calcio, magnesio, sodio, potasio o amonio y en el caso de la digestión anaerobia, la presencia de los AGV, ácido carbónico, fosfatos, boratos y silicatos.

Los principales factores que afectan el pH en el proceso anaeróbico son el ácido carbónico y los ácidos volátiles. En un rango de pH entre 6.0 y 7.5, la capacidad de los sistemas anaeróbicos depende casi completamente del sistema ácido carboníco/alcalinidad, la cual, en equilibrio con la disociación del ácido carbónico, tiende a regular la concentración del ion hidrógeno. Las variaciones de pH son causadas por una disminución de la actividad metanogénica, causada por un aumento de la carga orgánica o de la concentración de los ácidos grasos volátiles, causando un desarrollo desbalanceado de las cadenas tróficas (De Lemos, 2007).

La relación entre la alcalinidad y los ácidos volátiles durante la digestión anaerobia está basada en la capacidad de la alcalinidad del sistema para neutralizar los ácidos formados en el proceso y el amortiguamiento del pH en el caso de acumulación de los ácidos volátiles. Ambos, la alcalinidad y los ácidos volátiles derivan primeramente de la descomposición de los compuestos orgánicos durante la digestión (De Lemos, 2007).

Como resultado de la reacción de alcalinidad con los ácidos volátiles producidos en el sistema, la alcalinidad de bicarbonatos es convertida en la alcalinidad de ácidos volátiles, debido a que los ácidos volátiles son más fuertes que los bicarbonatos. Sin embargo, la capacidad amortiguadora de la alcalinidad de los ácidos volátiles está situado en el rango de pH de 3.75 y 5.75, por lo que tiene menos importancia en la digestión anaerobia. En la práctica, para obtener la alcalinidad de bicarbonato, la porción correspondiente a la alcalinidad de los ácidos volátiles debe ser restado del total de la alcalinidad (Foresti, 1994)

En el monitoreo de reactores anaerobios, la verificación sistemática de la alcalinidad adquiere una mayor importancia que la evaluación del pH, debido a la escala logarítmica del pH, indicando que cambios pequeños en el pH, implican un consumo de gran cantidad de alcalinidad, por lo tanto, la reducción de la capacidad amortiguadora en el medio (Mata-Álvarez, 2002)

Rypley et al. (1996) proponen una metodología para determinar las porciones de alcalinidad de bicarbonato y de alcalinidad de ácidos grasos volátiles, la titulación de una muestra se lleva a cabo en dos fases:

- Titulación hasta un pH de 7.5, llamada alcalinidad parcial, prácticamente equivalente a la alcalinidad por bicarbonatos.
- Titulación hasta un pH de 4.3, llamada alcalinidad intermedia, prácticamente equivalente a la alcalinidad de los ácidos volátiles.

El valor de la relación entre estas dos etapas de titulación hace referencia a la estabilidad del reactor. Para valores mayores a 0.3 indica perturbaciones en el proceso de digestión anaerobia, mientras que para el caso contrario indica estabilidad.

3.2.3 Temperatura

La digestión anaerobia puede ser llevada a cabo en un amplio rango de temperaturas, desde rangos psicrófilos alrededor de 10°C hasta temperaturas termófilas sobre los 70°C. La temperatura tiene influencia sobre la cinética y la termodinámica de las reacciones anaerobias. En general, la metanogénesis es fuertemente influenciada por este parámetro, así como la rapidez de degradación y el incremento del rendimiento (Mata – Alvarez, 2002).

De acuerdo con Baere (2000), han sido identificados dos rangos óptimos con la máxima actividad de degradación alrededor de los 35°C en el rango mesófilico y alrededor de 55°C en el rango termófilico. Una gran cantidad de tratamientos de residuos sólidos es llevada a cabo sólo en estos dos rangos de temperatura.

Aun cuando la cinética de las reacciones es más rápida y los rendimientos son más grandes en condiciones termófilas, quedan pendientes varias interrogantes como si los beneficios superan las ventajas, tales como el adicionar calor a los digestores, la pobre calidad del sobrenadante y la inestabilidad del proceso. Las condiciones óptimas dependerán del tipo de sustrato, concentración, biodegradabilidad y tipo de sistemas usados (Mata-Álvarez, 2002).

3.2.4 Ácidos Grasos Volátiles

La abundancia de los ácidos grasos volátiles varía en el proceso de digestión anaerobia, dependiendo de la alimentación. Entre el total de AGV producidos, las fracciones de ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico, se encuentran entre un rango de 30-75%, 5-30%, 10-30%, 2-30%, respectivamente. Los ácidos orgánicos no volátiles como el ácido láctico y pirúvico están presentes en trazas (Yang et al. 2015).

Es de gran importancia conocer el umbral superior de las concentraciones de AGV para la producción de metano en la digestión anaerobia; ya que a altas concentraciones ocurre una disminución del pH e inhibición de los metanógenos, mientras que a bajas concentraciones no existe un efecto negativo (Grady et al., 1999).

Es importante resaltar, que no es la concentración absoluta de los AGV lo que determina el decaimiento del proceso, pero sí su rápido incremento. Esto significa que la cadena trófica va hacia los organismos acidogénicos en vez de ir hacia los metanogénicos. Este valor es generalmente expresado en términos de ácido acético o concentración de DQO (Mata-Alvarez, 2002).

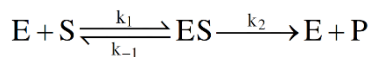
El incremento de los ácidos orgánicos se debe principalmente a la tasa de carga orgánica. Este aumento es generalmente amortiguado por la alcalinidad del sistema, de manera que las variaciones de pH sean pequeñas.

4 CAPÍTULO 4. MODELOS CINÉTICOS

4.1 Teoría cinética de Michaelis – Menten

La cinética de Michaelis-Menten está caracterizada bajo el postulado de que una enzima y un sustrato participan en equilibrio con un complejo enzima-sustrato, el cual no es afectado por la formación del producto, durante el periodo en que la rapidez inicial de reacción es medida (Ainsworth,1977).

Para una reacción enzimática irreversible, sin importar si uno o más productos sean formados, el mecanismo es el siguiente:



La rapidez de reacción o variaciones dependientes del tiempo para cada uno de los reactantes es expresada mediante las siguientes ecuaciones:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1})[ES]$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = v$$

Bisswanger (2017) muestra una simulación de la rapidez de reacción de cada reactante, asumiendo constantes apropiadas. En esta simulación, la cual es mostrada en la figura 4.1, se diferencian tres fases:

- 1) Fase inicial rápida o estado pre-estacionario: En donde la concentración del complejo [ES] es formada instantáneamente, mientras que la cantidad de enzimas libres decrecen. Además de una formación de producto muy baja.
- 2) Fase media: donde el consumo y formación de sustrato y producto, respectivamente, son los más altos, mientras que [ES] y la cantidad de enzimas libres permanecen casi constantes.
- 3) Fase de agotamiento: donde la cantidad de sustrato se agota y por lo tanto [ES] decae y la rapidez de formación de producto tiende a 0.

Si el equilibrio del complejo enzima-sustrato y sus componentes es mucho más rápido que la formación de producto, es decir $k_1 \approx k_{-1} > k_2$, tanto la producción del sustrato como la del producto, proceden de forma lineal (cinética de orden cero), mientras que la concentración de [ES] permanecerá casi constante, debido a una formación y consumo de

[ES] en balance. Esta fase puede ser considerada como un estado de cuasi-equilibrio, la cual se mantiene por un periodo limitado de tiempo y se designa como estado pseudoestacionario.

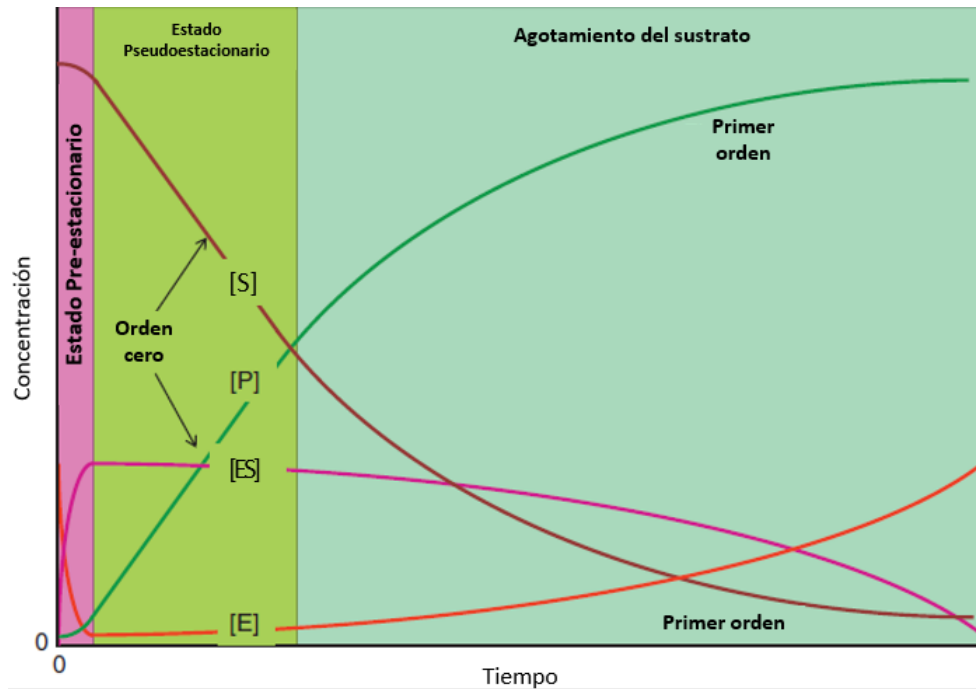


Figura 4.1 Variación de las concentraciones de los reactantes de una reacción enzimática (Bisswanger, 2017)

Cuando la rapidez de reacción se encuentra en estado pseudoestacionario, la formación del producto depende directamente de la concentración de complejo enzima-sustrato, en el cual los cambios de [E] y [ES] con respecto al tiempo pueden ser considerados como 0 (Valsaraj, 2018), es decir:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad \text{y} \quad \frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0;$$

entonces

$$k_1[S][E] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

Considerando que la concentración inicial de la enzima es igual a la concentración de la enzima libre y la enzima que forma el complejo enzima-sustrato:

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

Sustituyendo $[E]_0$ y despejando [ES] la ecuación queda:

$$[ES] = \frac{k_1[S][E]_0}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}$$

Sustituyendo la anterior expresión en la ecuación de rapidez de formación del producto, se obtiene una ecuación en función de las constantes de rapidez y la cantidad de sustrato.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Las constantes de rapidez individuales no son obtenidas directamente, por lo que son convertidas en constantes cinéticas. La expresión $(k_{-1} + k_2)/k_1$ incluye tres constantes de rapidez que son combinadas en una, la cual lleva por nombre la constante de Michaelis y Menten (K_m). La cantidad de enzima inicial permanece constante durante la reacción, de manera que $k_2[E]_0$ es remplazada por una constante cinética, designada como V_{max} , siendo la rapidez máxima por unidad de concentración que se puede tener, ésta es alcanzada cuando todos los sitios activos de las enzimas participan en la reacción (Bisswanger, 2017).

La ecuación en términos de constantes cinéticas queda expresada de la siguiente manera:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

$$V_{max}[=] \frac{mol}{tiempo} \quad [S][=] \frac{mol}{volumen} \quad Km[=] \frac{mol}{volumen}$$

Valsaraj et al. (2017) consideran que la ecuación de Michaelis-Menten es caracterizada por dos constantes:

- La constante de Michaelis K_m ; la cual está relacionada con la constante de disociación, indica la afinidad del sustrato con la enzima, a valores bajos de K_m , mayor afinidad.
- V_{max} ; la cual es la rapidez de avance máximo por unidad de concentración de enzima.

De la ecuación pueden ser obtenidas directamente K_m y $V_{m\acute{a}x}$.

Gráficamente, la ecuación de Michaelis-Menten representa una sección de una hipérbola rectangular (Bisswanger 2017), ver la figura 4.2. En donde se tienen tres corolarios:

- Cuando el valor de la concentración del sustrato es mucho menor que el de la constante de Michaelis, la ecuación puede quedar expresada como:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m}$$

Esta ecuación resultante describe una línea recta que describe una cinética de primer orden, es decir, es linealmente dependiente de la concentración del sustrato.

- Sin embargo, cuando la concentración del sustrato es mucho mayor a la constante cinética K_m , la ecuación se reduce a:

$$v = V_{max} = K_2[E]_0$$

Esta ecuación es independiente de la concentración del sustrato, característica de una reacción de cinética de orden 0.

- Por otra parte, cuando la concentración del sustrato tiene el mismo valor que la constante de Michaelis-Menten, la rapidez de reacción es igual a la mitad de la rapidez máxima que se puede alcanzar.

$$v = \frac{V_{max}[S]}{2[S]} = \frac{V_{max}}{2}$$

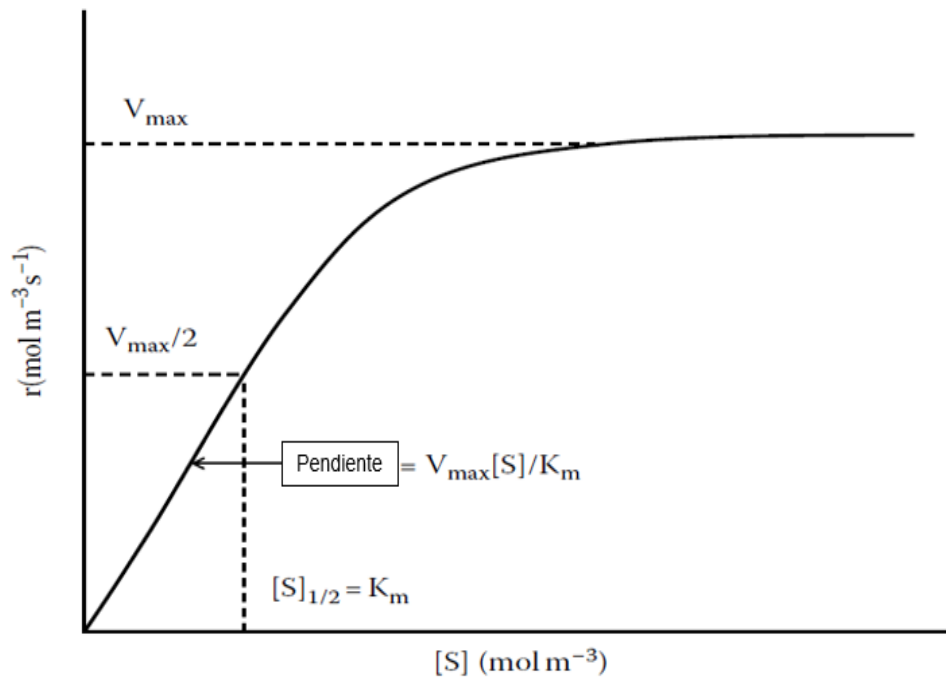


Figura 4.2 Representación esquemática de la curva hiperbólica de tasa de consumo de sustrato de acuerdo con cinética de reacción de Michaelis y Menten (Valsaraj y Melvin, 2018).

4.2 Métodos para obtención de constantes cinéticas de Michaelis-Menten

De acuerdo con Ainsworth (1977), la principal dificultad al encontrar constantes cinéticas recae en la definición de V_{max} . Debido al comportamiento asintótico de la ecuación de Michaelis-Menten, el acercamiento de la rapidez de formación de producto a su valor límite es muy lento; por lo que se prefiere transformar la ecuación para ser representada de una forma lineal y obtener constantes cinéticas.

- La gráfica de Eddie

En 1942 Eadie al realizar una multiplicación cruzada de los términos de Michaelis-Menten obtuvo la siguiente ecuación:

$$vK_m + v[S] = V_{max}[S]$$

Al transferir el primer término a la derecha y dividirlo, la ecuación queda, ver figura 4.3:

$$v = V_{max} - \frac{v}{[S]} K_m$$

- La gráfica de Lineweaver-Burk

En 1934 Lineweaver y Burk obtuvieron una ecuación invirtiendo la ecuación de Michaelis-Menten y agruparon sus términos en la forma de una línea recta, ver figura 4.3:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

- La gráfica de Hanes

En 1932 Hanes obtuvo una transformación al multiplicar la ecuación lineal de Lineweaver-Burk por la concentración del sustrato, dando como resultado la ecuación, ver figura 4.3:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{[S]}{V_{max}}$$

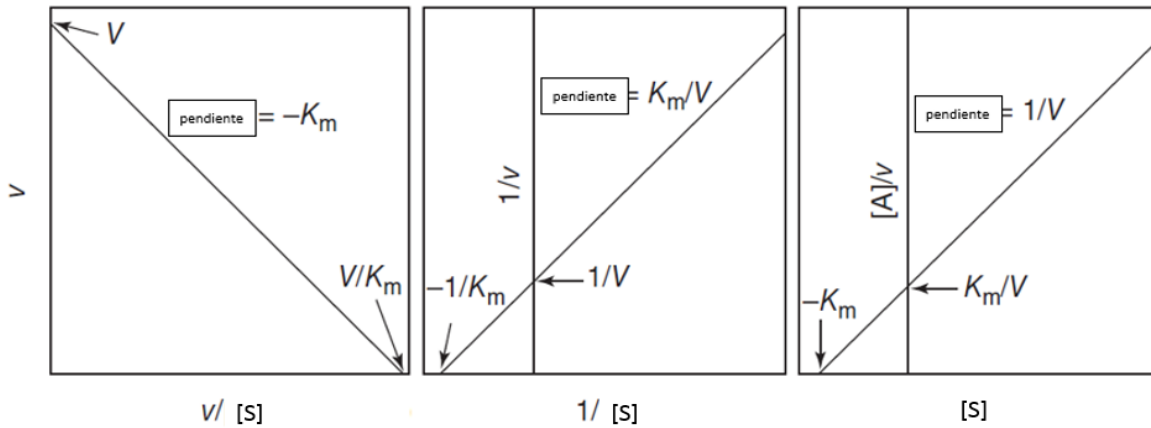


Figura 4.3 De izquierda a derecha se presentan las gráficas de Eadie, Lineweaver-Burk y Hanes.

- La gráfica de Eisenthal-Cornish-Bowden

Esta gráfica representa un método gráfico diferente. Se obtiene a partir de una modificación en la ecuación de Michaelis-Menten a una ecuación lineal con variables imaginarias V_{max} como ordenada y K_m como abscisa, mientras que v y $[S]$ son constantes. (Eisenthal R et al, 1974)

$$V_{max} = K_m * \frac{v}{[S]} + v$$

Se traza y se extrapolan líneas rectas con cada uno de los datos de v y $[S]$ para obtener un patrón de líneas como resultado con una intersección en común, las coordenadas (x,y) de la intersección, corresponderán a los valores de K_m y V_{max} . Debido a la dispersión de datos, se tendrá más de una intersección para todos los valores de rapidez y concentración, por tanto, las constantes cinéticas son obtenidas del valor promedio de todas las coordenadas (x,y) de cada una de las intersecciones, ver figura 4.4.

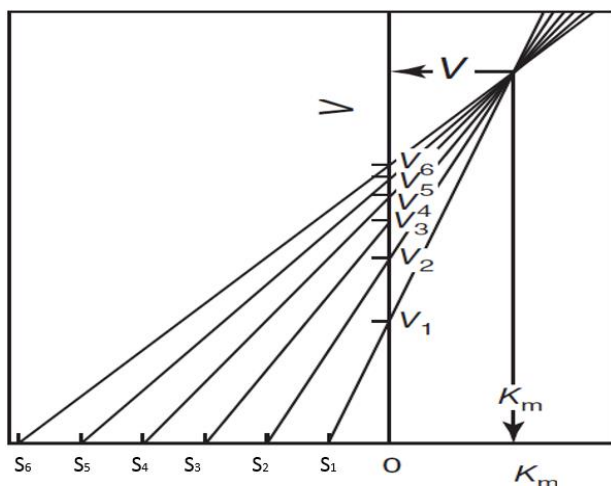


Figura 4.4 Gráfica de Eisenthal-Cornish-Bowden

Regresión no lineal

De la misma manera que con una regresión lineal, la regresión no lineal permite determinar los valores de los parámetros que minimizan la suma de los cuadrados de las distancias de los puntos de una curva, con el objetivo de minimizar el residual de la suma de los cuadrados (Lira et al., 2013).

En comparación con los métodos lineales, mediante este método se pueden determinar simultáneamente varios parámetros cinéticos. Además, se tiene una menor restricción en la elección de las variables controladas, y por lo tanto disminuyen las desviaciones estándar y aumenta la precisión al estimar los parámetros cinéticos, debido a que no es necesario realizar transformaciones lineales a las variables en donde los datos se limitan a un intervalo lineal. El ajuste mediante regresión no lineal, se debe resolver realizando iteraciones matemáticas de la ecuación de velocidad. Actualmente, el procedimiento iterativo se realiza con la ayuda de un software específico, en el que se proporciona una estimación inicial del valor de cada parámetro, para posteriormente ajustar esos valores para mejorar el ajuste a la curva de datos (Lira et al., 2013).

Lira (2013) en su estudio de comparación de diferentes métodos de análisis cinéticos, concluye que el método lineal y el no lineal, no son métodos y propone que una forma de realizar el análisis cinético de una enzima, es utilizar ambos de manera complementaria.

4.3 Modelo de Gompertz

El modelo de Gompertz es bien conocido por ser utilizado en varios aspectos de la biología, como lo es el crecimiento en animales, plantas y bacterias. La primera aplicación de este modelo fue por Benjamín Gompertz en 1825, la función original era usada para describir distribución de edades en poblaciones de seres humano, esta ha sufrido modificaciones a través del tiempo (Tjørve et al., 2019).

Diferentes re-parametrizaciones han surgido respecto al modelo original de Gompertz, muchas de las encontradas en la literatura son más útiles que otras, debido a la facilidad en la interpretación de sus parámetros, asociándolos a un significado biológico. Zwietering et al. (1990) propusieron una modificación, mejor conocida como “El modelo de Gompertz modificado”, siendo actualmente, uno de los modelos más comunes para el describir el crecimiento microbiano (Tjørve et al., 2019).

Varios autores han utilizado el modelo de Gompertz modificado en estudios cinéticos de la producción de biogás. Por ejemplo, Hongguang et al. (2019) lo emplean al ajustar datos acerca de la digestión anaerobia mixta de cerdos muertos y desperdicios de cerdos, para analizar el efecto de la proporción de cerdos muertos en la fermentación. Hongguang et al. (2019) utiliza el modelo basándose en la previa experiencia de Li et al. (2011) quienes utilizan este modelo para el estudio de la fermentación de biogás en residuos sólidos urbanos, encontrando que el cambio de producción acumulada de gas, tenía una buena correlación con el modelo.

Cárdenas-Cleves et al. (2017) en su estudio de mejora del potencial bioquímico de metano en la digestión anaerobia, utilizan el modelo de Gompertz para ajustar el Potencial Bioquímico de metano y analizar la relación que existe en diferentes relaciones de desperdicio alimenticio y estiércol de cerdo. El modelo de Gompertz modificado se utiliza bajo la premisa de que la producción de CH₄ es proporcional a la actividad microbiana (Nielfa et al., 2015).

Basándose en la experiencia de investigaciones previas relacionadas con la producción de metano, citadas anteriormente, el modelo de Gompertz modificado puede ser utilizado para describir la producción acumulativa de metano durante la digestión anaerobia de distintos sustratos a diferentes concentraciones de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DQO).

Debido a que el modelo de Gompertz y sus diferentes re-parametrizaciones son aplicadas en diferentes tipos de crecimiento, el significado de sus parámetros depende del tipo de datos que se esté analizando, para el caso de la producción de biogás, el modelo queda de la siguiente manera:

$$PM = PM_{max} \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{max} e}{PM_{max}} (L - t) + 1 \right] \right\}$$

PM: Producción acumulada de metano

PM_{max}: Producción máxima acumulada de metano cuando el tiempo tiende a infinito

t: Tiempo en el que se registra la producción de metano

R_{max}: Rapidez máxima de producción de metano o tasa de crecimiento absoluta

L: Tiempo de latencia

e: Base del logaritmo natural e = 2.718

4.4 Inhibición por sustrato

McKee (2014), en su libro de Bioquímica, clasifica la inhibición enzimática en tres tipos principales:

- Inhibición competitiva, en donde el sustrato y el inhibidor compiten por el mismo sitio de la enzima; la actividad de la enzima disminuye al aumentar K_m sin que cambie $V_{m\acute{a}x}$
- Inhibición no competitiva, donde el inhibidor se une a un sitio diferente del sitio activo, el valor de $V_{m\acute{a}x}$ decrece, mientras que el valor de K_m permanece constante
- Inhibición acompetitiva, ocurre cuando el inhibidor sólo se une al complejo – enzima sustrato y no a la enzima libre más observable a altas concentraciones de sustrato. Este efecto es reflejado por el descenso de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m .

Bisswanger (2017), clasifica a la inhibición por sustrato como acompetitiva, en donde a altas concentraciones de sustrato, la rapidez de reacción disminuye en vez de ir hacia una rapidez máxima. Este fenómeno es atribuido a una segunda molécula de sustrato que se une al complejo enzima – sustrato e inhibe la reacción; el segundo sitio de unión puede ser el sitio de unión del producto de la enzima.

