



**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL
BIOQUÍMICO DE METANO DE
RESIDUOS CÍTRICOS MEDIANTE
DIGESTIÓN ANAEROBIA**

VALENTINA URREA ARBOLEDA

**Universidad Católica de Manizales
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Ingeniería Ambiental
Manizales, Colombia
2019**

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DE RESIDUOS CÍTRICOS MEDIANTE DIGESTIÓN ANAEROBIA

VALENTINA URREA ARBOLEDA

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Ingeniera Ambiental

Directora:

MARIA FERNANDA ORTIZ REVELO

Ingeniera Química

Especialista en Ingeniería Sanitaria y Ambiental

Directora del Programa de Ingeniería Ambiental

Universidad Católica de Manizales

Tutor:

JUAN SEBASTIAN ARCILA HENAO

Ingeniero Químico, PhD Ingeniería Ambiental

Docente-Investigador Universidad Católica de Manizales

Línea de Investigación:

Asistencia de Investigación

Grupo de Investigación:

TECNOLOGÍAS AVANZADAS EN SANEAMIENTO AMBIENTAL

Universidad Católica de Manizales

Facultad de Ingeniería y Arquitectura

Manizales, Colombia

2019

El siguiente trabajo investigativo es dedicado a mis padres y a mi hermano por todo el apoyo brindado durante la etapa de elaboración de este, así como por permitirme la oportunidad y las herramientas necesarias para desarrollar y concluir satisfactoriamente una carrera profesional de alta calidad.

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud al docente Juan Sebastián Arcila por ofrecerme la oportunidad de trabajar en éste proyecto; por la paciencia, el tiempo y el esfuerzo dedicados durante el desarrollo de todo el proceso de investigación, así como por el amplio conocimiento brindado que permitió el alcance de los objetivos aquí establecidos.

De igual manera, mis agradecimientos a la Universidad Católica de Manizales por brindar los recursos necesarios para llevar a cabo el trabajo de investigación, así como al personal de CALER, a los miembros del IMBA, y a los colaboradores de la universidad por su buena disposición y por el gran apoyo que significaron los servicios prestados.

Tabla de contenido

Lista de tablas	4
Lista de figuras	4
Lista de gráficas	4
Resumen	5
Participación en eventos	6
Abreviaciones	6
Unidades	6
1. Capítulo I	7
1.1 Introducción	7
1.1.1 Limitaciones por inhibición de la actividad metanogénica	9
1.2 Planteamiento del problema	12
1.3 Justificación	14
1.3.1 Comparación en costos del biogás	15
1.4 Referente teórico	15
1.4.1 Caracterización de cítricos	15
1.4.2 Digestión Anaerobia	16
1.4.3 Potencial Bioquímico de Metano (PBM)	17
1.4.3.1.1 Sustrato	19
1.4.3.1.1.1 Tamaño de partícula	19
1.4.3.1.1.2 Almacenamiento	20
1.4.3.1.2 Inóculo	21
1.4.3.1.3 Medio	22
1.4.3.1.4 Agua	23
1.4.3.1.5 Temperatura	23
1.4.3.1.6 Incubación	24
1.4.3.1.7 pH	24
1.4.3.1.8 Reactores	24
1.4.3.1.9 Control positivo	25
1.4.3.1.10 Condiciones anaerobias	25
1.4.3.3.1 Métodos de medición de producción de biogás	26
1.4.3.3.2 Solubilidad de los gases	26

1.5 Antecedentes	27
1.5.1 Investigaciones sobre la influencia de los aceites esenciales en la prueba de PBM.....	27
1.5.2 Investigaciones sobre la prueba de PBM en condiciones termofílicas ...	27
1.5.3 Investigaciones sobre el PBM en reactores discontinuos y semicontinuos.....	28
1.5.4 Investigaciones sobre la influencia de la temperatura en la prueba de PBM	29
1.5.5 Investigaciones sobre el PBM de diferentes residuos orgánicos.....	30
1.5.6 Otras investigaciones sobre la influencia de diferentes parámetros sobre el PBM.....	30
1.6 Hipótesis.....	31
1.7 Objetivos	31
1.7.1 Objetivo general	31
1.7.2 Objetivos específicos.....	31
2. Capítulo II	32
2.1 Metodología general.....	32
2.1.3.1 Etapa I: Determinación del PBM de sustratos cítricos puros.....	36
2.1.3.2 Etapa II: Identificación de la mezcla óptima de sustratos cítricos para prueba de PBM.....	37
2.1.3.2.1 Diseño experimental.....	39
2.1.3.2.2 Modelo de predicción de la cinética de crecimiento	41
2.1.3.2.3 Medio Sintético	41
2.1.3.3 Concentración del sustrato	42
3. Capítulo III	42
3.1 Resultados y discusión	42
3.1.1 Etapa I: Determinación del PBM de sustratos cítricos puros.....	42
3.1.2 Etapa II: Identificación de la mezcla óptima de sustratos cítricos para la prueba de PBM.....	44
4. Capítulo IV	50
4.1 Conclusiones	50
4.2 Recomendaciones.....	51
Referencias	51

Lista de tablas

Tabla 1. Composición química del residuo de cáscara de naranja.....	16
Tabla 2. Componentes necesarios en un medio sintético.....	22
Tabla 3. Preparación de medios de cultivo para cada reactor.	38
Tabla 4. Descripción del medio anaerobio básico.....	41
Tabla 5. Resultados obtenidos tras la digestión anaerobia en la etapa I.	43
Tabla 6. Producción de CH ₄ en la etapa experimental II	46
Tabla 7. Composición del biogás producido.	46
Tabla 8. Remoción de material orgánico representado como sólido volátil durante la digestión anaerobia en la etapa experimental II.....	48
Tabla 9. Resultados pruebas finales de DQO etapa experimental II.....	48
Tabla 10. Resultados pruebas finales de N-NH ₄ ⁺ etapa experimental II.	49

Lista de figuras

Figura 1. Montaje experimental para la biodegradación anaerobia para la prueba estándar de PBM.	24
Figura 2. Medición de muestra de los reactores para pruebas finales de sólidos de la etapa experimental II.	32
Figura 3. Aclimatación del inóculo.	34
Figura 4. Medición de gas en la etapa experimental I mediante el método de probeta invertida	34
Figura 5. Montaje de probeta invertida para medición de metano.....	35
Figura 6. Analizador de gases.	36
Figura 7. Reactores etapa experimental I.	37
Figura 8. Reactores anaerobios de la etapa experimental II.....	38
Figura 9. Etapas experimentales I y II de la prueba de PBM.....	38
Figura 10. Preparación de medio de cultivo para reactores anaerobios en la etapa II.	39
Figura 11. Diseño experimental simplex con centroide.....	39
Figura 12. Ejemplos de diseños de mezclas para tres componentes	40
Figura 13. Diseño de mezcla en forma de símplex para una mezcla de tres componentes.....	40

Lista de gráfica

Gráfica 1. Efecto del tamaño de partícula en el rendimiento de metano de la fibra de sisal ...	20
Gráfica 2. Producción de metano mediante digestión anaerobia en la etapa I.....	43
Gráfica 3. Producción de metano mediante digestión anaerobia en la etapa experimental II..	45

Resumen

La producción de biogás a partir de la digestión anaerobia de residuos cítricos se presenta como una alternativa viable para obtención de gas rico en metano, una fuente renovable de energía. Los cítricos hacen parte de una de las principales cadenas de producción agrícolas en Colombia, de dichas actividades productivas se generan grandes volúmenes de residuos orgánicos que son generalmente desechados en vertederos y que son una materia prima aprovechable dentro de variados procesos de valorización de residuos. El objetivo de este estudio es determinar el potencial bioquímico de metano de residuos cítricos mediante procesos de digestión anaerobia, empleando cáscaras de lima ácida Tahití (*Citrus × latifolia*), mandarina Oneco (*Citrus reticulata*) y naranja Tangelo (*Citrus hibridus (reticulata x paradasi)*) como sustrato. Se llevaron a cabo dos ensayos experimentales en modo de operación por lotes manteniendo una relación (X₀/S₀) de 2 g SVT/g SVT_{sustrato}. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones mesofílicas de 37°C y agitación constante de 100 rpm. El proceso experimental se llevó a cabo en dos etapas: i) Evaluación de sustratos puros para mayor producción de biogás: El ensayo experimental #1 se desarrolla con el fin de determinar el tipo de sustrato que presenta mayor producción de biogás, se empleó una temperatura de incubación de 35°C. ii) Evaluación de la mezcla óptima de sustratos para mayor producción de biogás: Para el ensayo experimental #2 se evaluó la mezcla de sustratos óptima para mayor producción de metano; con el fin de optimizar el proceso e incrementar la producción de biogás, se implementaron nuevas medidas modificando algunas condiciones de operación como la adición de un medio basal compuesto por soluciones minerales con el fin de eliminar limitantes en el proceso de digestión por falta de micronutrientes enriqueciendo el medio de cultivo; por otro lado también se incrementó la temperatura de operación a 37°C. Los resultados muestran que la mayor producción de metano en ambos experimentos fue obtenida por la cáscara de naranja con un valor de $0,46 \pm 0,05$ LCH₄/gSV para la etapa experimental I y $0,50 \pm 0,06$ LCH₄/gSV para la etapa experimental II; la mezcla de los tres sustratos resultó ser el segundo mayor PBM con un valor de $0,47 \pm 0,06$ LCH₄/gSV; sin embargo para los casos en los que se realizó mezcla de dos sustratos no resultó ser conveniente ya que se presentaron los valores más bajos en la producción de biogás. Con base en la revisión de literatura puede suponerse que la presencia de AGV resultaron en inhibición del proceso, definiendo la curva de producción de biogás en un proceso de dos etapas.

Palabras clave

Digestión anaerobia, potencial bioquímico de metano, residuos cítricos, valorización de residuos, metano, biogás, energía renovable.

Participación en eventos

Se presentaron avances del presente proyecto en dos eventos de investigación:

INNOVUS: Feria de innovación de la Universidad Católica de Manizales.

RREDSSI: Encuentro Departamental de Semilleros de Investigación nodo Caldas.

Abreviaciones

AGV: Ácidos grasos volátiles

DA: Digestión anaerobia

DBO: Demanda biológica de oxígeno

DQO: Demanda química de oxígeno

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

PBM: Potencial bioquímico de metano

SV: Sólido volátil

UE: Unión europea

Unidades

GW: Gigavatio

TJ: Terajulio

TWh: Teravatio-hora

1. Capítulo I

1.1 Introducción

Debido a sus características geográficas, Colombia es un país privilegiado para el desarrollo de actividades agroindustriales por sus condiciones de humedad, pluviosidad, y geografía favorables para el cultivo de gran variedad de especies; entre ellas, específicamente, el cultivo de cítricos, el segundo frutal más cultivado en el país después del banano (Orlando Orduz Rodríguez et al. 2008) siendo esta la principal actividad productiva en 21 de los 32 departamentos del país, que fueron agrupados en cuatro núcleos productivos en el Acuerdo de Competitividad de cítricos (Oscar n.d.). Dichas zonas productoras de cítricos se encuentran ubicadas entre los 0 m y los 1600 m de altitud, con temperaturas medias de 23°C a 34°C, pluviosidades acumuladas anuales de 900 mm a 1200 mm y luminosidad mayor a 1900 h de brillo solar anual (Orlando Orduz Rodríguez et al. 2008)

Las cadenas productivas de cítricos incluyen productos en su fase primaria tales como las naranjas, limones, limas, mandarinas y toronjas, y una serie de productos asociados a la fase industrial como zumos, pulpas, jaleas, mermeladas, aceites, esencias y pellets para alimentación animal (González-sánchez, Pérez-fabiel, and Wong-villarreal 2015). Para dichos procesos industriales se exprime casi la mitad de la frutas procesadas para jugos y el resto incluyendo la cáscara, las semillas, membranas y otros subproductos, se consideran desechos de cítricos (Wilkins et al. 2007)

Las cáscaras secas de los cítricos son ricas en pectina, celulosa y hemicelulosa y pueden usarse como un sustrato de fermentación, varios investigadores han propuesto diferentes aplicaciones para éstos residuos de cítricos, como la producción de pectina, flavonoides, fibra y alimentos para animales (Inoue et al. 2010; Mamma, Kourtoglou, and Christakopoulos 2008); también se han propuesto diversas transformaciones microbianas para la utilización de desechos de procesamiento de alimentos para producir productos valiosos como biogás, etanol, ácido cítrico, químicos, diversas enzimas, compuestos aromatizantes volátiles, ácidos grasos y biomasa microbiana (Dhillon et al. 2004). Si bien los desechos de cáscara de naranja pueden reutilizarse para una amplia variedad de propósitos, hasta hace relativamente poco tiempo no ha habido otros medios satisfactorios de eliminación que no sean el vertido de los desechos en terrenos adyacentes a los sitios de producción, utilizándolos como materia prima en la fabricación de alimentos para ganado o quemándolos (Lapuerta et al. 2008); por lo que una gran fracción de éstos desechos todavía son desperdiciados cada año, lo que produce un deterioro del medio ambiente y una pérdida de recursos potencialmente valiosos (Bisaria and Ghose 1981). Este desperdicio (que asciende a varias toneladas por día en una planta de procesamiento de tamaño mediano) causa muchos problemas económicos y ambientales; debido a los altos costos de transporte, la falta de sitios de disposición y porque el material de relleno posee alta fermentabilidad por su alto contenido orgánico (Tripodo et al. 2004). Estos desechos sólidos de origen lignocelulósico normalmente representan el 40-50% de la materia prima procesada y tienen una concentración total de sólidos (TS) del 10-15%. (Viswanath,

Sumithra Devi, and Nand 1992). Se ha descrito un gran número de propuestas prometedoras para el uso de estos residuos en la literatura (Ángel Siles López, Li, and Thompson 2010). Entre otros, estos incluyen el uso de los desechos para producir fertilizantes, aceites esenciales, pectina, etanol, enzimas industriales, proteínas unicelulares, absorbentes de contaminantes y suplementos de pulpa de papel.

Si bien los procesos de producción agrícolas representan una de las fuentes más significativas de residuos orgánicos, por otro lado tenemos que el desperdicio de alimentos es sin duda otra de las problemáticas que se enfrentan actualmente en el mundo, por ejemplo, en algunos casos, las frutas y vegetales no cumplen con condiciones regulatorias de comercio impuestas por cadenas de comercialización convirtiéndose entonces en desperdicio, esta problemática representa una gran fuente de residuos orgánicos en todo el mundo; algunos reportes sobre las cadenas de producción de alimentos dado por organismos como la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), establecen que 1/3 de la comida en el mundo (1.3 billones de toneladas) se echa a perder o es desperdiciada.

La biomasa en forma de celulosa, hemicelulosa y lignina proporciona un medio para recolectar y almacenar la energía solar y, por lo tanto, representa un importante recurso energético y material. Sin embargo, antes de usar este recurso, es necesario convertirlo en una forma utilizable, como una materia prima gaseosa (metano) o líquida (etanol) que se ajuste a nuestra economía química (Bisaria and Ghose 1981). Entre las diferentes posibilidades para el aprovechamiento y valorización de los desechos y residuos orgánicos, específicamente de los residuos lignocelulósicos como es el residuo industrial de naranja, generado y desechado de las industrias de procesamiento de frutas, la digestión anaerobia se presenta como una alternativa viable frente a otros procesos. En este marco, la digestión de biomasa constituye una opción atractiva principalmente en aplicaciones locales, ya que permite que la biomasa se utilice cerca de la fuente y, por lo tanto, elimine gran parte de los costos derivados del almacenamiento y el transporte. (Lapuerta et al. 2008). La digestión anaerobia, en la que se puede lograr el control de la contaminación y la recuperación de energía, es otra forma posible de tratar y revalorizar los abundantes residuos de piel de naranja. Este proceso se define como la conversión biológica de material orgánico en una variedad de productos finales, incluido el "biogás", cuyos principales constituyentes son el metano (65–70%) y el dióxido de carbono (Forgács et al. 2012). Las ventajas de la digestión anaeróbica incluyen bajos niveles de lodos biológicos, bajos requerimientos de nutrientes, alta eficiencia y producción de metano, que puede utilizarse como fuente de energía para calefacción y electricidad en el sitio de aprovechamiento (Nallathambi Gunaseelan 2009). Los residuos de piel de naranja contienen hidratos de carbono solubles e insolubles que pueden ser digeridos a biogás (Wikandari et al. 2015). La presencia de un alto contenido de materia orgánica, el 90-95% de ST (Viswanath et al. 1992) hace que estos desechos sean ideales para la digestión anaeróbica, por otro lado, tenemos que los desechos de cítricos tienen típicamente bajos valores de pH (3-4), alto contenido de agua (aproximadamente 80 - 90%) y altos contenido de materia orgánica (aproximadamente 95% de sólidos totales). Estas características indican que los residuos cítricos no pueden ser dispuestos en rellenos sanitarios de acuerdo a regulaciones europeas (2008 n.d.) así mismo, éstos desechos pueden ser un problema en procesos de

compostaje, debido a su bajo pH, la presencia de aceites esenciales que inhiben el procesos de compostaje y la rápida biodegradabilidad de éste residuo, lo cual puede causar problemas de anaerobiosis en las pilas de compostaje (Ruiz and Flotats 2014).

