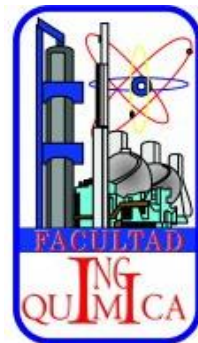




**Benemérita Universidad Autónoma
De Puebla**

Facultad De Ingeniería Química

Colegio De Ingeniería Química



Caracterización de los productos obtenidos a partir
de la biodigestión del lactosuero.

TESIS

Para obtener el título de:

Licenciado en Ingeniería Química

Paulette Anahí Espíndola Enríquez

Asesor:

Dr. Manuel Sánchez Cantú

Coasesor:

Mtra. Carla de la Cerna Hernández

Puebla, Puebla.

Septiembre 2016

**El éxito no está en vencer siempre
sino en no desanimarse nunca.**

Napoleón Bonaparte

Dedicatoria:

A mis padres Olguita y Manuel.

Agradecimientos:

A la Maestra Carla, por darme la oportunidad de hacer, imaginar, probar y desesperarme en sus laboratorios.

Al Doctor Manuel Sánchez por ser mi guía moral, por brindarme su tiempo y su conocimiento para llevar a cabo este proyecto.

A mis padres nuevamente, por enseñarme el valor del trabajo y a que no existen las palabras “no se puede”.

A mis hermanos Evelyn, Jhonatan, Emmanuel, María Fernanda y Jorge, por hacer de mi vida un escenario lleno de risas y amistad.

A Alan, porque me ha enseñado que la grandeza del corazón no la determina la edad.

A Karen, por ser mi compañera de viaje.

A los maestros que marcaron mi camino, en especial a Gérard que fue, es y será mi maestro en la vida.

A mis amigos más antiguos: Analí, Leo, Hernán, Arturo, Manuel y Lalo, porque la distancia no aminora el cariño y los años solo lo refuerzan.

A mis amigos y colegas de la universidad: Gaby, Erika, Ashley, Abelardo, Jonathan, Faby, Karen, Sady, Nadia y a todos los que brevemente dejaron una pequeña huella en mi, siempre importante, siempre de aprendizaje, a todos ellos por acompañarme en mis sueños y por estar siempre dispuestos a brindar su tiempo para escuchar.

A mis más recientes amigos de la universidad Arturo, Jonathan, Braulio, Ismael y Pepe, que hicieron de mis últimos días universitarios momentos de risa y que supieron escuchar atentamente mis locuras.

Un especial agradecimiento a Zul, que supo entrar inesperadamente a esta vida tan agitada y que me enseñó a descubrir las señales

Índice de contenido

Índice de tablas	7
Índice de figuras.....	7
Objetivos:	8
<i>Objetivo general:</i>	8
<i>Objetivos particulares:</i>	8
Hipótesis	8
Resumen.....	9
Introducción.....	10
Capítulo 1: Antecedentes	12
1.1 <i>Lactosuero.</i>	13
1.2 <i>Impacto ambiental del lactosuero.</i>	14
1.2.1 <i>Impacto del lactosuero en México</i>	16
1.3 <i>Usos y aplicaciones del lactosuero.</i>	18
1.3.1 <i>Fertilizantes y alimento de ganado.</i>	18
1.3.2 <i>Sector alimenticio.</i>	18
1.3.3 <i>Sector industrial.</i>	19
1.3.4 <i>Sector energético.</i>	19
1.4 <i>Tratamientos.</i>	19
1.4.1 <i>Tratamientos biológicos sin valorización.</i>	20
1.4.2 <i>Tratamiento Biológico Valorizado</i>	24
1.4.2.1.4 <i>Codigestión con lactosuero</i>	29
Bibliografía del Capitulo 1	37
Capítulo 2: Metodología	43
2.1 <i>Lactosuero</i>	44
2.2 <i>Inóculo</i>	44
2.3 <i>Medio Basal</i>	45
2.4 <i>Ensayos en codigestión</i>	45

2.5 pH	47
2.6 Cromatografía de gases.	47
2.7 Incubación.	47
Capítulo 3: Resultados	48
3.1 Caracterización del lactosuero.....	49
3.2 Resultados de la muestra sin adición de nitrógeno (N ₂) ni corrección de pH.	50
3.3 Resultados de la adaptación de bacterias.	51
3.4 Resultados de la adición del medio.	53
Capítulo 4: Conclusiones	62

Índice de tablas.