La molécula de sustrato adicional unida evita la formación de producto por parte de la primera molécula de sustrato. En la figura 4.5 se muestran los equilibrios de las reacciones enzimáticas, donde la molécula de sustrato inhibitoria sólo puede unirse al complejo enzima – sustrato y actúa como inhibidor acompetitivo (Bisswanger, 2017):

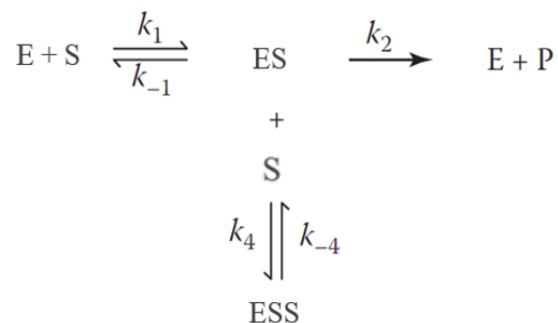


Figura 4.5 Equilibrio de inhibición acompetitiva por sustrato

Los tres tipos de inhibición pueden ser expresados mediante un cambio en los dos coeficientes de la ecuación de rapidez, que puede ser arreglada de la siguiente manera (Mata – Álvarez, 2002):

$$v = V_{max} \frac{1}{1 + \frac{K_M}{S}}$$

En la inhibición acompetitiva, la rapidez máxima se ve afectada de la siguiente manera:

$$v = V_{max} \frac{1}{1 + \frac{K_M}{S} + \frac{I}{K_i}}$$

Siendo “ I ” la concentración del inhibidor y “ K_i ” el coeficiente de inhibición.

Cuando la sustancia inhibitoria es el mismo sustrato, se sustituye la concentración del inhibidor por la del sustrato, quedando la ecuación:

$$v = V_{max} \frac{1}{1 + \frac{K_S}{S} + \frac{S}{K_i}}$$

En el caso de realizar los anteriores ajustes en la ecuación empírica de crecimiento de microorganismos de Monod, la cual tiene el mismo comportamiento que la cinética enzimática de Michaelis – Menten y posee la misma forma, la ecuación resultante conformaría la expresión de Haldane (1930):

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{1 + \frac{K_S}{S} + \frac{S}{K_i}}$$

4.5 Cinética de Haldane-Andrews

Estudios de simulación realizados por John F. Andrews (1968), muestran que el resultado de la inhibición por sustrato en colonias de reactores por lotes es un incremento en el tiempo de latencia, mientras que en un reactor continuo es en inestabilidad del proceso

Una cantidad amplia de autores (Driessen & Anterveld, 2002; Swaen, 1997; Van Laak, 2011) han utilizado la ecuación de Monod con resultados satisfactorios. Andrews (1968) reporta que con esta ecuación se ha encontrado un ajuste razonable para los datos de crecimiento de colonias, incluso para sistemas de colonias mixtas tales como los usados en procesos biológicos para el tratamiento de residuos.

De acuerdo con Valsaraj (2018), la ecuación de Monod es una expresión empírica que declara que, si la concentración de nutriente alcanza un alto valor, la rapidez de crecimiento específico se estabiliza. Sin embargo, esta ecuación no es válida para aquellos sustratos que limitan el crecimiento microbiano a bajas concentraciones y que lo inhibe a altas concentraciones.

La función propuesta por Haldane para la inhibición de enzimas a concentraciones altas de sustrato, es utilizada para ilustrar el comportamiento dinámico de los microorganismos al utilizar un sustrato inhibitorio. Esta función que incorpora los efectos de inhibición a altas concentraciones es de especial valor en proceso biológico utilizados para el tratamiento de residuos que contienen, fenoles, nitrato, amonio, ácidos grasos volátiles, etc., conocidos por su efecto inhibitorio para varios microorganismos encargados de metabolizarlos (Andrews,1968).

La función de inhibición es expresada de la siguiente manera (Andrews,1968):

$$\mu = \frac{\hat{\mu}}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}}$$

Donde:

μ : Tasa de crecimiento específica

$\hat{\mu}$: Tasa máxima de crecimiento específico en la ausencia de inhibición

K_s : Constante de saturación, numéricamente igual a la concentración más baja de sustrato a la cual la tasa de crecimiento específico es igual a la mitad del crecimiento específico máximo en la ausencia de inhibición

K_i : Constante de inhibición, numéricamente igual a la concentración más alta de sustrato a la cual la tasa de crecimiento específico es igual a la mitad del crecimiento específico máximo en la ausencia de inhibición.

S: Concentración de sustrato limitante

La tasa máxima de crecimiento alcanzable, debido a los efectos de inhibición es obtenida de la primera derivada de la ecuación de Haldane e igualarla a 0, la cual puede ser expresada de la siguiente manera (Andrews,1968):

$$\hat{\mu}_{max} = \frac{\hat{\mu}}{1 + 2 \left(\frac{K_s}{K_i} \right)^{0.5}}$$

$$\mu_{max} = \frac{\hat{\mu}}{1 + 2 \left(\frac{K_s}{K_i} \right)^{0.5}}$$

Donde:

$\hat{\mu}_{max}$: Tasa máxima de crecimiento específico alcanzable en la presencia de inhibición

La concentración de este sustrato S_m a esta tasa máxima de crecimiento puede ser obtenida mediante la siguiente ecuación:

$$S_m = (K_s * K_i)^{0.5}$$

5 CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA

En este capítulo se describe cada una de las etapas experimentales de acuerdo con el diagrama presentado en la figura 5.1. Se tendrá un experimento de potencial bioquímico de metano con corridas correspondientes a los sustratos en sus distintas concentraciones, para posteriormente aplicar las teorías cinéticas y finalmente darles una interpretación. La experimentación consiste en la medición de producción de biogás en reactores biológicos por lotes, utilizando como sustrato, compuestos químicos de fórmula conocida a diferentes concentraciones.

Se utilizaron como sustrato, los componentes intermediarios más comunes y que tienen una gran importancia termodinámica en la etapa de fermentación de la digestión anaerobia. Estos compuestos fueron ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido butírico, metanol y etanol.

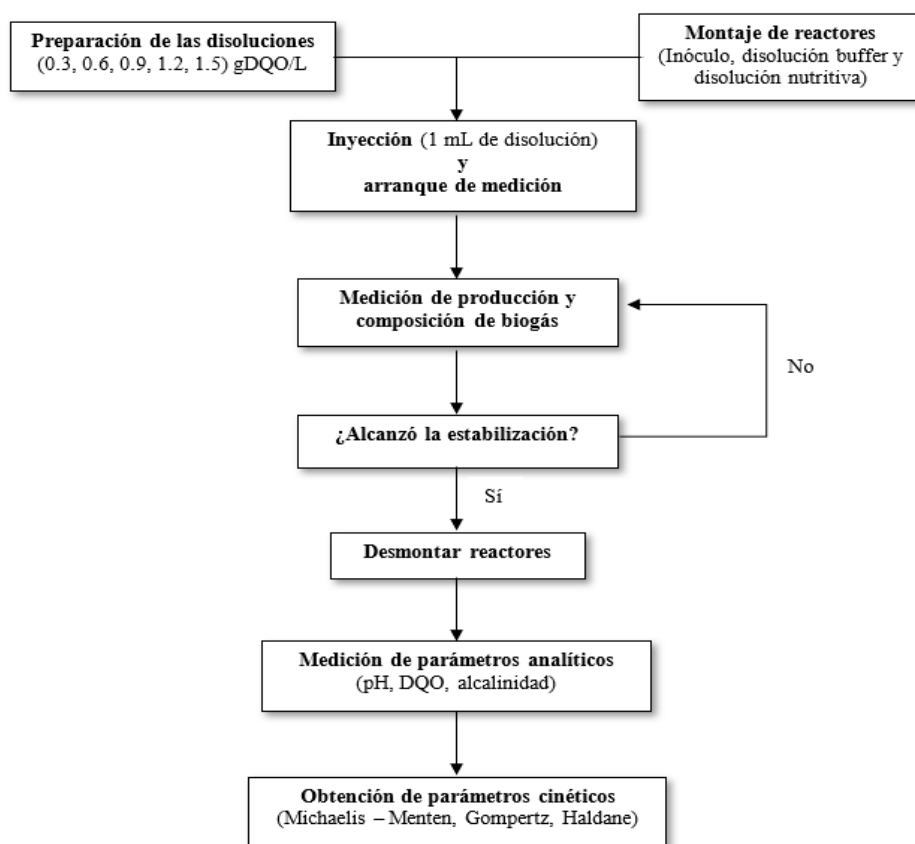


Figura 5.1 Diagrama de procedimiento experimental

Se realizó una prueba previa utilizando metanol como sustrato, con el objetivo de determinar las concentraciones adecuadas de las disoluciones para llevar a cabo la experimentación de manera que la producción de metano fuese detectable para el equipo de medición. Se utilizó

este compuesto debido a que, por la información termodinámica y su estructura, se supuso que se tendría una rapidez de producción de biogás más baja que cualquier otro sustrato.

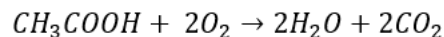
Se observó que para concentraciones menores a 0.3 gDQO/L, la producción de metano no era detectable en la misma proporción que para concentraciones más altas, por lo que se decidió que las concentraciones dentro del reactor fueran de 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 y 1.5 gDQO/L, para que además de ser detectable para el equipo, el cambio en la rapidez de producción de biogás influenciada por la concentración, sea observable y cuantificable con precisión.

5.1 Preparación de disoluciones

Las disoluciones fueron preparadas de manera que la concentración de cada sustrato fuese de 0.3 – 1.5 gDQO/L dentro del reactor, partiendo de que se inyectaría 1 mL de cada disolución. Para evitar la propagación de error en los instrumentos, se realizó una disolución madre por cada compuesto en un matraz aforado de 50 mL, la cual una vez inyectando 1 mL al reactor, tendría una concentración de 1.5 gDQO/L. A partir de la disolución madre, se realizaron en matraces aforados de 25 mL, las disoluciones que tendrían concentraciones de 0.3-1.2 gDQO/L en el reactor.

A continuación, se presenta el cálculo ejemplo para la preparación de disoluciones del ácido acético, que tendrán concentración de 0.3 – 1.5 gDQO/L en cada reactor:

Se calcula la demanda química de oxígeno para este compuesto, considerando la siguiente reacción:



Para oxidar 1 mol de ácido acético o bien 60 g de ácido acético, se requieren 2 mol o equivalente a 64 g de Oxígeno, por lo que se establece la siguiente relación:

$$0.9375 \frac{g \text{ HAc}}{g \text{ O}_2}$$

Partiendo del hecho de que el volumen de trabajo será de 400 mL y que al reactor se le inyectará 1 mL de disolución, se calcularon los gramos de compuesto que debe haber en cada reactor:

$$g \text{ DQO en el reactor} = 0.4 \text{ L} * \left(0.3 \frac{g \text{ DQO}}{L}\right) = 0.6 \text{ g de DQO}$$

$$g \text{ HAc en el reactor} = 0.6 \text{ gDQO} * \left(0.9375 \frac{g \text{ HAc}}{g \text{ O}_2}\right) = 0.5625 \text{ g HAc.}$$

Deben de estar 0.5625 g HAc en 1 mL de la disolución que se va a inyectar, es decir, se requiere que la concentración de la disolución sea $0.5625 \frac{g \text{ HAc}}{\text{mL de disolución}}$, por lo que se calcula la concentración inicial del reactivo:

$$C_i \text{ reactivo} = \text{Pureza del reactivo} * \rho_{\text{reactivo}}$$

$$C_i \text{ reactivo} = 0.999 \frac{g \text{ soluto}}{g \text{ disolución}} * 1.05 \frac{g \text{ disolución}}{mL \text{ de disolución}} = 1.04895 \frac{gHAc}{mL \text{ dis}}$$

Se realiza el cálculo para preparar una disolución madre de 100 mL

$$V_2 = \frac{0.5625 \frac{g \text{ HAc}}{mL \text{ de disolución}} * 50 \text{ mL}}{1.04895 \frac{gHAc}{mL \text{ dis}}} = 26.81 \text{ mL}$$

Se agregará 26.81 mL del reactivo original a un matraz y se realizará el aforo a 50 mL

Para el cálculo del volumen a tomar para las preparar las disoluciones de otra concentración se realiza a partir de la concentración de la disolución madre

Por ejemplo para una concentración inicial de 0.x gDQO/L, se requiere tener 0.1125 g de HAc en un mililitro o en otras palabras una concentración de 0.1125

$$V_2 = \frac{0.1125 \frac{g \text{ HAc}}{mL \text{ de disolución}} * 25 \text{ mL}}{0.5625 \frac{gHAc}{mL \text{ dis}}} = 5 \text{ mL}$$

5.2 Lavado de lodos

Se realiza el lavado de los lodos anaerobios con el objetivo de remover los posibles metabolitos que éstos puedan contener debido a su origen, y de esta manera, asegurar que el estudio realizado contemple sólo la acción del sustrato de nuestro interés. Tal procedimiento consiste en agregar agua destilada a una cantidad de lodos para su posterior centrifugación a una rapidez de 3600 RPM durante 7 minutos; una vez terminada la centrifugación, se retira el sobrenadante, en el cual es supuesto que se han separado distintos metabolitos que pudieran estar presentes. Este procedimiento se repite tres veces a la misma cantidad de lodos y se realiza hasta obtener la masa de lodos requerida para toda la experimentación.

5.3 Equipo utilizado para la medición de biogás producido

El equipo utilizado para la medición de producción de biogás mediante el proceso de digestión anaerobia es el sistema AMPTS, ver figura 5.2, por sus siglas en inglés, de la marca Bioprocess Control, el cual consta de los siguientes componentes:

1.- La unidad de incubación de muestras; con capacidad de pruebas de hasta 15 reactores hechos de vidrio con un volumen de 500 mL, los cuales cuentan con puertos de alimentación y de muestreo, así como un agitador de rotación lenta (10-200 RPM) para mezclar el medio.

Además de un recipiente en el que se proporciona un baño de agua para el control de temperatura de los reactores.

2.- Dispositivo de medición de volumen de gas; el volumen de gas liberado se mide usando un dispositivo de medición de flujo de gas húmedo, el cual cuenta con un arreglo de 15 celdas que funciona mediante el principio del desplazamiento del líquido y flotabilidad.

3.- Software de medición del gas; un sistema de adquisición de datos, el cual ofrece mediciones en tiempo real que cuantifica la producción acumulativa de biogás.

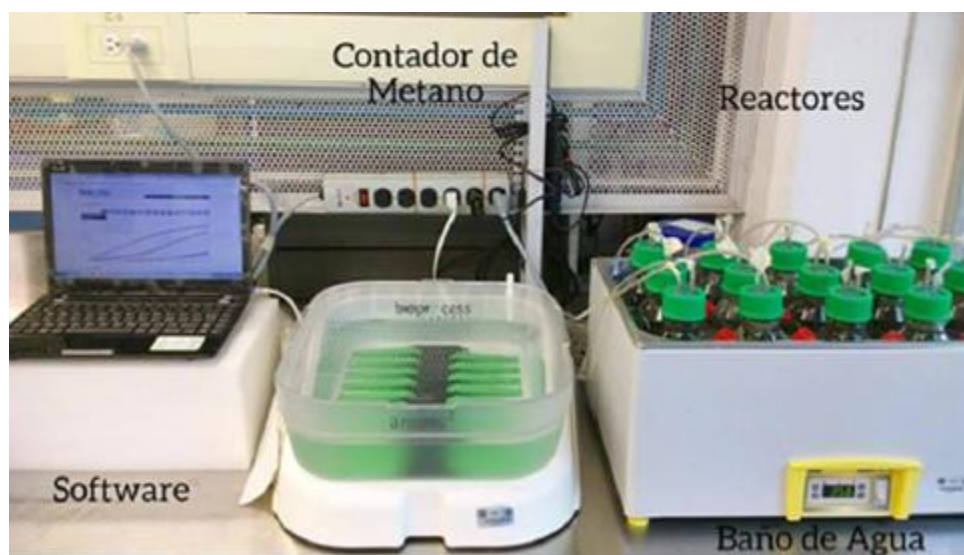


Figura 5.2 Sistema Automático de Prueba de Potencial de Metano (AMPTS, por sus siglas en inglés)

5.4 Montaje de los reactores

Los reactores utilizados en la experimentación son frascos de vidrio con un volumen de 500 mL.

El montaje del reactor se lleva a cabo con la preparación del inóculo, el cual tiene los siguientes componentes:

- 102.4 g de lodos anaerobios provenientes de una planta cervecera, caracterizados como 8g de sólidos volátiles
- 100 mL de una disolución buffer de fosfatos de pH 7.0
- 1 mL de disolución nutritiva
- Agua potable

El agua potable es utilizada para completar un volumen de trabajo de 400 mL en cada reactor. La elección de utilizar este tipo de agua en vez de agua destilada, es debido a su contenido de sales que podría beneficiar el crecimiento microbiano y que junto con la disolución nutritiva ayuda a evitar el rompimiento celular. Una vez se tengan todos los componentes del inóculo en el reactor, se homogeniza la mezcla.

Posteriormente, se introducen los agitadores en cada reactor y se sellan herméticamente con una tapa que contiene un puerto de salida, el cual es conectado al medidor del biogás. Los reactores se sumergen parcialmente (asegurándose de que se cubra la parte del inóculo) en un recipiente de agua de temperatura controlada a 35°C, esta temperatura se encuentra en el rango mesofílico, el cual es óptimo para el crecimiento de microorganismos involucrados en el proceso de digestión anaerobia.

Para asegurar las condiciones anaerobias, se hace pasar a través del reactor, un flujo de nitrógeno para desplazar el volumen de cabeza compuesto por aire. Finalmente se activan los motores de agitación, verificando la correcta conexión entre cada uno de ellos y que la agitación se esté efectuando en cada reactor.

5.5 Inyección de disoluciones a los reactivos.

Para agregar el sustrato al inóculo, se optó por inyectar 1 mL de la disolución de sustrato a través del puerto de medición, una vez ya montado el reactor. Se opta por este procedimiento debido a que, si se agregara el sustrato al inóculo durante el montaje, podría llevar a la pérdida de información valiosa de la producción de biogás, ya que al momento de agregar el sustrato al inóculo comenzaría a efectuarse la reacción enzimática. Además, no se tendrían las condiciones anaerobias necesarias para llevar a cabo la experimentación de nuestro interés.

Ya que se quiere evitar errores en cuanto al conteo de biogás, también es necesario asegurarse de que, al momento de la inyección del sustrato, se active inmediatamente el contador de biogás del equipo AMPTS. En la figura 5.3 se puede observar el momento en que es inyectado 1 mL de sustrato al reactor.

Los datos de producción de biogás que se obtengan, a los cuales les llamaremos datos brutos, corresponden a la generación por parte del sustrato y el inóculo. Para conocer la producción de biogás generado sólo por el sustrato, es necesario contar con blancos para cada ronda de experimentación. El contenido de los blancos sólo corresponderá a los componentes del inóculo, sin inyección de algún sustrato.

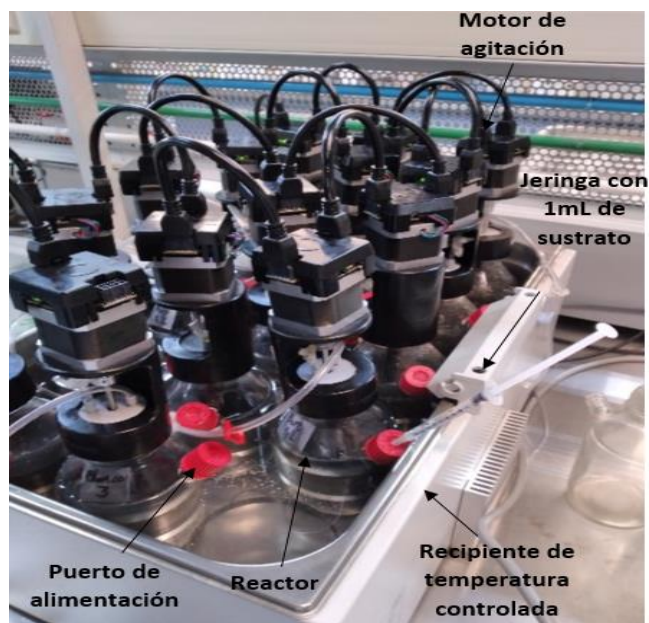


Figura 5.3 Inyección del sustrato al reactor

5.6 Medición de la producción y composición de biogás.

La experimentación es detenida cuando se alcanza una estabilidad de la producción de biogás en los reactores. Para conocer el estado de cada uno de los reactores, se observa diariamente la producción de biogás mediante el software del Sistema Automático de Prueba del Potencial de Metano (AMPTS, por sus siglas en inglés), el cual nos proporciona los valores y muestra una gráfica de volumen de biogás producido contra el tiempo en el que transcurre la experimentación.

Los volúmenes de metano fueron calculados al registrar el volumen de biogás acumulado, acoplado con un análisis realizado en el cromatógrafo de gases; en dicho análisis se muestra el porcentaje de nitrógeno, metano y de dióxido de carbono. Una vez se tenga la composición de biogás, se puede conocer la producción de metano. La muestra que es inyectada al cromatógrafo de gases, es obtenida al extraer parte de la fase gaseosa del reactor con ayuda de una jeringa a través del puerto de alimentación, posteriormente se inyectan 0.5 mL de biogás al cromatógrafo de gases.

Se dice que se alcanza una estabilización en la producción de biogás cuando ésta tiene cambios muy pequeños con respecto al tiempo; además de que la pendiente de producción de biogás para cada concentración se empieza a igualar con la del blanco, por lo que se vuelve útil restar los valores de producción del blanco a los valores de producción de cada sustrato. Cuando esta diferencia se mantiene constante a través del tiempo, se procederá a detener el contador de biogás y a desmontar los reactores.

5.7 Medición de parámetros analíticos.

Se realiza la medición de varios parámetros analíticos para determinar el estado del reactor, posterior al desmontaje. Para esta experimentación, se realizó la medición de pH, alcalinidad y contenido de ácidos grasos volátiles.

Una vez realizado el desmontaje de los reactores, se realiza la medición de pH del contenido del reactor, utilizando un potenciómetro y agitación constante.

Para las pruebas de alcalinidad, fue necesario centrifugar el contenido del reactor. Posteriormente, se tomó un volumen de 20 mL del sobrenadante y se tituló con una disolución de ácido clorhídrico (HCl) de concentración 0.091 N hasta alcanzar un pH de 5.75, el cual está asociado a la alcalinidad de bicarbonatos, posteriormente se realizó la titulación hasta alcanzar un pH de 4.3, correspondiente a la alcalinidad debida a los ácidos grasos volátiles.

Debido a que el contenido de ácidos grasos volátiles se mide mediante un cromatógrafo de gases, es necesario realizar filtraciones al vacío para obtener la muestra que se inyectará, con el fin de evitar problemas con los sólidos disueltos y sedimentos. Para este procedimiento, de igual manera que con el procedimiento de alcalinidad, se centrifuga el contenido de los lodos en el reactor, se retira el sobrenadante y adicionalmente el sobrenadante es filtrado al vacío en dos ocasiones, utilizando filtros con tamaño de poro de 0.45 μm y 0.25 μm , respectivamente.

5.8 Obtención de parámetros cinéticos.

Una vez finalizada la parte experimental, se procede a realizar el análisis de los datos que se obtuvieron de las técnicas implementadas y los datos de medición de los equipos.

Los resultados de producción de metano asociado al sustrato y al consumo endógeno son ajustados mediante la ecuación del modelo de Gompertz modificado, para obtener los parámetros cinéticos de la actividad metanogénica, tales como el tiempo de latencia, tasa máxima de producción y producción máxima

Se analizó la influencia del sustrato y de la concentración de cada sustrato en la rapidez de producción y la producción máxima de metano.

Se realizó el cálculo de la rapidez de producción de metano, para posteriormente utilizar el modelo de Michaelis – Menten y obtener las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$, para conocer la afinidad del sustrato y la rapidez máxima de producción de metano. Para aquellos compuestos que presentan efectos de inhibición, se utiliza el modelo cinético de Haldane.

A continuación, se presenta una matriz de experimentación, tabla 5.1, donde se resumen los procedimientos llevados a cabo en la presente metodología.

Tabla 5.1 Matriz de experimentación

Sustrato	Concentración inicial (gDQO/L)				
	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
Ácido Acético	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparación de disoluciones ➤ Montaje de reactores ➤ Medición de la producción de metano <ul style="list-style-type: none"> ➤ Pruebas Analíticas: <ul style="list-style-type: none"> - pH - Alcalinidad - DQO ➤ Ajuste de curvas de producción de metano ➤ Obtención de parámetros cinéticos de acuerdo con el comportamiento presentado en las curvas de producción de metano 				
Etanol					
Ácido Láctico					
Metanol					
Ácido Butírico					
Ácido Propiónico					

6 CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados de la producción específica de metano acumulada y pruebas analíticas (DQO, alcalinidad, pH y AGV) por cada sustrato y cada concentración de sustrato. Además de sus respectivos análisis con los modelos de Gompertz, Michaelis-Menten y Monod, para obtener los parámetros cinéticos que describan mejor el comportamiento de cada sustrato en cuanto al volumen acumulado de metano producido.

6.1 Curvas de producción específica de metano

El equipo AMPTS, registró valores de volumen de biogás producido en cada reactor en mililitros normalizados (Nml) (0°C y 1 atm) y mediante un análisis de cromatografía se determinó la composición de biogás. De esta manera, logramos conocer cuál fue la producción de metano en cada reactor. Además, con el objetivo de presentar resultados específicos y comparables con otras investigaciones, se consideró dividir la producción de metano entre los gramos de sólidos volátiles utilizados en cada experimentación (8gSV), obteniendo como resultado la producción específica de metano con unidades de (Nml/gSV).