Por otro lado, las alternativas de tratamiento térmico, como la incineración, gasificación o pirólisis no son alternativas tan eficientes desde un punto de vista energético y económico, puesto que por su alto contenido de humedad, los residuos requerirían un procedimiento previo de deshidratación. Otra alternativa para el aprovechamiento de estos residuos sería la producción de bioetanol; sin embargo, requiere altos costos de inversión para la construcción y el mantenimiento de una planta de bioetanol; cerca de 600 Eu/Ton de residuos tratados por año (Sánchez-Segado et al. 2012) comparado con 75 - 200 Eu/Ton/año para una planta de biogás (Cavinato et al. 2010; Karellas, Boukis, and Kontopoulos 2010; Sorda, Sunak, and Madlener 2013). Desde un punto de vista energético ésta opción de valorización no es tan eficiente como la producción de metano (Biogás) a través de la digestión anaerobia; ya que como se ha reportado, con el bioetanol se obtuvo un rendimiento de 50-60 L/ton de residuos, equivalente a 294-352 kW/h/ton de residuo; por otro lado, con el proceso de digestión anaerobia se tiene 78 - 110 m³CH₄/ton de desechos con 18% de sólidos totales (ST) y 95% de sólidos volátiles (SV, base de materia seca) y a 737 - 1040 kW/h/ton de desechos: 1.5 - 2 veces más alto que los valores obtenidos con bioetanol (Ruiz and Flotats 2014).

De acuerdo a la estimación realizadas por la unidad de planeación minero energética (UPME), en el 2012 Colombia presentaba una producción de residuos agrícolas cercanos a 66.2 millones de toneladas/año con un potencial energético de 330350 TJ/año. Por todas estas razones, la digestión anaerobia es una alternativa muy llamativa para el aprovechamiento de los residuos orgánicos. La digestión anaeróbica es un proceso biológico de tres etapas. El material orgánico sólido se disuelve enzimáticamente. Las sustancias orgánicas solubles son luego metabolizadas por bacterias a ácidos orgánicos y alcoholes. Las bacterias del metano convierten estos ácidos grasos y alcoholes en metano y dióxido de carbono (Clausen, Sitton, and Gaddy 1979).

Sin embargo, hay una serie de factores que pueden llegar a intervenir en el proceso de digestión anaerobia de los residuos cítricos específicamente, y se atribuyen especialmente a la presencia de aceites esenciales en los cítricos, los cuales son conocidos por inhibir la actividad metanogénica durante los procesos de digestión anaerobia.

1.1.1 Limitaciones por inhibición de la actividad metanogénica

Los aceites esenciales cítricos son líquidos que contienen, entre otros componentes, los compuestos volátiles aromáticos de las plantas de cítricos. Sus propiedades antimicrobianas han sido utilizadas con variados propósitos para aplicaciones bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitarias, insecticidas, medicinales y cosméticas, especialmente en la actualidad en las industrias farmacéutica, sanitaria, cosmética, agrícola y alimentaria. Usualmente contienen una amplia variedad de compuestos, aproximadamente entre 20 y 60 (Bakkali et al. 2008); de éstos el 85- 99% son compuestos volátiles y el resultante 1-15% son compuestos no-volátiles (Ruiz and Flotats 2014). El principal componente es el limoneno,

con una concentración que varía entre el 32% y el 98% dependiendo de la variedad: 32-45% en Bergamina, 45-76% en limón y 68-98% en naranja dulce (Moufida and Marzouk 2003).

El daño causado por compuestos como el limoneno se debe al hecho de que afecta varias partes de la célula simultáneamente, se ha demostrado que éstos pasan a través de la pared celular y la membrana citoplásmica, rompen la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y los permeabilizan. La citotoxicidad parece incluir dicho daño a la membrana. En las bacterias, la permeabilización de las membranas se asocia con la pérdida de iones y la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y el agotamiento de la reserva de ATP (Bakkali et al. 2008). Se ha demostrado que éste compuesto causa la falla final del proceso a una concentración de 400 $\mu\text{L} / \text{L}$ en la digestión mesofílica (Mizuki, Akao, and Saruwatari 1990) y en el rango de 450 a 900 $\mu\text{L} / \text{L}$ en la digestión termofílica (Forgács, Chalmers tekniska högskola., and Högskolan i Borås. 2012). Si bien existen diferentes técnicas para realizar la extracción de los aceites esenciales cítricos estos no serán considerados en el presente trabajo de investigación.

Se han llevado a cabo varias investigaciones para abordar los desafíos de la inhibición por el limoneno (Forgács et al. 2012; Mizuki et al. 1990). Estos métodos se pueden clasificar en tres categorías: eliminación de limoneno, recuperación de limoneno y conversión de limoneno en un compuesto menos tóxico. Entre estos métodos, la recuperación de limoneno parece ser la mejor alternativa, ya que este químico es un compuesto valioso utilizado en varias industrias como perfumería, productos químicos, cosméticos, medicina y sabor de alimentos (Forgács et al. 2012; Raeissi et al. 2008).

Existen varios métodos que se han descrito para la recuperación de limoneno, incluida la explosión de vapor (Forgács et al. 2012), la destilación de vapor (Martín et al. 2010) y la hidrólisis ácida (Lohrasbi et al. 2010). Métodos clásicos de extracción como la maceración y la extracción Soxhlet requieren solventes de extracción peligrosos o períodos de extracción alargados (Inoue et al. 2010).

La ventaja clave de la digestión anaerobia como tecnología de aprovechamiento, en comparación con otros métodos, es la producción de biogás; éste es un material gaseoso: una mezcla que contiene metano y dióxido de carbono producido durante la digestión anaerobia de compuestos orgánicos (Wikandari et al. 2015); este gas es inflamable y se puede quemar para producir energía dentro una variedad de aplicaciones, como calefacción, generación de electricidad o como combustible automotriz en motores de gas. Como se dijo anteriormente, la producción de metano significa que la digestión anaerobia puede ser mucho más energéticamente favorable cuando se compara con el relleno y el compostaje de desechos orgánicos (Gijzen et al. 1987a; Gallert et al. 2003) y evita el gran impacto ambiental de los sitios de relleno típicamente asociados (Orlando Orduz Rodríguez et al. 2008)

La biomasa y los desechos orgánicos representan un gran potencial como recurso energético renovable. La disminución de los suministros de energía y los impactos ambientales asociados con el uso de formas de energía fósil están fomentando un renovado interés en la energía renovable. La biogasificación de estas materias primas orgánicas es una opción atractiva porque:

- Puede procesar alimentos húmedos o secos.

- No requiere tratamiento térmico ni químico.
- No requiere cultivos puros ni condiciones estériles.
- El producto metano es de alta calidad y se separa fácilmente del reactor.
- El producto metano se puede usar en una variedad de estados de pureza y se usa comúnmente como una forma de energía importante en todo el mundo.

Se desarrolló un método, conocido como el ensayo de potencial bioquímico de metano (PBM), para estimar la conversión final y el rendimiento de metano asociado de los sustratos orgánicos (Owen et al. 1979). Este método se ha aplicado ampliamente con modificaciones menores para determinar la producción final de metano a partir de variedad de acciones de alimentación (Chynoweth et al. 1993; Tong, Smith, and McCarty 1990).

El ensayo PBM se desarrolló como un método estandarizado para determinar la biodegradabilidad final y el rendimiento de metano asociado durante la fermentación metanogénica anaeróbica de sustratos orgánicos. En general, es análogo al ensayo de demanda bioquímica de oxígeno que se ha utilizado ampliamente para determinar la biodegradabilidad en condiciones aerobias para el análisis de la calidad del agua. La prueba implica la incubación por lotes de un sustrato en condiciones ideales para la descomposición anaeróbica. Estas condiciones incluyen: (1) inóculo de amplio espectro; (2) exceso de inóculo; (3) exceso de nutrientes; concentración de sustrato por debajo de los niveles inhibitorios; (4) exceso de capacidad de amortiguación; (5) temperatura moderada; y (6) condiciones anaeróbicas estrictas (Chynoweth et al. 1993).

Con el fin de evaluar el potencial energético de un sustrato en específico, en este caso el potencial del sustrato cítrico a partir de digestión anaerobia para generación de biogás; se llevan a cabo la prueba de PBM la cual indica la cantidad de gas metano producido por fracción orgánica del sustrato. Estos ensayos traen algunos beneficios como: (a) la tasa de metano se puede medir fácilmente; (b) la alta tasa de metano está asociada con la eliminación de la demanda química de oxígeno (DQO), que es un objetivo importante de las aplicaciones de tratamiento de aguas residuales; y (c) el gas metano es un producto energético útil. (Hamon, 1993).

Dos de los factores más importantes que deben considerarse al aplicar la fermentación de metano al material lignocelulósico son la velocidad y el grado (biodegradabilidad) de la degradación. Una alta biodegradabilidad significa que no solo se puede generar más metano por unidad de masa de alimento, sino que también se obtiene menos residuos para su posterior eliminación (Tong et al. 1990). Una velocidad de biodegradación rápida reduce el tamaño requerido para un reactor y, por lo tanto, hace que el proceso sea más atractivo económicamente (Clausen et al. 1979) Ambos factores son funciones de las propiedades intrínsecas del propio material lignocelulósico y de los microorganismos involucrados (Bisaria and Ghose 1981)

En el presente proyecto de investigación, se pretende determinar el potencial bioquímico de metano de residuos cítricos empleando cáscaras trituradas de limón, mandarina y naranja como sustrato para el proceso de digestión anaerobia mediante el cual se genera la producción de biogás; trabajando con reactores por lotes bajo condiciones de operación mesofílicas; identificando la mezcla de sustrato óptima para mayor producción de biogás así como evaluando el proceso de digestión mediante valores como el periodo de latencia y velocidad de producción de biogás para cada tipo de sustrato empleado.

El resto de este trabajo se estructura de la siguiente manera. El capítulo I presenta la introducción al tema de interés; los antecedentes así como bases teóricas de trabajos desarrollados en los cuales la generación de biogás a partir de digestión anaerobia hace parte del tema central de investigación; seguido del planteamiento del problema y proporciona una descripción de la literatura y de investigaciones que sirven como sustento a este proyecto; se presentan los objetivos a alcanzar en este proyecto; así como el propósito y sus implicaciones prácticas. El capítulo II presenta la metodología general empleada para el alcance de los objetivos planteados así como el montaje experimental de la prueba de PBM y las técnicas de análisis y limitaciones en el proceso. El capítulo III presenta los resultados obtenidos y el análisis del conjunto de datos, e ilustra los resultados de aplicación del modelo matemático para ajuste de datos; finalmente el capítulo IV presenta las conclusiones del proyecto de investigación.

1.2 Planteamiento del problema

La gran dependencia al petróleo y la producción y el consumo de combustibles fósiles han sido unos de los principales catalizadores de la tragedia ambiental que se vive actualmente; lo que hace que la transición hacia energías renovables y hacia un modelo de desarrollo políticamente correcto sea una de las decisiones indispensables para el crecimiento y el progreso de nuestra sociedad así como para garantizar la integridad ecológica de nuestro planeta; como estrategia para hacer frente al cambio climático se han identificado cada uno de los pilares de nuestro desarrollo y se han propuesto los 21 objetivos de desarrollo sostenible, buscando replantear el modelo de desarrollo actual en mira a uno ambiental, social y económicamente responsable. Como estrategias para lograr el alcance de los objetivos de desarrollo sostenible, el gobierno colombiano ha apostado por una mejora y tecnificación del campo colombiano, impulsando así el sector agrícola en el país; como parte de estas estrategias se ha instaurado la política diversificadora de cultivos tradicionales, viéndose beneficiado específicamente la agroindustria cítrica en diferentes zonas del país.

La naranja es la fruta más cultivada en todo el mundo y representa aproximadamente el 50–60% de la producción total de cítricos; sin embargo, también otras especies por ejemplo, limón, lima, mandarina, pomelo tienen importancia industrial (Satari y Karimi, 2018). Brasil, China, India, México, España y Estados Unidos producen más de dos tercios de los cítricos

del mundo (Paggiola et al., 2016; Satari y Karimi, 2018). En Colombia la producción de cítricos se centra en el departamento de Santander, con mayor área cultivada. La naranja Tangelo posee un potencial muy grande, con gran demanda local, nacional y exportación como fruta de mesa; su popularidad radica en las características como cáscara de fácil desprendimiento y buen sabor (Rodríguez Astudillo 2010). Se calcula que pueden existir entre 10 a 12 mil hectáreas de mandarina, siendo la mandarina ‘Oneco’ una de las variedades que sobresalen siendo cultivada en el occidente del país (Orduz-Rodríguez J, Monroy J, Barrera S, Núñez V 2012). La lima o limón Tahití se produce en siete departamentos del país, siendo el principal productor Santander con 80,3% de participación en 2017. Asimismo, 35 municipios del país cuentan con producción de lima Tahití, de los cuales seis hacen parte de las zonas más afectadas por el conflicto armado (zomac). En el último año se tuvo un área cosechada de 4580 Ha produciéndose 86297 Ton para el 2017 Según información del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

En el Eje Cafetero colombiano se encuentra localizada gran parte de la industria procesadora de cítricos del país, con una capacidad de procesamiento de 110.000 toneladas de naranja por año, de las cuales 13.000 Tm./año corresponden a Frutasa-Caldas y a Passicol-Caldas con 7.000 Tm./año (González-sánchez et al. 2015).

Como se mencionó anteriormente, entre las nuevas estrategias del gobierno para impulsar la industria agropecuaria en el país, se evidencia el aumento y la tecnificación del sector agrícola con los cuales se ha generado un aumento considerable en la producción del campo, trayendo como consecuencia un aumento en los residuos orgánicos, que traen tras su proceso de fermentación, la generación de lixiviados y gases de efecto invernadero como CH₄ y CO₂; causando así degradación de los suelos, de los cuerpos de aguas superficiales y subsuperficiales y afectación a la calidad del aire así como generación de malos olores y vectores biológicos. Otra de las problemáticas que presenta el campo colombiano es la falta de acceso energético debido a las largas distancias de los centros poblados más cercanos; una alternativa concerniente a la valorización de residuos sólidos puede ser implementado en aquellos sectores productivos del país donde se desarrollan prácticas agrícolas como principal fuente de sustento; en este caso, una alternativa viable sería la generación de gas metano a partir de un proceso de digestión anaerobia, donde los residuos sólidos orgánicos son transformados directamente en biogás y en un subproducto orgánico con gran capacidad fertilizante; de esta manera, se tiene fácil acceso a gas natural que puede ser empleado directamente en los hogares para alimentación así como para generación de energía eléctrica.

Según reportes de Gunaseelan (2004), el rendimiento de metano de los residuos cítricos va a depender de la especie de cítrico empleado, así como de las condiciones geográficas, ambientales, etc; es decir que los valores reportados en otras partes del mundo pueden variar considerablemente, por tal motivo es indispensable evaluar el potencial y rendimiento de especies cultivadas en Colombia para tener una idea de la capacidad de producción de biometano y el potencial energético que puede alcanzar el país a partir del aprovechamiento de la biomasa.

1.3 Justificación

La digestión anaerobia ofrece una solución para el tratamiento de los residuos con alto contenido orgánico, permitiendo de esta manera la disminución del impacto ambiental del proceso productivo; recientes investigaciones han demostrado que los residuos de cítricos son un recurso potencialmente valioso que pueden desarrollarse en productos de alto valor como por ejemplo el metano (Martín et al. 2010); adicionalmente, proporciona oportunidades para utilizar el biogás en la generación de energía, en forma de electricidad, calor y combustible, brindando beneficios económicos y medioambientales adicionales (Breure, Lijzen, and Maring 2018).

La UE es el líder mundial en producción eléctrica de biogás, con más de 10 GW instalados y un número de 17,400 plantas de biogás, en comparación con la capacidad global de biogás de 15 GW en 2015. En la UE, el biogás entregó 127 TJ de calor y 61 TWh de electricidad en 2015; cerca del 50% del consumo total de biogás en Europa se destinó a la generación de calor. Europa es el principal productor mundial de biometano para uso como combustible de vehículo o para inyección en la red de gas natural. En 2015, 459 plantas produjeron 1.200 millones de m³ y 340 plantas se alimentaron de la red de gas, con una capacidad de 1,5 millones de m³. Alrededor de 697 estaciones de llenado de biometano aseguraron el uso de 160 millones de m³ de biometano como combustible de transporte en 2015 (Scarlat, 2018).

Un análisis de energía mostró que en una planta de procesamiento de cítricos que maneja 600 Mg por día de frutas, el biogás producido a partir de las corrientes de desechos es suficiente para satisfacer la demanda de electricidad y combustible y el exceso de electricidad generado a partir del biogás también puede venderse (Koppar and Pullammanappallil 2013). Adicionalmente se tiene que el biogás obtenido puede actualizarse a biometano e inyectarse en la red de gas natural o usarlo en vehículos de transporte, con la purificación adecuada para eliminar los gases traza, como el H₂S, el agua y el CO₂ (Scarlat, 2018).