Tabla 1.1 Composición del lactosuero.....	13
Tabla 1.2 Producción nacional de leche de bovino 2004-2014.....	17
Tabla 3.1 Caracterización del lactosuero.....	49

Índice de figuras

Figura 1.1: hidrólisis de lactosa vía enzimática.....	30
Figura 2.1: Lactosuero.....	44
Figura 2.2 a) Estiércol de vaca fresco, b) Inóculo fermentado.....	45
Figura 2.3: Bolsas de biodigestión con lactosuero, medio e inóculo.....	46
Figura 2.4 Bolsas de biodigestión izquierda P2-30, derecha P3-00.....	47
Figura 3.1 Bolsas de biodigestión con sobrenadante.....	51
Figura 3.2 Bacterias incubadas obtenidas del inóculo.....	52
Figura 3.3: Bolsas de biodigestión con bacterias adaptadas.....	53
Figura 3.4: Bolsas de biodigestión con biogás.....	53
Figura 3.5: Gráfica de aziridina (C_2H_4NH) y dióxido de carbono (CO_2).....	54
Figura 3.6: Comparación de las gráficas obtenidas prueba P1-50.....	56
Figura 3.7 Gráfica de aziridina, dióxido de carbono y etanol.....	57
Figura 3.8: Gráfica de metilurea ($C_2H_5N_2O$) y dióxido de carbono (CO_2).....	58

Objetivos:

Objetivo general:

Caracterizar los productos obtenidos a partir de la biodigestión anaerobia del lactosuero bruto.

Objetivos particulares:

- 1) Obtener el lactosuero.
- 2) Caracterizar el lactosuero.
- 3) Realizar pruebas de digestión anaerobia variando el porcentaje de medio mineral a una temperatura y pH constantes.
- 4) Caracterizar los productos obtenidos a partir de la biodigestión anaerobia del lactosuero.

Hipótesis

La generación de productos de mayor valor agregado es posible usando el lactosuero bruto a través de la biodigestión.

Resumen

A lo largo del proceso de elaboración del queso se genera como subproducto una gran cantidad de lactosuero. Este subproducto se caracteriza por su elevado contenido de agua y materia orgánica (lactosa y proteínas en su mayoría), por lo que es necesario su tratamiento para evitar problemas de contaminación o en el mejor de los casos su valorización para la recuperación de los principales compuestos.

En este trabajo se llevó a cabo la biodigestión anaerobia del lactosuero bruto procedente de la producción de queso tipo fresco de una quesería que se ubica en la comunidad de San Antonio Soledad, Puebla para la obtención de productos de mayor valor agregado (entre ellos el biogás). Además, se planteó la codigestión del lactosuero con abono de vaca como una opción para agilizar el tratamiento de este subproducto altamente contaminante.

Se fijaron los parámetros reportados para otros sustratos que podría permitir la producción de biogás y posteriormente se procedió a determinar los productos obtenidos y la utilidad de éstos.

En este sentido, se comprobó la producción de aziridina (C_2H_4NH) y 1-metilurea ($C_2H_6N_2O$) en mayor proporción y solo en pequeñas trazas, dióxido de carbono (CO_2) y Etanol (C_2H_6O).

Introducción

La población mundial crece a un ritmo tan acelerado que se supone alcanzará 8,500 millones de personas para el año 2025. Con esto se puede notar que las necesidades crecerán de igual manera, y se requerirá que aumente el suministro de alimentos, agua, vestimentos, transporte, entre otras cosas; pero el desafío mayor será en hacerlo sin afectar más el equilibrio del medio ambiente.

El uso de los modelos tradicionales de desarrollo rural han causado graves problemas de contaminación en el suelo, agua y aire aunado a la agricultura intensiva, la agroindustria y las actividades humanas dando como resultado la crisis medio ambiental que estamos viviendo. En este sentido, se han puesto en marcha algunos programas para ayudar a aminorar el efecto pero en cuanto estas entorpecen la producción de las grandes empresas son declaradas obsoletas y se vuelve al círculo destructivo.

Uno de los problemas más graves a los que se enfrenta en medio ambiente es el manejo inadecuado de los residuos producidos, no solo del sector rural, sino también del industrial y urbano. Por falta de conocimiento, tecnología o por costumbre la mayoría de estos residuos son desechados sin tratamiento previo que constituye agentes contaminantes de largo alcance; pues alteran los ecosistemas y afecta el equilibrio ecológico y la calidad de vida.

La producción ganadera, por ejemplo, genera desechos (excretas, fertilizantes, sobrantes de riego, agua de limpieza), que son altamente contaminantes debido a que contienen materia orgánica, que al ser depositados en estanques o cuerpos de agua conlleva entre otros muchos riesgos la disminución del oxígeno disponible durante la descomposición lo que provoca la muerte de la vida acuática y en general a la vida a su alrededor.

No obstante, gracias a la investigación de los diversos usos de los desechos se ha logrado implementar métodos de tratamiento para obtención de productos de un mayor valor agregado de lo que antes solo era considerado

como desperdicio. Un ejemplo es la biodigestión con la que han logrado obtener diversos productos a partir de diferentes desechos agrícolas y del sector alimentario todo esto de manera natural.

La aplicación de técnicas como la biodigestión han permitido transformar desechos como el lactosuero y el estiércol bovino en recursos que sirven para la obtención de productos con un mayor valor agregado.