En las figuras 6.1 y 6.2, podemos observar las gráficas de producción específica de metano generado por parte de la suma de sustrato e inóculo y la producción por parte del sustrato, respectivamente, para concentraciones de 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, y 1.5 gDQO/L. Hay que observar que para los sustratos ácido acético(a) y etanol(b) la cantidad de metano producido que muestran las curvas es proporcional a las concentraciones de sustrato añadido; algo que se observa de una forma menos definida para el metanol (e). En cambio, la proporcionalidad entre la cantidad de producción y la concentración se pierde con los ácidos láctico (c), butírico(d) y propiónico(f).

Para obtener el volumen acumulado de metano producido y asociado exclusivamente al sustrato, al volumen acumulado de metano producido por el sustrato e inóculo se le restó el volumen acumulado de metano producido por el inóculo (correspondiente al consumo endógeno), mismo que corresponde a la producción generada por el reactor (inóculo) que se utiliza como control.

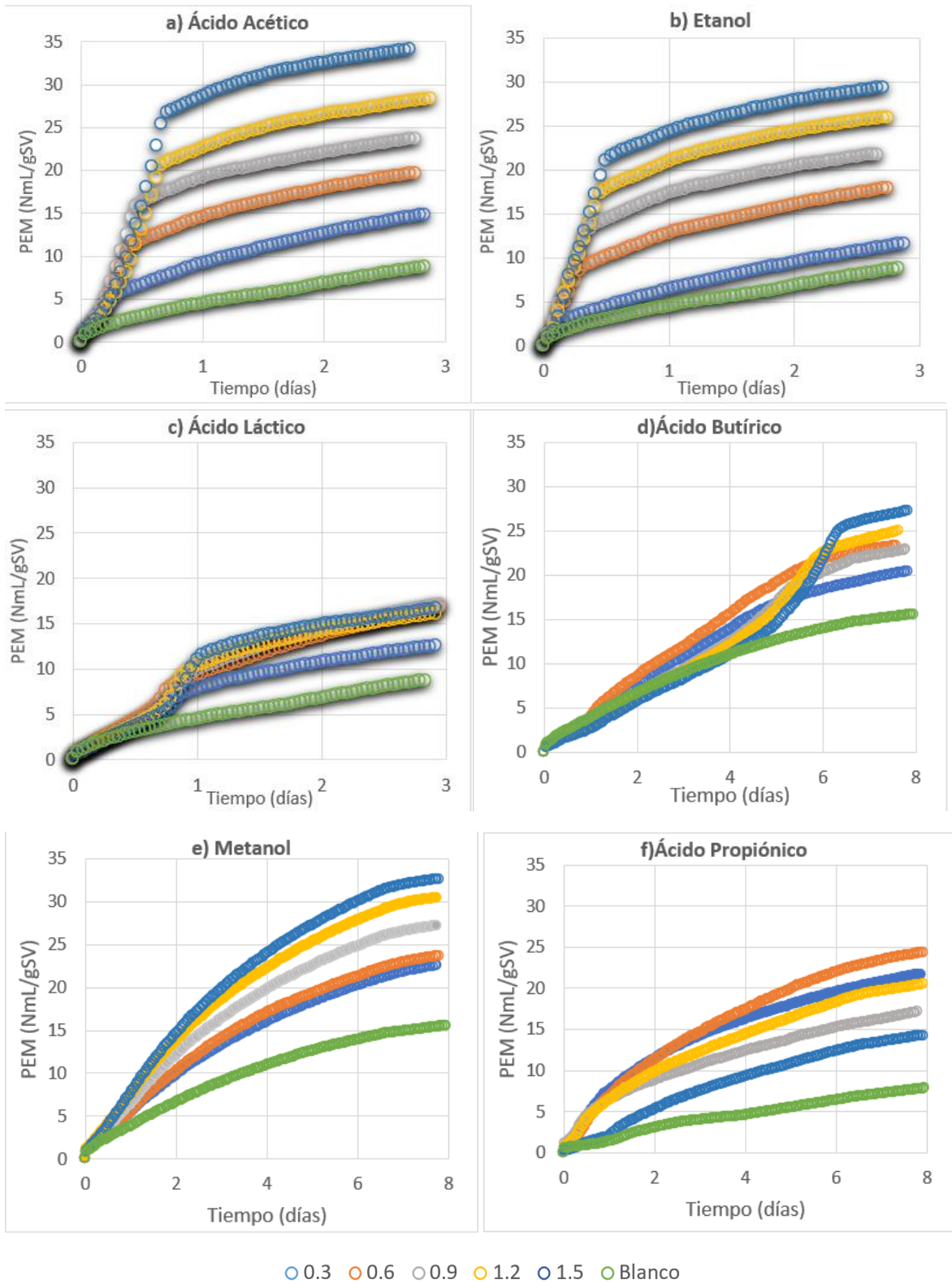


Figura 6.1 Gráficas de producciones específicas de metano (PEM) por parte de la mezcla sustrato más inóculo

Para el cálculo de la producción de metano a partir de las curvas de producción de biogás, se realiza lo siguiente:

Del análisis de cromatografía para el reactor con ácido acético con concentración de 0.3 gDQO/L el día 1, se obtiene la siguiente composición del biogás:

- Metano: 0.7643
- Dióxido de carbono: 0.2357

Mientras que, para el reactor de control, se obtiene la siguiente composición de biogás al día 1:

- Metano: 0.7692
- Dióxido de carbono: 0.2308

El equipo AMPTS, nos da como información el volumen acumulado de biogás producido, por lo que se multiplica por la composición de metano presente en la mezcla y se obtiene el metano producido por el sustrato e inóculo.

Por ejemplo, la producción para el biogás en el día 0.96 al día 1, es de 1.9 NmL para el reactor con concentración inicial de 0.3 gDQO/L, para calcular el volumen de metano, se realiza lo siguiente:

$$NmL\ de\ CH_4_{Sustrato\ e\ Inóculo} = 1.9\ mL\ Biogás * (0.7643) = 1.4522\ NmL\ de\ CH_4$$

La producción de biogás por parte del reactor de control se considera como el biogás producido por el inóculo, al igual que con los reactores que contienen sustrato, se multiplica por la composición de metano que arroja el análisis de cromatografía.

$$NmL\ de\ CH_4_{Reactor\ de\ control} = 1.2\ mL\ Biogás * (0.7692) = 0.9230\ NmL\ de\ CH_4$$

Finalmente, para conocer la producción de metano debido al sustrato, se realiza una resta del metano producido en el reactor de control a la producción de metano registrada en los reactores a los que les fue añadido sustrato:

$$NmL\ de\ CH_4_{Sustrato} = (1.4522 - 0.9230)NmL\ de\ CH_4 = 0.5292\ NmL\ de\ CH_4$$

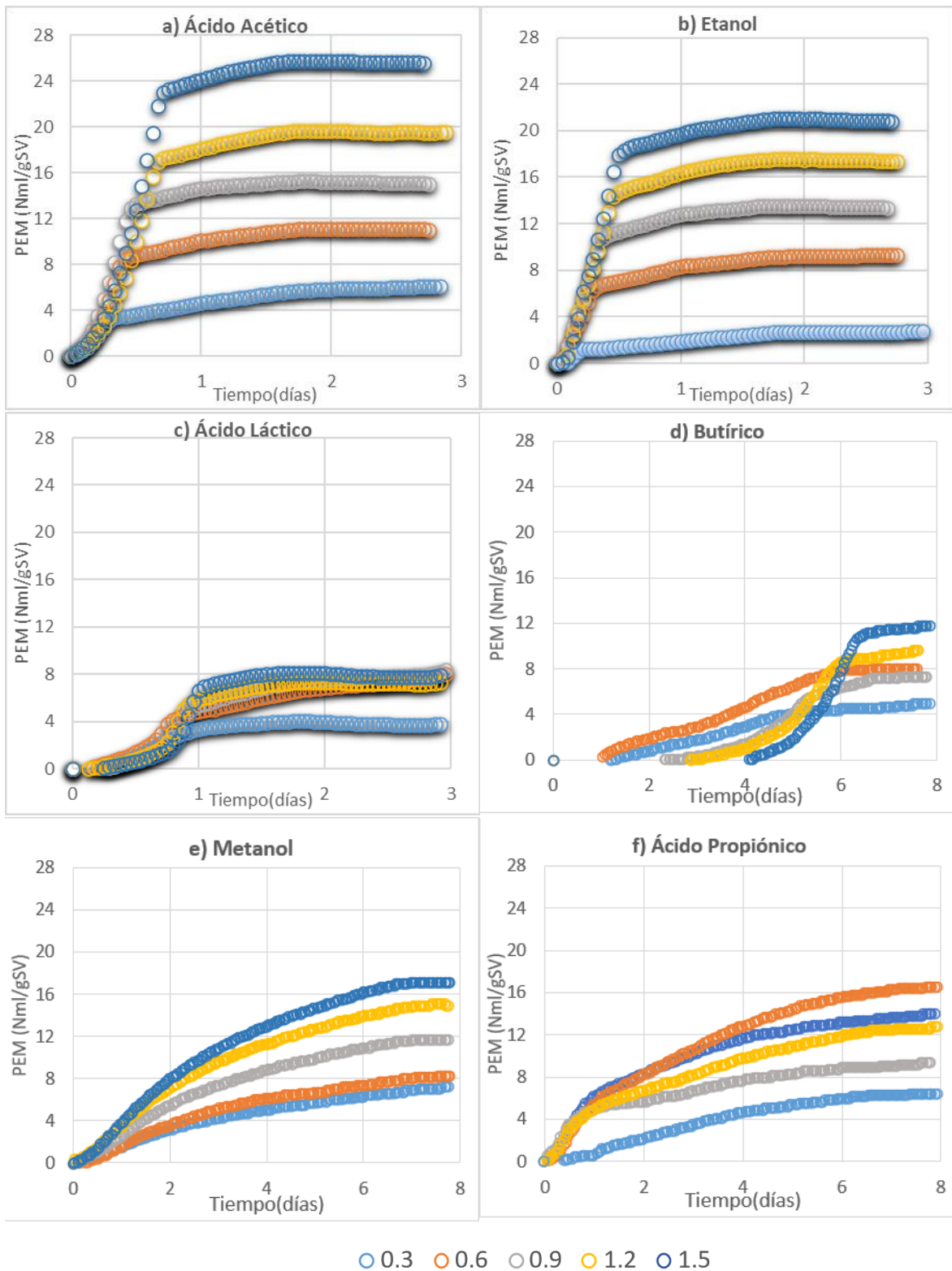


Figura 6.2 Gráficas de producción específica de metano (PEM) por parte del sustrato

Las gráficas de las figuras 6.1 y 6.2 y tienen como valores máximos 35 y 28 (NmL/gSV), respectivamente, con el propósito de visualizar y comparar fácilmente el volumen de metano acumulado entre cada uno de los sustratos. Para el caso de las primeras gráficas, se incluye el metabolismo endógeno del inóculo.

Se debe considerar que, para el caso del ácido acético, etanol y ácido láctico, las pruebas fueron llevadas a cabo durante 3 días, mientras que, para los sustratos restantes se prolongaron hasta aproximadamente 8 días, debido a que hasta ese tiempo alcanzaron un máximo en la producción de metano. Se observa que la mayor producción de metano corresponde al ácido acético, teniendo valores de producción máxima entre 6.1 y 25.7 NmL/g SV, seguido del etanol con una producción entre 2.8 y 20.8 NmL/gSV. En contraste, el ácido láctico a pesar de alcanzar una producción máxima antes de los 3 días es el sustrato que cuenta con volúmenes de metano acumulado más bajos, con valores entre 3.8 y 7.9 NmL/gSV.

Una gran parte de los estudios realizados acerca de la producción de metano utilizando diferentes metabolitos, reportan que el ácido acético es el sustrato con el que se obtiene la producción más alta, además de favorecer el crecimiento microbiano. Lo anterior, debido a que la degradación del ácido acético a metano está favorecida termodinámicamente y a diferencia de otros sustratos que puedan ser utilizados, su degradación no requiere la formación de compuestos intermediarios, ya que es el producto principal de la acetogénesis y por tanto, un sustrato con una rapidez de producción alta en comparación con los demás metabolitos realizados en este estudio.

En el caso del etanol, es un sustrato que de la misma manera que el ácido acético, muestra una de las producciones más altas de metano. Wu et al. (2015) en su estudio del efecto del etanol en la prefermentación, los resultados mostraron que con una prefermentación etanólica se obtienen mejores rendimientos en la producción de metano, además de disminuir los efectos de inhibición por acidificación e incluso se logró reducir la fase de atraso y promover el crecimiento de metanógenos; lo que concuerda con los resultados obtenidos en cuanto a producción de metano.

Al comparar las curvas de producción específica de metano por parte del ácido láctico con las curvas de etanol y ácido láctico, podemos observar fácilmente que para este sustrato se tiene una menor producción de metano, así como una fase de latencia más prolongada, hasta que ocurre un cambio drástico en la rapidez de producción, para posteriormente disminuir y llegar a un máximo. Yang et al. (2015) en un estudio de rendimiento de metano y cinética, reporta algo similar, ya que en la producción acumulada de metano utilizando como sustrato el ácido láctico, muestra dos fases de latencia, así como el aumento drástico en la producción de metano después de superar estas dos fases, hasta llegar a un máximo. Además, reporta un valor de crecimiento microbiano más bajo al compararlo con reactores que utilizan ácido acético, propiónico y valérico.

Para el reactor con concentración inicial de 0.3gDQO/L de ácido láctico a diferencia de los demás reactores del mismo sustrato, no presenta una fase de latencia, ni el cambio abrupto anteriormente mencionado. Zellner et al. (1994) señala que, a bajas concentraciones, el

lactato puede ser directamente convertido en acetato mediante la bacteria anaerobia Clostridia. Por otra parte, la degradación de ácido láctico a ácido acético y posteriormente a metano, lleva como intermediario al ácido propiónico, el cual podría estar causando esas fases de atraso prolongadas en comparación con los demás metabolitos que alcanzaron producción máxima en 3 días.

Para el caso de los sustratos cuyas pruebas se prolongaron hasta 8 días, el ácido butírico es el sustrato que muestra una menor producción acumulada de metano, con valores entre 4.9 y 11.7 NmL/gSV. Cabe destacar que, para las pruebas realizadas para este sustrato, se observa un periodo de tiempo de atraso o latencia, prolongado hasta los 4 días para la concentración más alta de sustrato; en general, a mayor concentración se observa un tiempo de latencia mayor. Posteriormente, para el metanol se registra una producción entre 6.9 y 17.2 NmL/gSV, así como un tiempo de atraso más corto en comparación con el ácido butírico. En el caso del ácido propiónico, la producción de metano tiene un comportamiento particular en relación con los demás sustratos; generalmente se observa que a medida que se aumenta su concentración inicial, la producción máxima incrementa. Sin embargo, para el ácido propiónico observamos que la producción máxima se da para la concentración de 0.9 gDQO/L, seguido de 0.3 gDQO/L, mientras que para el reactor con concentración de 1.5 gDQO/L se muestra el rendimiento máximo más bajo.

De acuerdo con Han et al. (2020), el ácido propiónico ha mostrado inhibición de la producción de biogás, incluso a concentraciones muy baja. Además, afecta la abundancia de los metanógenos consumidores de ácido acético y, por lo tanto, afecta el rendimiento en la producción de biogás. El mecanismo que se ha descrito para explicar la toxicidad que ejerce el ácido propiónico, es la difusión de ácido propiónico no ionizado en las células microbianas (Russel, 1992)

La abundancia de metanógenos como de bacterias sintróficas en digestores varía de forma similar al orden de magnitud con la concentración inicial de ácido propiónico. La conversión del propionato a acetato es termodinámicamente desfavorable, por lo tanto, sólo a concentraciones extremadamente bajas el ΔG se convertirá en negativo (Han et al., 2008). Capson – Tojo et al. (2017) reporta que las tasas de carga orgánica, la alta concentración de carbohidratos sin fibra y grasa son algunas de las razones por las que se puede incrementar la tasa de rapidez del ácido propiónico hasta un punto en que se exceda la tasa de consumo.

En el caso del metanol Wejima et al. (2001), menciona que el metanol es un excelente sustrato homoacetogénico, además de que, ciertos cultivos de microorganismos de este tipo presentan gran crecimiento en presencia de este sustrato. Florencio en 1994, determina que a bajas concentraciones el metanol es principalmente usado por metanógenos. Además, que, en condiciones mesofílicas, la metanogénesis del metanol es favorecida fuertemente sobre los homoacetógenos, lo cual puede explicar la alta producción de metano a pesar de que se tomaron 8 días para llegar a un máximo

6.2 Ajuste con el modelo de Gompertz modificado

Para describir la cinética de la producción de metano, incluyendo el tiempo de latencia observado en los experimentos de algunos sustratos, se utilizó el modelo de Gompertz modificado. En la tabla 6.1 se encuentran reportados los parámetros obtenidos del ajuste para estas curvas, como son la producción máxima específica de metano (PM_{max}), tiempo de latencia (L) y tasa máxima de producción (R_{max}), de acuerdo con la ecuación de Gompertz modificada, presentada a continuación:

$$PM = PM_{max} \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{max} e}{PM_{max}} (L - t) + 1 \right] \right\}$$

El modelo de Gompertz modificado, se ajustó a las curvas de producción por parte del sustrato, con coeficientes de correlación (R^2) entre 0.946 – 0.996. Se puede observar que, para los casos de ácido acético, etanol y metanol, la producción máxima específica de metano obtenida mediante el modelo de Gompertz, incrementa a medida que se aumenta la concentración inicial de sustrato. En cambio, el ácido láctico en la concentración de 1.2 gDQO/L tienen una menor producción máxima (7.22 NmL/gSV) que la producción para la concentración de 0.9 gDQO/L (7.77 NmL/gSV), al igual que con el ácido butírico en donde se obtiene una mayor producción máxima (8.22 NmL/gSV) para la concentración de 0.6 gDQO/L en comparación con la concentración de 0.9gDQO/L (7.67 NmL/gSV). Para el caso del ácido propiónico, los valores de producción máxima no tienen una relación tan estrecha con la concentración inicial del sustrato.

Los valores para las tasas máximas específicas de producción de metano tienen un comportamiento igual que para los valores de producción máxima, ver tabla 6.1; para el caso del ácido acético, etanol y metanol incrementa a medida que la concentración inicial del sustrato se incrementa. El ácido láctico y el ácido butírico presentan un comportamiento distinto, ya que se pierde la relación con las concentraciones, tal y como puede observarse para las concentraciones de 0.9 – 1.2 y 0.6 – 0.9 gDQO/L, donde se obtuvieron valores más altos de tasa máxima para los valores más bajos de concentración. Mientras que para el ácido propiónico no se muestra relación alguna con la concentración.

Respecto al tiempo de latencia (L), tabla 6.1, el etanol fue el sustrato que presentó los valores más bajos, desde 0.03 – 0.09 días, seguido del ácido acético en un rango de valores de 0.07 – 0.23 días. Los sustratos que presentan el mayor tiempo de latencia son el ácido láctico y el ácido butírico, con valores entre 0.35 – 0.69 y de 1.34 – 4.87 días, respectivamente. El tiempo de latencia es fácilmente observable en la gráfica de ácido butírico(d) de la figura 6.2, ya que la producción de metano se registra hasta después del primer día y en el caso de la concentración más alta, se observa posterior al cuarto día. Para el caso del metanol y el ácido propiónico, los tiempos de latencia para casi todas las concentraciones, muestran valores negativos, al igual que para algunos valores de ácido acético y etanol, indicando que no se presentó tiempo de latencia o que fue demasiado corto para la aclimatización a esas

concentraciones de sustrato. En algunos casos se presentaron valores negativos para este parámetro, por lo que se decidió no presentarlos en la tabla 6.1.

Para el caso del ácido acético y etanol se observa que existe una relación proporcional entre el tiempo de latencia y la concentración inicial de sustrato, lo mismo ocurre para el ácido láctico y el ácido butírico, a excepción de las dos concentraciones más bajas.

En cuanto al coeficiente de correlación, se observa que a medida que se incrementa la concentración del sustrato, el modelo de Gompertz modificado se ajusta de mejor manera, esto puede ser observado claramente para el ácido acético y el etanol, como se mencionó anteriormente, a bajas concentraciones, estos sustratos presentan tiempos de latencia muy cortos, por lo que para el modelo de Gompertz modificado es más difícil calcular este tiempo y, por lo tanto, la correlación se vuelve menor.

Tabla 6.1 Parámetros obtenidos con el modelo modificado de Gompertz para las curvas de producción de metano por parte del sustrato.

Sustrato	Concentración (gDQO/L)	PM _{max} (Nml/gSV)	R (Nml/(gSV·d))	L (Días)	R cuadrada
Ácido Acético	0.3	5.90	5.03	---	0.954
	0.6	10.79	22.59	0.07	0.979
	0.9	15.02	40.12	0.12	0.994
	1.2	19.44	38.67	0.22	0.994
	1.5	25.61	51.68	0.23	0.995
Etanol	0.3	2.79	1.75	---	0.946
	0.6	8.97	14.93	---	0.955
	0.9	13.23	30.96	0.03	0.986
	1.2	17.21	37.56	0.06	0.99
	1.5	20.67	47.65	0.09	0.994
Ácido Láctico	0.3	3.86	6.28	0.35	0.993
	0.6	7.41	5.99	0.23	0.987
	0.9	7.77	9.23	0.46	0.993
	1.2	7.22	13.45	0.53	0.993
	1.5	7.94	21.03	0.69	0.987
Ácido Butírico	0.3	5.00	1.30	1.59	0.992
	0.6	8.22	1.95	1.34	0.947
	0.9	7.67	3.02	3.57	0.986
	1.2	9.42	5.06	4.18	0.97
	1.5	12.47	7.33	4.87	0.979
Metanol	0.3	7.18	1.37	---	0.989
	0.6	8.12	1.80	0.13	0.989
	0.9	11.92	2.51	---	0.992
	1.2	15.20	3.18	---	0.992
	1.5	17.48	3.77	0.05	0.993
Ácido Propiónico	0.3	13.59	3.35	---	0.976
	0.6	16.90	3.37	---	0.988
	0.9	9.28	1.82	---	0.95
	1.2	13.13	2.31	---	0.978
	1.5	6.66	1.43	0.52	0.996

En la figura 6.3 se presentan los gráficos de la producción específica de metano junto con las curvas de producción estimada obtenidas con el modelo de Gompertz modificado para cada concentración de sustrato. En estas gráficas no se decidió establecer valores máximos para el eje vertical, con el objetivo de que se pudieran visualizar las curvas obtenidas con el modelo de ajuste junto con los puntos obtenidos experimentalmente.

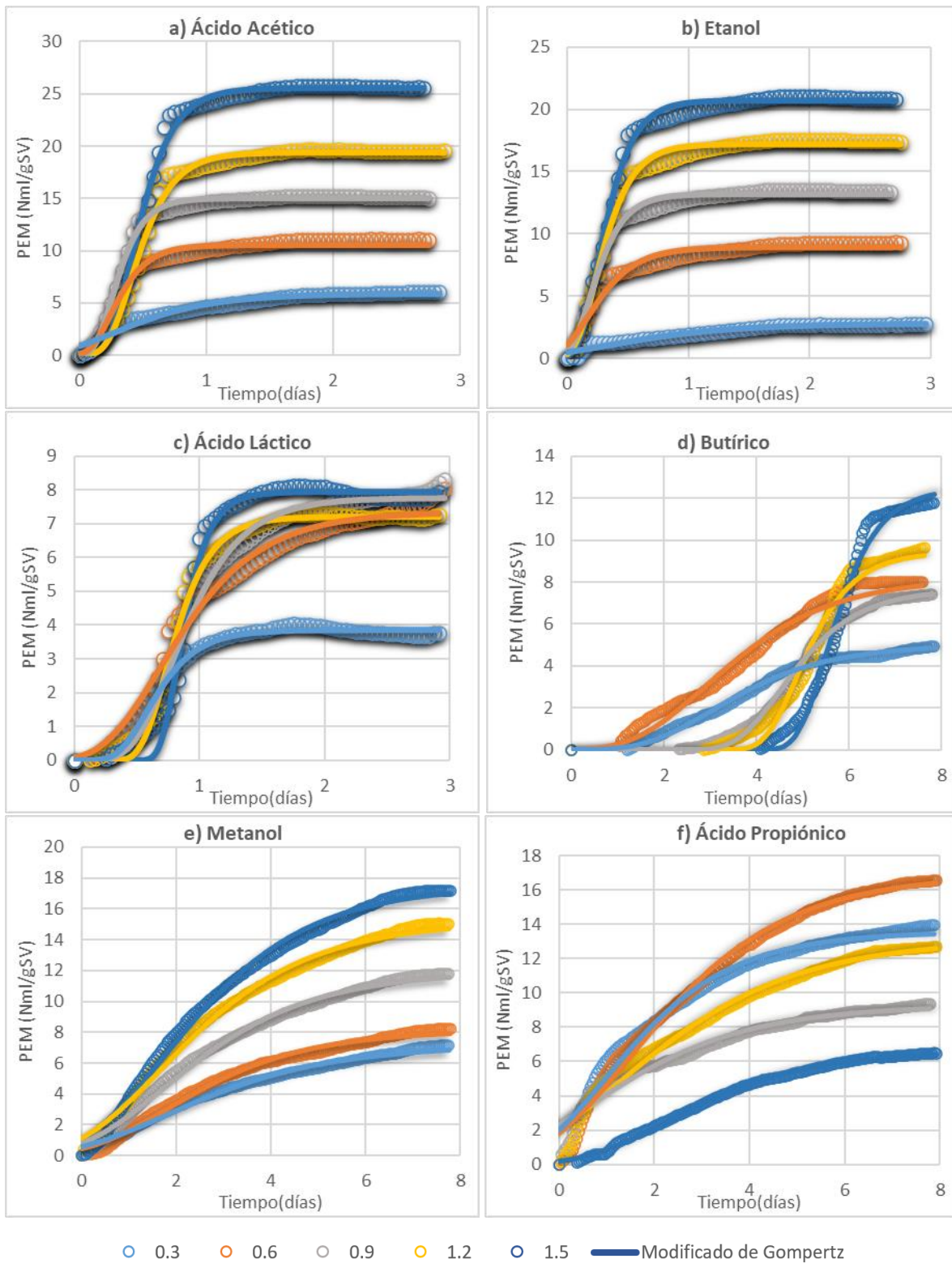


Figura 6.3 Gráficas de producción específica de metano por parte del sustrato y su ajuste con el modelo de Gompertz

De las gráficas de la figura 6.3 se debe destacar que para las curvas de las concentraciones de 0.6 – 1.5 gDQO/L correspondientes al ácido láctico y el ácido butírico, se observa que una vez que se supera la fase de latencia, comienza la producción de metano, pero posteriormente se da un incremento abrupto por un periodo corto de tiempo comparado con el periodo de latencia; una vez finalizado este cambio abrupto, la producción de metano sigue ocurriendo a una velocidad más baja, hasta llegar a su máxima producción. Debido a este fenómeno, es que gráficamente observamos que, para estos sustratos, las curvas estimadas mediante el modelo de Gompertz no se acoplan de la misma manera en que lo hacen las curvas de los demás sustratos.