De acuerdo a la estimación realizadas por la unidad de planeación minero energética (UPME), en el 2012 Colombia presentaba una producción de residuos agrícolas cercanos a 66.2 millones de toneladas/año con un potencial energético de 330350 TJ/año. Además, el uso de la biomasa para la generación de biogás mediante digestión anaerobia se estima en 54300 TJ/año, el cual podría cubrir el 15% de la oferta energética del país, en donde el aporte del sector agrícola sería del 39% (21147 TJ/año), principalmente a partir de desechos provenientes de las empresas azucareras y el sector cafetero (UPME, 2015).

Con el fin de realizar la transición hacia procesos productivos más sostenibles, el aprovechamiento de los residuos cítricos de la actividad agrícola es una buena oportunidad para generación de energía así como obtención de variados subproductos con alto valor agregado. A partir de la producción de cítricos, aproximadamente un tercio de los cítricos que se utiliza para el procesamiento, producen cerca de 50–60% de residuos orgánicos (Team Biogas 2016). La composición aproximada de los bioproductos obtenidos en las plantas de

procesamiento de cítricos incluye algunas grasas, azúcares libres (p. Ej., Glucosa, fructosa y sacarosa), ácidos orgánicos, polímeros de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa y pectina), enzimas (pectinesterasa, fosfatasa y peroxidasa), flavonoides, aceites esenciales (principalmente limoneno), y pigmentos (Karellas et al. 2010), la extracción de estos compuestos funcionales aumentará el valor de los productos de los desechos agrícolas (Inoue et al. 2010), esta gran variedad de productos pueden ser comercializados en diferentes mercados, aportando mayor valor agregado a los residuos de cítricos y contribuyendo de este modo a una economía circular.

Además de los beneficios económicos de la generación de energía y combustible, las plantas de digestión anaerobia proporcionan beneficios ambientales adicionales (por ejemplo, disminución de la contaminación del agua, el suelo y el aire, etc.) (Scarlat, Dallemand, and Fahl 2018).

1.3.1 Comparación en costos del biogás

El etanol y el biogás constituyen dos formas diferentes de energía. Los valores de energía del metano es de 36.64 MJ / Nm³, comparado con la gasolina y el etanol con 32 MJ / L y 21.2 MJ / L, respectivamente (Murphy and Power 2009). Por lo tanto, la energía total producida a partir de 100,000 toneladas de residuos cítricos en forma de etanol y biogás es igual a 6.26 millones de litros de gasolina. Comparando los costos de producción del biogás con otros combustibles como el etanol y la gasolina se tiene que la producción de biogás a partir de desechos cítricos es un proceso económicamente factible con un buen margen de ganancia dependiendo de la capacidad de la planta (Lohrasbi et al. 2010).

1.4 Referente teórico

1.4.1 Caracterización de cítricos

Los cítricos están constituidos principalmente por 80 a 85 % de agua y 12 a 15 % de sólidos totales. Prácticamente no contienen almidón y su contenido de proteínas y grasa es muy baja. Por su alto contenido en ácido cítrico y vitamina C, los limones y limas ácidas constituyen la materia prima para la extracción de estos productos y por su alto contenido de glándulas oleíferas, para la extracción de aceites esenciales que son utilizados para perfumería y otros usos farmacéuticos e industriales (Velázquez and Hevia. Julio T. 2000)

Universidad nacional mayor de San Marcos (1994), citado por Aquino (1995), reporta en la tabla de composición química de los alimentos los componentes del tangelo en g/100 g de porción comestible: agua 87,0 g, proteína 1,2g, carbohidratos 11,2 g.

Los residuos cítricos contienen 74.53% de carbohidratos, 7.68% de proteínas y 10.80% de grasas (Pourbafrani et al. 2010). El contenido de Limoneno del residuo cítrico es 3.68% del peso seco (Ahring, Sandberg, and Angelidaki 1995). Algunos datos obtenidos de Martín, (2018) muestra la composición química de la cáscara de naranja antes y después de ser sometida a pretratamiento, los resultados se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 1. Composición química del residuo de cáscara de naranja (Martín et al. 2010)

Parámetro	Residuo de cáscara de naranja	Cáscara de naranja pretratada
pH	3,42 ± 0,02	3,41 ± 0,02
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	1950 ± 27	445 ± 12
Acidéz volatil (mg Acido acético/L)	pH < 3,5	pH < 3,5
DQO (mg O ₂ /g base seca)	1085 ± 55	1177 ± 46
Humedad (%)	79,83 ± 0,08	91,15 ± 0,01
Sólidos totales (%)	20,17 ± 0,08	8,85 ± 0,01
Sólidos minerales %	0,87 ± 0,03	0,26 ± 0,05
Sólidos volátiles %	19,31 ± 0,11	8,58 ± 0,05
Nitrógeno total (mg/g base seca)	12,24 ± 0,56	11,14 ± 0,04
N-Kjeldahl (mg/g base seca)	11,67 ± 0,24	9,66 ± 0,56
N-NH ₃	1,68 ± 0,19	1,88 ± 0,20

1.4.2 Digestión Anaerobia

Los cuatro procesos principales en la digestión anaerobia son la hidrólisis, la fermentación, la acetogénesis y la metanogénesis. Los microorganismos se agrupan en relación con el proceso del que son responsables, es decir, como organismos hidrolíticos, fermentativos, acetogénicos

y metanogénicos con dependencia mutua entre sí, particularmente por razones energéticas. La naturaleza de la cadena alimentaria anaeróbica es tal que cada uno de estos grupos se basa en el anterior para su sustrato y en el siguiente para evitar la acumulación de sus productos (Gerardi 2003b). Las bacterias hidrolíticas desempeñan un papel en el primer paso al degradar las materias orgánicas complejas en sus monómeros, como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos. La hidrólisis es el primer paso y, a menudo, el que limita la (Morgenroth, Kommedal, and Harremoës 2002).

La acidogénesis o fermentación es la descomposición de los materiales o monómeros solubles producidos por el proceso de hidrólisis: los principales productos de estos organismos incluyen AGV, alcoholes e hidrógeno. En general, se considera que la fermentación es el más rápido de los pasos individuales en el proceso anaeróbico (Vavilin et al. 2008).

Los metanógenos se basan en los fermentadores / acetógenos para proporcionarles los sustratos requeridos de carbonato, hidrógeno y ácido acético, mientras que los acetógenos se basan en los metanógenos para eliminar el hidrógeno, ya que las reacciones químicas que realizan solo son termodinámicamente favorables a concentraciones muy bajas de hidrógeno. (Chynoweth et al. 1993). Los productos de la acidogénesis se convierten posteriormente en ácido acético mediante acetógenos y finalmente se convirtieron en metano mediante metanógeno. Durante mucho tiempo se ha sugerido que el VFA es uno de los parámetros más importantes para describir el proceso de digestión anaeróbica (Chen, Cheng, and Creamer 2008).

La ausencia de oxígeno molecular libre es importante para el cultivo de organismos anaeróbicos e incluso la presencia de ciertos iones que pueden aceptar electrones (nitrito, sulfato) pueden desalentar la producción de metano ya que permiten que ocurran más reacciones de oxidación termodinámicamente favorables (Gerardi 2003).

El proceso de digestión anaerobia es el proceso mediante el cual se realiza la degradación de la materia orgánica para la obtención de biogás desarrollado durante la prueba de PBM.

1.4.3 Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

Con el fin de determinar el potencial que posee un residuo para generar biogás se realizan ensayos de potencial bioquímico de metano. El PBM ha demostrado ser un método relativamente simple y confiable para comparar la extensión y la tasa de conversión del metano (Chynoweth et al. 1993).

Existen varios métodos por lotes para medir los potenciales de metano de los residuos. El enfoque básico es incubar una pequeña cantidad de los desechos con un inóculo anaerobio y medir la generación de metano, generalmente mediante mediciones simultáneas del volumen de gas y la composición del gas.

Sin embargo, los enfoques técnicos en términos de pretratamiento de la muestra, inóculo, técnica de medición de gases e incubación varían significativamente entre los métodos publicados. Algunas de estas diferencias se originan a partir del propósito de medir el potencial de metano y del tipo de muestras de desechos medidas.

Según Strömberg, 2014, el valor de BMP se presenta como el volumen de metano por gramo de material orgánico, a menudo definido por SV, DQO o DBO. Para fines de estandarización, el valor de BMP debe presentarse utilizando el mismo tipo de unidad y, como la mayoría de las pruebas de BMP actuales se realizan con un material bastante sólido, los SV deben considerarse como la opción más adecuada. Para evitar la inhibición debida a la acumulación de productos intermedios, es importante tener una relación óptima entre el inóculo y el sustrato.

El volumen generalmente se expresa en condiciones de presión estándar (1 atm) y temperatura (0 C) (condiciones STP). La temperatura y la presión en el punto de medición siempre se deben registrar para convertir el volumen de gas medido en gas seco en condiciones estándar (273.15 K, 101.33 kPa; (Holliger et al. 2016; Strömberg, Nistor, and Liu 2014)). También se utilizan otras variaciones para expresar el potencial de metano. De la misma manera, el potencial de biogás puede definirse como la producción de biogás definitiva.

Los grandes volúmenes de inoculación aseguran una alta actividad microbiana, bajo riesgo de sobrecarga y bajo riesgo de inhibición (Angelidaki and Sanders 2004).

Además del nivel de biodegradabilidad del material, los resultados de una prueba de BMP también proporcionan información valiosa sobre la velocidad del proceso de degradación que, junto con el valor de BMP, ofrece información clave en la selección del tipo de sustrato más adecuado para el proceso. Además, también puede proporcionar un conocimiento valioso en la elección de la velocidad de carga orgánica y el tiempo de retención de una planta a gran escala (Chynoweth et al. 1993).

1.4.3.1 Montaje experimental

Comúnmente se utilizan dos configuraciones experimentales diferentes para establecer la biodegradabilidad y la tasa de hidrólisis de los sustratos de partículas, es decir, los experimentos por lotes (Veeken and Hamelers 1999) o continuos (Miron, Lier, and Lettinga 2000). En el enfoque por lotes, el sustrato seleccionado (residuo) se incuba en frascos cerrados a una temperatura específica con una cantidad de inóculo metanogénico. Después de la incubación, el grado de degradación del sustrato se evalúa en intervalos de tiempo preestablecidos para determinar la velocidad y la biodegradación o hidrólisis final. Los controles con solo el inóculo agregado se incluyen para dar cuenta del biogás producido a partir de la materia orgánica contenida en el inóculo. La configuración continua utiliza reactores de tanque agitado continuo (CSTR) que funcionan a una temperatura específica y con diferentes tiempos de retención hidráulica (TRH). Los análisis se realizan a partir del efluente una vez que se ha establecido el estado estacionario (Angelidaki and Sanders 2004). Se debe tener en cuenta que las pruebas de lotes solo muestran la producción potencial (máxima) de CH₄ para un determinado sustrato / cultivo. En un proceso continuo de digestión anaeróbica, estos resultados pueden diferir significativamente. Por lo tanto, se espera que en

los procesos continuos los rendimientos reales sean más bajos debido a una menor degradación de la materia orgánica y a la existencia de elementos traza (Karellas et al. 2010)

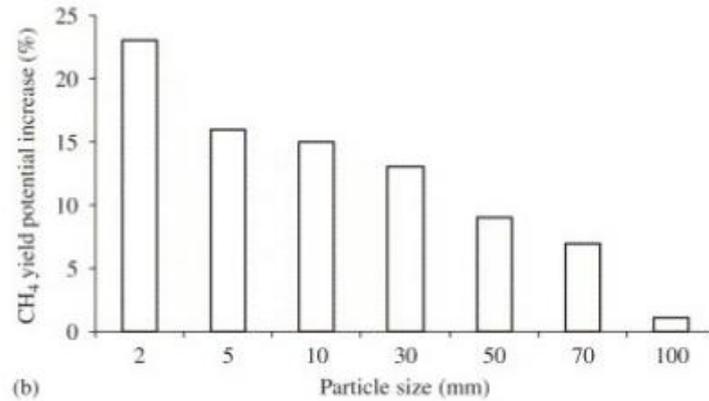
1.4.3.1.1 Sustrato

Un factor importante para la hidrólisis es el estado físico y la estructura del sustrato y su accesibilidad para las enzimas hidrolíticas. El tamaño de las partículas y la composición de las partículas determinan la velocidad y el mecanismo de hidrólisis y degradación en un sistema (Morgenroth et al. 2002). Por lo tanto, es obvio que la velocidad de hidrólisis de los sustratos en partículas es más baja que la de los polímeros disueltos, ya que con los primeros, sólo una parte del sustrato es accesible a las enzimas (Angelidaki and Sanders 2004). De esta manera el tamaño de la partícula del sustrato definirá la velocidad con la que los microorganismos degradan dicho compuesto.

Las muestras de sustrato a analizar deben ser lo más representativas posible del sustrato a digerir a escala completa.

1.4.3.1.1.1 Tamaño de partícula

Teóricamente, el tamaño de partícula de la alimentación puede tener un gran impacto en la velocidad de reacción, ya que esto está directamente relacionado con el área de superficie disponible. Esta hipótesis se ha demostrado en varios estudios experimentales. Kayhanian y Hardy (1994) informaron que la velocidad de reacción es inversamente proporcional al tamaño de partícula promedio. En un estudio posterior sobre varios tratamientos mecánicos en varios materiales orgánicos, se encontró que la reducción en el tamaño de las partículas podría mejorar la producción de biogás hasta en un 18% y reducir el tiempo de digestión requerido hasta en un 59% (Palmowski y Muller 2 000). Mshandete et al (2006) encontraron resultados similares en los que una reducción en el tamaño de la fibra de sisal a 2 mm aumentó la producción de metano en un 23% en relación con los residuos no tratados como puede evidenciarse en la Figura 4 (Walker, Banks, and Heaven 2008).



Gráfica 1. Efecto del tamaño de partícula en el rendimiento de metano de la fibra de sisal (Mshandete et al. 2006)

Según Holliger (2013), todas las partículas deben tener como máximo 10 mm en cualquier dimensión (diámetro, longitud). Para lograr esto, la muestra de sustrato se puede tamizar para separar la fracción > 10 mm, que se puede moler y volver a mezclar con la fracción <10 mm.

Chynoweth et al. (1993) desarrollaron ensayos con el fin de encontrar un tamaño de partícula por debajo del cual los cambios en la cinética de conversión serían mínimos, el procedimiento estándar para procesar muestras fue molerlas pasándolas a través de un Molino Urschell equipado con una cabeza de 0.8 mm. Como hipótesis sostenían que los tamaños de partículas en el rango de milímetro a centímetro no expondrían significativamente más área de superficie y, por lo tanto, exhibirían una cinética similar. Las pruebas con sorgo, caña y la fracción orgánica de desechos sólidos (principalmente papel) confirmaron esta hipótesis. Por lo tanto, procesaron muestras para estudios de BMP a través de una cabeza de 1,6 mm. Finalmente plantearon que la reducción del tamaño de partícula por debajo de cierto tamaño (aproximadamente 1 mm) comenzará a aumentar la cinética de una manera no reproducible, es decir, introducirá una variable incontrolable en la interpretación de las constantes cinéticas del ensayo. Tamaños más pequeños tampoco serían económicos de obtener en una base comercial.

1.4.3.1.1.2 Almacenamiento

Las muestras del sustrato deben usarse tan frescas como sea posible. Al igual que las muestras de inóculo, pueden almacenarse a 4°C, pero en general solo por 5 días. Para periodos más largo de almacenamiento pueden ser congeladas y almacenadas a -20°C. Para descongelar las muestras almacenadas a -20°C, deben trasladarse a una temperatura de 4°C seguido de un cuidadoso aumento de la temperatura hasta alcanzar la temperatura ambiente antes de ser empleada en la prueba de PBM.

1.4.3.1.2 Inóculo

Es de gran importancia encontrar un inóculo adecuado que contenga los microorganismos necesarios para que se lleve a cabo el proceso de degradación. El lodo digerido es a menudo el inóculo usado (Owen et al. 1979).

El inóculo debe tomarse de un digestor anaeróbico activo que digiera materia orgánica compleja y se encuentre en estado estable en el momento del muestreo. Esto proporciona una comunidad microbiana altamente diversa capaz de digerir una gran variedad de moléculas orgánicas. La temperatura del ensayo de BMP, mesofílica o termofílica, suele ser la misma que la temperatura de funcionamiento del digestor de inóculo. El lodo anaeróbico de los digestores de plantas de tratamiento de aguas residuales y el digerido de plantas agrícolas que tratan el estiércol como materia prima principal se utilizan con frecuencia y pueden recomendarse como fuentes de inóculo. Una alternativa al uso de un inóculo específico es mezclar inóculos de diferentes fuentes para aumentar la diversidad de la comunidad microbiana. No es necesario que el inóculo se adapte específicamente a los sustratos a probar, pero si hay acceso a dicho inóculo, puede acortar la duración de la prueba (Holliger et al. 2016).

Según reporta Holliger (2016) los valores indicativos para un inóculo de buena calidad son:

pH: >7 y <8.5

AGV: <1.0 gCH₃COOH / L

NH₄: < 2.5 gN-NH₄ / L

Alcalinidad: > 3 gCaCO₃ / L

Otro factor importante para la digestión anaerobia es la cantidad de inóculo agregado. A menudo se desea una baja cantidad de inóculo, ya que el inóculo también contribuye a la formación del producto (biogás) y, por lo tanto, puede confundir los resultados si la producción de biogás a partir del inóculo es relativamente alta en comparación con el compuesto (o desperdicio) bajo investigación. Por otro lado, una cantidad relativamente pequeña de inóculo puede provocar una sobrecarga del proceso con la acidificación como resultado (Angelidaki and Sanders 2004).