Capítulo 1: Antecedentes

1.1 Lactosuero.

El lactosuero es un subproducto de la transformación de leche en queso, y es, el principal contaminante generado por la industria láctea. Es un líquido amarillo transparente que se obtiene una vez que se ha logrado la precipitación de la caseína en la producción de diversos quesos. Este subproducto representa entre el 85%-95% del volumen total de leche convertida y retiene alrededor del 55% de los nutrientes de la leche (González, 1996). Sus principales componentes son lactosa, proteínas, grasa y algunos minerales. En la tabla 1.1 se puede observar la composición promedio del suero en porcentajes.

Tabla 1.1: Composición media del Lactosuero

Parámetro	Suero	Suero
	Dulce %	Ácido %
Agua	93 - 95	93-95
Lactosa	4.5 -5.3	3.8 – 5.2
Grasa	0.1- 0.4	0.1 – 0.5
Extracto Seco	5 - 7	5-7
Proteínas	0.6–1.1	0.2 – 1.1
Sales Minerales	0.5–0.7	0.5 – 1.2
Proteína	0.55	0.55
Calcio	0.12	0.04
Fósforo	0.07	0.04
Sodio	0.05	0.05
Cloruro	0.16	0.16
Ácido láctico	0.40	0.05
Valor de pH	6.5	5

Fuente: Bylund, 2003

El lactosuero se clasifica en dos tipos, el suero ácido y el suero dulce. Esta clasificación depende de las características fisicoquímicas del suero y al mismo tiempo de la fuente de procedencia de éste.

El suero dulce es aquel que se obtiene de la coagulación enzimática de la leche (Guerrero *et al.*, 2010). Este tipo de suero proviene de la fabricación de queso de pasta cocida y prensada, en caso de ser leche de vaca, o de la fabricación de queso de cabra u ovejas (Callejas *et al.*, 2012); estos quesos son destinados a la maduración y su pH característico es mayor a 6.

Por otra parte, existe también el suero ácido el cual que se obtiene acidificando el medio del cual se obtendrá el queso. En este grupo se encuentran los quesos tipo fresco, que han sido fabricados con pastas blandas y generalmente tienen un pH cercano a 4.5 (Callejas *et al.*, 2012).

1.2 Impacto ambiental del lactosuero.

El incremento en el procesamiento de leche para la obtención de diversos productos lácteos, como el queso, yogurt, crema, entre otros; ha dado como resultado la generación simultánea de grandes cantidades de subproducto como es el suero de quesería o lactosuero. Se estima que por cada litro de leche, solo entre el 10% y el 20% se convierte en queso y el resto, es decir, de 80% a 90% se vuelve lactosuero (Velazco B., 2014). Por ejemplo, para poder producir 1 Kg de queso se obtendrán 9 Kg de lactosuero, esto multiplicado por las grandes cantidades de leche procesada alrededor del planeta se ha convertido en un serio problema para el medio ambiente.

Visto desde otro ángulo, una granja quesera donde la transformación de leche en queso sea de alrededor de 100 toneladas de leche por día producirá aproximadamente la misma cantidad de desechos orgánicos como lo haría una ciudad con aproximadamente 55000 personas (González S., 1996), pero con la complejidad que implica que este suero sea tratado previamente para poder ser desechado como otro efluente.

Se estima que aproximadamente el 47 % del total de suero producido al año alrededor del mundo es arrojado sin tratamiento alguno al medio ambiente,

lo cual no solo implica lo serio daños que se están provocando a la naturaleza, sino también el desperdicio de importantes fuentes de nutrientes (Berna y Bahattin, 2010).

El suero de quesería es un efluente que contiene altas cargas orgánicas, con parámetros de DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) y de DQO (Demanda Química de Oxígeno) en un intervalo de 0.1-100 Kg/m³ (Prazeres *et al.*, 2012), lo cual implica que al ser depositado en cualquier cuerpo de agua, sin ningún tratamiento previo, este consumirá una gran cantidad de oxígeno para poder degradarse, poniendo en riesgo la flora y la fauna del medio (Erguder *et al.*, 2000).

El suero generado en el proceso de transformación de la leche es a menudo clasificado como agua residual, lo cual es incorrecto ya que debido al alto contenido de materia orgánica se considera un importante contaminante cuando este llega al medio acuático o al suelo. Por otra parte, cuando éste es vertido directamente en las redes de saneamiento y drenaje puede saturar las estaciones de depuración de tratamiento de agua residual.

Debido a la cantidad total de nitrógeno y fósforo que contiene el suero y en general los efluentes originados por la industria láctea, pone en un considerable riesgo de eutrofización a los cuerpos de agua (Carvalho *et al.*, 2013), particularmente a los lagos y lagunas donde la mayoría de la veces es vertido este desecho.

Los problemas generados por la eutrofización son importantes ya que incluye un alza en los costos de potabilización de agua para consumo humano, ya que puede afectar el periodo de conservación del agua pura acortándolo y además las algas y lodos generados en la superficie de los cuerpos acuáticos pueden llegar a ser tóxicos para la vida humana y animal. Finalmente, el incremento en las concentraciones de nitrógeno amoniacal es tóxico para la fauna acuática (Carvalho *et al.*, 2013).