6.3 Cálculo de la rapidez de producción de metano

La rapidez específica inicial también es un parámetro calculado a través del modelo de Gompertz modificado, denotado como R (tasa máxima de producción de metano). Sin embargo, se decidió hacer una regresión lineal a los puntos que se consideraron como parte de la fase definida como aclimatada al sustrato, debido a que el modelo de Gompertz modificado a bajas concentraciones se ajusta a los datos experimentales de la producción de metano con coeficientes de correlación más bajos que a concentraciones más altas. Por ejemplo, en la figura 6.4 se muestran las gráficas de producción específica de metano para las concentraciones de 0.3 y 1.5 gDQO/L correspondientes al ácido acético en donde se puede observar que, en la gráfica correspondiente a la concentración más baja, la pendiente calculada mediante la regresión lineal difiere en gran medida, en comparación con la pendiente de la curva del modelo, teniendo valores de 14.04 y 5.03 Nml/d·SV, respectivamente. En contraste, en el gráfico b) de la figura 6.4 correspondiente a la concentración más alta, se puede observar que el modelo se acopla de mejor manera y que las pendientes son similares, tal como lo muestran los valores de rapidez calculados de 48.02 Nml/d·gSV para la regresión lineal y de 51.68 Nml/d·gSV para el modelo de Gompertz modificado.

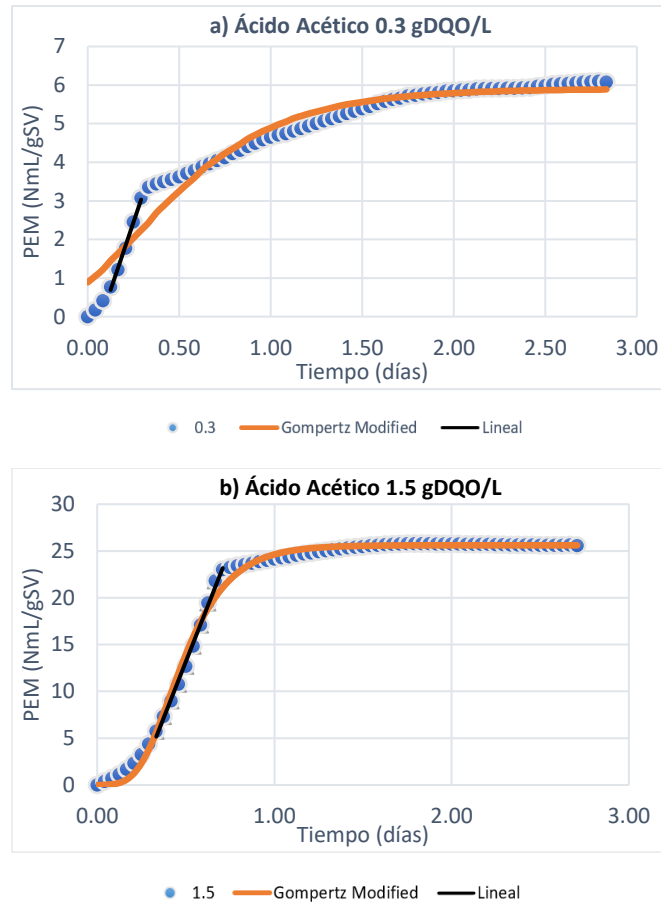


Figura 6.3 Gráficas de ácido acético para comparar la determinación de la rapidez específica entre cálculo de la pendiente y el modelo de Gompertz

Para el análisis cinético con la ecuación de Michaelis-Menten, fue comentado anteriormente que debe obtenerse la rapidez inicial de consumo de sustrato. Como adaptación a la prueba del potencial bioquímico de metano, se midió la rapidez inicial específica de la producción metano, la cual es indicadora del consumo de sustrato. En esta investigación, la obtención de esta rapidez se realizó mediante un ajuste lineal de los puntos que se encuentran en la zona definida como estado pseudoestacionario o fase aclimatada al sustrato, es decir, aquella fase que se encuentra después de la fase de atraso o de latencia y antes de la fase de agotamiento del sustrato; además de ser la zona en donde se obtiene la mayor pendiente, que equivale a la tasa más alta de producción de metano. Para esto es necesario definir los puntos que se encuentran en esta fase y posteriormente calcular la rapidez específica en esta zona.

Para mostrar el proceso que se siguió para identificar el estado pseudoestacionario y calcular la rapidez, en la gráfica a) de la figura 6.5 se muestran los puntos correspondientes a la fase de atraso y a la del estado pseudoestacionario tomados de la gráfica de rendimiento de producción de metano por parte del ácido acético (después de restar la producción debido al inóculo). Posteriormente en la gráfica b) se observan sólo los puntos elegidos correspondientes a la fase del estado pseudoestacionario. De acuerdo con la teoría de Michaelis-Menten, es en esta fase de aclimatización del sustrato al medio, en donde se tiene

la concentración más cercana a la inicial, la cual tiene un valor conocido y es posible relacionar la concentración y la rapidez para el análisis cinético. En la fase de estado pseudoestacionario la formación del producto tendrá una cinética de orden 0 respecto al tiempo, por lo que, a estos puntos, se les realizó una regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta, de la cual, la pendiente corresponderá a la rapidez inicial específica de producción de metano, con unidades de (Nml/gSV·día).

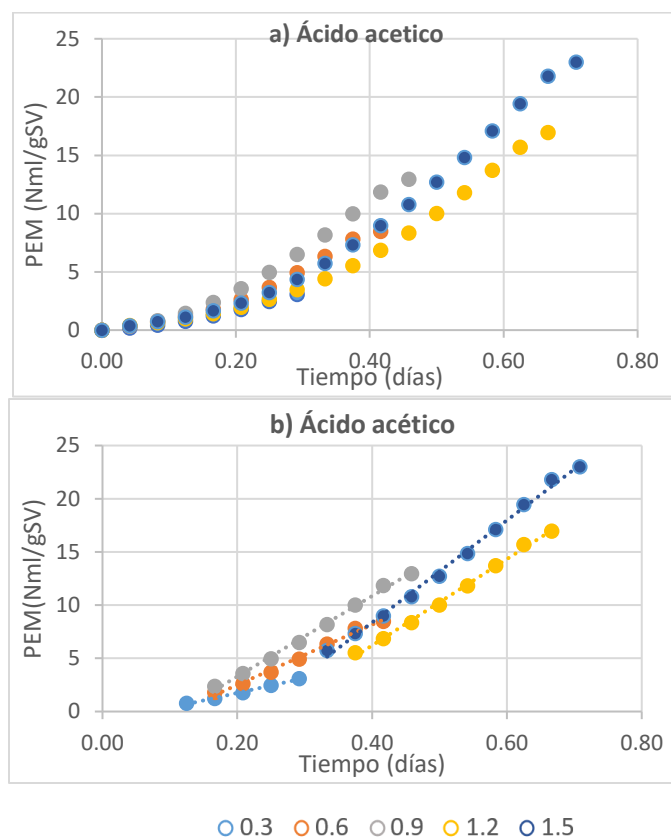


Figura 6.4 Gráficas de ácido acético para cálculo de la rapidez específica de producción de metano.

En la figura 6.6 se muestra el procedimiento que se realizó para el caso del ácido láctico, se quiso puntualizar en este sustrato, debido al fenómeno que fue comentado anteriormente, en donde comienza la producción de metano para después presentarse un cambio abrupto en la rapidez de producción (una pendiente más pronunciada), el cual se presenta en este sustrato y además en el ácido butírico. Para estos casos, se contempló hacer una regresión lineal sobre los puntos en donde se registra el cambio abrupto en la rapidez de producción específica de metano, ver gráfica b) de la figura 6.6.

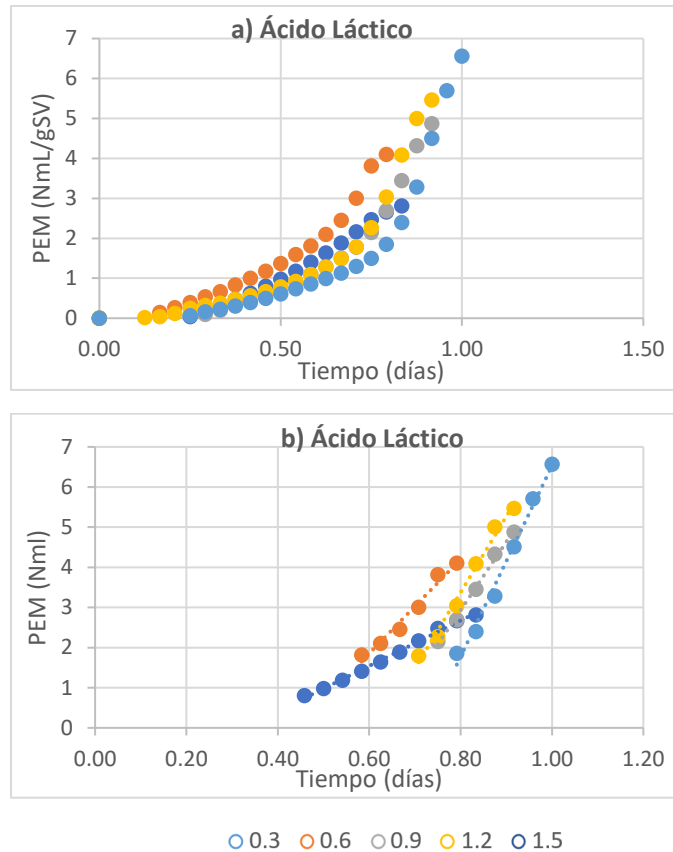


Figura 6.5 Gráficas de ácido láctico para cálculo de la rapidez específica de producción de metano.

En la gráfica a) de la figura 6.6, en un principio se observa un tiempo de latencia, posteriormente empieza la producción de metano y finalmente se muestra ese cambio abrupto en la rapidez.

A continuación, se presenta la tabla 6.2, donde se presentan los resultados de la rapidez inicial específica de producción de metano para cada una de las concentraciones de los distintos sustratos, junto a estos valores, se encuentra el coeficiente de correlación al cuadrado que se obtuvo al realizar la regresión lineal a los puntos que se consideraron en el estado estacionario, tal y como se consideró en el procedimiento efectuado en las figuras 6.5 y 6.6.

A excepción del ácido propiónico, la producción específica inicial de metano aumenta conforme aumenta la concentración inicial de los sustratos (ácido acético, etanol, ácido láctico y ácido butírico), además de que no parece tener una relación proporcional con la cantidad de sustrato inicial.

Tabla 6.2 Rapidez de producción específica de metano por parte del sustrato.

Sustrato	Concentración	Rapidez (Nml/(día·gSV))	R ²
Ácido Acético	0.3	14.04	0.994
	0.6	28.31	0.992
	0.9	37.81	0.996
	1.2	40.59	0.997
	1.5	48.02	0.996
Etanol	0.3	7.91	0.971
	0.6	22.43	0.997
	0.9	31.13	0.998
	1.2	35.54	0.998
	1.5	42.03	0.998
Ácido Láctico	0.3	5.65	0.996
	0.6	11.75	0.973
	0.9	17.01	0.994
	1.2	18.95	0.987
	1.5	23.79	0.988
Ácido Butírico	0.3	1.10	0.991
	0.6	1.83	0.998
	0.9	3.13	0.986
	1.2	5.23	0.995
	1.5	7.83	0.993
Metanol	0.3	1.67	0.997
	0.6	1.99	0.992
	0.9	2.87	0.997
	1.2	3.74	0.997
	1.5	4.34	0.994
Ácido Propiónico	0.3	8.73	0.991
	0.6	8.11	0.991
	0.9	9.07	0.971
	1.2	8.57	0.991
	1.5	2.71	0.997

6.4 Obtención de parámetros cinéticos de Michaelis – Menten

Los datos de la rapidez inicial específica para la producción de metano fueron utilizados para obtener los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis-Menten. Para la obtención de estos parámetros se utilizó la ecuación de Lineweaver y Burk. A continuación, se presenta como ejemplo, el procedimiento realizado para el ácido acético:

A continuación, se presenta un cálculo ejemplo, para los datos utilizados para la producción de metano por parte del ácido acético:

Se graficó el inverso de la rapidez contra el inverso de la concentración inicial, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Se realiza una regresión lineal a los puntos graficados y de la ecuación de este ajuste, podemos obtener los valores de los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y de K_m de la siguiente manera:

$$b = \frac{1}{V_{max}}; \quad V_{max} = \frac{1}{b}$$
$$m = \frac{K_m}{V_{max}}; \quad K_m = m * V_{max}$$

Donde “b” es la ordenada al origen y “m” es la pendiente de la recta

Para el caso del ejemplo presentado en la figura 6.7:

$$b = 0.0069; \quad V_{max} = \frac{1}{0.0069} = 144.91 \frac{Nml}{d\acute{a}a * gSV}$$

$$m = 0.0189; \quad K_m = 0.0189 * 144.91 = 2.74 \frac{gDQO}{L}$$

En la tabla 6.3 se presentan los valores del cálculo de los inversos de velocidad y concentración inicial:

Tabla 6.3 Datos para la linealización con el modelo de Lineweaver - Burk

1/[S] (1/(gDQO/L))	1/V (1/(NmL/gSV·d))
3.333	0.0712
1.667	0.035
1.111	0.026
0.833	0.025
0.667	0.021

Los valores de la tabla 6.3 fueron graficados tal y como se muestra en la figura 6.7, donde se muestra el gráfico obtenido junto con los datos de la regresión lineal realizada.

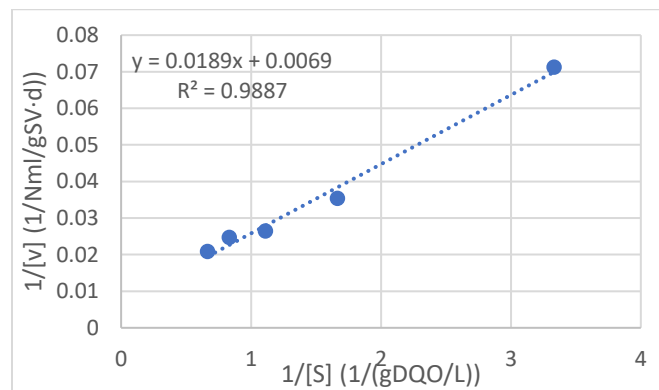


Figura 6.6 Diagrama de Lineweaver – Burk para la producción de metano por parte de ácido acético

En la figura 6.8 se presentan los diagramas de Lineweaver – Burk para cada sustrato en la producción de metano por parte del sustrato, siguiendo el procedimiento previamente explicado. En cada uno de ellos se muestra la ecuación de la recta, así como el coeficiente de correlación.

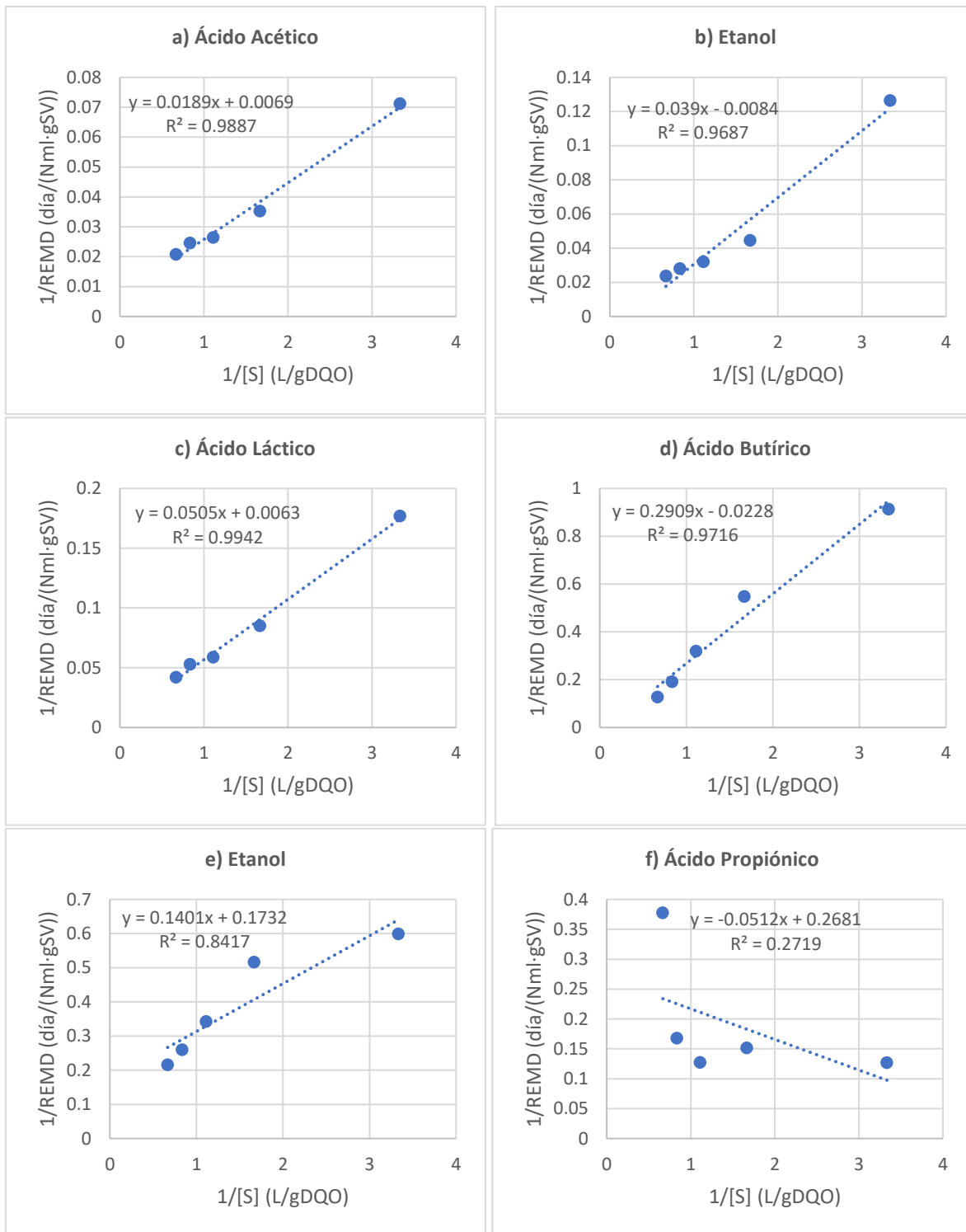


Figura 6.7 Diagramas de Lineweaver – Burk para la producción de de metano por parte del sustrato

Además de utilizar la ecuación de Lineweaver – Burk, se decidió utilizar una regresión no lineal para el cálculo de los parámetros de la ecuación de Michaelis – Menten. Este cálculo fue realizado mediante el software IBM SPSS Statistic, mismo que fue utilizado para la obtención de los parámetros de Gompertz.

En la tabla 6.4 se presenta un resumen de los valores de las constantes cinéticas obtenidas, mediante la ecuación de Lineweaver – Burk y el ajuste no lineal, junto con su respectivo coeficiente de correlación (R^2).

Tabla 6.4 Constantes de Michaelis – Menten para la producción de metano por parte del sustrato, obtenidas mediante Lineweaver – Burk y ajuste no lineal

Sustrato	Lineweaver-Burk			Ajuste no lineal		
	Rmax (NmL/gSV·d)	Km (gDQO/L)	R ²	Rmax (NmL/gSV·d)	Km (gDQO/L)	R ²
Ácido Acético	144.91	2.74	0.989	95.25	1.49	0.982
Etanol	115.31	2.73	0.969	134.14	3.24	0.973
Ácido Láctico	159.91	8.07	0.994	75.15	3.31	0.987
Ácido Butírico	-43.78	-12.74	0.972	---	---	---
Metanol	5.45	0.74	0.869	16.09	3.82	0.946

En los valores de la tabla 6.4 se observa que el metanol muestra ser el sustrato con menor rapidez mediante ambos modelos, teniendo un mejor ajuste para la regresión no lineal, con valores de 5.45 y 16.09 NmL/gSV·d, respectivamente. Por otra parte, el ácido acético aun cuando muestra la mayor producción específica de metano para el ajuste de Lineweaver – Burk (144.91 NmL/gSV·d), en comparación con los demás sustratos, para el ajuste mediante una regresión no lineal queda como el segundo sustrato con mayor rapidez máxima específica.

Para el caso del etanol, el valor de la rapidez máxima para ambos ajustes es mayor a 100 NmL/gSV·d, quedando como el sustrato con mayor rapidez máxima (134.14 NmL/gSV·d) para el caso del ajuste no lineal, mientras que para el ajuste mediante Lineweaver – Burk es el tercer sustrato con mayor rapidez máxima (115.31 NmL/gSV·d). En el caso del ácido láctico, ocurre el caso contrario al del etanol, mientras que para el ajuste no lineal es el tercer sustrato con valor más alto (75.15 NmL/gSV·d), para el ajuste no lineal, mediante Lineweaver – Burk es el sustrato con el valor más alto de rapidez máxima (159.91 NmL/gSV·d).

Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para el ácido butírico carecen de significado físico para ambos ajustes, ya que para el caso del ajuste mediante Lineweaver – Burk tienen valores negativos y para el ajuste no lineal son demasiado grandes, por lo que se optó por no agregarlos en la tabla. Como se mencionó anteriormente, los datos correspondientes al ácido propiónico no se ajustan a la cinética de Michaelis – Menten (una cinética en donde el aumento de concentración inicial, provoca aumento en la rapidez inicial específica), debido a los efectos de inhibición que presenta.

Los valores del parámetro Km obtenidos con el ajuste de Lineweaver – Burk, tienen una relación directa con la rapidez máxima, es decir, los sustratos que presentan valores más altos

para rapidez máxima (ácido láctico con 159.91 NmL/gSV·d y ácido acético con 144.91 NmL/gSV·d), son aquellos que tienen los valores más altos de Km (ácido láctico con 8.07 gDQO/L y ácido acético con 2.74 gDQO/L). En otras palabras y de acuerdo con el significado físico de Km, los sustratos con menor afinidad fueron aquellos que alcanzaron una mayor rapidez. Esto quiere decir que, aunque se tenga un valor más alto de rapidez máxima, al tener una menor afinidad, se necesitará de una concentración más alta para alcanzar ese valor.

Para los valores de Km obtenidos mediante el ajuste de regresión no lineal, se observa que los valores tienen una relación inversa con la rapidez máxima, a excepción del etanol, ya que este sustrato tiene el valor más alto para rapidez máxima (134.14 NmL/gSV·d) pero un valor de Km de 3.24 gDQO/L, encima del valor más bajo de Km (1.49 gDQO/L), correspondiente al ácido acético.

Para observar lo anterior con mayor claridad, se ordenaron de mayor a menor el valor de las constantes obtenidas mediante los dos métodos:

Rapidez específica de producción de metano

$$V_{max}^{A.L.} > V_{max}^{HAc} > V_{max}^{EtOH} > V_{max}^{MeOH}$$

Lineweaver – Burk

$$V_{max}^{EtOH} > V_{max}^{HAc} > V_{max}^{A.L.} > V_{max}^{MeOH}$$

Regresión No Lineal

Constante de Michaelis – Menten

$$K_m^{A.L.} > K_m^{HAc} > K_m^{EtOH} > K_m^{MeOH}$$

Lineweaver – Burk

$$K_m^{MeOH} > K_m^{A.L.} > K_m^{EtOH} > K_m^{HAc}$$

Regresión No Lineal

En la figura 6.9 se muestran las gráficas de rapidez específica de producción de metano contra la concentración inicial de sustrato, para los compuestos ácido acético(a), etanol(b), ácido láctico(c) y metanol(d). Estas gráficas fueron obtenidas utilizando la ecuación de Michaelis – Menten a partir de los valores de los parámetros cinéticos V_{máx} y Km, obtenidos del ajuste de Lineweaver – Burk y el no lineal. Además, en las gráficas se muestran los valores de

rapidez experimental, con el objetivo de compararlos con los valores de rapidez que proporcional el modelo, utilizando diferentes ajustes.