Por último, el inóculo debe tener una baja producción de metano endógeno, lo que significa que debe haber poco sustrato residual que aún pueda transformarse en biogás.

La producción de metano endógeno (espacios en blanco) debe ser inferior al 20% de la producción total de metano (inóculo y sustrato) y, si es demasiado alta, podría ser necesaria una incubación previa para agotar el sustrato fácilmente biodegradable en el inóculo. Para los sustratos que tienen PBM bastante bajos, puede ser difícil cumplir con esta recomendación. En tales casos, el inóculo debe tener una producción de metano endógeno muy baja (~ 50 NLCH₄ kgVS⁻¹) y uno debe aplicar ISR bajos (Holliger et al. 2016).

La fracción de inóculo en la mezcla de prueba general es normalmente más alta que la parte del sustrato agregado. Por lo tanto, el inóculo no solo es la fuente de la comunidad microbiana necesaria para la digestión anaeróbica, sino también una fuente importante de macro y micronutrientes, oligoelementos y vitaminas, así como la capacidad de amortiguación del pH. Sin embargo, para evitar cualquier deficiencia, se pueden agregar oligoelementos y vitaminas mediante la adición de soluciones. Si la alcalinidad del inóculo está por debajo de 3 gCaCO₃ / L, se debe agregar bicarbonato de sodio para alcanzar al menos 3 gCaCO₃ / L. No se debe utilizar tampón fosfato (Holliger et al. 2016).

1.4.3.1.3 Medio

Un factor importante asociado con el inóculo es el medio, el cual puede ser adicionado al inóculo durante la prueba de biodegradabilidad. El medio consta de varios minerales y no contiene ninguna cantidad significativa de carbono orgánico. Puede ser adicionado como fuente de nutrientes, micronutrientes, factores de crecimiento, vitaminas y metales traza necesarios para el crecimiento de los microorganismos.

Los medios sintéticos se utilizan en los casos en que la falta de componentes importantes para el crecimiento podría limitar el crecimiento microbiano. Los componentes importantes necesarios para el crecimiento se muestran en la Tabla 2. (Angelidaki and Sanders 2004)

Tabla 2. Componentes necesarios en un medio sintético (Angelidaki, 2004)

Componente	Función en la célula	Forma química suministrada en medios sintéticos.
Nitrógeno (N)	Siguiente más abundante después del carbono. Elemento principal en ácidos nucleicos y aminoácidos.	NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , N ₂ , KNO ₃
Fósforo (P)	Para ácidos nucleicos y fosfolípidos.	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Azufre (S)	En los aminoácidos cisteína y metionina, vitaminas como la tiamina, biotina y ácido lipoico, coenzimas A	Na ₂ SO ₄ , KH ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, cisteína, etc
Potasio (K)	Utilizado por varias enzimas diferentes	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnesio (Mg)	Estabiliza los ribosomas, membranas celulares y ácidos nucleicos.	MgCl ₂ , MgSO ₄
Sodio (Na)	Necesario para muchas enzimas.	NaCl
Calcio (Ca)	Ayuda a estabilizar la pared celular bacteriana y es importante para estabilizar las endosporas.	CaCl ₂
Hierro (Fe)	Presente en los citocromos.	FeCl ₃ , FeSO ₄ , Hierro quelado diverso (en complejos con EDTA etc.)

Micronutrientes	Estos suelen ser necesarios para enzimas específicas.	Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, V, Zn
Factores de crecimiento	Requerido en pequeñas cantidades.	Vitaminas, aminoácidos (esenciales), purinas, pirimidinas.

1.4.3.1.4 Agua

El agua adicionada a los reactore es esencial para la fermentación de metano, ya que los nutrientes de los microorganismos deben disolverse en agua antes de que puedan ser asimilados (Forster and Wase, 1989). El contenido de humedad no solo ayuda al movimiento bacteriano, sino que también se sabe que influye en la limitación del transporte de masas en una lecho con alto contenido de sólidos y el equilibrio entre la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) por bacterias acidogénicas y la conversión de ácidos en metano por bacterias metanogénicas (Ghosh, 1985).

1.4.3.1.5 Temperatura

La temperatura afecta la supervivencia y el crecimiento de microorganismos y también influye en sus actividades metabólicas. En general, las temperaturas más altas que no matan a los microorganismos resultan en actividades metabólicas más altas. La temperatura es la variable más importante para controlar la tasa de metabolismo microbiano en el ambiente anaeróbico (Westermann et al. 1989). A temperaturas mayores, la tasa de hidrólisis parece continuar aumentando hasta las temperaturas termofílicas, aunque es cuestionable si la tasa mejorada sería suficiente para compensar el aumento de los costos de calefacción a gran escala (Torres-Castillo, R., Llabrés-Luengo, P., & Mata-Alvarez 1995) .

La digestión anaeróbica se aplica en tres rangos de temperatura diferentes, es decir, el mesofílico (25–40°C), el termofílico (45–60°C) y el psicofílico (<20°C). En general, las tasas de proceso generales se duplican por cada aumento de 1°C en la temperatura de operación hasta una temperatura óptima de 60°C. Existe un debate considerable frente a la temperatura óptima de digestión anaerobia debido a que no existe una única respuesta ya que ésta depende de factores como el tipo de digestor empleado y el tipo del sustrato con el cual se alimenta el sistema (Harmon et al. 1993).

El trabajo experimental realizado por Cavinato, 2010 en el cual evaluaba los beneficios de una temperatura del proceso adecuada (55 °C) en comparación a un rango termofílico "reducido" (47°C) ha señalado que la producción de biogás mejora de 0,45 a 0,62 m³ / kg VS operando en condiciones termofílicas adecuadas. Por otra parte, también el contenido de metano fue mayor: del 52% al 61% , empleando residuos orgánicos provenientes de poscosecha y desechos de ganado. Sin embargo, las variantes de digestión anaeróbica empleadas para procesar cultivos o sustratos con mayor contenido de N, generalmente funcionan en el rango mesofílico debido al aumento de la evolución de NH₃ en temperaturas

más altas, ya que éste actúa como un inhibidor del proceso de metanogénesis. (Karellas et al. 2010)

1.4.3.1.6 Incubación

Los recipientes de prueba de BMP deben incorporarse en un ambiente de temperatura controlada con variaciones máximas de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora o baño de agua), y el enfriamiento durante la medición de gas debe evitarse tanto como sea posible. Las temperaturas típicas de incubación de las pruebas son mesofílicas y termofílicas a 37°C y 55°C , respectivamente. (Holliger et al. 2016).

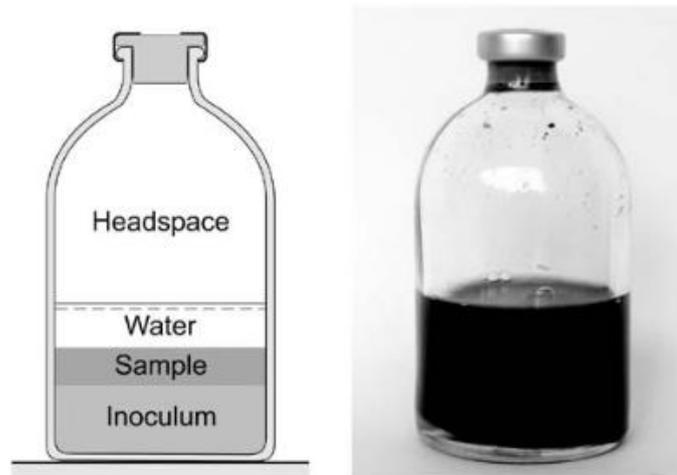


Figura 1. Montaje experimental para la biodegradación anaerobia empleado en la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU) para la prueba estándar de PBM (Angelidaki and Sanders 2004)

1.4.3.1.7 pH

El pH influye en la actividad de las enzimas hidrolíticas y los microorganismos que están activos dentro de ciertos rangos de pH, generalmente estrechos. El proceso de digestión anaeróbica ocurre en el intervalo de pH de 6.0–8.3. (Angelidaki and Ahrino 1994)

Si el pH de los residuos a analizar está fuera del rango óptimo, y si no hay suficiente capacidad de tampón, se inhibirá el proceso anaeróbico. Esto llevará a la subestimación del potencial de metano (Angelidaki and Sanders 2004).

1.4.3.1.8 Reactores

Los recipientes del reactor utilizados para las pruebas de PBM deben tener un volumen que se adapte a la homogeneidad del sustrato, el volumen esperado de gas producido y la sensibilidad de la técnica de medición de gas. Se pueden usar volúmenes más pequeños (~ 100 ml) para sustratos homogéneos, mientras que volúmenes más grandes (500 ml a 2.000 ml) son más adecuados para sustratos heterogéneos.

Los recipientes deben estar cerrados con septos de caucho butílico a prueba de gas que sean lo suficientemente gruesos para ser perforados varias veces con una aguja, especialmente en el caso de la medición manométrica de gases, o estar conectados al dispositivo de medición de gas a través de conectores y tuberías que no aseguren pérdidas de biogás producido. Antes de la incubación, se debe realizar una prueba de fugas para desechar las botellas con fugas. (Holliger et al. 2016).

1.4.3.1.9 Control positivo

Para la validación de los resultados de la prueba BMP, se deben llevar a cabo controles positivos. Éstos permiten la validación de la actividad del inóculo con un sustrato estándar y la comparan con su valor nominal bien conocido. El control positivo también permite validar el procedimiento de medición de gas.

1.4.3.1.10 Condiciones anaerobias

El lavado con N₂ puro se debe llevar a cabo con cuidado y solo se debe utilizar para reactores pequeños con espacio de cabeza. En la metodología descrita por Angelidaki (2004) se inyectó gas con una relación de N₂: CO₂ (80: 20) antes de agregar el inóculo y los desechos, posteriormente se sellaron con tapones de butilo y fueron cerrados con agrafes de aluminio.

1.4.3.2 Inhibición

Una amplia variedad de sustancias inhibitorias son la causa principal de la alteración o falla de los digestores anaeróbicos, especialmente en el caso de los digestores termófilos (Chen et al. 2008). Estos incluyen amoníaco, sulfuro, iones de metales ligeros, metales pesados y compuestos orgánicos tales como fenoles (Sierra-alvarez and Lettinga 1991), alcohol (Demirer et al. 2015), aldehídos (Kleerebezem and Lettinga 2002), éter y cetonas (Playne et al. 1983), y ácidos carboxílicos (Blum and Speece 2014) (Martín et al. 2010).

Además, durante el proceso anaeróbico, una gran parte del nitrógeno orgánico se transforma en amoníaco (NH₃-N). Este NH₃-N, aunque en su forma no ionizada es un inhibidor potencial de la degradación anaeróbica, está disponible para las plantas pero es potencialmente fitotóxico.

1.4.3.3 Métodos para determinación de la biodegradabilidad anaerobia

1.4.3.3.1 Métodos de medición de producción de biogás

La producción de biogás se mide como aumento de volumen bajo presión constante (métodos volumétricos), medición del aumento de presión en volumen constante (métodos manométricos), o medición de la formación de metano mediante cromatografía de gases. En las técnicas volumétricas se hace pasar el gas producido a través de una base de modo que cuando el CO₂ queda atrapado en la solución alcalina, entonces solo se determina el volumen de CH₄ (Holliger et al. 2016)

1.4.3.3.2 Solubilidad de los gases

La solubilidad de los componentes del gas en la solución de barrera de un dispositivo de medición después del procedimiento de desplazamiento del líquido es otro factor que podría influir en los resultados. Especialmente el dióxido de carbono es sensible a este fenómeno, ya que su solubilidad en agua a 25°C es aproximadamente 25 veces mayor en comparación con el metano. (Strömberg et al. 2014)

También se debe considerar el tipo de líquido utilizado (la "solución de barrera"), que se puede seleccionar para minimizar la solubilidad de los gases o para maximizar la solubilidad de un componente. En el primer caso, algunas fuentes simplemente recomiendan el uso de agua acidificada, donde otras sugieren agregar salinidad (Kida et al., 2001), y otras más una combinación de acidez y salinidad (Soto, Méndez, and Lema 1993). En el segundo caso, se han utilizado soluciones alcalinas para absorber dióxido de carbono cuando se requiere la cuantificación del metano solamente. Aunque las condiciones alcalinas reducen la pérdida de gases por difusión a través de la solución de barrera, no pueden evitarlo por completo (Strömberg et al. 2014)

Soto et al. (1993) compararon los sistemas de desplazamiento de líquidos con los métodos de cromatografía de gases y concluyeron que estos últimos son más precisos para producciones con bajo contenido de metano.

Otro método de determinación de la biodegradabilidad son métodos basados en el agotamiento del sustrato, por lo general requieren un análisis más complejo. El agotamiento del sustrato puede determinarse como un parámetro agrupado (sólidos volátiles (SSV), demanda química de oxígeno (DQO), carbono orgánico disuelto (COD), etc.) o directamente análisis del compuesto que se está utilizando como sustrato (Rozzi y Remigi, 2001).

1.5 Antecedentes

1.5.1 Investigaciones sobre la influencia de los aceites esenciales en la prueba de PBM

Forgacs (2012) realizó pruebas de PBM empleando la metodología descrita por Hansen et al a partir de residuos cítricos con pretratamiento por explosión de vapor para eliminar los aceites esenciales y sin pretratamiento en modo de operación por lotes. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando botellas de vidrio de 2 L con un volumen de reacción de 600 mL en condiciones termofílicas (55 ° C). Cada botella se alimentó con una cantidad apropiada de sustrato correspondiente a una concentración final de sólidos volátiles (VS) de 0,75% y la posterior adición de agua destilada hasta un volumen de 200 mL. Finalmente, se agregaron 400 mL de inóculo a cada botella y luego los reactores se sellaron con tapones de septo de goma y aluminio, y se lavaron con un gas que contenía 80% de N₂ y 20% de CO₂ para asegurar las condiciones anaeróbicas. Los blancos que contienen agua que reemplaza al sustrato también se utilizaron para determinar la producción de metano de los propios inóculos. A lo largo de los períodos experimentales, las botellas fueron incubadas a 55 ° C, y agitados una vez al día en la incubadora. Se aplicó un tratamiento previo de explosión de vapor para mejorar la digestibilidad anaeróbica de los residuos cítricos, lo que resultó en una disminución de la concentración inicial de limoneno en un 94.3%. en la serie de digestión anaerobia por lotes, la producción de metano de residuos cítricos pretratada se comparó con la de las muestras no tratadas. Se obtuvo un potencial de metano de $0,537 \pm 0,001 \text{ m}^3/\text{kg VS}$ (sólidos volátiles) durante la siguiente prueba de lote producida, correspondiente a un aumento del 426% en comparación con el $0.102 \pm 0.021 \text{ m}^3/\text{kg VS}$ de las muestras no tratadas. Los efectos a largo plazo del tratamiento se investigaron más a fondo mediante un proceso de co-digestión semicontinua. Una producción de metano de $0.555 \pm 0.0159 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kg VS}/\text{día}$ se logró cuando los residuos tratados (correspondientes al 30% de la carga de VS) se co-digirieron con residuos sólidos municipales. (Forgács et al. 2012)

1.5.2 Investigaciones sobre la prueba de PBM en condiciones termofílicas

Kaparaju 2006 realizó una serie de ensayos bajo condiciones termofílicas con el fin de determinar el PBM de residuos cítricos, obteniendo para los ensayos en modo de operación batch una producción de $49 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kg}$ Un ajuste al valor de pH fue necesario debido a los bajos niveles iniciales de pH del residuo cítrico, lo cual resultó ser un factor crucial para la operación estable del digestor ya que el procedimiento mostraba una tendencia a ser inhibido debido a la acumulación de AGV y una disminución en el pH de digestión. Los ensayos por lotes se realizaron por triplicado de viales de vidrio de 120 ml. De la capacidad total, la fase líquida constituyó 60 ml con inóculo (10 ml), tampón de NaHCO₃ (6 ml, 3 g de NaHCO₃ l-1), agua destilada (42 ml) y residuos de naranja (1.65 g, 3 gVS l-1) . En todos los ensayos, el pH se ajustó a 6,9-7,4 (hidróxido de sodio 1 M (NaOH) y ácido clorhídrico 1 M, HCl). A continuación, los viales se lavaron con nitrógeno / dióxido de carbono (mezcla de N₂ / CO₂; 80/20%) y se sellaron inmediatamente con tapones de goma de butilo y rizos de aluminio.