La búsqueda para el tratamiento y correcta disposición del lactosuero y de los residuos producidos por la industria lechera comenzó aproximadamente

en la década de 1970 con la aplicación de diversos métodos para reducir su carga orgánica, los cuales incluyeron el tratamiento usando lodos activados, sistemas de filtración por goteo y lagunas de almacenamiento, entre los métodos más simples (Prazeres *et al.*, 2012). No obstante, debido a las cantidades que debían tratarse, estos métodos poco a poco fueron siendo obsoletos ya que los requerimientos de energía y oxígeno eran cada vez mayores y los sistemas se volvían ineficientes y muy costosos de mantener, sin mencionar que a partir de estos sistemas no se podía obtener ningún producto de valor.

En la mayoría de los países el desecho del suero de quesería está regulado por la normativa ambiental lo que obliga a los productores a que lleve a cabo una adecuada gestión de los residuos. Considerando que la mayoría de las empresas queseras pertenecen a pequeños y medianos productores, estas no suelen tener las condiciones necesarias de saneamiento de este desecho por lo que en la mayoría de las veces acaba dispuesto en los drenajes sin tratamiento alguno. La mayoría de las queserías no puedan afrontar los gastos elevados que implica la correcta gestión de los residuos lo que además supone la pérdida de un producto con alto contenido de proteínas y lactosa.

1.2.1 Impacto del lactosuero en México

En México la producción de leche y sus derivados es poca en comparación con otras partes del mundo. Sin embargo, según datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través del órgano estadístico, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) dio a conocer las cifras de producción de leche hasta marzo 2015 en el cual se ve el incremento en la producción y consumo de la leche y sus derivados respecto a años anteriores con lo que además se puede hacer un análisis de los desechos generados.

Como se puede observar en la tabla 1.2, el incremento en la producción de leche de bovino a nivel nacional se ha mantenido relativamente pequeño, ya que solo ha sido del 1.3% anualmente, aunque transformado en cantidad de litros representa un crecimiento total anual de 1, 265, 616 millones de litros en

los últimos 10 años. En 2014 la producción total fue de 11, 368 millones de litros, lo que implica que aproximadamente se produjeron 29 millones de litros por día en todo el territorio nacional. (SIAP)

Tabla 1.2: Producción nacional de leche de bovino 2004- 2014 (Miles de litros)

Año	Producción	Crecimiento Anual (%)
2014	11, 129, 918	1,5
2013	10, 965, 629	0,8
2012	10, 880, 870	1,5
2011	10,724, 288	0.4
2010	10, 676, 692	1.2
2009	10, 549, 037	-0.4
2008	10, 589, 481	2.4
2007	10, 345, 982	2.6
2006	10, 088, 550	2.2
2005	9, 868, 302	0.0
2004	9, 864, 302	0.8

Fuente: SIAP hasta diciembre 2014

Visto desde un ámbito local la tendencia es similar ya que el estado de Puebla se encuentra en la posición número 20 de 32 entidades federativas hasta diciembre del 2014, y la producción solo en los tres primeros meses del 2015 es de 108,136, 000 miles de litros de leche de bovino (SIAP). Particularmente en 2014 el estado de Puebla se destacó por un incremento considerable en la producción de leche y sus derivados con un aumento del 5.4%, siendo así la tercer entidad del país con mayor avance en este rubro según datos de SAGARPA.

Del total de la leche producida en el estado de Puebla el 10% de ésta es convertida en queso, lo que significa que se generan aproximadamente un millón de litros de lactosuero anualmente con una tendencia a la alza. Es por

esta razón que poco a poco se han ido buscando nuevos métodos que den un valor agregado al lactosuero haciendo de este un recurso y no un residuo.

1.3 Usos y aplicaciones del lactosuero.

Gracias a las características y propiedades presentes en el lactosuero, existe una amplia lista de aplicaciones para éste, con diversos objetivos como es el tratamiento de los efluentes de la industria láctea y el aprovechamiento de las fuentes nutricionales presentes en él.

Algunas de las alternativas planteadas para el correcto aprovechamiento del lactosuero son la aplicación para la alimentación animal, alimentación humana, fertilizantes, el aprovechamiento industrial y como un recurso energético (Parra H., 2009).

1.3.1 Fertilizantes y alimento de ganado.

Sin ningún tratamiento previo, el lactosuero, puede ser utilizado como un complemento en la alimentación del ganado bovino y porcino debido a la gran cantidad de agua, grasas y proteínas contenidas en él, ya que tras concentrarse en plantas de secado este lactosuero deshidratado se puede incorporar a la dieta animal junto con los forrajes (González M., 2012). Otras veces también puede ser utilizado como fertilizante aunque no es tan recomendable ya que deja un depósito salino y una película grasa en los sembradíos, por lo que su utilización debe ser regulada para evitar un daño a la estructura fisicoquímica del terreno (González M., 2012; Fernández R., 2014).