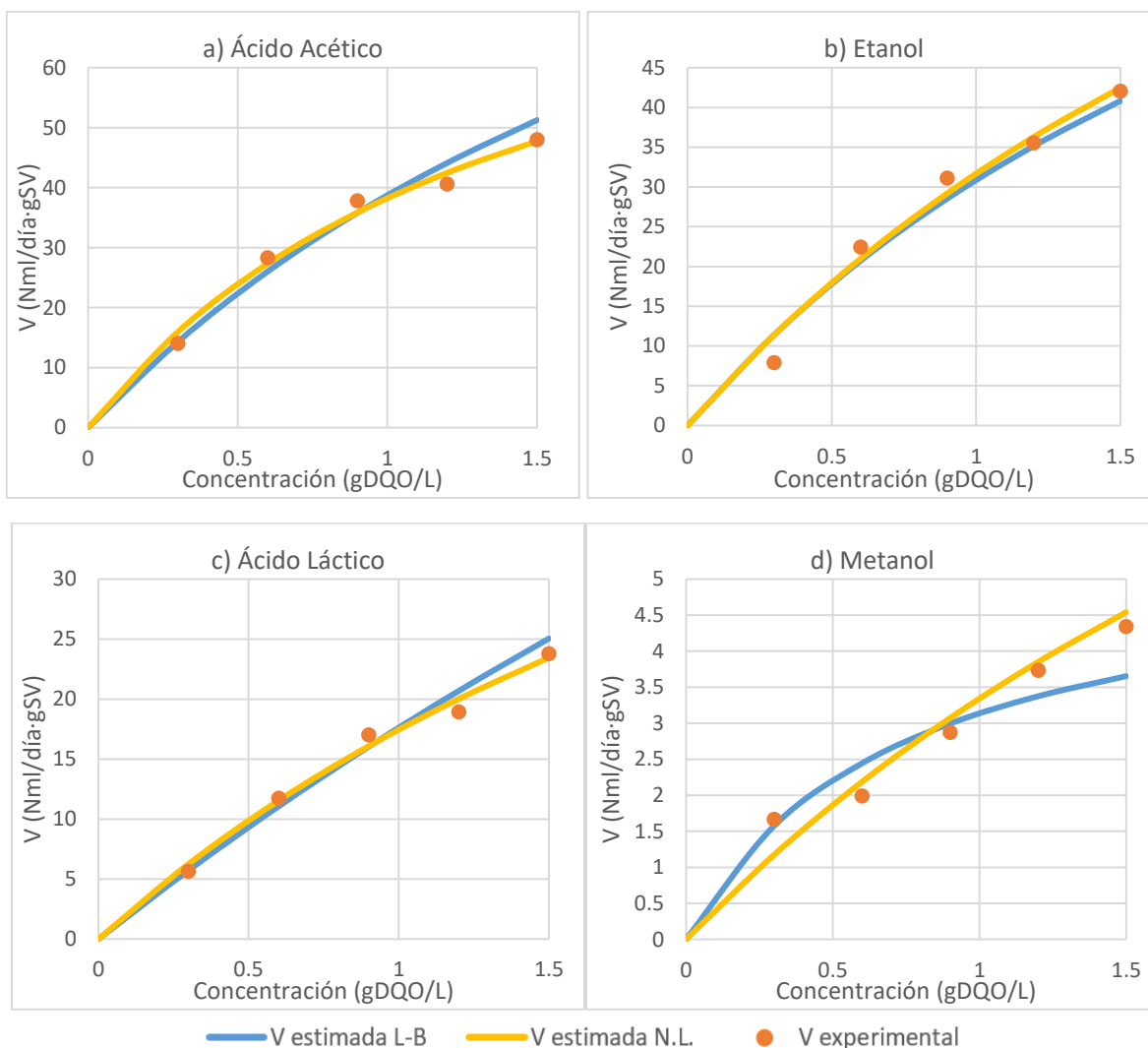


Figura 6.8 Gráficas de la ecuación de Michaelis – Menten para la producción de metano por parte del sustrato

Para el caso del ácido butírico no se presenta el gráfico en la figura 6.9, debido a que, los valores de rapidez muestran un comportamiento diferente a los demás sustratos (como se mencionó anteriormente). Además de que mediante el ajuste con la ecuación de Lineweaver – Burk y la regresión no lineal, se obtuvieron valores que carecen de significado físico, como se muestra en la tabla 6.4. De la misma manera, al no ajustarse los dos modelos anteriores, los valores para el ácido propiónico no aparecen en las gráficas de la figura 6.9. Asimismo, para la concentración de este último sustrato, la rapidez inicial de producción de metano no depende de la concentración inicial de sustrato, por lo que se considera que no se sigue una cinética de Michaelis – Menten. Esto último es asociado principalmente a efectos de

inhibición por sustrato, por lo que se hará un análisis con el modelo de cinética de inhibición de Monod.

Al igual que con los datos de producción de metano por parte del sustrato, también se realizó un análisis cinético de las curvas para los datos correspondientes al metano producido por parte del inóculo más el sustrato. Este análisis siguió el mismo procedimiento para el cálculo de la rapidez mediante la pendiente más grande de las curvas, la obtención de constantes de Michaelis – Menten mediante el método de linealización de Lineweaver – Burk. Los resultados de este análisis son presentados en la figura 6.5 y pueden visualizarse los ajustes en la gráfica 6.10.

Tabla 6.5 Constantes de Michaelis – Menten para la producción de metano por parte del sustrato e inóculo, obtenidas mediante Lineweaver – Burk y ajuste no lineal

Sustrato e Inóculo	Lineweaver-Burk			Ajuste no lineal		
	Rmax (NmL/gSV·d)	Km (gDQO/L)	R ²	Rmax (NmL/gSV·d)	Km (gDQO/L)	R ²
Ácido Acético	81.26	1.12	0.996	95.10	1.46	0.996
Etanol	100.44	1.65	0.994	84.45	1.25	0.992
Ácido Láctico	56.72	1.84	0.999	63.47	2.17	0.994
Ácido Butírico	8.43	0.50	0.801	15.00	1.54	0.891
Metanol	7.68	0.24	0.857	8.42	0.33	0.88

En la tabla 6.5 podemos observar que a diferencia de los valores presentados en la tabla 6.4, no se presentan valores negativos para ninguno de los sustratos, además de que se presentan valores más altos del coeficiente R² para ambos ajustes (L – B y no lineal) en aquellos reactores donde se utilizó como sustrato el ácido acético, etanol y el ácido láctico. Sin embargo, para los ajustes de los valores de los sustratos ácido butírico y metanol se presenta un coeficiente de correlación más bajo comparado con los valores de la tabla 6.4.

Para los datos del ajuste mediante Lineweaver – Burk de la tabla 6.5, aquellos reactores que utilizaron sustratos en donde se llevó a cabo la prueba en tres días (ácido acético, etanol, ácido láctico) presentan los valores más altos de rapidez máxima específica. El valor más alto para la rapidez de producción de metano corresponde al reactor que utiliza como sustrato etanol (100.44 NmL/gSV·d), seguido del ácido acético con un valor de 81.26 NmL/gSV·d y por último el ácido láctico con 56.72 NmL/gSV·d. Para los reactores en los que se llevaron a cabo las pruebas hasta en 8 días (ácido butírico y metanol) se presentan valores de rapidez máxima específica de producción de metano mucho menores, teniendo valores de 7.68 y 8.43 NmL/gSV·d para el metanol y el ácido butírico respectivamente. Los datos del ajuste no lineal presentan un comportamiento parecido a los valores obtenidos con el modelo de Lineweaver – Burk, los valores más altos para la rapidez específica de producción de metano corresponden a aquellos reactores en los que las pruebas se llevaron a cabo en 3 días. Para este ajuste, el ácido acético muestra el valor más alto (95.10 NmL/gSV·d), seguido del etanol (84.45 NmL/gSV·d) y el ácido láctico (63.47 NmL/gSV·d). Para el caso de los reactores en

los que se efectuó la prueba durante 8 días se tienen valores más bajos de este parámetro, 15 y 8.42 NmL/gSV·d para ácido butírico y metanol respectivamente.

De la misma manera que para el análisis de producción sólo por parte del sustrato, para el caso del reactor que utilizó como sustrato al ácido propiónico, muestra un comportamiento diferente a los demás debido a que no hay una relación entre la concentración inicial de sustrato y la rapidez de producción.

Los valores correspondientes al parámetro K_m obtenidos con el ajuste de Lineweaver – Burk presentan una relación directa con la rapidez máxima específica, a excepción del ácido láctico que es el sustrato con menor rapidez máxima específica para aquellas pruebas que fueron llevadas a cabo en tres días. Sin embargo, presenta el valor más alto de K_m (1.84 gDQO/L), seguido del etanol con un valor de K_m de 1.65 gDQO/L y del ácido acético con 1.12 gDQO/L. Para los reactores en los que las pruebas fueron llevadas a cabo en 8 días, al igual que con los valores de rapidez máxima específica de producción, presentan los valores más bajos de K_m , 0.50 y 0.24 gDQO/L para ácido butírico y metanol, respectivamente. Para el ajuste no lineal al igual que con el ajuste mediante Lineweaver – Burk, el valor más alto de K_m corresponde al ácido láctico (2.17 gDQO/L) y el valor más bajo al ácido butírico (0.33 gDQO/L). Sin embargo, para los demás sustratos no parece haber una relación directa de K_m con la rapidez específica de producción de metano, teniendo valores 1.54 gDQO/L para ácido butírico y de 1.25 y 1.46 gDQO/L para etanol y ácido acético, respectivamente.

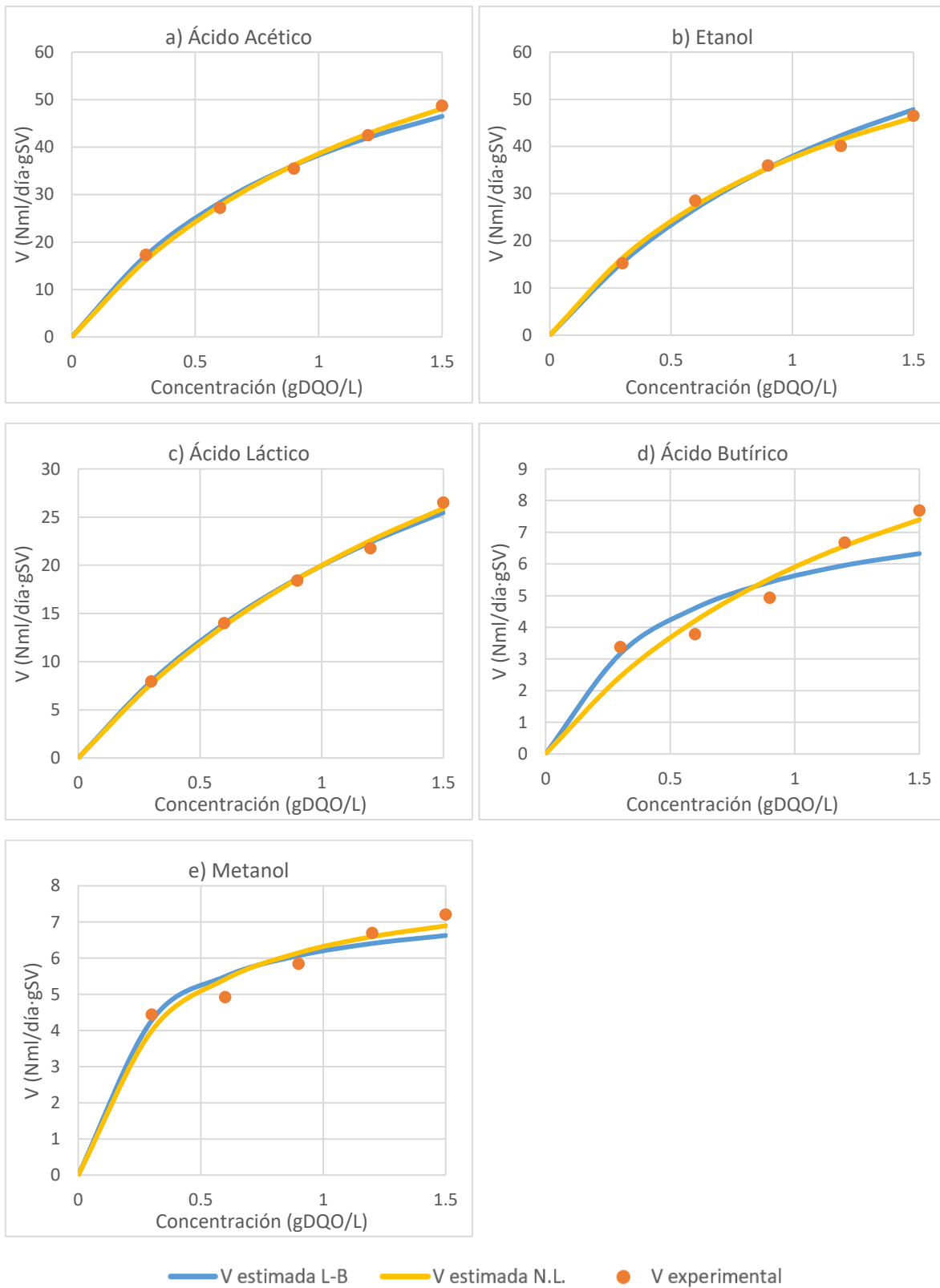


Figura 6.9 Gráficas de la ecuación de Michaelis – Menten para la producción de metano por parte del sustrato

6.5 Ecuación de Monod

Como se mencionó anteriormente, en el conjunto de reactores en los que se utilizó ácido propiónico como sustrato, no presentó un comportamiento que se acoplara a la cinética de Michaelis – Menten, debido a que la concentración inicial de sustrato no mostró una relación directa con la rapidez específica de producción de metano, ni con la producción máxima. Por lo tanto, para realizar el análisis correspondiente a este sustrato, se utilizó el modelo de Monod, útil para aquellas curvas cinéticas en donde se observan efectos de inhibición.

La rapidez específica de producción de metano asociada al ácido propiónico, se calculó de la misma manera que para los demás sustratos, tal y como se muestran en la tabla 6.2 presentada anteriormente. En esta tabla, se puede observar fácilmente que la concentración inicial de sustrato no tiene relación alguna con la rapidez específica calculada.

A continuación, se explica el procedimiento realizado para obtener las constantes cinéticas de la ecuación de Haldane.

De la ecuación de inhibición de crecimiento de Haldane:

$$\mu = \frac{\hat{\mu}}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}}$$

Aun cuando en la presente experimentación no se ha medido el crecimiento de los microorganismos en el reactor, se ha medido la producción de metano, la cual se toma como indicador de crecimiento de microorganismos, es decir, se asume que, al haber una mayor producción de metano, indica que hay un mayor número de microorganismos que están degradando la materia orgánica, algo similar con la relación entre la ecuación de Monod (ecuación empírica) y de Michaelis – Menten (ecuación teórica). Por lo tanto, en vez de utilizar la tasa de crecimiento de microorganismos, se utiliza la rapidez específica de producción de metano, por lo que, la ecuación queda de la siguiente manera:

$$v = \frac{\hat{v}}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}}$$

La ecuación anterior representa a la ecuación desarrollada teóricamente para describir la inhibición acompetitiva debido al exceso de sustrato. Para poder obtener los parámetros de esta ecuación, se procedió a realizar una regresión no lineal mediante el software IBM SPSS Statistic, mismo que es utilizado para encontrar los parámetros de la ecuación de Gompertz y de la ecuación de Michaelis – Menten. Se utilizaron como datos, la rapidez específica de producción de metano (v) y la concentración inicial de sustrato (S), de manera que se obtuvieran los parámetros de \hat{v} rapidez máxima específica de producción de metano en ausencia de inhibición), K_M (constante de Michaelis – Menten) y K_i (constante de inhibición), los cuales se presentan en la tabla 6.7.

Tabla 6.6 Parámetros obtenidos mediante la ecuación de Monod para la producción de metano por parte del ácido propiónico

Parámetro	Valor
K _m (gDQO/L)	1.236
K _i (gDQO/L)	0.173
V _{max} (NmL/gSV·d)	58.74
R ²	0.894

Una vez obtenidos los parámetros de la ecuación de inhibición, se procede a calcular la rapidez máxima específica de producción de metano en presencia de inhibición, mediante la siguiente ecuación:

$$\hat{V}_{max} = \frac{\hat{V}}{1 + 2 \left(\frac{K_M}{K_i}\right)^{0.5}} = \frac{58.74 \frac{NmL}{gSV \cdot d}}{1 + 2 \left(\frac{1.24}{0.17}\right)^{0.5}} = 9.27 \frac{NmL}{gSV \cdot d}$$

Además, se calcula la concentración de sustrato a la que se encuentra esta rapidez máxima, mediante la siguiente ecuación:

$$S_m = (K_m K_i)^{0.5} = \left(1.236 \frac{gDQO}{L} * 0.173 \frac{gDQO}{L}\right)^{0.5} = 0.46 gDQO/L$$

Las anteriores ecuaciones corresponden de forma análoga a la ecuación para calcular la tasa de crecimiento máximo en presencia de inhibición de la ecuación de Haldane. Por lo que se sigue asumiendo que la producción de metano es un indicador del crecimiento de microorganismos en el reactor.

La rapidez máxima de producción de metano para el ácido propiónico (9.27 NmL/gSV·d) esta sólo por encima de la tasa máxima correspondiente al metanol con el ajuste de Lineweaver-Burk y por debajo mediante el ajuste no lineal. Siendo uno de los sustratos con menor rapidez máxima, pero alcanzando una producción mayor que para el ácido acético, ácido butírico y una producción similar a la del metano.

La concentración a la que se encuentra esta rapidez máxima al ajustar el modelo, corresponde al valor de 0.46 gDQO/L, un valor muy cercano a la concentración más baja utilizada en este experimento.

Los parámetros mostrados en la tabla 6.6, nos muestran el posible comportamiento del ácido propiónico en caso de no presentar inhibición. Teniendo una rapidez máxima de 58.74 NmL/gSV·d, de igual manera, al considerar este caso, sólo superaría la rapidez máxima del metanol y estaría por debajo de los demás sustratos.

En cuanto a los parámetros de afinidad, tenemos un valor de K_m de 1.236 gDQO/L, siendo uno de los valores más bajos en comparación de los demás sustratos, a excepción del valor de K_m del metanol (0.74 gDQO/L), obtenido mediante el método de Linewaver – Burk y siendo el valor más bajo al compararlo con los valores de K_m obtenidos mediante la regresión lineal.

En cuanto al parámetro de K_i , tenemos un valor de 0.173 gDQO/L, siendo un valor por debajo de K_m . De acuerdo a su definición K_i debería tener un valor más alto que K_m , sin embargo, en este análisis está por debajo de K_m . Siendo K_i , la concentración más baja a la cual la rapidez máxima específica de producción de metano sin considerar inhibición se encuentra a la mitad, mientras que K_m , es la concentración más alta a la cual la rapidez máxima específica de producción sin inhibición, se encuentra a la mitad. Ambos parámetros ayudan a calcular la rapidez máxima de producción de metano en condiciones de inhibición.

En la tabla 6.7, se muestran los valores de la rapidez obtenida mediante el cálculo de la pendiente de los datos experimentales y el valor estimado mediante la ecuación de Monod, Asimismo, en la figura 6.11, se muestran los puntos de los valores experimentales y la curva del ajuste que se obtiene al utilizar los parámetros obtenidos mediante la ecuación de Monod.

Tabla 6.7 Rapidez experimental y estimada del ácido propiónico, mediante el modelo de Monod

Concentración inicial (gDQO/L)	V experimental (NmL/gSV·d)	V estimada (NmL/gSV·d)
0	0	0
0.3	8.73	8.58
0.6	8.11	9.01
0.9	9.07	7.77
1.2	8.57	6.56
1.5	2.71	5.61

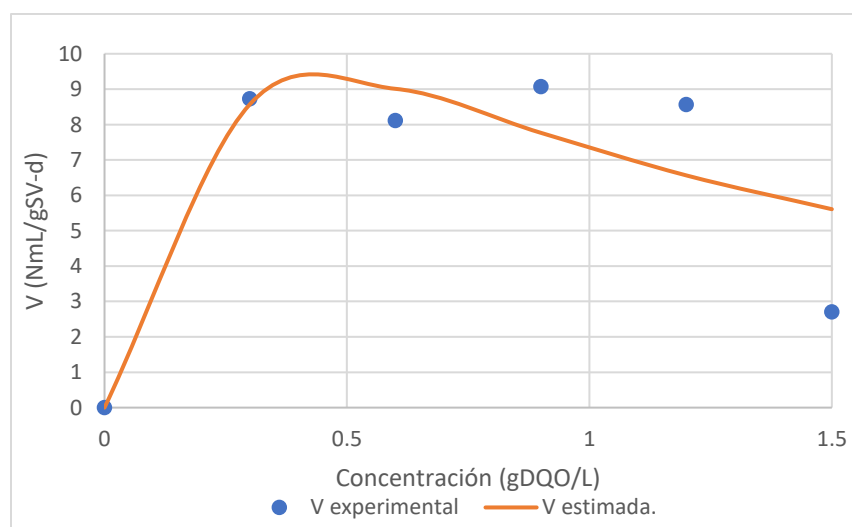


Figura 6.10 Gráfica de la ecuación de Haldane para el ácido propiónico

6.6 Pruebas analíticas

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para las técnicas analíticas, así como su análisis y relación con los datos obtenidos y calculados anteriormente.

6.7 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

En la figura 6.11 y 6.12 se muestran las gráficas de barras correspondientes a la Demanda Química de Oxígeno (DQO) total y por parte del sustrato, respectivamente. Para calcular este último parámetro, se restó el valor de DQO del blanco al valor de DQO total de cada sustrato. Esta prueba fue realizada al finalizar la experimentación cinética, después de desmontar los reactores.

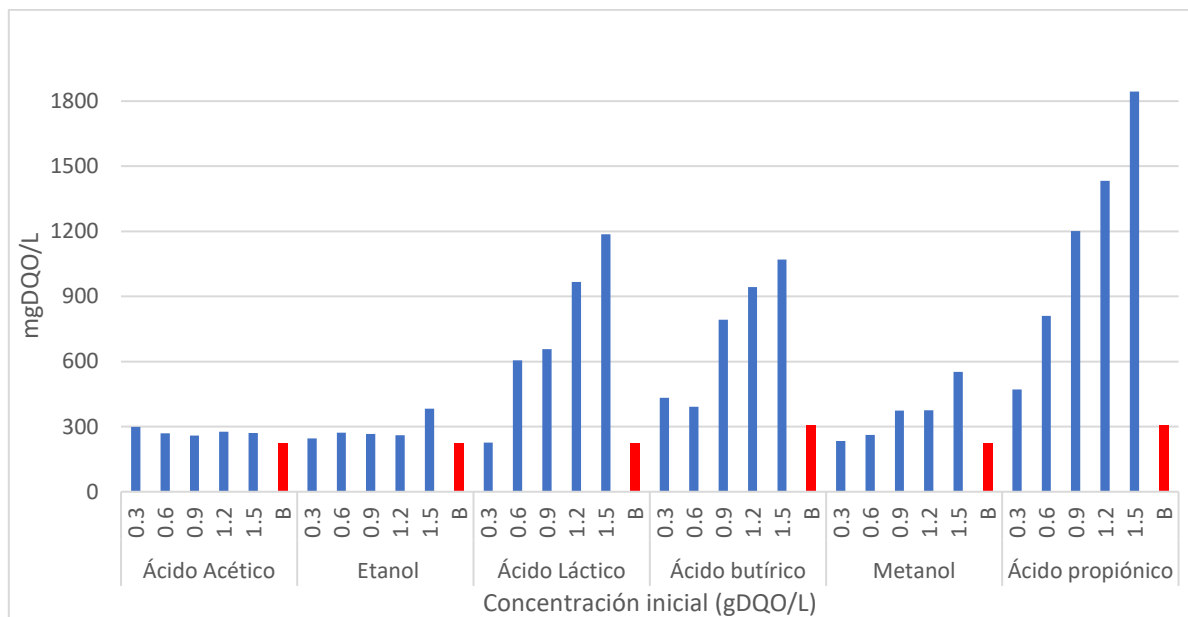


Figura 6.11 Demanda Química de Oxígeno total en cada reactor

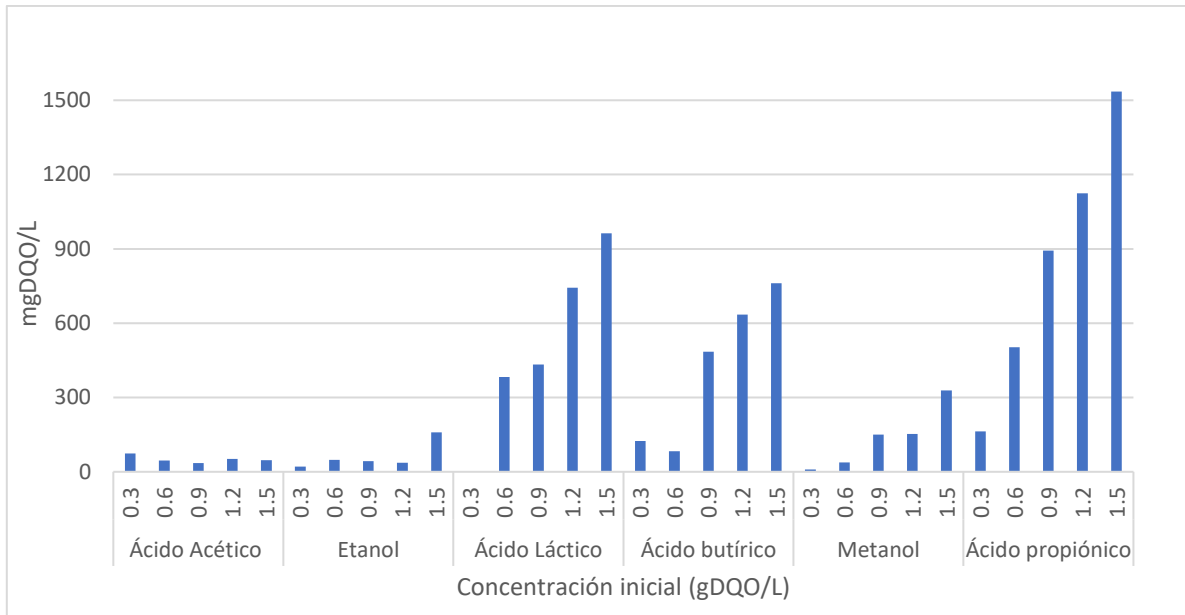


Figura 6.12 Demanda Química de Oxígeno correspondiente al sustrato en cada reactor

En la gráfica de DQO total, se observa una tendencia en la que, a una mayor concentración inicial de sustrato, se presentan valores mayores de DQO, esto es más apreciable para los valores correspondientes al ácido láctico, butírico, metanol y ácido propiónico.