Finalmente, se inyectó sulfuro de sodio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$; 0.25 g l⁻¹) para eliminar cualquier oxígeno residual. Los viales se incubaron en cultivos estáticos a 55 ± 1 ° C y se mezclaron agitándolos una vez al día. Se emplearon blancos con agua destilada para medir la producción del inóculo. Adicionalmente se llevaron a cabo pruebas en modo semi-continuo así como un postratamiento con digestión aerobia del material digerido. El estudio reveló que la digestión termofílica de los desechos industriales de naranja podría producir un rendimiento final de metano de hasta 0.5 a 0.6 m³kg/V_S. Una tonelada de residuos de naranja (aprox. 10% V_S) produciría de 50 a 60 m³ de metano. Los desechos de naranja se pueden digerir en una OLR que varía de 2.8 a 4.2 kgV_S m⁻³d⁻¹ (HRT de 40 y 28d respectivamente). Sin embargo, a mayor OLR (5,6 kgV_S m⁻³d⁻¹; HRT de 20 d), se observó una alta tendencia a inhibir la metanogénesis, aparentemente debido a la acumulación de AGV y la subsiguiente disminución del pH. Fue necesario un ajuste del pH (de un valor inicial de 3.2 toques. 8) para el desperdicio de pH bajo y se encontró que era un factor crucial para la operación de un digestor estable. Alrededor del 60 al 70% del N en los residuos fue amonificado. Se encontró que el postratamiento aeróbico reduce el amoníaco y los AGV, especialmente el acetato, en el digestato en menor medida. (Kaparaju and Rintala 2006)

1.5.3 Investigaciones sobre el PBM en reactores discontinuos y semicontinuos.

Wikandari, 2015 desarrolló la determinación del potencial de biogás de las cáscaras de naranja en la digestión por lotes. Los procesos de digestión se realizaron en reactores discontinuos y semicontinuos. En el experimento para seleccionar el solvente, la digestión se realizó con diferentes concentración de sólidos volátiles (VS) que oscila entre el 0,5 y el 2%. En el estudio de optimización, 2% de VS de las cáscaras sin tratar y pretratadas se colocaron en una botella de vidrio de 120 ml. El volumen total de la mezcla fue de 30 ml, incluyendo 20 ml de inóculo, y el resto fue de cáscara de naranja y agua. Luego, los reactores se lavaron con una mezcla de gas que contenía 80% de N₂ y 20% de CO₂ durante 2 minutos. Los reactores se incubaron a 55 ° C durante 33 días. Los reactores que contenían sólo agua e inóculo se utilizaron como blanco. Los experimentos se realizaron por triplicado. Al final de las digestiones, se midió el pH de los digestatos. Los pretratamientos se llevaron a cabo con piel de naranja homogeneizada o troceada a 20-40 ° C con residuos de piel de naranja y una relación de hexano (p / v) que osciló entre 1: 2 y 1: 12 durante 10 a 300 min. Para las digestiones semicontinuas, los desechos tratados previamente se seleccionaron en función de los resultados obtenidos de la digestión por lotes. A pesar de que el rendimiento teórico de metano es de 0,45 Nm³ / kg V_S, los rendimientos de metano de 0,061 y 0,113 Nm³ / kg V_S se obtuvieron en este experimento a partir de cáscaras cortadas y homogeneizadas, respectivamente. El tratamiento previo de los desechos aumentó la producción de metano hasta el valor de 0.076–0.217 m³ / kg V_S correspondiente al 25–350% de mejora. Esto indica la fuerte inhibición por el limoneno. La mejor condición de tratamiento previo basada en el rendimiento de metano obtenido para mayor producción de biogás fue para la cáscara de naranja cortada y una proporción de hexano de 12: 1 a 20 ° C durante 10 minutos, lo que corresponde a un aumento de más del triple de la producción de biogás de 0,061 a 0,217 m³

de metano / kg VS. En el presente estudio, el limoneno se recuperó de la cáscara de naranja mediante un pretratamiento con un líquido olídico usando un solvente para extraer el limoneno. También se logró identificar que el residuo de hexano en la cáscara tuvo un impacto negativo en la producción de biogás, como lo demuestra la reducción del 28,6% del metano y la menor producción de metano de los residuos de cáscara de naranja pretratados en el sistema de digestión semicontinua en comparación con el de la cáscara sin tratar. (Wikandari et al. 2015)

1.5.4 Investigaciones sobre la influencia de la temperatura en la prueba de PBM

Martín, 2010, realizó una serie de ensayos con el fin de comparar la producción de metano en condiciones mesofílicas y termofílicas evaluando el efecto del pretratamiento de cáscara de naranja. Todos los experimentos se llevaron a cabo en modo de operación por lotes. La temperatura se mantuvo por medio de una camisa termostática que contiene glicerol a 37 ° C para experimentos mesofílicos y 67 ° C para ensayos termofílicos. el montaje consiste en dos reactores continuos de tanque agitado de 3.5L con cuatro entradas para alimentación, ventilación del biogás, inyección del gas inerte (Nitrógeno) para mantener las condiciones anaerobias y para remover el efluente. El contenido del reactor se agitó usando una pala de agitación conectada a un motor. El volumen de metano producido durante el proceso se midió utilizando depósitos Boyle-Mariotte de 2 L conectados a cada reactor. Para eliminar el CO₂ producido durante el proceso, se conectaron burbujeadores bien cerrados que contenían una solución de NaOH (6 N) entre los dos elementos. El volumen de metano desplazó un volumen igual de agua medible desde el reservorio. Se encontró que el coeficiente de rendimiento de metano en condiciones estándar de temperatura y presión (STP) era mayor en condiciones termófilas (332 ± 17 mLSTPCH₄ / g de VS agregadas) que a temperatura mesofílica (230 ± 16 mLSTPCH₄ / g añadido VS). Además, la tasa media fue considerablemente diferente en ambos casos, siendo más alta en condiciones termofílicas (13.28 mLSTPCH₄ / g agregados VS h) que a la temperatura más baja (1.92 mLSTPCH₄ / g agregados VS h). Esto justifica la elección de la temperatura termofílica como la temperatura más adecuada para el tratamiento anaeróbico de los desechos de piel de naranja a escala piloto, dado que el volumen del reactor es menor; incluso teniendo en cuenta los mayores costos de calefacción en estas condiciones. Tras un pretratamiento para extraer D-limoneno, se evaluó la digestión anaerobia de los desechos de cáscara de naranja a escala de laboratorio y piloto en condiciones mesofílicas y termofílicas. La eliminación de D-limoneno del 70% se logró con el pretratamiento. Los resultados mostraron la conveniencia de las condiciones termofílicas para el tratamiento de estos desechos, ya que la tasa de producción de metano y la biodegradabilidad fueron mayores que a la temperatura mesofílica. A escala piloto, se empleó un reactor termofílico de tanque de agitación continua que funciona en modo semicontinuo. La OLR se encontró en el rango de 1.20–3.67 kg DQO / m³ d; El rango más apropiado para trabajar en condiciones estables a SRT de 25 d. Se encontró que el coeficiente de rendimiento de metano era de 0,27 a 0,29 LSTPCH₄ / g de DQO agregada y la biodegradabilidad 84-90% en estas condiciones. Sin embargo, la acidificación se produjo en el OLR más alto.

1.5.5 Investigaciones sobre el PBM de diferentes residuos orgánicos

Gunaseelan (2004) desarrolló ensayos de PBM de 54 muestras de desechos de frutas y vegetales y ocho muestras de biomasa estándar para comparar las extensiones y las tasas de conversión a metano. Todas las muestras, excepto la celulosa, se secaron a 60 ° C, se molieron en una licuadora para pasarlas a través de una malla de 2 mm y se almacenaron a 4 ° C hasta su uso. El inóculo se obtuvo de un Reactor de tanque agitado continuo mesófilo de 5 l (35 ° C). La composición del medio nutriente básico fue la descrita por Owen et al. Se agregaron 5 g de sólidos totales (TS) de cada muestra a una botella de suero de 135 ml junto con 75 ml de la solución de inóculo de nutrientes y semillas.

Los rendimientos de metano acumulados de los cítricos mostraron una variabilidad en los rendimientos y tasas de metano entre las variedades y también entre las diferentes partes de fruta de una sola variedad. En la naranja de piel apretada, los rendimientos de los prensados fueron mayores que en las cáscaras, mientras que en la mandarina de piel suelta, las cáscaras y los frutos podridos mostraron rendimientos similares pero superiores a los de las prensas.

Los rendimientos máximos de metano (B₀) y la cinética de los desechos de fruta variaron de 0.18 a 0: 732 l/g VS agregados y 0.016 a 0: 122 d⁻¹, respectivamente, y el de desechos vegetales varió de 0.19 a 0: 4l/g VS agregado y 0.053 a 0: 125 d⁻¹, respectivamente. Todas las muestras de frutas y desechos vegetales probados dieron curvas monofásicas de producción de metano. Diferentes partes de la fruta dentro de la misma variedad mostraron diferentes rendimientos en naranja, granada, uva y sapota. La producción y más del 90% del rendimiento de metano se lograron entre 40 y 50 días de fermentación. Se compararon varias partes del fruto para una misma variedad, entre ellas incluía tres tipos de cítricos: la naranja *Citrus sinensis* para la cual obtuvo una producción de metano de 0.455 (0.018) l g⁻¹ VS_{adicionado}, el mandarino *Citrus reticulata* con un valor de producción de metano igual a 0.486 (0.014) l g⁻¹ VS_{adicionado} y para *Citrus limón* 0.473 (0.011) l g⁻¹ VS_{adicionado}. (Gunaseelan 2004)

1.5.6 Otras investigaciones sobre la influencia de diferentes parámetros sobre el PBM

Mizuki (1990) desarrolló ensayos para determinar el efecto inhibitorio de los aceites de las cáscaras de naranja, específicamente de la especie *C. Unshu*, la especie más consumida en Japón, de dichos ensayos se obtuvo que la adición de 0 o 60 / ~ 1 de aceite de cáscara / litro por día a las digestiones no mostró ningún efecto inhibitorio sobre la producción de metano y la cantidad máxima de aceite de cáscara permisible para una práctica fermentación de metano fue de aproximadamente 65 micro l / litro por día. (Mizuki et al. 1990)

Según Angelidaki (1994), los ácidos grasos volátiles no solo son un indicador del desequilibrio del proceso, sino que también pueden inhibir el crecimiento de

microorganismos en ciertos niveles. Por ejemplo, la fermentación de glucosa se inhibe en concentraciones de AGV superiores a 4 g / L . (Angelidaki and Ahrino 1994)

En ensayos desarrollados por Lay se evaluó la relación entre el contenido de humedad y el tiempo de fase de retraso para cada descomposición de diferentes residuos orgánicos, lo que indica que el tiempo de la fase de retraso disminuyó con el aumento del contenido de humedad (Lay et al. 1997). Adicionalmente, se ha informado que el período de la fase de retraso también se ve influenciado por las concentraciones iniciales de microorganismos y sustancias que estimulan el crecimiento de la bacteria (Lankford et al. 1966), ya que se utilizó la misma cantidad de lodo y el mismo tamaño de las muestras, y el cambio en el contenido de humedad causó el cambio en el tiempo de la fase de retraso para el mismo tipo de residuo sólido.

Liu, 2008; Lay, 1997 indican que la acumulación de AGV ha demostrado ser un fenómeno típico de los digestores estresados. Además, la acumulación de AGV produce una disminución del pH. El pH óptimo para la digestión anaeróbica es entre 7 y 8 (). Si el pH en los reactores cae por debajo de pH 6.2, la metanogénesis se inhibirá y, como consecuencia, el proceso probablemente fracasará debido a la alta sensibilidad de las bacterias formadoras de metano. (Liu et al. 2008)

1.6 Hipótesis

¿La digestión anaerobia de desechos cítricos es una alternativa energéticamente viable?

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Evaluar la producción de metano de residuos cítricos empleando procesos de digestión anaerobia.

1.7.2 Objetivos específicos

Evaluar el potencial bioquímico de metano de tres tipos de residuos cítricos puros, en condiciones de operación por lotes.

Evaluar la mezcla óptima de sustratos de residuos cítricos para mayor generación de metano.

2. Capítulo II

2.1 Metodología general

2.1.1 Especies de cítricos seleccionados

Fueron seleccionados tres tipos de híbridos de cítricos: Naranja Tangelo (*Citrus hibridus* (*reticulata* x *paradisi*)); mandarina Oneco y lima ácida Tahití (*Citrus* × *latifolia*). Para preparar el sustrato se utiliza un molino tradicional y un procesador de alimentos, el sustrato seco pasa a través de un tamiz de 2 mm con el fin de garantizar tamaño de partícula óptimo para el proceso de digestión; para la etapa I del proceso se adicionó un pequeño volumen de agua con el fin de obtener una consistencia similar a una pasta. Para la etapa II se trabajó en base seca.

2.1.2 Técnicas analíticas



Figura 2. Medición de muestra de los reactores para pruebas finales de sólidos de la etapa experimental II.

La prueba de alcalinidad del inóculo por potenciometría para alcalinidades mayores a 100 mg/L , los sólidos totales y sólidos volátiles (ST y SV) fueron determinados de acuerdo a los

métodos estándar (APHA, 2005). La medición de pH se realizó empleando un potenciómetro Thermo Scientific Orion star. La demanda química de oxígeno (DQO) se determinó empleando los kits de HACH, a partir de una serie de diluciones descritas a continuación:

Dilución para prueba inicial de DQO del sustrato seco: Pesar 5 g de sustrato y adicionarlo a un balón de 100 mL, aforar con agua destilada. Agitar solución durante 2 horas. Centrifugar solución durante 20 minutos. Realizar filtración del sobrenadante empleando un filtro de fibra de vidrio de 24 mm. Adicionar 1 mL de la muestra filtrada en un balón de 5 mL y aforar con agua destilada.

Dilución para prueba final de DQO y NH₄ de los reactores: Pesar 5 g de sustrato y adicionarlo a un balón de 100 mL, aforar con agua destilada. Agitar solución durante 2 horas. Centrifugar solución durante 20 minutos. Realizar filtración del sobrenadante empleando un filtro de fibra de vidrio de 24 mm. Adicionar 1 mL de la muestra filtrada en un balón de 25 mL y aforar con agua destilada.

A continuación adicionar 2 mL de la dilución en el tubo de prueba de DQO de HACH. Llevar a digerir durante 2 h a una temperatura de 150°C. Dejar enfriar la prueba. Medir en el espectrofotómetro HACH con el programa 435 a una longitud de onda de 160 nm.

La prueba de nitrógeno amoniacal NH₄ que se realizó al final del proceso de digestión se desarrolló empleando los kits de HACH, empleando la misma dilución descrita final de DQO; posteriormente, adicionar 0,1 mL de la dilución al tubo de prueba. Añadir una almohadilla de Salicilato. Añadir una almohadilla de Cianurato. Cerrar tubo y agitar. Reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Medir en el espectrofotómetro HACH con el programa 343.

La aclimatación del lodo se realizó durante dos semanas manteniendo el lodo a una temperatura de 37°C y agitación constante, con el fin de obtener un inóculo endógeno que no representara producción de biogás significativa durante la prueba de digestión. La producción de metano a partir del inóculo (blanco negativo) se restó de la producción de metano de las muestras de desechos. Por lo tanto, el resultado representa solo la producción de metano a partir de los residuos y no del inóculo. En producciones de gas muy bajas, la incertidumbre sobre los resultados aumenta, porque la diferencia entre las muestras de desechos y las muestras de control puede no ser significativa. Si el potencial de metano es bajo, se debe aumentar la proporción de la muestra de desecho con el inóculo.

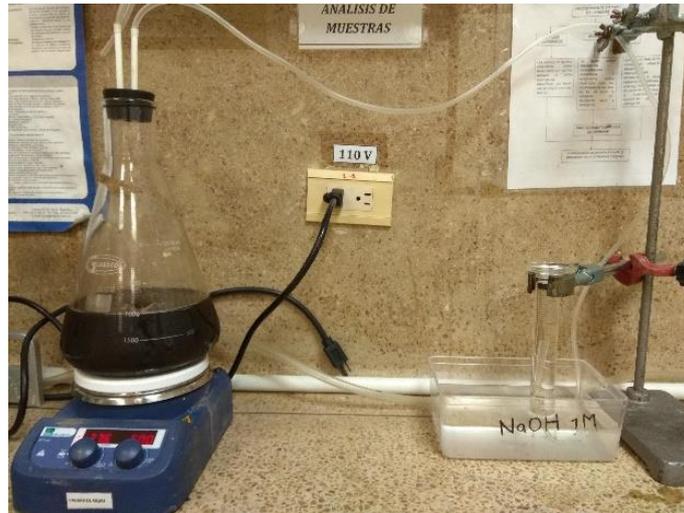


Figura 3. Aclimatación del inóculo.

La medición de metano producido se realizó mediante el método volumétrico de probeta invertida. Al perforar el tapón de goma, el biogás pasa hacia un recipiente por una jeringa parcialmente sumergida en una solución 2 M de NaOH, el cual se encuentra conectado por una manguera hacia la probeta invertida en un recipiente con agua donde puede medirse el volumen desplazado por el metano. Para la etapa I se empleó una modificación pasando el biogás directamente del reactor a un recipiente con la probeta invertida en la solución barrera de NaOH en lugar de agua.



Figura 4. Medición de gas en la etapa experimental I mediante el método de probeta invertida



Figura 5. Montaje de probeta invertida para medición de metano producido en la etapa experimental II.