1.3.2 Sector alimenticio.

El suero de leche microfiltrado y concentrado es un polvo que es conocido como “proteína de suero” el cual tiene un alto contenido de proteínas (75%) con un gran valor biológico (Resinos y Guerrero, 2006). Este suero se procesa solo en algunos países industrializados y con un alto grado de desarrollo, ya que este proceso implica un procedimiento de manufactura y control de calidad con tecnología de vanguardia, lo que lo hace muy costoso (Velazco B., 2014). Este concentrado del suero se destina para el consumo humano, en suplementos alimenticios para bebés, derivados lácteos y bebidas

energéticas para deportistas de alto rendimiento, entre otros. También es usado como suplemento en la fabricación de productos cárnicos, productos para la panificación, confitería, horneados, pastas y quesos procesados, alimentos dietéticos y dulces (Parra R., 2009; Velazco B., 2014).

1.3.3 Sector industrial.

El rol que juega el lactosuero en el sector industrial es muy importante ya que destaca principalmente la producción de 2,3-butanediol, exopolisacáridos, glicerol, ácidos orgánicos como el ácido acético, ácido láctico y ácido propiónico, todas estas sustancias son obtenidas vía fermentación (González M., 2009; Parra H., 2009).

1.3.4 Sector energético

A partir de la fermentación del lactosuero se pueden obtener algunos productos con propiedades energéticas como el etanol, debido a la cantidad de lactosa contenida en el lactosuero representa también un potencial en la producción de biogás (Guimarães *et al.*, 2010; Viquez J., 2012).

1.4 Tratamientos.

En general, alrededor del mundo la mayoría de las fábricas y granjas donde se producían residuos lácticos no daban ningún tipo de tratamiento a sus desechos y la única forma en que podían eliminar la gran cantidad de lactosuero generado era vertiéndolo directamente en los cuerpos de agua como lagunas o ríos; algunas otras construían estanques o cisternas para almacenar el suero y así después mandarlo a las plantas de tratamiento municipales o era utilizado para el alimento de los animales.

Al paso de los años las necesidades de los consumidores de productos lácteos fueron creciendo y con ellas la producción de los desechos de las granjas por lo que poco a poco esto se volvió un problema; al mismo tiempo, la problemática ambiental crecía y la conciencia respecto a cómo aminorar la huella ecológica también, por lo que las normas de disposición y desecho de este tipo de residuos fue haciéndose más y más estricta. Por ejemplo, para que se pudiera desechar el lactosuero como un efluente doméstico se debía diluir el

suero en conjunto con los efluentes domésticos (Gannoun *et al.*, 2008), pero al paso del tiempo esta medida fue ineficiente también ya que saturaba la capacidad de tratamiento de las plantas de agua residual.

Se ha puesto especial atención en la investigación concerniente al tratamiento de los residuos provenientes de las industrias alimenticias, ya que la mayoría de las veces estos desechos contienen aun importantes fuentes de nutrientes que están siendo desperdiciadas. El caso del lactosuero no es ajeno a esta onda de investigación pues en las últimas décadas se han hecho importantes avances para su utilización dando un valor a lo que antes era considerado un desecho.

Existen diferentes rubros donde se han clasificado las maneras de tratamiento del lactosuero; se usan métodos que no dan ningún valor a este residuo pero que reducen la carga orgánica de éste, otros son tratamientos biológicos con los que se ha conseguido obtener productos o subproductos para diversas ramas de la industria.

1.4.1 Tratamientos biológicos sin valorización.

Los tratamientos biológicos no valorizados son aquellos en los que solo se busca disminuir la carga orgánica del lactosuero y hacer más simple su desecho. Uno de los tratamientos más aplicados para esto fue el de lodos activados hasta que se hizo ineficiente y obsoleto, otro más fueron las lagunas abiertas donde se dejaba fermentar el lactosuero al aire libre provocando serios problemas de olores y sistemas de filtración donde solo se retenía los compuestos más grandes pero en realidad no disminuían significativamente la carga orgánica (Prazeres *et al.*, 2012).

La investigación concerniente al tratamiento del lactosuero usando los principios del tratamiento de aguas residuales (vía lodos activados, filtros de goteo, lagunas de almacenamiento, etc.), tuvo sus inicios en la década de los 1970's y fue en un inicio una solución prometedora, ya que se podía disminuir la carga orgánica de este desecho, aunque conforme aumentaba el volumen de tratamientos las plantas eran cada vez más ineficientes, y los procesos eran

sobrepasados por los componentes del lactosuero, sin mencionar las grandes cantidades de energía que se necesitaban para poder suministrar la cantidad de oxígeno para poder degradarse (Erguder *et al.*, 2000).

Para la siguiente década se hicieron notables los avances ya que se implementaron sistemas de bioreacción, donde se observaba que la eficiencia de los microorganismos para degradar el medio era significativa; adicionalmente este proceso anaeróbico permitía la generación de gases como metano y dióxido de carbono que podían ser utilizados como otras fuentes de energía (Blonskaja y Vaalu, 2006).