Además, se observa que los valores más bajos de concentración de DQO corresponden al ácido acético con un rango entre 259 y 298 mgDQO/L, seguido del etanol con valores entre 245 y 383 mgDQO/L y por último el metanol, entre 233 y 552 mgDQO/L. Estos sustratos, fueron aquellos que tuvieron una tasa de producción y producción máxima específica de metano más grande. Por otra parte, los ácidos láctico, butírico y propiónico los cuales fueron sustratos que presentaron tasas de producción y producción máxima específica de metano más pequeña junto con tiempos de latencia considerables, son aquellos que presentan mayor concentración de DQO, con valores de 227-1186, 391 – 1070 y 472 – 1844 mgDQO/L, respectivamente.

Debido a que la última etapa de la digestión anaerobia (metanogénesis) es en donde la DQO es convertida a una forma gaseosa (CH_4 y CO_2) que deja inmediatamente el medio acuoso del reactor, los anteriores resultados concuerdan con las tasas de producción y producción específica de metano correspondientes a cada reactor, ya que aquellos que presentaron una concentración más alta de DQO (menor degradabilidad), son aquellos que presentaron una menor producción de metano.

El ácido propiónico es el sustrato que presenta una mayor concentración de DQO con un valor de 1844 mgDQO/L para el valor de concentración inicial más alto, lo cual concuerda con la producción de metano más pequeña (51.91 NmL de CH_4) para la concentración inicial de 1.5 gDQO/L, debido a los efectos de inhibición comentados anteriormente.

El ácido láctico es el segundo sustrato con mayor concentración de DQO total para el reactor con una concentración inicial de 1.5 gDQO/L, teniendo un valor de 1186 mgDQO/L, además

de que este reactor es el segundo con menor producción de CH₄ (65.08 NmL) a esta concentración inicial. Cabe destacar que el valor de DQO para el reactor con concentración inicial de 0.3 gDQO/L es mucho menor en comparación con las demás concentraciones. Sin embargo, esto no se ve reflejado de igual manera en su producción de metano, mientras que para las demás concentraciones el rango de producción se encuentra entre 66.59 y 58.43 NmL de CH₄, el valor para este reactor es de 32.34 NmL de CH₄.

Continuando con los valores más altos de DQO obtenidos experimentalmente a concentraciones iniciales de 1.5 gDQO/L, encontramos al ácido butírico con un valor de 1070 gDQO/L con la tercera producción más baja de metano (94.19 NmL de CH₄) a esta concentración inicial. De la misma manera que con los demás sustratos, el valor de este parámetro disminuye a medida que disminuye la concentración inicial, con excepción de los reactores con concentración inicial de 0.3 y 0.9 gDQO/L, en donde se obtuvo una concentración de DQO de 433 mgDQO/L y 391 mgDQO/L, respectivamente.

Por otra parte, el metanol presenta una concentración de DQO de 552 mgDQO/L para la concentración inicial más alta de este sustrato, valor que concuerda con una producción de metano de 137.48 NmL de CH₄, la cual está por arriba de la producción de metano para el ácido butírico a esta concentración y por debajo de la producción del ácido acético y el etanol.

El etanol y el ácido acético son los sustratos que presentan valores notablemente más bajos para la concentración de DQO. El etanol muestra un valor de DQO de 383 mgDQO/L para la concentración inicial más alta de sustrato, quedando por debajo de la concentración de DQO para el metanol; mientras que registra una mayor producción de metano, con un valor de 168.32 NmL de CH₄.

Por último, se encuentra el ácido acético, el cual es el sustrato en el que se obtuvo una mayor producción de metano, teniendo un valor de 206.32 NmL de CH₄, para una concentración inicial de 1.5 gDQO/L. Por otra parte, se registró una concentración de DQO de 271 mgDQO/L, siendo el valor más bajo comparado con los demás sustratos, a esta concentración inicial de sustrato.

Como fue mencionado anteriormente, existe una relación directa entre la concentración inicial de sustrato y la concentración de DQO después de llevada a cabo la experimentación, a excepción de algunos sustratos, los cuales fueron comentados previamente. Además, se puede observar que, para todos los sustratos, la concentración de DQO final y la producción de metano más altas se presentan en los reactores con concentración inicial de 1.5 gDQO/L, mientras que, al disminuir el valor de la concentración inicial, en general, la concentración de DQO final y la producción de metano disminuye.

Debido a que la producción de biogás es la forma en la que se elimina DQO del medio, se podría esperar que en los reactores que tienen una mayor producción de metano sean aquellos en los que se registre una menor concentración de DQO. Sin embargo, esto sólo es válido al comparar reactores de la misma concentración, pero de diferente sustrato, es por ello que lo comentado anteriormente, fue comparando la concentración final de DQO y la producción de metano para diferentes sustratos a la concentración inicial de sustrato elegida (en el

anterior caso la concentración de 1.5 gDQO/L). Para realizar una comparación entre los reactores de un mismo sustrato, es necesario realizar una comparación entre la DQO final y la DQO inicial, es decir, la DQO utilizada para la producción de metano en cada reactor, lo cual hace referencia al rendimiento, el cual será comentado en el siguiente apartado.

En la figura 6.13 se muestra la gráfica de la concentración de la Demanda Química de Oxígeno correspondiente al sustrato, que al ser una derivación de la figura 6.12 y, debido a que para obtener la concentración de DQO del sustrato sólo basta con restar la DQO del blanco (el cual para varios sustratos fue el mismo), presenta un comportamiento similar en cuanto a las concentraciones iniciales de sustrato y concentración de DQO. En esta gráfica es más notable la diferencia entre las concentraciones tan bajas para el ácido acético, etanol y metanol, estando en un rango entre 35 y 52 gDQO/L, de 21 y 160 gDQO/L y de 10 y 328 gDQO/L, respectivamente; y las concentraciones del ácido propiónico, láctico y butírico, con un rango de 163 y 1535 gDQO/L, 3 y 962 gDQO/L y de 83 y 761 gDQO/L, respectivamente.

Además de realizar el análisis del rendimiento con los valores de producción de metano y la equivalencia de esta producción en DQO, se calculó el porcentaje de remoción de DQO a partir de la cantidad de DQO obtenida en la técnica analítica una vez desmontado los reactores y con los valores de las concentraciones iniciales en cada reactor.

La gráfica 6.14 muestra la cantidad de DQO que se encuentra al inicio en el reactor (de acuerdo con las concentraciones iniciales) representada por la suma de la barra sin relleno más la barra con relleno, y la cantidad de DQO al final (de acuerdo con la prueba analítica) representada por las barras con relleno. Estos últimos valores son los mismos que los representados en la figura 6.13, sin embargo, se decidió representarlos de esta manera para poder visualizar de manera sencilla, la cantidad de DQO que se utilizó, la cual está representado por la barra sin relleno. Cabe mencionar que para el caso del reactor con concentración de 1.5 g de DQO para el ácido propiónico se obtienen valores mayores a la concentración inicial, debido a que en la técnica analítica de DQO obtenemos valores por encima de 1500 mgDQO/L, valor el cual corresponde a la concentración de DQO al inicio de la experimentación.

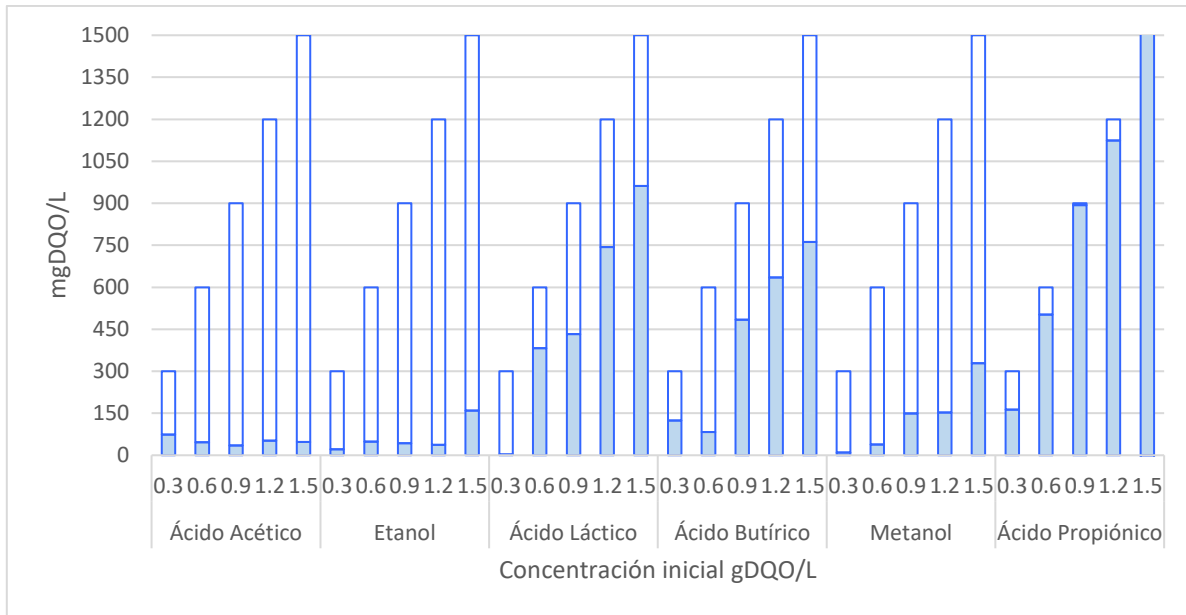


Figura 6.13 Remoción de DQO. Concentraciones iniciales representada por la suma de la barra sin relleno y DQO al final (De acuerdo con prueba analítica)

A partir de los valores de la gráfica 6.13 se realiza el cálculo del porcentaje de remoción de DQO de la siguiente manera:

$$\%Remoción_{DQO} = \frac{[DQO_{inicial}] - [DQO_{final}]}{[DQO_{inicial}]} * (100)$$

Debido a que todos los reactores contienen el mismo volumen (400 mL) es que podemos hacer el cálculo de esta forma. De otra manera, se tendría que calcular la cantidad de DQO que hay presente en cada reactor, al multiplicar la concentración por el volumen de mezcla en el reactor

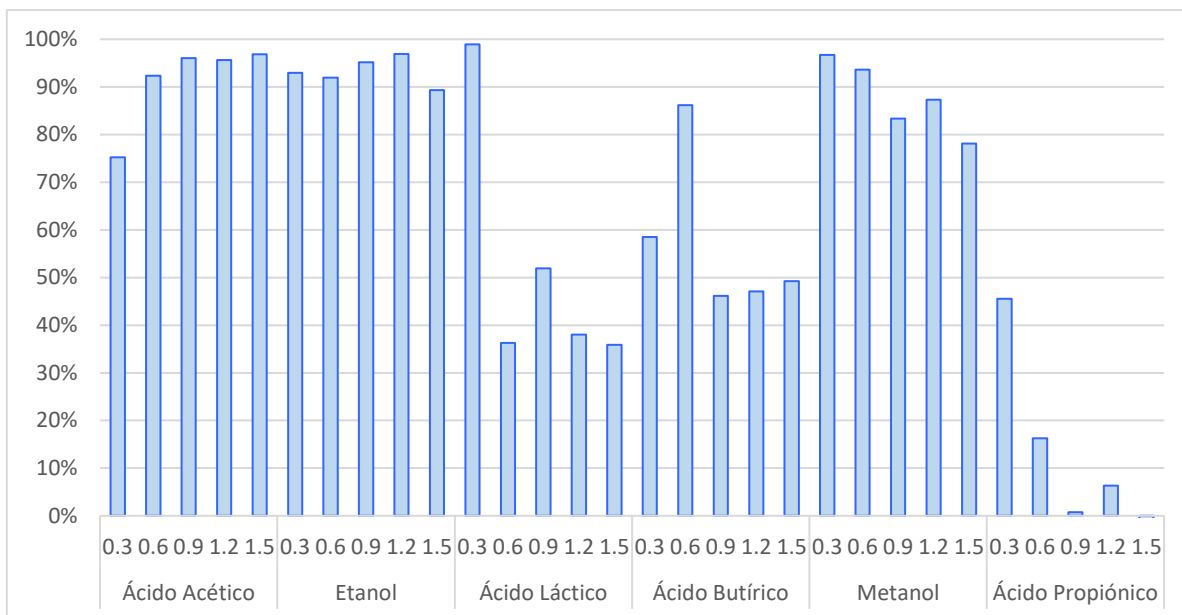


Figura 6.14 Porcentaje de remoción de DQO

En la figura 6.14 podemos observar que, para el ácido acético y etanol, se muestran porcentajes de remoción altos y similares para todas las concentraciones, teniendo valores que van desde el 75% al 97% y del 89% al 97%, respectivamente.

Después del etanol y ácido acético, el metanol es el sustrato que tiene mayor porcentaje de remoción de DQO, con valores entre 78% y 97%. Para el metanol se muestra una disminución en la remoción de DQO a medida que se aumenta la concentración inicial en los reactores, a excepción de la concentración inicial de 0.9 gDQO/L, ya que tiene ligeramente mayor remoción el reactor con concentración inicial de 1.2 gDQO/L. Cabe destacar que aquellos sustratos que tuvieron una mayor remoción de DQO, los sustratos anteriormente mencionados, fueron aquellos que tuvieron una mayor producción de metano, por lo que se comprueba que los valores entre estos dos parámetros no se excluyen entre sí.

El ácido butírico muestra el porcentaje de remoción más alto para el reactor con concentración inicial de 0.6 gDQO/L, con un valor de 86%, por otra parte, los demás reactores tienen un porcentaje de remoción entre 46% y 58%, teniendo valores muy similares para las concentraciones de 0.9 – 1.5 gDQO/L.

Respecto al ácido láctico, se observa un porcentaje de remoción bastante alto, con un valor de 99% para el reactor con concentración inicial de 0.3 gDQO/L, mientras que, para los demás reactores, se tienen porcentajes entre el 36% y 52%, sin mostrar alguna relación respecto a la concentración inicial.

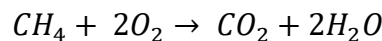
El ácido propiónico es el sustrato con menor porcentaje de remoción de DQO, se muestra una tendencia en la que, a mayor concentración inicial, la remoción decrece, a excepción del reactor con concentración inicial de 0.9 gDQO/L, teniendo una cantidad de DQO menor al reactor con 1.2 gDQO/L al inicio. Como se comentó anteriormente, para el reactor con

concentración de 1.5gDQO/L, se obtiene un rendimiento negativo, debido a que en el análisis se obtuvo una concentración final que es mayor a la inicial.

6.8 Rendimientos

Los rendimientos para la producción de metano en cada reactor se calcularon utilizando la relación que existe entre el volumen de metano producido y su equivalencia en DQO. Se realizaron los cálculos necesarios para obtener la equivalencia de NmL de CH₄ a mgDQO. A continuación, se presentan los cálculos realizados para este procedimiento:

Reacción de oxidación de metano:



Para oxidar 1 mol de CH₄ se necesita de 2 mol de O₂, por lo que se tiene la siguiente relación:

$$\frac{64gDQO}{mol\ de\ CH_4}$$

Un mol de metano a 0°C y 1 atmósfera (condiciones normalizadas) equivale a 22.414 L, por lo tanto:

$$\frac{22414 \frac{NmL\ CH_4}{mol}}{64 \frac{gDQO}{mol}} = 350.2 \frac{NmL\ CH_4}{gDQO}$$

De acuerdo con cálculos realizados mediante la ley de los gases ideales y la definición de DQO, 350.2 mL de CH₄ es el rendimiento de metano de 1 gDQO a 1 atmósfera y 0° C

Posteriormente se toma en cuenta la producción máxima de cada reactor por parte del sustrato y se multiplica por esta relación para calcular su equivalente en DQO, sea el caso de 0.3 gDQO/L

$$\frac{48.85\ NmL\ CH_4}{350.2 \frac{NmL\ CH_4}{gDQO}} = 0.1395\ gDQO$$

Las concentraciones de DQO correspondientes a cada sustrato en el reactor se multiplican por el volumen de trabajo, de esta manera conocemos la cantidad de DQO correspondiente al sustrato hay en el reactor.

El reactor con concentración de 0.3 gDQO/L de ácido acético

$$0.3 \frac{gDQO}{L} * (0.4L) = 0.12\ gDQO$$

Finalmente, se realiza una comparación entre la cantidad de DQO del sustrato al inicio del experimento y la producción máxima de CH₄ en cada reactor:

$$\text{Rendimiento} = \frac{0.1395gDQO}{0.12gDQO_{sustrato}} = 1.16$$

El resultado de 1.16 es mayor a uno, lo que indica que el denominador está subestimado y hay una fracción residual no cuantificada. En la Tabla 6.8, se muestran los resultados del anterior procedimiento para cada uno de los reactores de la experimentación.

Tabla 6.8 Rendimiento de cada reactor en la producción de metano.

Sustrato	Concentración (gDQO/L)	gDQO de sustrato en el reactor	Producción máxima de CH ₄ (Nml)	Producción máxima mgDQO CH ₄	Rendimiento
Ácido Acético	0.30	0.12	48.85	0.14	1.16
	0.60	0.24	88.84	0.25	1.06
	0.90	0.36	122.13	0.35	0.97
	1.20	0.48	157.31	0.45	0.94
	1.50	0.60	206.32	0.59	0.98
Etanol	0.30	0.12	22.37	0.06	0.53
	0.60	0.24	74.54	0.21	0.89
	0.90	0.36	108.54	0.31	0.86
	1.20	0.48	140.47	0.40	0.84
	1.50	0.60	168.32	0.48	0.80
Ácido Láctico	0.30	0.12	32.34	0.09	0.77
	0.60	0.24	64.40	0.18	0.77
	0.90	0.36	66.59	0.19	0.53
	1.20	0.48	58.43	0.17	0.35
	1.50	0.60	65.08	0.19	0.31
Ácido Butírico	0.30	0.12	39.51	0.11	0.94
	0.60	0.24	64.02	0.18	0.76
	0.90	0.36	59.22	0.17	0.47
	1.20	0.48	76.99	0.22	0.46
	1.50	0.60	94.19	0.27	0.45
Metanol	0.30	0.12	57.05	0.16	1.36
	0.60	0.24	65.90	0.19	0.78
	0.90	0.36	94.09	0.27	0.75
	1.20	0.48	120.40	0.34	0.72
	1.50	0.60	137.48	0.39	0.65
Ácido Propiónico	0.30	0.12	111.57	0.32	2.65
	0.60	0.24	132.40	0.38	1.58
	0.90	0.36	75.14	0.21	0.60
	1.20	0.48	101.39	0.29	0.60
	1.50	0.60	51.91	0.15	0.25

En esta tabla, se puede observar que en la mayoría de los reactores se obtiene un rendimiento bastante alto, incluso para el ácido acético, metanol y ácido propiónico, se tienen rendimientos superiores a la unidad. Debido a que el máximo rendimiento posible es de 1 por conservación de masa, se asume que pudo haber imprecisiones en la técnica de medición de metano y captura de muestra, o bien, errores en la cuantificación de DQO residual por debajo del valor real. Sin embargo, la medición y el análisis realizado de los valores de DQO obtenido, nos permiten observar el comportamiento entre los sustratos y la variación de su concentración inicial.

Como se mencionó anteriormente en el análisis de DQO, a una mayor concentración inicial de sustrato, se espera una mayor producción máxima de metano, algo que en efecto ocurre en la mayoría de los reactores, exceptuando el caso del ácido propiónico, que como se ha mencionado anteriormente, es el sustrato que muestra efectos de inhibición. Sin embargo, este aumento en la producción máxima de metano, no es proporcional al aumento de concentración. Lo anterior se ve reflejado en los valores obtenidos de rendimiento, ya que a mayor concentración el rendimiento decrece para el caso del ácido acético, ácido láctico, ácido butírico y metanol

A continuación, en las figuras 6.15 y 6.16 y se observan los valores de rendimiento para los valores de producción máxima registrado por el equipo de medición, así como para los valores obtenidos mediante el modelo de Gompertz modificado, respectivamente.

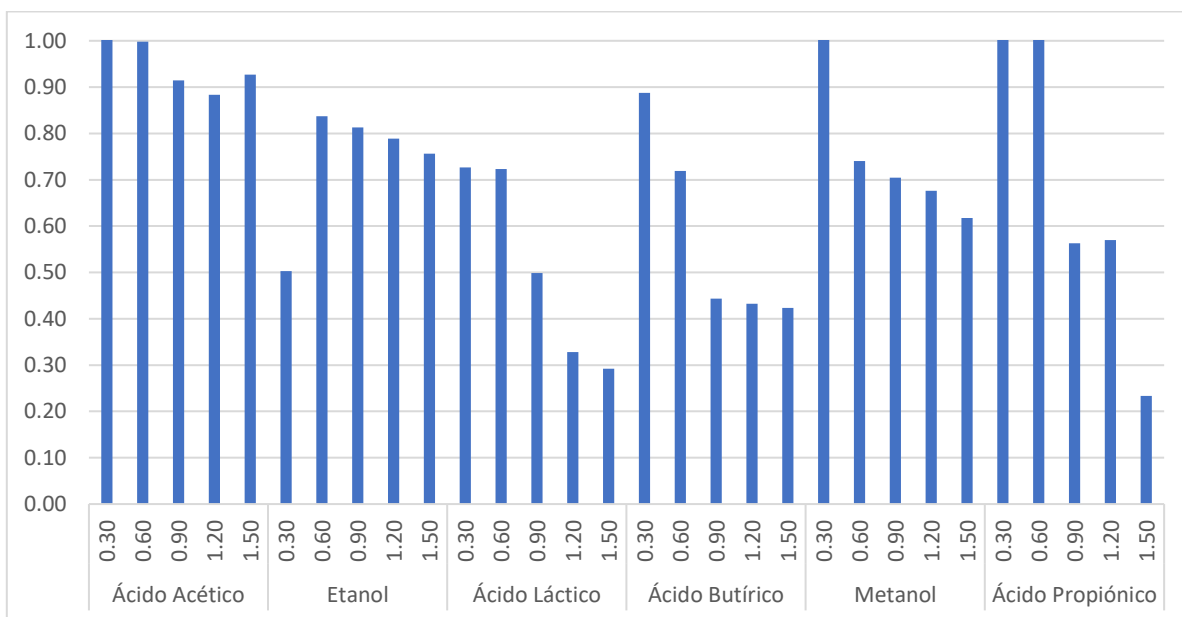


Figura 6.15 Gráfica de rendimiento de metano con datos obtenidos experimentalmente.

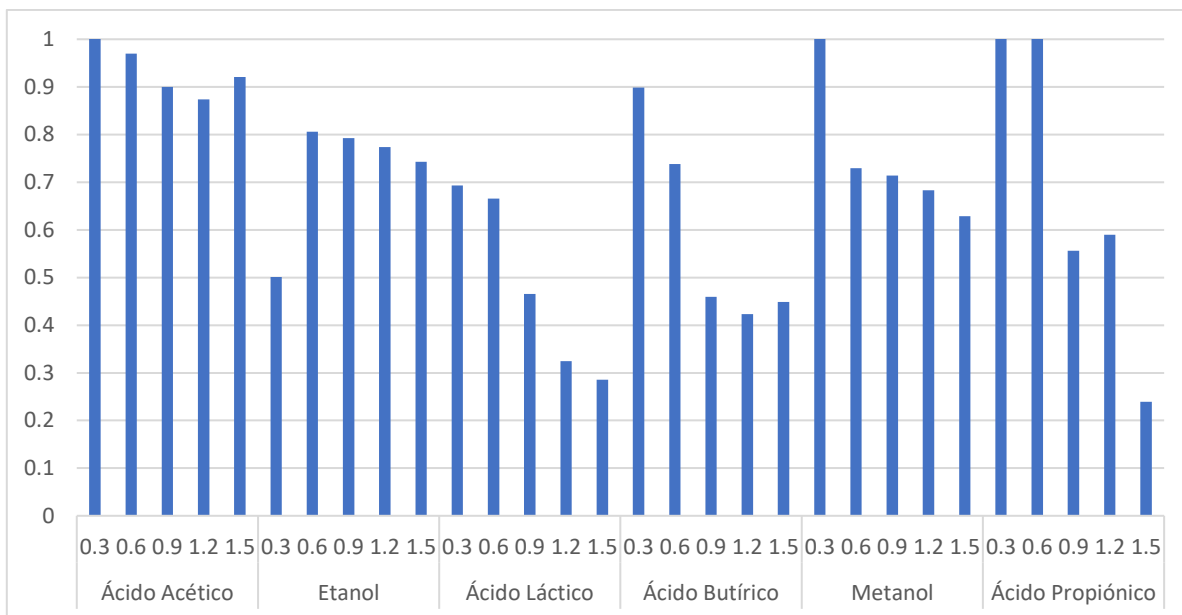


Figura 6.16 Gráfica de rendimiento de metano con datos obtenidos mediante el modelo de Gompertz

Los resultados de rendimiento para ambas gráficas no muestran grandes diferencias entre sí, debido a que el Modelo de Gompertz modificado se ajusta de muy buena manera a los datos obtenidos. En general, se puede observar que, para cada sustrato, al incrementar la concentración inicial, el rendimiento es menor. Para las concentraciones más bajas de ácido acético, metanol, y las concentraciones de ácido propiónico 0.6 y 0.9 gDQO/L se observa un rendimiento muy cercano a la unidad.