Se realizó la medición de la composición del gas generado, para lo cual se empleó el equipo analizador de gases referencia Gasboard gas Analyzer RS232, suministrado por la Universidad Nacional, permitiendo conocer la composición del biogás generado por el sistema, obteniendo los porcentajes para CH_4 , CO_2 , H_2 , así como el potencial calórico. Para ello se conectó una aguja con una llave de tres vías a una jeringa con la cual se extraía el gas de los reactores y en la cual se medía el volumen generado de gas, que era luego inyectado en el equipo para su posterior análisis.



Figura 6. Analizador de gases Gasboard gas Analyzer RS232.

2.1.3 Montaje de potencial Bioquímico de Metano

Para determinar la producción de biogás de los residuos cítricos se desarrollaron dos pruebas de PBM: la etapa I se realizó con el fin de determinar la producción de tres tipos de residuos cítricos y la etapa II para determinar la mezcla óptima de estos residuos para mayor producción de metano.

2.1.3.1 Etapa I: Determinación del PBM de sustratos cítricos puros

Para el primer montaje se evaluaron los sustratos de cítrico de limón, mandarina y naranja por separado, empleando botellas serológicas de 120 mL, trabajando con una relación sustrato / inóculo (X0/S0) igual a 0.5, adicionando 541,6 mg de sustrato cítrico, 8 mL de inóculo y 350 mg de CaCO₃ con el fin de aportar capacidad buffer al sistema y que no disminuya el pH durante el periodo de digestión, por último se generó vacío en el medio con el fin de garantizar condiciones anaerobias; se sellaron con tapón de goma y agrafe metálico. Se empleó un blanco endógeno y se llevó a cabo por duplicado. Los reactores fueron incubados en una incubadora con agitación orbital a una temperatura de 35°C. La prueba tuvo una duración de 21 días.



Figura 7. Reactores etapa experimental I.

La medición de metano se realizó mediante probeta invertida en una solución 2 M de NaOH. Al perforar el tapón de goma el gas pasaba a través de la solución buffer hacia la probeta donde podía medirse la cantidad de volumen desplazado de solución por el metano.

2.1.3.2 Etapa II: Identificación de la mezcla óptima de sustratos cítricos para prueba de PBM

Para el segundo montaje de PBM se pretendía determinar la mezcla de sustratos óptima para mayor producción de metano, para lo cual se empleó un diseño experimental de mezclas manteniendo una relación de 2 g SVT/g SVT sustrato, las cantidades adicionadas se evidencian en la Tabla 4. Se emplearon botellas serológicas de 120 mL y se adicionaron soluciones enriquecidas con el fin de aportar nutrientes y minerales al medio, se adicionó una solución de NaOH al 2M para neutralizar el pH y finalmente se completaron los 80 mL del medio con agua destilada; se inyectó nitrógeno gaseoso durante 1 minuto con el fin de garantizar condiciones anaerobias, se cerraron la botellas con tapón de goma y se sellaron con sello metálico, posteriormente fueron incubadas a 37°C en una incubadora con agitador orbital. La prueba tuvo una duración de 37 días.



Figura 8. Reactores anaerobios de la etapa experimental II.

Tabla 3. Preparación de medios de cultivo para cada reactor.

REACTOR	INÓCULO (g)	SUSTRATO			SLN A (mL)	SLN B (mL)	SLN C (mL)	SLN D (mL)	NaOH 2 M (mL)
		N	L	M					
BN	5,3	-	-	-	0,8	0,16	-	8	0,3
BP	5,3	-	-	-	0,8	0,16	8	8	0,3
1 (0,0,1)	5,3	-	-	1,783	0,8	0,16	-	8	0,3
2 (0,1/2,1/2)	5,3	-	0,744	0,8916	0,8	0,16	-	8	0,3
3 (0,1,0)	5,3	-	1,488	-	0,8	0,16	-	8	0,3
4 (1/2,1/2,0)	5,3	0,7927	0,744	-	0,8	0,16	-	8	0,3
5 (1,0,0)	5,3	1,585	-	-	0,8	0,16	-	8	0,3
6 (1/2,0,1/2)	5,3	0,7927	-	0,8916	0,8	0,16	-	8	0,3
7 (1/3,1/3,1/3)	5,3	0,5152	0,4836	0,5795	0,8	0,16	-	8	0,3



Figura 9. Etapas experimentales I y II de la prueba de PBM.

REACTORES ANAEROBIOS
MEDIO DE CULTIVO

- H₂O 63 mL
- NaOH 2M 0,2 mL
- Medio básico anaerobio
SIn A 0,8 mL
SIn B 0,16 mL
SIn C 8 mL (Blanco glucosa)
SIn D 8 mL
- Sustrato 1,5 g
- Inóculo 5,3 g

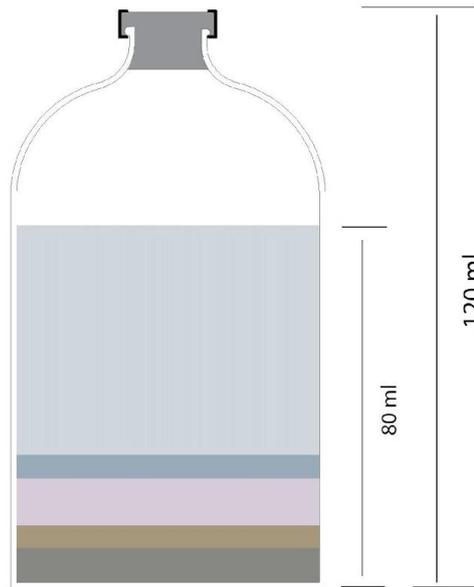


Figura 10. Preparación de medio de cultivo para reactores anaerobios en la etapa II.

2.1.3.2.1 Diseño experimental

La evaluación de la mezcla óptima de los tres residuos de cítrico se llevó a cabo empleando el diseño experimental con mezclas basado en un diseño simplex con centroide $2q-1$ sin restricciones. El diseño considera tres componentes ($q=3$), asociados a la fracción de desecho de mandarina, naranja y limón empleado en la mezcla como sustrato; las relaciones de cada componente se muestra en la figura 2.

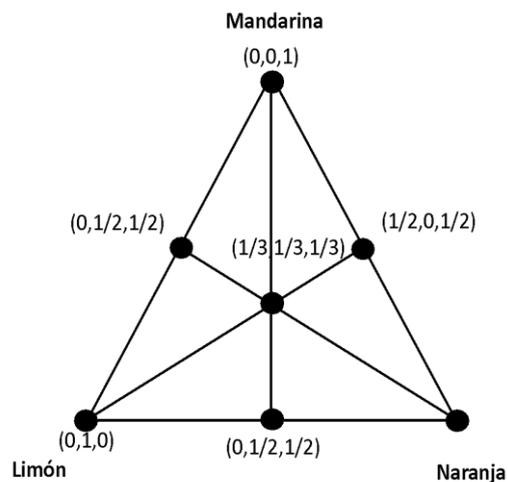


Figura 11. Diseño experimental simplex con centroide para los tres componentes cítricos a digerir.

La gráfica muestra una situación en la que los tres componentes, en este caso naranja, limón y mandarina pueden variar entre 0 y 1. Cada vértice de la región de la mezcla corresponde a un componente puro. Las líneas centrales simbolizan el eje principal de cada componente, y en su intersección común se encuentra el centroide global $\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3}$ de cada componente. (Eriksson et al. 1998)

Los diseños de experimentos con mezclas distribuyen adecuadamente las mezclas en la región experimental, la cual se representa con figuras geométricas de $q-1$ componentes, cuando los componentes de la mezcla pueden variar entre 0 y 1. Así para dos componentes la región experimental es un segmento de recta, para tres un triángulo, para cuatro un tetraedro y para más de cuatro un hipertetraedro. El rasgo característico de una mezcla es que la suma de todos sus componentes se suma al 100%. Esto significa que estos componentes, factores de mezcla, no pueden manipularse de forma completamente independiente entre sí, y que sus proporciones deben estar entre 0 y 1. (Eriksson, 1998)

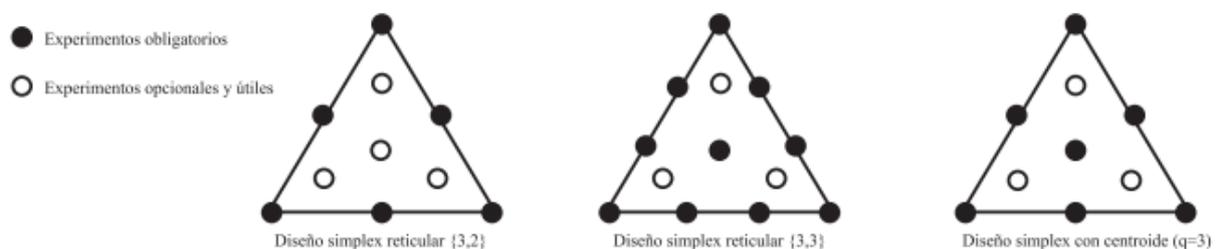


Figura 12. Ejemplos de diseños de mezclas para tres componentes (Eriksson, 1998)

Los dos tipos básicos de diseño son el simplex reticular y simplex con centroide. El diseño simplex con centroide se aplica cuando se tienen pocos componentes y consiste en 2^{q-1} puntos definidos de la siguiente forma: las mezclas puras, todos los puntos medios de las aristas definidas por cada dos vértices, los centroides de las caras definidas por cada tres vértices y así hasta obtener el centroide global (ver Fig. 2).

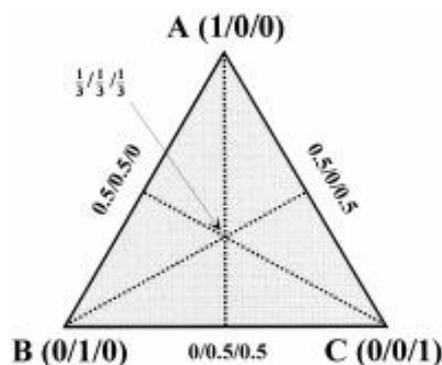


Figura 13. Diseño de mezcla en forma de s3mplex para una mezcla de tres componentes.

Después de recolectar las observaciones definidas en el plan experimental, es necesario ajustarlas a un modelo estadístico para investigar el efecto de los componentes sobre la respuesta (Ortega et al. 2015).

2.1.3.2.2 Modelo de predicción de la cinética de crecimiento

Una vez se tenga modelada la respuesta, el investigador puede predecirla en cualquier formulación posible dentro de la región experimental utilizada para ajustar el modelo; encontrando así, la composición de la mezcla que corresponda a un perfil de respuesta óptima. También puede cuantificar la influencia que tienen los diferentes componentes sobre la respuesta, tanto en forma individual como en su acción conjunta con otros componentes, en cuyo caso, en función de su signo se determinará si existe sinergismo o antagonismo entre los componentes (Ortega et al. 2015).

La naturaleza variable del inóculo y la heterogeneidad de los residuos hacen que sea importante utilizar procedimientos de control en las líneas descritas para garantizar la reproducibilidad y repetibilidad (Hansen et al. 2004).

2.1.3.2.3 Medio Sintético

Se prepararon cuatro soluciones minerales para el enriquecimiento de los medios:

Tabla 4. Descripción del medio anaerobio básico

Solución	Preparación del medio	Referencias
A (100X)	100 g NH ₄ Cl, 5g CaCl ₂ ·2H ₂ O, 10 g MgCl ₂ ·6H ₂ O, 10 g NaCl Aforar con H ₂ O.	Angelidaki y Sanders, 2004
B (500X)	200 g KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O Aforar con H ₂ O.	Angelidaki y Sanders, 2004
C (Glucosa a 10X)	Pesar 10.6 g de glucosa seca y diluirla en 200 mL de agua destilada (solución de 50 g DQO de glucosa/L, considerando que 1 g DQO de glucosa= 1.06 g de glucosa)	-
D (Bicarbonato a 10X)	Preparar una solución de bicarbonato 10 veces concentrada. La cantidad de bicarbonato a añadir, dependerá de la alcalinidad del inóculo. Considerar que se debe alcanzar una alcalinidad ≥ 3 g CaCO ₃ /L.	-

2.1.3.3 Concentración del sustrato

La concentración de sustrato de 2 g VS / 100 ml en los reactores es seleccionada la necesidad de usar una muestra grande para tener una buena representatividad y obtener una alta producción de gas fácil de medir y, en general, Por otro lado, para evitar volúmenes demasiado grandes y poco prácticos de reactores y producción de gas y mantener la solución diluida para evitar la inhibición de la acumulación de AGV y amoníaco (Hansen et al. 2004).

3. Capítulo III

3.1 Resultados y discusión

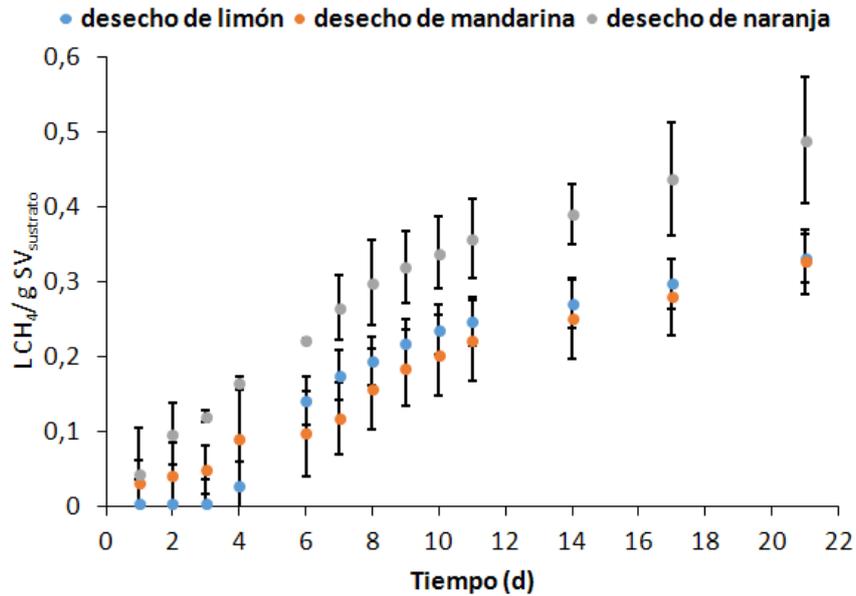
3.1.1 Etapa I: Determinación del PBM de sustratos cítricos puros

3.1.1.1 Medición de la producción de gas

El montaje tuvo una duración de 21 días en total. Las mediciones se realizaron durante los primeros 11 días consecutivos, a partir de allí se registraba la producción de gas cada 3 días debido a la disminución en la generación de biogás.

3.1.1.2 Producción máxima de metano ($LCH_4/gSVT_{\text{sustrato}}$)

En la gráfica 2 puede evidenciarse la producción de biogás durante los 21 días de prueba. El desecho de naranja muestra mayor producción de gas durante todo el periodo de prueba, seguido del desecho de limón y por último el desecho de mandarina; los valores se encuentran en la tabla 4.



Gráfica 2. Producción de metano mediante digestión anaerobia en la etapa I.

Tabla 5. Resultados obtenidos tras la digestión anaerobia en la etapa I.

Desecho	Producción máxima (LCH4/gSV)	Velocidad de producción de metano LCH4/gSV d	Periodo de latencia (d)
Limón	0,34 ± 0,02	0,07 ± 0,001	2,7 ± 0,2
Mandarina	0,33 ± 0,03	0,07 ± 0,005	2,3 ± 0,2
Naranja	0,46 ± 0,05	0,10 ± 0,03	0,2 ± 0,1

Para predecir el comportamiento del sistema y ajustar los datos de producción de biogás, se empleó el modelo de Gompertz, obteniéndose una diferencia en los resultados de ± 0.0102 , siguiendo el comportamiento esperado para los procesos de digestión anaerobia.

A partir del modelo de Gompertz fue posible obtener los valores correspondientes a velocidad de producción y de periodo de latencia para cada desecho empleado; el periodo de latencia es un periodo de retraso durante el cual los microorganismos se adaptan a las condiciones del medio así como al sustrato que van a digerir. Los valores correspondientes a producción de metano, velocidad de producción y periodo de latencia de los desechos de limón y mandarina son bastante similares. El desecho de limón y mandarina representan un 74% y 71% de producción de metano respectivamente en comparación al producido por el desecho de naranja, el cual presentó una velocidad de producción 30% mayor.

3.1.1.3 pH

Los valores de pH permanecieron prácticamente iguales, ya que se mantuvieron dentro del rango óptimo para el proceso de digestión, la naranja presentó una disminución del 0,9%.

La cinética de las diferentes etapas del proceso de digestión anaeróbica (hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis) y, finalmente, la forma de las curvas de producción de metano se controla principalmente por las características de biodegradabilidad del sustrato, la producción de fermentadores intermedios inhibitorios y el rendimiento de las poblaciones bacterianas metanogénicas (Labatut, Angenent, and Scott 2011). En este caso, la producción biogás sigue un crecimiento exponencial característico de los procesos de digestión, por lo cual puede descartarse alguna gran inhibición, los valores obtenidos alcanzaron el valor de PBM reportados para el caso de la naranja, el limón y la mandarina se encuentran por debajo de los valores encontrados en la literatura. La evaluación de estas curvas se puede ayudar de manera significativa mediante el uso de modelos matemáticos de la cinética de producción de metano, lo que permite conocer mejor el comportamiento del sustrato durante el proceso de digestión anaerobia (R. Borja, A. Martin, V. Alonso 1995).