1.4.1.2 Uso en sembradíos.

Es bien sabido que la investigación para el tratamiento del lactosuero comenzó por la cantidad de suero que era desechado de manera inconsciente al medio ambiente dañando los recursos naturales como los cuerpos de agua por la filtración en el suelo debido a la alta carga orgánica del suero, investigaciones recientes proponen su utilización medida como fertilizante en sembradíos de maíz y alfalfa, principalmente (Carvalho *et al.*, 2013).

El uso de suero permeado, que es el suero que queda después de la extracción de proteínas, contiene una alta concentración de sales minerales y lactosa, por lo que se propuso su uso controlado como un abono para los sembradíos. Este suero permeado puede aportar macronutrientes como potasio, calcio, fósforo, entre otros; para los cultivos y favorecer la reposición del suelo con el aporte de nitrógeno, azufre y magnesio (Robbin y Lehrs, 1992).

Se han hecho estudios del impacto del suero permeado en la tierra para determinar su capacidad de absorción de los nutrientes del suero, todo esto aplicándolo primero en bajas cantidades y aumentándolas poco a poco hasta encontrar el máximo permisivo. Se analizaron los parámetros físicos y químicos del suelo antes de aplicar el suero permeado (Robbin y Lehrs, 1992) y se ha demostrado el efecto positivo de éste en la reposición de suelo e inclusive en la regeneración de terrenos erosionados siempre y cuando éste haya sido diluido

en una proporción al menos de 1:20 con agua corriente y solo en ciertas estaciones del año dependiendo del clima de cada lugar (Prazeres *et al.*, 2012).

1.4.1.2 Procesos de biodigestión

Los sistemas de tratamiento anaerobio son sistemas biológicos que operan en ausencia de oxígeno, los cuales son adecuados para el tratamiento y degradación de materiales o residuos altamente biodegradables y concentrados.

El proceso global de biodigestión se logra gracias a la acción conjunta de poblaciones de microorganismos que interactúan de manera simultánea para la degradación de la materia orgánica. Esta degradación ocurre cuando una serie de microorganismos trabajan en serie o en serie-paralelo degradando la materia orgánica en etapas sucesivas (Lorenzo y Obaya, 2005).

1.4.1.2 Digestión Aerobia

La digestión aerobia consiste en la degradación de materia orgánica gracias a microorganismos (principalmente bacterias y protozoos) que trabajan en sistemas expuestos, es decir, en presencia de oxígeno, transformándola en productos inocuos y materia celular (Alatraste-Mondragon *et al.*, 2006). En un principio, la digestión aerobia tuvo gran aceptación debido a la simplicidad del proceso ya que solo implicaba la aireación de los lodos activados en tanques separados, permitiendo así la oxidación directa de la materia biodegradable y la autooxidación de la materia celular (Varnero M., 2011).

En las primeras fases del proceso aerobio, la población de microorganismos se pone en contacto con una fuente ilimitada de sustrato donde los microorganismos comienzan a reproducirse con una tasa de crecimiento logarítmica que solo puede ser limitada por su propia habilidad para reproducirse. De igual manera, la tasa de consumo de oxígeno aumenta rápidamente debido a la absorción y asimilación de la materia orgánica para la síntesis de nueva masa protoplasmática (Varnero M., 2011).

A medida que progresa la oxidación de la materia, la tasa de crecimiento poblacional se ve frenada progresivamente, disminuyendo consecuentemente

las fuentes de sustrato y el consumo de oxígeno; llevando a las especies de microorganismos a auto-oxidarse mediante un metabolismo endógeno hasta haber consumido todo el carbono presente (Valencia M., 2009).

Este proceso de tratamiento y regeneración de lodos activados tiene ciertas ventajas frente a la biodigestión anaerobia. Por ejemplo, la facilidad de operación, bajo capital de inversión con respecto al otro método, no produce olores ofensivos, reduce el NMP (Número Más Probable) de coliformes y organismos patógenos y reduce la tasa de respiración de los lodos, entre otras (Valencia M., 2009; Mara y Horan, 2003). De la misma manera, existen ciertas variables que condicionan su desarrollo y lo hacen menos conveniente que un tratamiento anaeróbico como los altos costos de operación causados por el alto consumo de energía para poder mantener oxigenado el sistema (Ramalho S., 2003).

El tratamiento del lactosuero vía digestión aerobia ha sido ampliamente probado y se ha comprobado que la temperatura óptima para la proliferación de los microorganismos y la degradación de la materia está en el intervalo de 22°C a 24°C, lo cual implica que no se necesita mucha energía para mantener el sistema. Además, el TRH (Tiempo de Retención Hidráulico) es corto, lo que ayuda a agilizar el proceso. No obstante, pese a las ventajas que presenta como las antes mencionadas, también se enfrenta a problemas de degradación como a que la carga orgánica es muy elevada para este tipo de sistemas ya que la relación de C/N/P promedio es de 100/5/1, mientras que la relación para el lactosuero es de 500/5/1 en digestión anaerobia (Prazeres *et al.*, 2012), casi 5 veces mayor por lo que muchas veces la transferencia de oxígeno puede ser insuficiente (Mara y Horan, 2003).