En la mayoría de los sustratos una mayor concentración inicial de éstos implica una mayor producción de metano, sin embargo, no ocurre de la misma manera para el rendimiento. Es decir, a mayores concentraciones se produce mayor volumen de metano, pero no en proporción al aumento de la cantidad de sustrato.

6.9 pH en los reactores

El pH de cada reactor se tomó antes de montar y sellar herméticamente los reactores y después de terminar la experimentación. Los valores correspondientes a los valores finales de pH se presentan con barras azules en la gráfica 6.18 mientras que los valores iniciales son representados por las barras rojas. Para los valores iniciales de pH, los cuales corresponden al inóculo (I), son obtenidos mediante el promedio del pH en cada uno de los reactores correspondientes a un mismo sustrato. Estos valores son similares para todos los reactores, debido a que contienen la misma mezcla.

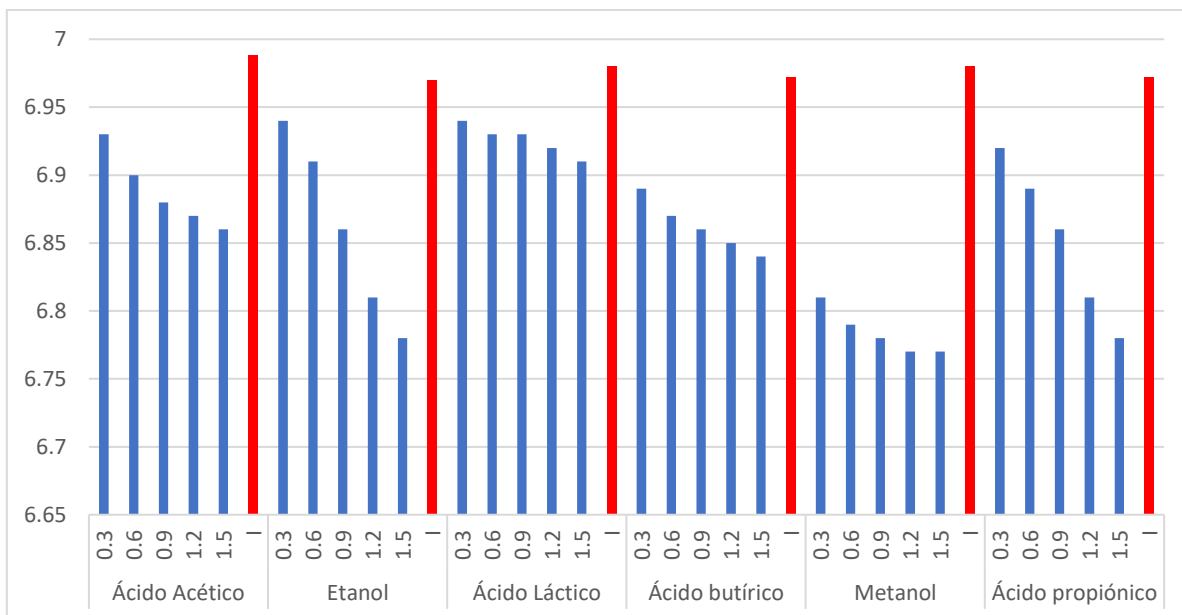


Figura 6.17 pH correspondiente a cada reactor. pH inicial (rojo) y pH final(azul)

La figura 6.17 muestra sólo un pequeño intervalo de pH, entre 6.65 y 7, debido a que los cambios en el pH fueron muy pequeños después de llevar a cabo cada experimentación. En la mayoría de los casos, estos cambios fueron en décimas de unidades, esto debido a la disolución amortiguadora de fosfatos con concentración de 0.02 N.

A pesar de lo anterior, es observable una tendencia en todos los sustratos, donde el valor del pH disminuye a medida de que la concentración inicial se incrementa. Esto debido a que habrá una mayor concentraciones de iones H^+ asociada a la acidez de cada uno de los sustratos. Además, de igual manera, los valores finales de pH, se pueden relacionar con la producción de metano en cada reactor, ya que los cambios de pH son debidos a la adición de sustrato, la producción de hidrógeno y que tan eficiente fue la degradación y el consumo de éstos para la producción de CH_4 . Sin embargo, para aquellos reactores de un mismo sustrato, los que tuvieron una mayor producción de metano, son aquellos que tienen los valores de pH más bajos.

De la misma manera que ocurre con el parámetro de DQO, ocurre para el pH, aún cuando se tenga una mayor producción de biogás en un reactor, no se garantiza que ese reactor tenga la concentración de DQO más baja o el pH más alto de todos los reactores para un mismo sustrato, debido a que se utilizaron diferentes concentraciones iniciales, por lo que se debe hacer referencia al rendimiento. De hecho, podemos observar la relación que existe entre las gráficas de las figuras 6.12 y 6.13 correspondientes a la concentración de DQO con la figura 6.18 correspondiente al pH. Aquellos reactores que tienen valores más bajos de pH, son aquellos que tienen una mayor concentración de DQO, asociándolo a la acidez y producción de hidrógeno que genera cada uno de los sustratos por estar en mayor concentración.

A pesar de que el metanol es un compuesto que tiene un pKa alto y que presentó una amplia producción de metano (aunque a una rapidez más lenta que para el ácido acético y el etanol), y por tanto consumo de sustrato e hidrógeno, estos reactores fueron los que presentaron los

valores más bajos de pH con un intervalo entre 6.77 y 6.81, seguido de los intervalos del etanol 6.78 y 6.91, de ácido propiónico entre 6.78 y 6.92 y de de ácido butírico entre 6.84 y 6.89, estos últimos dos, siendo aquellos en los que se presentaron largos periodos de atraso e inhibición. El hecho de que se hayan presentado largos periodos de atraso, se debe a la dificultad del medio para aclimatarse al cambio producido al agregar el sustrato.

Los reactores que presentaron los valores de pH más altos y que por lo tanto, fueron aquellos en donde probablemente hubo mayor consumo de sustrato y de hidrógeno en el medio, son el ácido acético con valores entre 6.86 y 6.93 y el ácido láctico con un intervalo entre 6.91 y 6.94.

Como se puede observar en la tabla 6.9 para el caso del etanol y metanol tienen pKa demasiado altos con respecto a los ácidos grasos utilizados en esta experimentación, por lo que de acuerdo con este aspecto, estos dos alcoholes deberían de tener los valores de pH más altos, sin embargo tienen los intervalos de valores más pequeños. Por otra parte el ácido láctico y acético son los sustratos con los valores de pKa más bajos y que por lo tanto pueden aportar mayor acidez al medio, contrariamente, son aquellos que tienen los valores de pH más altos. Cabe mencionar, que no sólo se debe considerar este aspecto, sino también los procesos que ocurren en la digestión anaerobia, como lo son la producción de hidrógeno y de intermediarios en las reacciones que ocurren para llegar a la producción de metano.

Tabla 6.9 Valores de pKa de los sustratos utilizados en cada reactor.

Sustrato	pKa
Ácido Acético	4.757
Etanol	15.9
Ácido Láctico	3.86
Ácido Butírico	4.819
Metanol	15.5
Ácido Propiónico	4.874

Cabe destacar que en el caso del ácido láctico, es un sustrato el cual al degradarse anaeróbicamente tiene como productos secundarios el ácido propiónico, el cual también debería tener efectos en el pH. Finalmente, se presenta el ácido acético, el cual tiene los valores de pH más altos para la mayoría de las concentraciones (0.3 – 0.9 gDQO/L), siendo el sustrato que produjo una mayor cantidad de metano, además de que este sustrato no pasa por intermediarios, debido a que es el producto que se obtiene en el proceso de acetogénesis, etapa que recibe su nombre debido a este sustrato.

Debemos de estudiar o hacer una muy buena referencia en cuanto a lo que ocurre con el etanol, ya que tiene un valor de pKa muy bajo comparado con los demás ácidos, sin embargo

es el que registra mayores cambios de pH, sería bueno relacionarlo con la producción de algún intermediario en algunas reacciones secundarias que se dan para la degradación del metano en cualquiera de las etapas de la degradación anaerobia.

6.10 Alcalinidad en los reactores

La alcalinidad es un parámetro a considerar al hablar de la estabilidad en el reactor. De acuerdo con Mata – Álvarez (2002), el tener una relación mayor de 0.3 para la relación de la alcalinidad de ácidos grasos y la alcalinidad de bicarbonatos, indica problemas de estabilidad. En la tabla 6.10 se muestran los datos registrados para la alcalinidad total, de bicarbonatos y de AGV.

Tabla 6.10 Alcalinidad de bicarbonatos y ácidos grasos volátiles

Sustrato	Concentración gDQO/L	Alcalinidad Bicarbonatos (mgCaCO ₃ /L)	Alcalinidad AGV (mgCaCO ₃ /L)	Alcalinidad Total (mgCaCO ₃ /L)	Relación AI/AP
Ácido Acético	0.3	9733.6	2438	12171.6	0.250
	0.6	9586.4	2456.4	12042.8	0.256
	0.9	9439.2	2447.2	11886.4	0.259
	1.2	9926.8	2180.4	12107.2	0.220
	1.5	9255.2	2530	11785.2	0.273
Etanol	0.3	9466.8	2392	11858.8	0.253
	0.6	9788.8	2336.8	12125.6	0.239
	0.9	9706	2281.6	11987.6	0.235
	1.2	9733.6	2594.4	12328	0.267
	1.5	9696.8	2419.6	12116.4	0.250
Ácido Láctico	0.3	9568	2272.4	11840.4	0.238
	0.6	9466.8	2474.8	11941.6	0.261
	0.9	9006.8	2824.4	11831.2	0.314
	1.2	8381.2	3008.4	11389.6	0.359
	1.5	8123.6	3413.2	11536.8	0.420
Ácido Butírico	0.3	11015	3085	14100	0.280
	0.6	11095	2945	14040	0.265
	0.9	10915	3235	14150	0.296
	1.2	10985	3220	14205	0.293
	1.5	11575	3615	15190	0.312
Metanol	0.3	10640	2920	13560	0.274
	0.6	10470	2960	13430	0.283
	0.9	10730	2835	13565	0.264
	1.2	10930	2940	13870	0.269
	1.5	11015	2970	13985	0.270
Ácido Propiónico	0.3	11332.5	1955	13287.5	0.173
	0.6	10860	3560	14420	0.328
	0.9	12450	4560	17010	0.366
	1.2	10015	3995	14010	0.399
	1.5	9395	4200	13595	0.447

En la tabla 6.10 se observa que, para el caso del ácido acético, etanol y metanol, sustratos los cuales fueron aquellos que presentaron la mayor cantidad y rapidez de producción de metano, son aquellos en los cuales, en todas sus concentraciones, tuvieron valores de relación por debajo de 0.3.

Por otra parte, el ácido butírico sólo presenta un valor por arriba de 0.3 para su concentración más alta, seguido del ácido láctico, en donde se presentaron fases de atraso más prolongadas, a concentraciones más altas, es donde tiene valores mayores a 0.3, es decir, para concentraciones de 0.9 – 1.5 gDQO/L, para el caso del ácido propiónico, el cual fue el sustrato que presenta claros efectos de inhibición y el cual se analizó anteriormente el tipo de cinética con la ecuación de Monod, es el sustrato con mayor cantidad de reactores que presentan valores de relación mayor a 0.3, con 4 concentraciones, de 0.6 – 1.5 gDQO/L, indicando algún tipo de desestabilización o perturbación en el proceso de digestión anaerobia, es por ello que . Ningún sustrato presentó valores mayores a 0.3 para las concentraciones iniciales más bajas utilizadas en el presente trabajo. La mayor parte de los reactores en los cuales se registran perturbaciones de acuerdo con este parámetro de alcalinidad, se presenta en las concentraciones más altas.

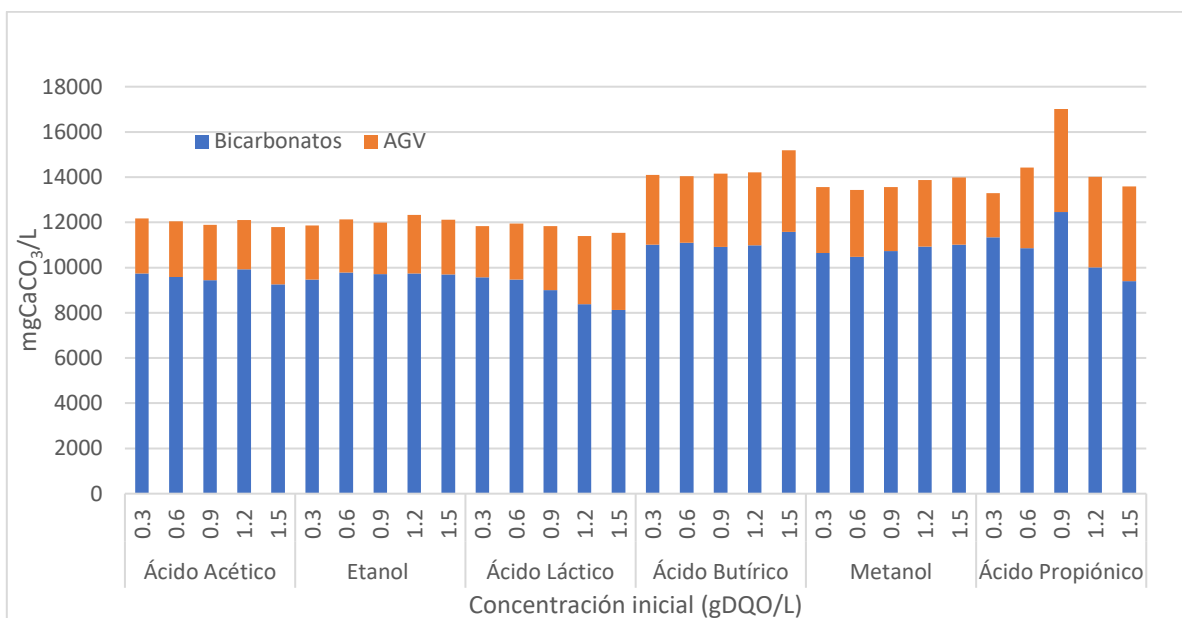


Figura 6.18 Alcalinidad correspondiente a bicarbonatos y a ácidos grasos volátiles en cada reactor

7 CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se determinó que el tipo de fermentación con la que se logra una mayor rapidez de producción de metano, es utilizando el ácido acético y el etanol, debido a que, utilizando estos compuestos como sustrato, se obtuvieron los valores de producción de metano en los reactores, así como un menor tiempo para llegar a un máximo en la producción.

Además, se determinó que el efecto de la concentración sobre la rapidez de producción de metano se da de manera diferente para cada sustrato, pero en la mayoría de casos, un aumento en la concentración implica una mayor producción de metano y a su vez una fase de latencia mayor. El ácido propiónico fue un caso particular en el que un aumento de concentración implicaba una menor producción de metano, lo que se asoció a los efectos tóxicos que este sustrato ejerce para las bacterias metanogénicas.

Los resultados de las pruebas analíticas concuerdan con los resultados de producción de metano, en donde aquellos reactores en los que se tuvo mayor producción, se tienen concentraciones de DQO más bajas, dando como resultado un porcentaje de remoción más alto.

El pH final de los reactores registra una disminución a medida que se aumenta una concentración asociada a una mayor cantidad de protones libres en el medio. Sin embargo, en el estudio de alcalinidad se muestra que los reactores de ácido acético, etanol y metanol no se tuvo algún problema de estabilidad. Por otra parte, el ácido butírico muestra inestabilidad para el reactor de concentración más alta, mientras que para los demás sustratos se muestra inestabilidad en la mayoría de las concentraciones.

La cinética de la producción de metano fue descrita utilizando el modelo cinético de Michaelis – Menten en donde se obtuvieron las constantes de esta ecuación mediante dos métodos, Lineweaver – Burk y una regresión lineal. Los parámetros obtenidos de rapidez máxima favorecen tanto al etanol como al ácido acético. Mientras que el parámetro de afinidad favorece al etanol y al ácido acético con los resultados obtenidos mediante la regresión no lineal.

El modelo de Gompertz, permitió el modelo de las curvas de cinética de producción de metano con muy buena correlación. Se obtuvo una mejor correlación en aquellas curvas que correspondían a reactores con una concentración inicial mayor de sustrato. Además, se determinaron parámetros de rapidez, producción máxima y tiempo de latencia para aquellos sustratos en los que se presenta. En cuanto al modelo de Haldane, sólo fue utilizado para describir el comportamiento del ácido propiónico, ya que muestra efectos de inhibición al aumentar la concentración inicial de sustrato.

8 CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth Stanley, (1977). *Steady-State Enzyme Kinetics*, The Macmillan Press LTD, London and Basingtoke, pp. 29-46
- 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.
- Bisswanger Hans (2017). *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*, Wiley-VCH, Weinheim Germany, pp. 55-62.
- Capson-Tojo, G., Ruiz, D., Rouez, M., Crest, M., Steyer, J.P., Bernet, N., Delgenes, J.P., Escudie, R., (2017). Accumulation of propionic acid during consecutive batch anaerobic digestion of commercial food waste. *Bioresour. Technol.* 245, 724e733
- Cárdenas-Cleves L. M., Marmolejo-Rebellón L. F. y Torres-Lozada P., (2018). Improvement of the Biochemical Methane Potential of Food Waste by Means of Anaerobic Co-Digestion with Swine Manure. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 35, No. 04, pp. 1219 – 1229.
- De Lemos, C. (2007). *Anaerobic reactors*, London, United Kingdom, Iwa Publishing, pp. 5-12
- Eisenthal R, Cornish-Bowden A. Direct Linear Plot - New Graphical Procedure for Estimating Enzyme Kinetic-Parameters. *Biochem. J.* 1974; 139:715–720.
- Florencio, L. (1994). The fate of methanol in anaerobic reactors. Ph.D. thesis, Wageningen Agricultural University, the Netherlands.
- G.S. Eadie. (1942), The Inhibition of Cholinesterase by Phytostigmine and prostigmine, *J. Biol. Chem.* 1942, 146:85-93
- Grady, C.P.L.J., Daigger, G.T., Lim, H.C., 1999. *Biological Wastewater Treatment*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Han Y., Green H., Tao W., (2020) Reversibility of propionic acid inhibition to anaerobic digestion: Inhibition kinetics and microbial mechanism. *Chemosphere* Vol 255 Article 126840

- Hanes C.S. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.* 1932; 26:1406–1421
- Hongguang Zhu*, Jing Yang and Cheng Xiaowei, (2019). Application of Modified Gompertz Model to Study on Biogas production from middle temperature co-digestion of pig manure and dead pigs, *E3S Web of Conferences* 118, 03022 (2019)
- J. C. Li, K. W. Sun, J. He, et al, *Chinese Journal of Environmental Science* 32, 1843 (2011).
- Lettinga G., Hulshoff, Pol, L.W. y Zeeman, G., (1996). Biological Wastewater Treatment. Part I: Anaerobic Wastewater Treatment. Lecture Notes. Wageningen Agricultural University, edn January 1996.
- Li Qian, Liu Yaqian, Yang Xiaohuan, Zhang Jiawen, Lu Bin, Chen Rong. Kinetic and thermodynamic effects of temperature on methanogenic degradation of acetate propionate, butyrate and valerate. *Chemical Engineering Journal* 396 (2020) 125366
- Lineweaver Hans, Burk Dean (1934), The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *J. Am. Chem. Soc.* 1934, 56, 3, pp. 658-666
- Lira Silva, Elizabeth, & Jasso Chávez, Ricardo. (2013). Comparación de los diferentes métodos de análisis cinéticos para determinar el tipo de inhibición de dos compuestos. *REB. Revista de educación bioquímica*, 32(1), 19-32.
- Mata-Alvarez, J., (2002). *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes*. IWA publishing.
- Methanol conversion in high -rate anaerobic reactors, Weijma J. and Stams A.J.M., *Water Science and Technology* Vol 44 No 8pp 7-14 IWA Publishing 2001
- Nicholls D. G. (1982). *Bioenergetics and Introduction to the Chemiosmotic Theory*. Academic Press, USA.
- Nielfa, A., Cano, R. and Fdz-Polanco, M. Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnology Reports* 5, 14-21 (2015).

- Niphaphat Phukoetphim, Apilak Salakkam, Pattana Laopaiboon, Lakkana Laopaiboon, 2016, Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghumjuice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models, *Journal of Biotechnology* 243 (2017) 69–75
- Pipyn, P., Verstraete, W., (1981). Lactate and ethanol as intermediates in two-phase anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1145–1154.
- Pullen, Tim., (2015). *Anaerobic Digestion – Making Biogas – Making Energy*. London: Routledge: Earthscan.
- Russell, J.B., (1992). Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 363e370
- Tjørve KMC, Tjørve E, (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS ONE* 12(6): e0178691.
- Valsaraj.K y Melvin.E, (2018). *Principles of Environmental Thermodynamics and Kinetics*, Taylor & Francis Group, LCC, pp. 159-161
- Walker, A.C. and Schmidt, C.L.A. (1944). Studies on histidase. *Arch. Biochem.*, 5,445–467.
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., Meng, L., (2009). Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy* 33, 848-853
- Wu, C., Wang, Q., Yu, M., Zhang, X., Song, N., Chang, Q., et al., (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
- Yang Yu, Qian Chen, Guo Jialiang, Zhiqiang Hu. Kinetics and methane gas yields of selected C1 to C5 organic acids in anaerobic digestion. *Water Research* 87 (2015) pp. 112 – 118.
- Z. H. Hu, H.Q. Yu, (2006) *Waste Management* 26, 1222(2006)

- Zhang Z., Yang Y., Lei Z., Hongjie C. y Norio S, (2008). Kinetic Difference between Acetate and Propionate Pregrown Reactors through Batch Methanogenesis Experiments *Japanese Journal of Water Treatment Biology* Vol. 44 No.2 pp. 95-107
- Zhao, N., Yu, M., Wang, Q., Song, N., Che, S., Wu, C., et al., (2016). Effect of ethanol and lactic acid pre-fermentation on putrefactive bacteria suppression, hydrolysis, and methanogenesis of food waste. *Energy Fuels* 30, 2982–2989.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van'T Rie T K. Modeling of the bacterial growth Curve. *Appl. Env. Microbiol.* 1990; 56(6):1975

9 CAPÍTULO 9. ANEXOS

Se realizó un análisis para los datos de rendimiento específico de metano para cada sustrato, para así obtener los valores de rendimiento específico de metano máximo (REM_{MAX}), la tasa máxima específica de producción de metano (R) y el tiempo de latencia. Se observa que, para el ácido acético, etanol y metanol, la producción específica máxima de metano incrementa a medida que incrementa la concentración.