Como se muestra en la tabla 4, la naranja presenta una mayor producción de metano así como mayor velocidad de producción; ésto se debe al valor obtenido para periodo de latencia donde se evidencia un valor muy bajo comparado con los desechos de limón y mandarina; es decir, al presentar un tiempo de latencia o retraso muy bajo habrá mayor producción y mayor velocidad de producción de metano.

Según la literatura se tiene que el potencial bioquímico de metano (PBM) de la cáscara de los cítricos se encuentra entre 0.46 y 0.64 $\text{m}^3_{\text{CH}_4}/\text{Kg}_{\text{SV}}$ (Gunaseelan 2004; Kaparaju and Rintala 2006; Koppa and Pullammanappallil 2013). A partir de ésta información se tiene que los resultados obtenidos no son los esperados y se encuentran por debajo de los valores registrados en la literatura, se puede evidenciar que la naranja ha sido el único sustrato en alcanzar el valor mínimo reportado, dichos resultados pueden deberse a la falta de pretratamiento para la eliminación de los aceites esenciales de los residuos cítricos que son fuertes inhibidores de la actividad metanogénica.

3.1.2 Etapa II: Identificación de la mezcla óptima de sustratos cítricos para la prueba de PBM

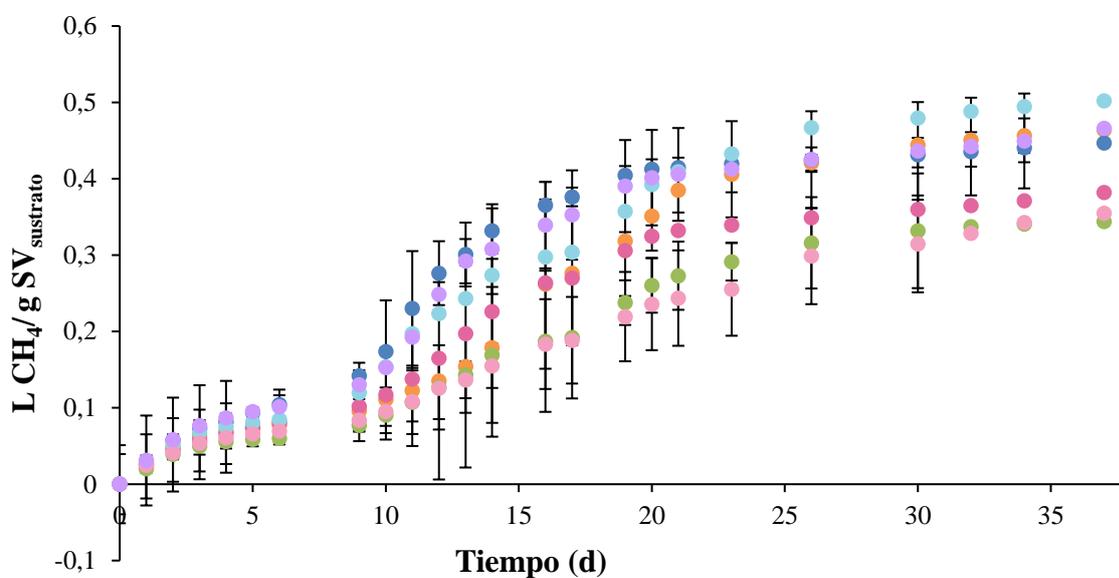
3.1.2.1 Caracterización del inóculo

Se realizó la prueba de alcalinidad para el inóculo obteniéndose un valor de 3306 mg/L, el valor de pH obtenido fue de 7,2. El valor de nitrógeno amoniacal obtenido es de 120 mg/L. Según Holliger (2013) éste es un inóculo de buena calidad, ya que ha reportado valores de pH >7 y <8.5 y valores de alcalinidad $>3\text{g/L}$ y valores de NH_4 : $< 2.5 \text{ gN-NH}_4 / \text{L}$

3.1.2.2 pH

El pH en los reactores permaneció en el rango óptimo para el proceso de digestión, con valores entre los 7,5 y 6.7 presentando una disminución total de aproximadamente 5.6% . La naranja presenta la mayor disminución de pH con un porcentaje del 6.7%, la mandarina y el limón presentan una disminución del 5,3% y 2,6% respectivamente.

3.1.2.3 Producción máxima de biogás ($LCH_4/gSVT_{\text{sustrato}}$)



REACTORES

- 1. Mandarina
- 2. Limón - Mandarina
- 3. Limón
- 4. Naranja - Limón
- 5. Naranja
- 6. Naranja - Mandarina
- 7. Limón - Mandarina - Naranja

Gráfica 3. Producción de metano mediante digestión anaerobia en la etapa experimental II.

Tabla 6. Producción de CH4 en la etapa experimental II .

Reactor	Desecho	Producción máxima (LCH4/gSV)
1	Mandarina	0,46 ± 0,01
2	Limón - Mandarina	0,38 ± 0,04
3	Limón	0,45 ± 0,03
4	Naranja - Limón	0,34 ± 0,04
5	Naranja	0,50 ± 0,06
6	Naranja - Mandarina	0,35 ± 0,05
7	Naranja - Limón - Mandarina	0,47 ± 0,06

Las mediciones realizadas empleando el equipo analizador de gases referencia Gasboard gas Analyzer RS232, permitieron conocer la composición del biogás generado por el sistema, obteniendo los porcentajes para CH4, CO2, H2, así como el potencial calórico. Los datos obtenidos se encuentran en la tabla 6.

Tabla 7. Composición del biogás producido.

Reactor	Vol (mL)	PC (MJ/m3)	% CO2	% CH4	% H2
2	42	21,61	44,544469	52,982646	2,472885033
3	20	-	73,83456	17,209954	8,955485454
4	38	17,52	49,994365	47,796687	2,208948495
5	22	10,3	61,762693	33,20104	5,036266594
6	40	18,58	48,576493	49,351944	2,071563089
3	36	25,35	35,132058	64,025501	0,842440802
7	32	22,25	38,427217	60,490798	1,081985499

Como se evidencia en las gráficas de producción de gas, la curva de frecuencia en la producción de biogás muestra un proceso de dos etapas, caracterizado por una curva con pasos de escalera. Según reporta Lijarza (2017) esto corresponde a muestras que se degradan con dificultad y tienen una curva de formación de gas retardada. La dificultad en la degradación puede deberse a una leve inhibición durante el proceso.

Según Hanaki (1981) múltiples picos en la producción de gas son bastante comunes en materias no homogéneas o en suspensión. Las bacterias hidrolíticas que descomponen los sustratos iniciales tienen diferentes tasas de degradación para diferentes compuestos. La ruta a través de la acidogénesis y la acetogénesis también difiere entre los compuestos. Los compuestos de ácidos grasos ricos en energía generalmente generan un impulso separado y posterior en la producción de metano que los desechos orgánicos. La relación de DQO y el rendimiento final de metano relacionado linealmente con el peso de sólidos volátiles es mayor en los sustratos que contienen compuestos de ácidos grasos. Las largas cadenas de

hidrocarburos generarán una gran cantidad de metano. Sin embargo, los ácidos grasos de cadena larga en los compuestos también pueden tener un efecto inhibitorio sobre la digestión. Los ácidos grasos de cadena larga siguen una vía de degradación conocida como beta oxidación (β -oxidación). Hanaki (1981) desarrolló ensayos para determinar la inhibición por presencia de ácidos grasos obteniendo que la producción neta acumulativa de ácido representó la β -oxidación de la mezcla de ácidos grasos, y estuvo acompañada por un período de retraso que se hizo más largo con el aumento de la concentración de la mezcla de ácidos grasos añadida. Este resultado significa que la mezcla de ácidos grasos fue inhibitoria de la β -oxidación de sí misma. Los diferentes intermedios en esta ruta de degradación cambian entre diferentes números de carbono y grados de insaturación, lo que puede llevar a diferentes picos en la producción de metano (Team Biogas, 2016).

Hansen (2004) desarrolló una serie de pruebas de digestión anaerobia, y para los casos en los cuales empleó aceite y grasas, se evidencia un comportamiento similar al presentar dos etapas de producción de biogás; la degradación de la grasa fue aparentemente inhibida, posiblemente por acumulación de intermedios (Springer-Verlag, Angelidaki, and Ahring 1992); lo cual dio lugar a curvas de producción de metano altamente variables. Tanto para la grasa como para el aceite se observó una fase de retraso significativo de dos semanas.

Por otro lado, en el caso de una materia prima que contiene una sustancia orgánica degradable (p. Ej., Lignina) que es difícil de descomponer anaeróbicamente, la producción de biogás en la etapa inicial del cultivo es pequeña y aumenta gradualmente con el lapso del período de cultivo. Y lo mismo retrasó la curva de producción acumulada de biogás ; también se presenta cuando hay un efecto de inhibición débil en la etapa inicial del cultivo o cuando la actividad de los microorganismos anaeróbicos pesados en el inóculo es muy baja y la fase de crecimiento retrasado se prolonga durante la etapa de crecimiento del microorganismo. Si la descomposición de la materia orgánica se desarrolla en dos etapas, se muestra la curva de biomasa de biogás de acumulación gradual. Este es el caso donde hay un grupo en el que las características de descomposición de la materia orgánica en la materia prima son diferentes o se produce una reacción de descomposición de las dos fases. (Kook-sik, 2011)

Shelton y Tiedje (1984) señalan que el análisis del potencial de producción de metano existente tiene limitaciones para cuantificar con precisión las emisiones de biogás debido a la disolución del dióxido de carbono. Chynoweth et al. Esto se evidencia en los altos volúmenes de metano obtenidos para los cuales se supone un valor de biogás tomando solo un porcentaje como metano. En la etapa experimental II no se evidenció dicho aumento de producción, generando valores dentro del rango reportado en el caso de la naranja, y valores inferiores para el limón y la mandarina con valores reportados en literatura de 0.46 y 0.64 $\text{m}^3_{\text{CH}_4}/\text{Kg}_{\text{SV}}$.

Esto puede deberse al hecho de que en la primer etapa experimental las mediciones del biogás se realizaban sumergiendo la probeta en la solución barrera de NaOH, por lo que el biogás salía del reactor y se desplazaba por toda la solución hasta ocupar el volumen medido en la probeta; para la etapa experimental II el gas pasaba por una jeringa parcialmente sumergida y salía rápidamente hacia la probeta con agua lo que puede indicar que el tiempo de contacto con la solución buffer debe ser un factor que afecta la cantidad de CO_2 retenido en el sistema. (Springer-Verlag et al. 1992)

3.1.2.3 Remoción de fracción orgánica

Tabla 8. Remoción de material orgánico representado como sólido volátil durante la digestión anaerobia en la etapa experimental II.

REACTOR	SV inicial (gSVT/gsustrato)	SV final (gSVT/gsustrato)	Remoción (gSVT/gsustrato)	% sólido
1 (0,0,1)	0,55207212	0,0032	0,54887212	99,4203656
2 (0,1/2,1/2)	0,552156997	0,003125	0,549031997	99,4340378
3 (0,1,0)	0,552197013	0,00455	0,547647013	99,1760187
4 (1/2,1/2,0)	0,552173953	0,173075	0,379098953	68,6557109
5 (1,0,0)	0,552049967	0,0032	0,548849967	99,4203423
6 (1/2,0,1/2)	0,552133937	0,00325	0,548883937	99,4113747
7 (1/3,1/3,1/3)	0,542131572	0,002825	0,539306572	99,4789088

Las pruebas para la determinación de sólidos volátiles antes y después del proceso de digestión anaerobia evidencian la eficiencia de remoción de carga orgánica, removiendo más del 99% de la fracción orgánica adicionada a cada reactor; también puede evidenciarse en la remoción de DQO, los resultados de la pruebas de caracterización iniciales y finales se encuentran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados pruebas finales de DQO etapa experimental II * Considerar dilución en 100 mL

Pruebas iniciales	SUSTRATO	DQO (mg/L)
	L (mg/L)	644
	N (mg/L)	859,333333
	M (mg/L)	650
Pruebas finales	REACTOR	
	1	61
	2	91
	3	34
	4	68
	5	39
	6	132,5
	7	55

3.1.2.4 Resultados N-NH₄⁺

Los resultados obtenidos para la prueba de nitrógeno amoniacal se encuentran en la tabla 10. La inhibición en los procesos de DA por NH₄ se presenta en concentraciones mayores a 1400 mg/L, por lo cual se descarta alguna inhibición para esta prueba.

Tabla 10. Resultados pruebas finales de N-NH₄⁺ etapa experimental II.

Reactor	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)
1	290
2	250
3	180
4	340
5	320
6	340
7	300

3.1.2.5 Inconvenientes durante el proceso

Durante el proceso de digestión de la segunda prueba se presentó un inconveniente el día 19 de prueba debido a la avería de la incubadora donde se encontraba el montaje por lo cual la temperatura disminuyó a temperatura ambiente de 20°C por lo menos durante 24 h, lo cual intervino en la actividad metabólica del sistema; sin embargo, según reporta Angelidaki (2004) el efecto de la temperatura en la digestión anaeróbica solo afecta teóricamente las tasas de degradación y no la biodegradabilidad definitiva de un componente. Sin embargo, las tasas de biodegradación pueden ser tan lentas que el potencial de biogás alcanzable parece ser menor que en condiciones óptimas.

Una vez se restauró la temperatura del sistema a 37°C se evidencia un aumento en la producción de biogás considerable, viéndose como la temperatura impulsó de nuevo el proceso; un aspecto inesperado fue el aumento en la producción de gas en los blancos positivos para glucosa donde se vio mayor producción de gas, así como para los blancos endógenos que no presentaban producción de gas durante los 8 días previos al incidente.

4. Capítulo IV

4.1 Conclusiones

- El sustrato de residuo cítrico con mayor PBM es el residuo de naranja con un rendimiento de metano de $0,50 \pm 0,06$ LCH₄/g_{SV}, seguido de la mezcla de los tres sustratos de cítrico con un valor de $0,47 \pm 0,06$ LCH₄/g_{SV}. Las mezclas de dos sustratos no resultaron ser convenientes debido a bajos niveles de producción de biogás, ninguno de éstos alcanzó los valores reportados de 0.46 LCH₄/g_{SV} para el PBM de los cítricos.
- Debido a que no se realizó el pretratamiento para la eliminación de los aceites esenciales de los cítricos, se cree que éstos pudieron intervenir durante el proceso de producción de biogás debido a las propiedades de sus componentes, impidiendo que en varios ensayos se alcanzara los valores mínimos de producción de metano reportados en la literatura; la inhibición por N-NH₄⁺ es descartada debido a los bajos valores obtenidos durante las pruebas.
- Las especies de cítricos cultivadas en Colombia que fueron estudiadas en esta investigación presentan un PBM menor al de las especies de cítricos reportadas en otras partes del mundo, debido a las variaciones geográficas que determinan las características de los frutos que varían para cada especie.
- Los residuos cítricos son un material valioso para el desarrollo de energías sostenibles, permitiendo la generación de biogás sin necesidad de realizar un pretratamiento previo del sustrato.
- La digestión anaerobia es un proceso exitoso en el tratamiento de desechos orgánicos, con alta eficiencia de remoción de carga orgánica de más del 99%, siendo ésta una alternativa ideal para hacer frente al impacto ambiental generado en rellenos sanitarios y vertederos, por el desperdicio de grandes volúmenes de residuos orgánicos.

4.2 Recomendaciones

Con el fin de elevar la producción final de metano es recomendable considerar las condiciones termófilas para el desarrollo de la prueba, ya que si bien representa mayor costo por consumo de energía, según sugieren Converti et al. (1999) las bacterias termofílicas pueden usar fuentes de carbono que no son biodegradables en condiciones mesofílicas, y la tasa de hidrólisis puede aumentar seis veces a temperatura termofílica. Por otro lado, los requerimientos de energía son más altos para la digestión termofílica (Zábranská et al. 2002), aunque en algunos casos este costo es compensado por un aumento en la biodegradación orgánica (Martín et al. 2010).

Si es posible, realizar la medición de biogás mediante cromatografía de gases, ya que de este modo los resultados son más precisos además que permite conocer todos los componentes del biogás generado durante el proceso.

Referencias

- Directiva 2008/98/EC del 19 de Noviembre de. n.d. *Directiva 2008/98/EC Del 19 de Noviembre de 2008.*
- Ahring, B. K., • M Sandberg, and • I Angelidaki. 1995. *Volatile Fatty Acids as Indicators of Process Imbalance in Anaerobic Digestors.* Vol. 43.
- Ángel Siles López, José, Qiang Li, and Ian P. Thompson. 2010. "Biorefinery of Waste Orange Peel." *Critical Reviews in Biotechnology* 30(1):63–69.
- Angelidaki, I. and B. K. Ahrino. 1994. *ANAEROBIC THERMOPHILIC DIGESTION OF MANURE AT DIFFERENT AMMONIA LOADS: EFFECT OF TEMPERATURE.* Vol. 28.
- Angelidaki, Irini and Wendy Sanders. 2004. "Assessment of the Anaerobic Biodegradability of Macropollutants." *Kluwer Academic Publishers.* 117–129.
- Bakkali, F., S. Averteck, D. Averteck, and M. Idaomar. 2008. "Biological Effects of Essential Oils - A Review." *Food and Chemical Toxicology* 46(2):446–75.
- Bisaria, Virendra S. and Tarun K. Ghose. 1981. "Biodegradation of Cellulosic Materials: Substrates, Microorganisms, Enzymes and Products." *Enzyme and Microbial Technology* 3(2):90–104.
- Blum, Diane J. W. and R. E. Speece. 2014. "Comparisons and Correlations All Use Subject to JSTOR Terms and Conditions A Database Environmental Interspecies of Chemical Bacteria to Toxicity in and Its Use and Correlations Comparisons." 63(3):198–207.
- Breure, A. M., J. P. A. Lijzen, and L. Maring. 2018. "Soil and Land Management in a Circular Economy." *Science of the Total Environment* 624:1025–30.