Después de varios experimentos algunos autores (Cordi, 2004; Farizoglu, 2007 y Ebrahimi, 2010), concluyeron que la forma más efectiva para el tratamiento del lactosuero vía digestión aeróbica era mediante la dilución el lactosuero, ya que así se lograba aligerar la carga orgánica. Además, se evitaban los problemas causados por la grasa y las proteínas contenidas en el

suero, cuando la disolución era mayor a 1:10 se obtenía una eficiencia mayor al 80% en la remoción de DQO (Cordi *et al.*, 2007).

Si bien se ha logrado obtener buenos resultados con respecto al tratamiento del lactosuero usando la digestión anaerobia, éste tiende a ser ineficiente cuando las cargas son altas, cuando los volúmenes de tratamiento son elevados y la eficiencia de las membranas tiende a ser menor por el uso continuo.

1.4.2 Tratamiento Biológico Valorizado

Los tratamientos biológicos valorizados son aquellos en los que se ha hecho uso de la tecnología con el objetivo de recuperar de los componentes aun presentes en el lactosuero como las proteínas y la lactosa, principalmente. También ha sido ampliamente utilizada para obtención de nuevos productos que sean útiles a la industria. Frecuentemente el hecho de tratar el suero por algún medio ayuda al mismo tiempo a disminuir la carga orgánica presente en un inicio. (Prazeres *et al.*, 2012).

1.4.2.1 Digestión anaerobia

La biodigestión anaerobia ha sido ampliamente utilizada para dar tratamiento a las aguas residuales, los efluentes de vino, leche y derivados, entre otros (Donoso *et al.*, 2009). En la digestión anaerobia los microorganismos desempeñan el papel de enzimas, ya que van consumiendo los diversos sustratos y en conjunto con ciertas bacterias van transformando todos los residuos en biogás.

La digestión anaerobia es un proceso complejo degradativo que se desarrolla en ausencia de oxígeno e involucra la interacción de dos comunidades microbianas principalmente, la *Archaea* y la *Bacteria*, para la producción de biogás. Estas dos familias de bacterias se unen en una red alimenticia sintrófica y simbiótica para llevar a cabo dos procesos muy importantes en la producción de biogás, la acetogénesis y la acidogénesis (Nielsen *et al.*, 2004).

Este proceso degradativo ha tenido varias ventajas como la baja generación de lodos, consumo reducido de energía y alta producción de metano (Parra H., 2009). Al mismo tiempo presenta algunas desventajas frente a otros tratamientos digestivos, la principal de ellas es la lentitud con la que se lleva a cabo todo el proceso (Montero *et al.*, 2008). Como resultado de este proceso se obtienen dos productos el biogás, que es una mezcla gaseosa compuesta principalmente de metano y dióxido de carbono y otras impurezas y el bioabono que se obtiene paralelamente como un efluente rico en nutrientes, ya que la mayoría de los compuestos iniciales se han transformado en biogás y el resto se ha mineralizado y se ha concentrado como el nitrógeno amoniacal que proviene del nitrógeno orgánico y que aumenta el contenido de nutrientes aprovechables por el suelo por lo que se usa para la regeneración de éste (Montero *et al.*, 2008).

Este tipo de tratamiento se lleva a cabo solo en condiciones específicas, con parámetros controlados que se han ido modificando paulatinamente hasta encontrar las condiciones que favorecen una óptima producción de biogás y sobre todo aquellas que den el mejor rendimiento de biogases.

1.4.2.1.1 Efecto de la temperatura en el proceso de biodigestión

Los procesos anaerobios, al igual que muchos otros procesos biológicos son fuertemente dependientes de la temperatura a la cual se encuentre el sistema, generalmente un aumento en la temperatura de fermentación representa un efecto positivo para el crecimiento bacteriano (Ye Chen *et al.*, 2008). Debido a que la producción de biogás está condicionada por el crecimiento bacterias y estas a su vez están sujetas a la temperatura, el control y el rango de temperatura se vuelven un parámetro muy importante en el diseño de los procesos de biodigestión.

Existen tres intervalos de temperatura en los cuales el proceso de biodigestión puede trabajar de manera estable, cada uno de éstos determina otros parámetros a su vez, pero el más importante de ellos es la tasa de crecimiento bacteriano. Se busca siempre la temperatura óptima a la cual la tasa de crecimiento sea la mayor y por lo tanto, que la producción del biogás

sea también la máxima. Los intervalos establecidos para el desarrollo del proceso son, psicofílico ($>25^{\circ}\text{C}$), mesofílico (entre 25 y 45°C) y termofílico ($<45^{\circ}\text{C}$). Las temperaturas en las que se desarrolla el proceso también condicionan el tiempo de fermentación del proceso, siendo éste mayor entre menor sea la temperatura.

La mayoría de los procesos se establecen en el intervalo de temperatura mesofílico por diversos motivos, el primero es que al ser el más estudiado los parámetros a controlar son más conocidos, otro motivo es que en comparación con el rango termofílico éste es más estable y no presenta los problemas de inhibición de gas debido a la producción excesiva de nitrógeno amoniacal (Varnero M., 2011), el tercero y quizá uno de los más importantes es la disminución de costos con respecto a la cantidad de energía utilizada para mantener estable la temperatura.