Tabla A. 1 Parámetros obtenidos con el modelo modificado de Gompertz para las curvas de producción de metano por parte del sustrato e inóculo

Sustrato	Concentración (gDQO/L)	Pmax (Nml/gSV)	R (Nml/(día*gSV))	L (Días)	R cuadrada
Ácido Acético	0.3	14.85	6.93	-0.34	0.971
	0.6	18.22	16.44	-0.12	0.955
	0.9	21.79	30.29	0.00	0.965
	1.2	26.68	32.98	0.10	0.985
	1.5	32.52	46.49	0.14	0.99
Etanol	0.3	12.37	4.59	-0.38	0.982
	0.6	16.96	11.09	-0.32	0.949
	0.9	20.17	22.44	-0.11	0.953
	1.2	24.14	30.51	-0.04	0.965
	1.5	27.32	40.87	0.02	0.973
Ácido Láctico	0.3	12.11	7.43	-0.03	0.991
	0.6	16.67	8.33	-0.05	0.989
	0.9	16.70	9.99	0.10	0.993
	1.2	15.71	10.76	0.11	0.99
	1.5	16.25	12.49	0.21	0.986
Ácido Butírico	0.3	21.70	3.77	0.12	0.999
	0.6	25.99	4.33	0.20	0.996
	0.9	29.62	3.73	0.49	0.995
	1.2	39.92	4.09	0.88	0.991
	1.5	67.49	4.97	1.86	0.986
Metanol	0.3	24.12	3.95	-0.31	0.99
	0.6	24.59	4.40	-0.18	0.994
	0.9	28.03	5.18	-0.19	0.995
	1.2	31.01	5.90	-0.20	0.992
	1.5	33.67	6.41	-0.13	0.995
Ácido Propiónico	0.3	21.41	4.11	-0.61	0.983
	0.6	25.01	4.38	-0.39	0.99
	0.9	17.64	2.66	-1.11	0.981
	1.2	21.54	3.31	-0.72	0.986
	1.5	14.98	2.50	0.11	0.994

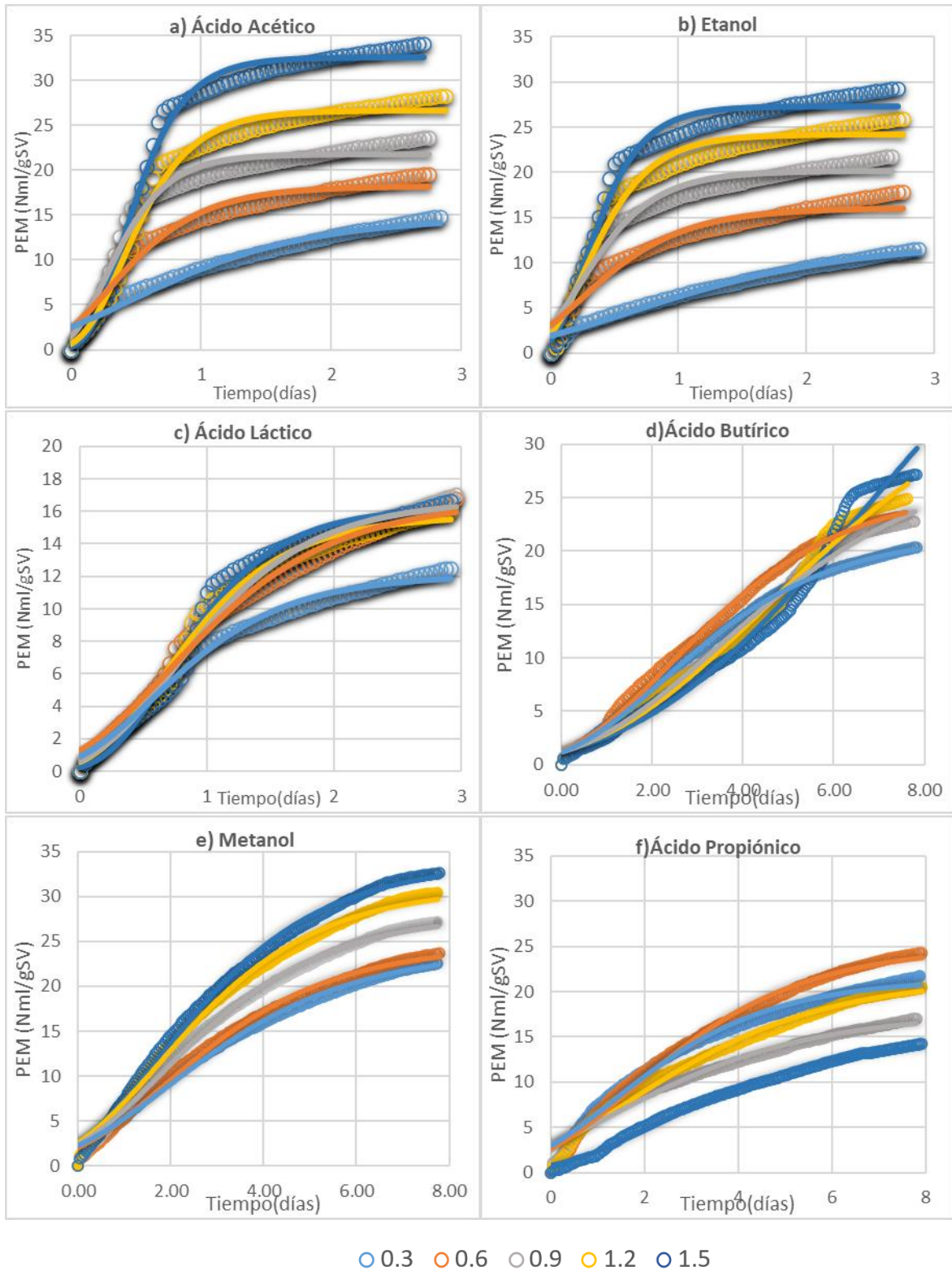


Figura A. 1 Parámetros obtenidos con el modelo modificado de Gompertz para las curvas de producción de metano por parte del sustrato e inóculo

Tabla A. 2 Rapidez de producción específica de metano por parte del sustrato

Sustrato	Concentración (gDQO/L)	REMD (Nml/(día*gSV))	R Cuadrada
Ácido Acético	0.3	17.31	0.996
	0.6	27.21	0.982
	0.9	35.52	0.982
	1.2	42.55	0.996
	1.5	48.72	0.994
Etanol	0.3	15.26	0.997
	0.6	28.54	0.998
	0.9	35.98	0.999
	1.2	40.16	0.997
	1.5	46.53	0.993
Ácido Láctico	0.3	7.95	0.998
	0.6	14.00	0.984
	0.9	18.42	0.990
	1.2	21.76	0.990
	1.5	26.51	0.991
Ácido Butírico	0.3	3.38	0.999
	0.6	3.78	0.996
	0.9	4.93	0.996
	1.2	6.67	0.998
	1.5	7.69	0.984
Metanol	0.3	4.44	0.998
	0.6	4.92	0.998
	0.9	5.84	0.999
	1.2	6.70	0.999
	1.5	7.21	0.999
Ácido Propiónico	0.3	7.89	0.993
	0.6	6.60	0.991
	0.9	7.86	0.981
	1.2	5.96	0.980
	1.5	2.65	0.995

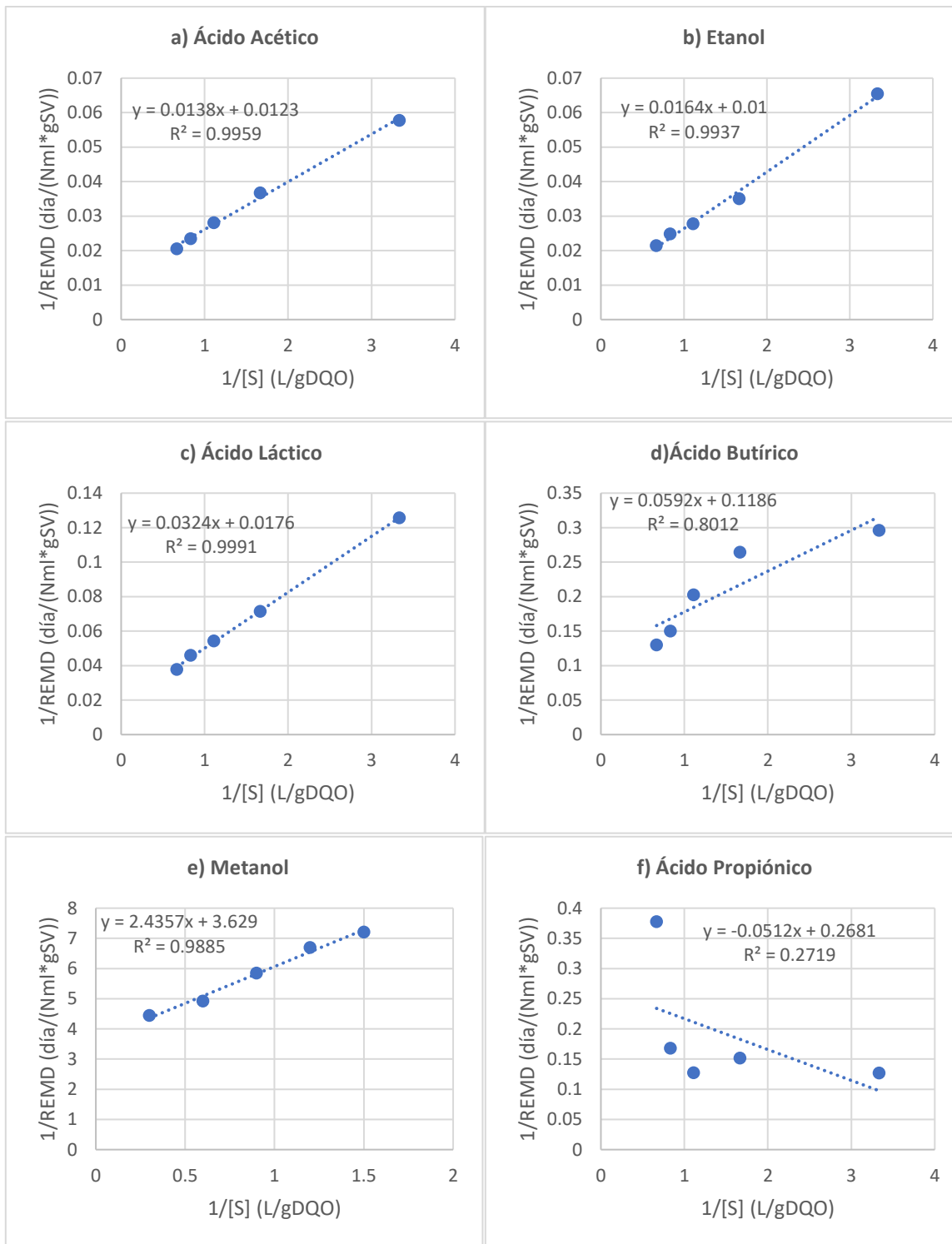


Figura A. 2 Diagramas de Lineweaver – Burk para la producción de sustrato e inóculo

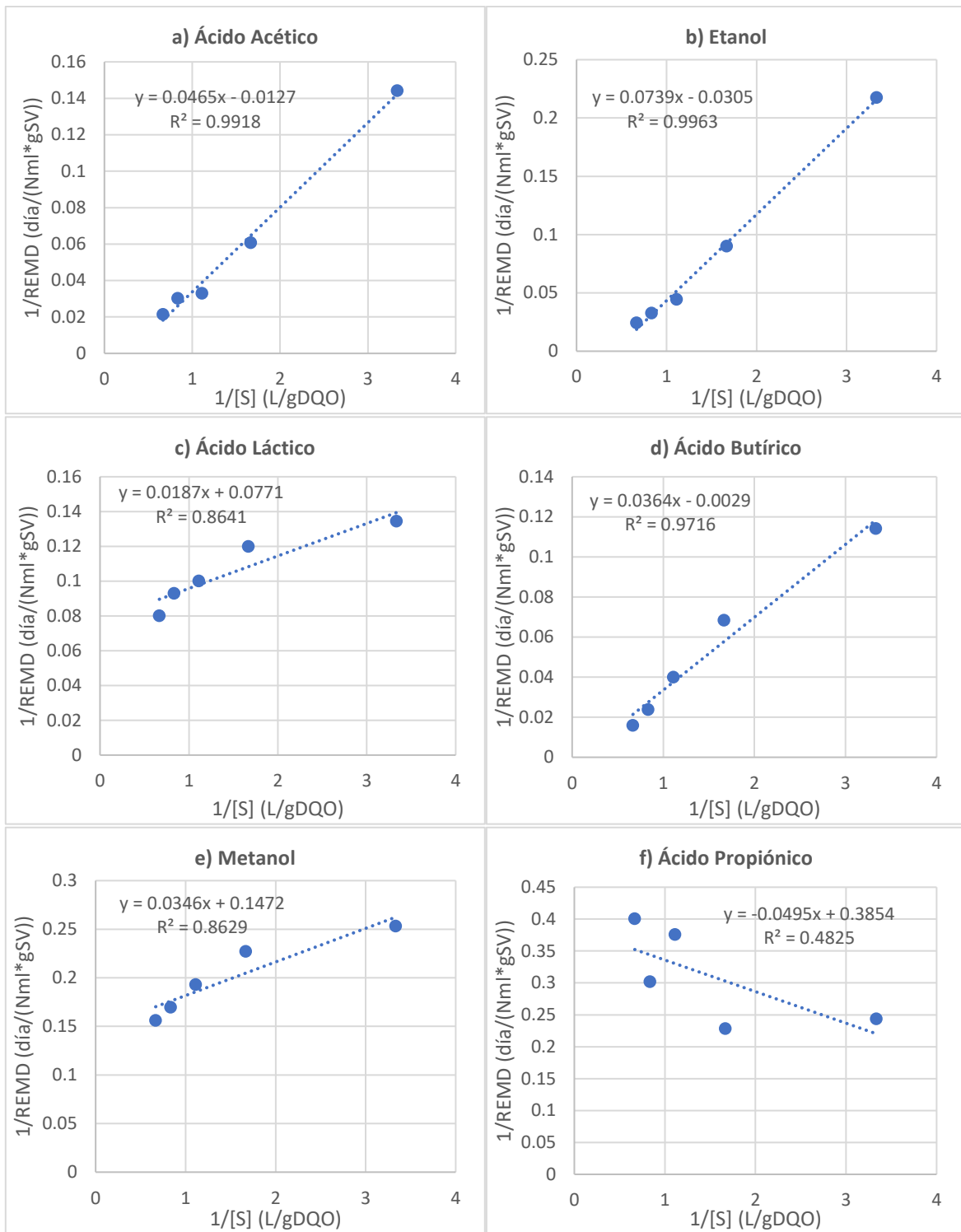


Figura A. 3 Diagramas de Lineweaver – Burk para la producción de sustrato e inóculo utilizando ajuste por modelo de Gompertz modificado

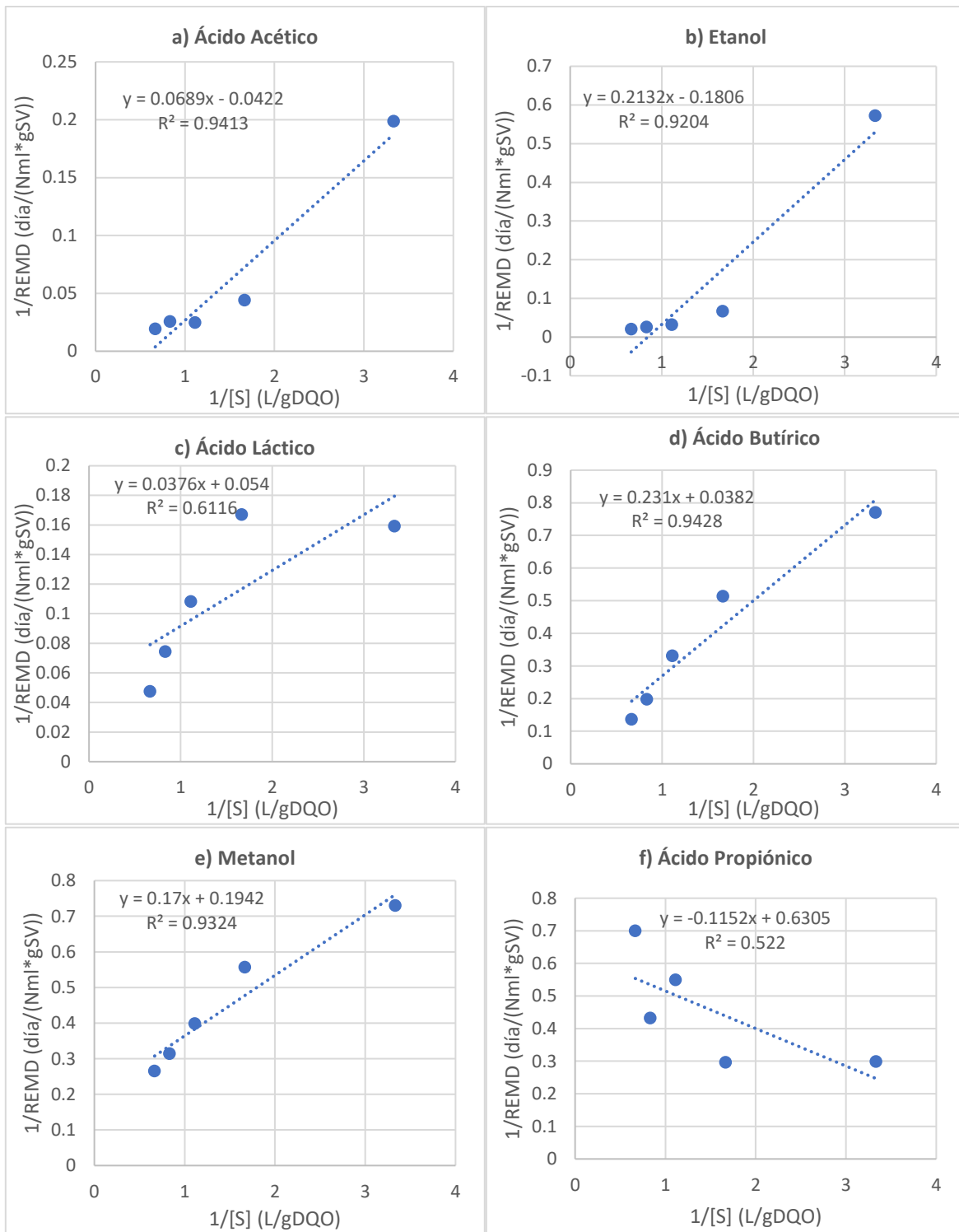
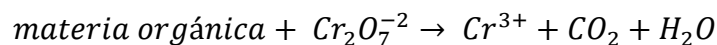


Figura A. 4 Diagramas de Lineweaver – Burk para la producción de sustrato utilizando ajuste por modelo de Gompertz modificado

Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno se basa en la oxidación de materia orgánica contenida en una muestra utilizando al dicromato de potasio como agente oxidante. La demanda química de oxígeno representa la cantidad del oxígeno contenido en el dicromato de potasio necesaria para llevar a cabo la oxidación.



Descripción

En un tubo de ensayo se colocan 2.5 mL de la muestra, se añade 1.5 mL de la disolución de digestión, la cual contiene dicromato de potasio disuelto en ácido sulfúrico, utilizando como catalizador nitrato de plata. Posteriormente se tapan los tubos de ensayo y se agitan vigorosamente para asegurar que los reactivos se mezclen adecuadamente.

Se introducen los viales en el reactor HACH para llevar a cabo la digestión durante 2 horas a una temperatura de 150 °C. Concluido el tiempo, se retiran los tubos de ensayo del reactor HACH y se dejan enfriar a temperatura ambiente.

Finalmente, se da lectura de las absorbancias de cada muestra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm.

Tabla A. 3 Calibración del espectrofotómetro

concentración (mg/L)	Absorbancia (Á)
50	0.008
150	0.037
250	0.065
350	0.090
450	0.116
550	0.135
650	0.169
750	0.199
850	0.208

La curva de calibración se realiza utilizando muestras de concentración de DQO conocidas, para posteriormente medir sus absorbancias y obtener la curva patrón presentada en la figura x.

Con ayuda de la curva patrón, podemos relacionar las absorbancias obtenidas de las muestras con concentraciones de DQO, de la siguiente manera:

$$DQO \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{Absorbancia} - b}{m}$$

Siendo b: la ordenada al origen de la recta de la curva patrón y; m: la pendiente de la recta de la curva patrón.

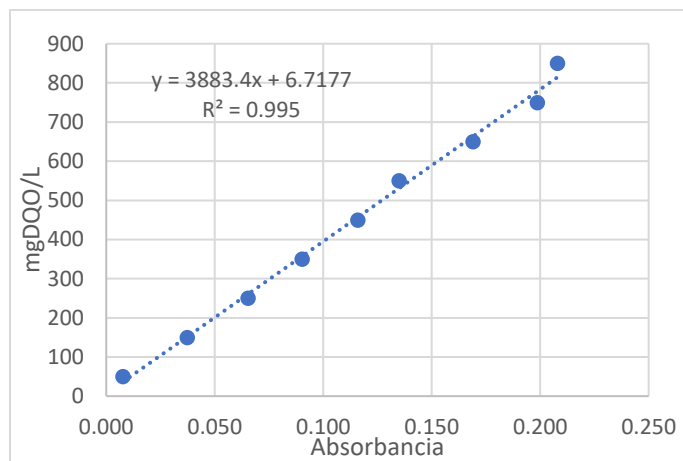


Figura A. 5 Curva de calibración para pruebas de DQO

En la tabla A. 4 se presentan con los valores DQO obtenidos para cada muestra:

Tabla A. 4 Curva de calibración para pruebas de DQO

Sustrato	Concentración inicial	Concentración DQO Total (gDQO/L)	Concentración DQO Blanco (gDQO/L)	Concentración DQO Sustrato gDQO/L
Ácido Acético	0.3	298	224	74
	0.6	269		46
	0.9	259		35
	1.2	276		52
	1.5	271		47
Etanol	0.3	245	224	21
	0.6	272		48
	0.9	267		43
	1.2	260		37
	1.5	383		160
Ácido Láctico	0.3	227	224	3
	0.6	606		382
	0.9	657		433
	1.2	967		744
	1.5	1186		962
Ácido butírico	0.3	433	308	125
	0.6	391		83
	0.9	793		484
	1.2	943		635
	1.5	1070		761
Metanol	0.3	233	224	10
	0.6	262		38
	0.9	373		150
	1.2	376		152
	1.5	552		328
Ácido propiónico	0.3	472	308	163
	0.6	811		502
	0.9	1202		893
	1.2	1432		1124
	1.5	1844		1535

Determinación de alcalinidad.

Para realizar la medición de alcalinidad se tomó un volumen de muestra fijo de 20 mL, esta muestra se titula con una disolución de HCl 0.092 N hasta un primer valor de pH de 5.75; este primer volumen titulado (V_1) corresponde a la alcalinidad parcial, prácticamente debida a los bicarbonatos. Posteriormente, se sigue titulando hasta alcanzar un pH de 4.3, el volumen utilizado (V_2) corresponde a la alcalinidad correspondiente a la alcalinidad intermedia, prácticamente debida a los ácidos grasos volátiles.

A continuación, se presentan las ecuaciones con las cuales, a partir de los volúmenes utilizados y la concentración de HCl, se calcula la alcalinidad en unidades de mgCaCO₃/L

$$\text{Alcalinidad de Bicarbonatos} = \frac{(V_1 * N)}{V.\text{muestra}} * \left(\frac{1 \text{ meq}}{1 \text{ eq}}\right) * \left(\frac{50 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{1 \frac{\text{meq}}{\text{L}}}\right)$$

$$\text{Alcalinidad de AGV} = \frac{(V_2 * N)}{V.\text{muestra}} * \left(\frac{1 \text{ meq}}{1 \text{ eq}}\right) * \left(\frac{50 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{1 \frac{\text{meq}}{\text{L}}}\right)$$

$$\text{Alcalinidad total} = \text{Alcalinidad de Bicarbonatos} + \text{Alcalinidad de AGV}$$

El índice AI/AP es la relación entre la alcalinidad de los ácidos grasos volátiles y la alcalinidad de bicarbonatos:

$$\frac{AI}{AP} = \frac{V_2}{V_1} = \frac{\text{Alcalinidad Bicarbonatos}}{\text{Alcalinidad de AGV}}$$

Tabla A. 5 Volúmenes obtenidos en la determinación de alcalinidad

Sustrato	Concentración inicial (gDQO/L)	V1 (mL)	V2 (mL)
Ácido Acético	0.3	10.58	13.23
	0.6	10.42	13.09
	0.9	10.26	12.92
	1.2	10.79	13.16
	1.5	10.06	12.81
Etanol	0.3	10.29	12.89
	0.6	10.64	13.18
	0.9	10.55	13.03
	1.2	10.58	13.4
	1.5	10.54	13.17
Ácido Láctico	0.3	10.4	12.87
	0.6	10.29	12.98
	0.9	9.79	12.86
	1.2	9.11	12.38
	1.5	8.83	12.54
Ácido Butírico	0.3	22.03	28.2
	0.6	22.19	28.08
	0.9	21.83	28.3
	1.2	21.97	28.41
	1.5	23.15	30.38
Metanol	0.3	21.28	27.12
	0.6	20.94	26.86
	0.9	21.46	27.13
	1.2	21.86	27.74
	1.5	22.03	27.97
Ácido Propiónico	0.3	45.33	53.15
	0.6	21.72	28.84
	0.9	24.9	34.02
	1.2	20.03	28.02
	1.5	18.79	27.19

Tabla A. 6 Valores de pH en cada reactor

Sustrato	Concentración gDQO/L	pH inicial	pH final	masa de lodos (g)	cambio pH
Ácido Acético	0.3	6.98	6.93	102.4	0.05
	0.6	6.99	6.9	102.4	0.09
	0.9	6.99	6.88	102.4	0.11
	1.2	6.99	6.87	102.4	0.12
	1.5	6.99	6.86	102.5	0.13
	Inóculo	6.988			
Etanol	0.3	6.97	6.94	102.4	0.03
	0.6	6.97	6.93	102.4	0.04
	0.9	6.97	6.93	102.4	0.04
	1.2	6.97	6.92	102.4	0.05
	1.5	6.97	6.91	102.4	0.06
	Inóculo	6.97			
Ácido Láctico	0.3	6.99	6.94	102.5	0.05
	0.6	6.98	6.93	102.5	0.05
	0.9	6.97	6.93	102.4	0.04
	1.2	6.98	6.92	102.4	0.06
	1.5	6.98	6.91	102.5	0.07
	Inóculo	6.98			
Ácido butírico	0.3	6.97	6.89	102.5	0.08
	0.6	6.97	6.87	102.4	0.1
	0.9	6.97	6.86	102.5	0.11
	1.2	6.97	6.85	102.4	0.12
	1.5	6.98	6.84	102.4	0.14
	Inóculo	6.972			
Metanol	0.3	6.96	6.81	102.4	0.15
	0.6	6.97	6.79	102.5	0.18
	0.9	6.99	6.78	102.4	0.21
	1.2	6.99	6.77	102.4	0.22
	1.5	6.99	6.77	102.4	0.22
	Inóculo	6.98			
Ácido propiónico	0.3	6.98	6.92	102.4	0.06
	0.6	6.97	6.89	102.5	0.08
	0.9	6.97	6.86	102.4	0.11
	1.2	6.97	6.81	102.4	0.16
	1.5	6.97	6.78	102.4	0.19
	Inóculo	6.972			