- Cavinato, C., F. Fatone, D. Bolzonella, and P. Pavan. 2010. "Thermophilic Anaerobic Co-Digestion of Cattle Manure with Agro-Wastes and Energy Crops: Comparison of Pilot and Full Scale Experiences." *Bioresource Technology* 101(2):545–50.
- Chen, Ye, Jay J. Cheng, and Kurt S. Creamer. 2008. "Inhibition of Anaerobic Digestion Process: A Review." *Bioresource Technology* 99(10):4044–64.
- Chynoweth, D. P., C. E. Turick, J. M. Owens, D. E. Jerger, and M. W. Peck. 1993. "Biochemical Methane Potential of Biomass and Waste Feedstocks." *Biomass and Bioenergy* 5(1):95–111.
- Clausen, E. C., O. C. Sitton, and J. L. Gaddy. 1979. "Biological Production of Methane from Energy Crops." *Biotechnology and Bioengineering* 21(7):1209–19.
- Demirer, Göksel N, Richard E. Speece, G N Demirer, and Richard E. Speece. 2015. "All Use Subject to JSTOR Terms and Conditions of Anaerobic Comparison Acrylic in Single-Biotransformation Completely Tank Reactor Systems Acid and Stirred." 72(1):84–89.
- Dhillon, Satvinder Singh, Rajwant Kaur Gill, Sikander Singh Gill, and Malkiat Singh. 2004. "Studies on the Utilization of Citrus Peel for Pectinase Production Using Fungus *Aspergillus Niger*." *International Journal of Environmental Studies* 61(2):199–210.
- Eriksson, Lennart, Erik Johansson, Conny Wikstrom"umetri, and Wikstrom"umetri. 1998. *Mixture Design-Design Generation, PLS Analysis, and Model Usage*. Vol. 43.
- Forgács, Gergely., Chalmers tekniska högskola., and Högskolan i Borås. 2012. *Biogas Production from Citrus Wastes and Chicken Feather : Pretreatment and Co-Digestion*. Chalmers University of Technology.
- Forgács, Gergely, Mohammad Pourbafrani, Claes Niklasson, Mohammad J. Taherzadeh, and Ilona Sárvári Hováth. 2012. "Methane Production from Citrus Wastes: Process Development and Cost Estimation." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 87(2):250–55.
- Gerardi, Michael H. 2003. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*.
- González-sánchez, María E., Sergio Pérez-fabiél, and Arnaldo Wong-villarreal. 2015. "Residuos Agroindustriales Con Potencial Para La." *Revista Argentina de Microbiología* 47(3):229–35.
- Gunaseelan, V. Nallathambi. 2004. "Biochemical Methane Potential of Fruits and Vegetable Solid Waste Feedstocks." *Biomass and Bioenergy* 26(4):389–99.
- Hansen, Trine L., Jens Ejbye Schmidt, Irimi Angelidaki, Emilia Marca, Jes La Cour Jansen, Hans Mosbæk, and Thomas H. Christensen. 2004. "Method for Determination of Methane Potentials of Solid Organic Waste." *Waste Management* 24(4):393–400.
- Harmon, J. L., S. A. Svoronos, G. Lyberatos, and D. Chynoweth. 1993. "Adaptive Temperature Optimization of Continuous Anaerobic Digesters." *Biomass and Bioenergy* 5(3–4):279–88.
- Holliger, Christof, Madalena Alves, Diana Andrade, Irimi Angelidaki, Sergi Astals, Urs Baier, Claire Bougrier, Pierre Buffière, Marta Carballa, Vinnie de Wilde, Florian Ebertseder, Belén Fernández, Elena Ficara, Ioannis Fotidis, Jean-Claude Frigon, Hélène Fruteau de Laclos, Dara S. M. Ghasimi, Gabrielle Hack, Mathias Hartel, Joern Heerenklage, Ilona Sarvari Horvath, Pavel Jenicek, Konrad Koch, Judith Krautwald, Javier Lizasoain, Jing Liu, Lona Mosberger, Mihaela Nistor, Hans Oechsner, João Vítor Oliveira, Mark Paterson, André Pauss, Sébastien Pommier, Isabella Porqueddu, Francisco Raposo, Thierry Ribeiro, Florian Rüsç Pfund, Sten Strömberg, Michel Torrijos, Miriam van Eekert, Jules van Lier, Harald Wedwitschka, and Isabella Wierinck. 2016. "Towards a Standardization of Biomethane Potential Tests." *Water Science and Technology* 74(11):2515–22.
- Inoue, Tsuyoshi, Shuntaro Tsubaki, Kazunori Ogawa, Kiyotaka Onishi, and Jun ichi Azuma.

2010. "Isolation of Hesperidin from Peels of Thinned Citrus Unshiu Fruits by Microwave-Assisted Extraction." *Food Chemistry* 123(2):542–47.
- Kaparaju, P. L. N. and J. A. Rintala. 2006. "Thermophilic Anaerobic Digestion of Industrial Orange Waste." *Environmental Technology* 27(6):623–33.
- Karellas, Sotirios, Ioannis Boukis, and Georgios Kontopoulos. 2010. "Development of an Investment Decision Tool for Biogas Production from Agricultural Waste." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(4):1273–82.
- Kleerebezem, R. and G. Lettinga. 2002. "Conversion and Toxicity Characteristics of Formaldehyde in Acetoclastic Methanogenic Sludge."
- Koppar, Abhay and Pratap Pullammanappallil. 2013. "Anaerobic Digestion of Peel Waste and Wastewater for on Site Energy Generation in a Citrus Processing Facility." *Energy* 60:62–68.
- Labatut, Rodrigo A., Largus T. Angenent, and Norman R. Scott. 2011. "Biochemical Methane Potential and Biodegradability of Complex Organic Substrates." *Bioresource Technology* 102(3):2255–64.
- Lankford, C. E., J. R. Walker, J. B. Reeves, N. H. Nabbut, B. R. Byers, and R. J. Jones. 1966. "Inoculum-Dependent Division Lag of Bacillus Cultures and Its Relation to an Endogenous Factor(s) ('schizokinen')." *Journal of Bacteriology* 91(3):1070–79.
- Lapuerta, Magín, Juan J. Hernández, Amparo Pazo, and Julio López. 2008. "Gasification and Co-Gasification of Biomass Wastes: Effect of the Biomass Origin and the Gasifier Operating Conditions." *Fuel Processing Technology* 89(9):828–37.
- Lay, J. J., Y. Y. Li, T. Noike, J. Endo, and S. Ishimoto. 1997. "Analysis of Environmental Factors Affecting Methane Production from High-Solids Organic Waste." Pp. 493–500 in *Water Science and Technology*. Vol. 36.
- Liu, Cun fang, Xing zhong Yuan, Guang ming Zeng, Wen wei Li, and Jing Li. 2008. "Prediction of Methane Yield at Optimum PH for Anaerobic Digestion of Organic Fraction of Municipal Solid Waste." *Bioresource Technology* 99(4):882–88.
- Lohrasbi, Mehdi, Mohammad Pourbafrani, Claes Niklasson, and Mohammad J. Taherzadeh. 2010. "Process Design and Economic Analysis of a Citrus Waste Biorefinery with Biofuels and Limonene as Products." *Bioresource Technology* 101(19):7382–88.
- Mamma, Diomi, Elisavet Kourtoglou, and Paul Christakopoulos. 2008. "Fungal Multienzyme Production on Industrial By-Products of the Citrus-Processing Industry." *Bioresource Technology* 99(7):2373–83.
- Martín, M. A., J. A. Siles, A. F. Chica, and A. Martín. 2010. "Biomethanization of Orange Peel Waste." *Bioresource Technology* 101(23):8993–99.
- Miron, Yehuda, Jules B. V. A. N. Lier, and Gatze Lettinga. 2000. "The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids , carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in cstr systems." 34(5).
- Mizuki, E., T. Akao, and T. Saruwatari. 1990. "Inhibitory Effect of Citrus Unshu Peel on Anaerobic Digestion." *Biological Wastes* 33(3):161–68.
- Morgenroth, E., R. Kommedal, and P. Harremoës. 2002. "Processes and Modeling of Hydrolysis of Particulate Organic Matter in Aerobic Wastewater Treatment - A Review." Pp. 25–40 in *Water Science and Technology*. Vol. 45.
- Moufida, Saïdani and Brahim Marzouk. 2003. "Biochemical Characterization of Blood Orange, Sweet Orange, Lemon, Bergamot and Bitter Orange." *Phytochemistry* 62(8):1283–89.
- Mshandete, Anthony, Lovisa Bjo, Amelia K. Kivaisi, M. S. T. Rubindamayugi, and Bo Mattiasson. 2006. "Effect of Particle Size on Biogas Yield from Sisal Fibre Waste." 31:2385–92.
- Murphy, J. D. and N. Power. 2009. "Technical and Economic Analysis of Biogas Production

- in Ireland Utilising Three Different Crop Rotations.” *Applied Energy* 86(1):25–36.
- Nallathambi Gunaseelan, V. 2009. “Biomass Estimates, Characteristics, Biochemical Methane Potential, Kinetics and Energy Flow from *Jatropha Curcus* on Dry Lands.” *Biomass and Bioenergy* 33(4):589–96.
- Orduz-Rodríguez J, Monroy J, Barrera S, Núñez V, Ligarreto G. 2012. “Caracterización Morfoagronómica y Molecular de Mandarina ‘Arrayana’ En El Piedemonte Del Meta (Colombia).” *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12.
- Orlando Orduz Rodríguez, Javier, Sandra Xiomara Pulido Castro, Beatriz Alvarado Pérez, Nelson Polanco Artunduaga, Edgar Fernando Almansa Manrique, Albert Julesmar Gutierrez, Carmen Rosa Salamanca Solís, José Orlando Arguello Tovar, Jorge Humberto Arguelles Cárdenas, and Meta Colombia. 2008. *Evaluación de La Citricultura Del Departamento Del Casanare y Recomendaciones Para Su Mejoramiento Productivo*. Villavicencio, Meta.
- Ortega, Diana Cristina, Moises Oswaldo Bustamante Rúa, Derly Faviana Gutiérrez-Rôa, and Alexander Alberto Correa-Espinal. 2015. “Mixture Experiments in Industrial Formulations.” *DYNA* 82(189):149–56.
- Oscar. n.d. *Acuerdo de competitividad de la cadena productiva de los citricos Corporación Colombia Internacional, CCI Secretaría Técnica*.
- Owen, W. F., D. C. Stuckev, J. B. Healv, L. Y. Young, and P. L. Mccagr. 1979. *Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity*. Vol. 13. Pergamon Press Lid.
- Playne, M. J., B. R. Smith, Biotechnology Group, and Csiro Division. 1983. “Toxicity of Organic Extraction Reagents to Anaerobic Bacteria.” XXV:1251–65.
- Pourbafrani, Mohammad, Gergely Forgács, Ilona Sárvári Horváth, Claes Niklasson, and Mohammad J. Taherzadeh. 2010. “Production of Biofuels, Limonene and Pectin from Citrus Wastes.” *Bioresource Technology* 101(11):4246–50.
- R. Borja, A. Martin, V. Alonso, I. Garcia and C. J. Banks. 1995. “Influence Of different Aerobic Pretreatments on the Kinetics of Anaerobic Digestion of Olive Mill Wastewater.” 29(2):489–95.
- Raeissi, S., S. Diaz, S. Espinosa, C. J. Peters, and E. A. Brignole. 2008. “Ethane as an Alternative Solvent for Supercritical Extraction of Orange Peel Oils.” *Journal of Supercritical Fluids* 45(3):306–13.
- Rodríguez Astudillo, José Luis. 2010. “Estudio de Almacenamiento Del Tangelo (*Citrus Reticulata* x *Citrus Paradisi*) En Refrigeración En La Provincia de Satipo.” Universidad Nacional del Centro de Perú.
- Ruiz, B. and X. Flotats. 2014. “Citrus Essential Oils and Their Influence on the Anaerobic Digestion Process: An Overview.” *Waste Management* 34(11):2063–79.
- Sánchez-Segado, S., L. J. Lozano, A. P. de los Ríos, F. J. Hernández-Fernández, C. Godínez, and D. Juan. 2012. “Process Design and Economic Analysis of a Hypothetical Bioethanol Production Plant Using Carob Pod as Feedstock.” *Bioresource Technology* 104:324–28.
- Scarlat, Nicolae, Jean François Dallemand, and Fernando Fahl. 2018. “Biogas: Developments and Perspectives in Europe.” *Renewable Energy* 129:457–72.
- Sierra-alvarez, Reyes and Gatzke Lettinga. 1991. “The Methanogenic Toxicity of Wastewater Lignins and Lignin Related Compounds.”
- Sorda, G., Y. Sunak, and R. Madlener. 2013. “An Agent-Based Spatial Simulation to Evaluate the Promotion of Electricity from Agricultural Biogas Plants in Germany.” *Ecological Economics* 89:43–60.
- Soto, M., R. Méndez, and J. M. Lema. 1993. “Methanogenic and Non-Methanogenic Activity Tests. Theoretical Basis and Experimental Set Up.” *Water Research* 27(8):1361–76.

- Springer-Verlag, ©, I. Angelidaki, and B. K. Ahring. 1992. *Applied Microbiology Biotechnology Effects of Free Long-Chain Fatty Acids on Thermophilic Anaerobic Digestion*. Vol. 37.
- Strömberg, Sten, Mihaela Nistor, and Jing Liu. 2014. "Towards Eliminating Systematic Errors Caused by the Experimental Conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) Tests." *Waste Management* 34(11):1939–48.
- Team Biogas. 2016. *Biomethane Potential Testing Report*.
- Tong, Xinggang, Laurence H. Smith, and Perry L. McCarty. 1990. "Methane Fermentation of Selected Lignocellulosic Materials." *Biomass* 21(4):239–55.
- Torres-Castillo, R., Llabrés-Luengo, P., & Mata-Alvarez, J. 1995. "Temperature Effect on Anaerobic Digestion of Bedding Straw in a One Phase System at Different Inoculum Concentration." 54:55–66.
- Tripodo, Maria Marcella, Francesco Lanuzza, Giuseppe Micali, Rosa Coppolino, and Fortunata Nucita. 2004. "Citrus Waste Recovery: A New Environmentally Friendly Procedure to Obtain Animal Feed." *Bioresource Technology* 91(2):111–15.
- Vavilin, V. A., B. Fernandez, J. Palatsi, and X. Flotats. 2008. "Hydrolysis Kinetics in Anaerobic Degradation of Particulate Organic Material: An Overview." *Waste Management* 28(6):939–51.
- Veeken, Adrie and Bert Hamelers. 1999. "Effect of Temperature on Hydrolysis Rates of Selected Biowaste Components." 69:249–54.
- Velázquez, Ciro J. and Hevia. Julio T. 2000. "Técnicas Mejoradas de Postcosecha, Procesamiento y Comercialización de Frutas." *Documentos Das FAO* 136.
- Viswanath, Prema, S. Sumithra Devi, and Krishna Nand. 1992. *Anaerobic Digestion of Fruit and Vegetable Processing Wastes for Biogas Production*. Vol. 40.
- Walker, Mark, Charles J. Banks, and Sonia Heaven. 2008. *The Development of a Mesh Bioreactor for the Anaerobic Digestion of Biodegradable Municipal Waste*.
- Westermann, Peter, Birgitte K. Ahring, Robert A. Mah, B. K. Westermann, R. A. Ahring, and Abstr Annu Mah. 1989. *Temperature Compensation in Methanosarcina Barkeri by Modulation of Hydrogen and Acetate Affinity Several Investigations Have Been Carried out with Enzymes of Poikilothermic Animals (9), and These Investigations Have Downloaded From*. Vol. 55.
- Wikandari, Rachma, Huong Nguyen, Ria Millati, Claes Niklasson, and Mohammad J. Taherzadeh. 2015. "Improvement of Biogas Production from Orange Peel Waste by Leaching of Limonene." *BioMed Research International* 2015.
- Wilkins, Mark R., Wilbur W. Widmer, Karel Grohmann, and Randall G. Cameron. 2007. "Hydrolysis of Grapefruit Peel Waste with Cellulase and Pectinase Enzymes." *Bioresource Technology* 98(8):1596–1601.
- Zábranská, Jana, M. Dohányos, P. Jeníček, P. Zaplatílková, and J. Kutil. 2002. "The Contribution of Thermophilic Anaerobic Digestion to the Stable Operation of Wastewater Sludge Treatment." Pp. 447–53 in *Water Science and Technology*. Vol. 46.