1.4.2.1.2 Influencia del pH en la biodigestión anaerobia

El segundo parámetro a considerar en el diseño de los sistemas de biodigestión es el efecto que tiene el pH dentro del sistema, el proceso anaerobio es afectado severamente por pequeños cambios del pH que lo hagan salirse del intervalo óptimo. Puesto que los microorganismos anaerobios son poco resistentes a cambios bruscos de pH, cualquier variación dentro del sistema hace que todo el sistema se vea seriamente afectado, por ello es recomendable trabajar siempre en pH próximo a la neutralidad, es decir, entre 6.8 y 7.4 , siendo el neutro el ideal. Debe notarse que ambos grupos de microorganismos tanto los metanogénicos como los acetogénicos tienen una tolerancia muy limitada de variación del pH y su punto óptimo es cercano a la neutralidad (Kroeker *et al.*, 1979).

Debe de cuidarse que el pH no esté en valores por debajo de 6.0 , ya que no solo las bacterias metanogénicas se ven afectadas, sino también el gas producido. Cuando hay variaciones en el pH del sistema el gas producto, es un gas pobre en metano lo que hace que éste sea de poca calidad energética. Los sistemas anaerobios con pH bajo, reducen la tasa reproducción de las bacterias metanogénicas haciendo que se concentren mayores cantidades de

CO₂ e H₂, favoreciendo así la producción de otros gases distintos al metano; y por el contrario los aumentos repentinos en el pH del sistema tampoco son favorables ya que cuando sobrepasa valores de 8.0 la composición del gas se ve igualmente afectada.

Si bien estos esporádicos aumentos de pH son raros se deben a la actividad propia de las bacterias y los efectos sobre la composición del gas también son negativas, pues dirige las reacciones a la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena larga que no pueden ser degradados por las bacterias metanogénicas.

El efecto de pH mayores a los óptimos tiene como efecto también que las reacciones biológicas dentro del sistema sean orientadas a la generación de productos no deseados como el nitrógeno amoniacal (NH₄⁺) y los ácidos grasos volátiles (AGV), produciendo una atmósfera tóxica y llevando al sistema a un estado de inhibición y baja producción de metano (Ye Chen *et al.*, 2008). Además del rendimiento de metano en el biogás, el porcentaje de reducción de contaminantes en el sustrato también decrece, si se compara el efecto degradativo vía DQO y sólidos totales el efecto es mucho mayor en aquellos sistemas donde el control del pH es bueno (Ghaly A., 1996).

El control del pH puede hacerse de manera práctica y eficiente, según Ghaly la adición de Ca(OH)₂ regula todo el sistema y genera un precipitado cuya composición rica en dióxido de carbono (CO₂) y carbonato de calcio (CaCO₃) que puede ser utilizado por las bacterias metanogénicas, el gas producto de éste arreglo del pH puede contener hasta un 80% en porcentaje de metano en comparación, por ejemplo, a la adición de NaHCO₃ cuyo efecto neutralizador es bueno pero con bajo rendimiento de metano debido a la alta producción de CO₂ (Ghaly A., 1996). Igualmente la adición de hidróxido de sodio (NaOH) como corrector del sistema buffer es buena, aunque afecta directamente el rendimiento de metano, no dejando que la producción de éste sea mayor al 50% (Yan *et al.*, 1989).

1.4.2.1.3 Efecto de la relación Carbono –Nitrógeno en la biodigestión anaerobia

Se sabe que prácticamente toda la materia orgánica es capaz de producir biogás al ser sometida a un sistema de biodigestión anaerobia, solo que la cantidad y la calidad de este gas dependerá del tipo de sustrato que sea tratado, por lo que es necesario que las bacterias metanogénicas tengan los nutrientes necesarios para llevar a cabo todo el proceso, ya que son muy sensibles y en caso de que esta relación sea deficiente entran en un estado de inhibición.

Los nutrientes contenidos principalmente en todos los sistemas de biodigestión son nitrógeno y carbono, ya que de ellos se alimentan las bacterias, donde el carbono es utilizado como fuente de energía y el nitrógeno para la formación de nuevas células (Velazco B., 2014). Dado que este tipo de bacterias consumen 30 veces más carbono que nitrógeno la relación óptima de estos dos elementos es de 30:1 y puede variar en un intervalo de hasta 20:1 (Veyna S., 2007).

Cuando la relación C/N está por debajo del intervalo permitido, se verán efectos adversos dentro del sistema, es decir, baja la producción y la calidad del biogás y cuando el intervalo está muy por debajo de lo permitido hasta en una relación de 8:1 se inhibe la por completo la actividad bacteriana debido a la formación en exceso de amonio, que es considerado como uno de los principales inhibidores de la metanogénesis debido a que envenena el ambiente (Velazco B., 2014).

Por el contrario, si la relación de C/N está por encima de 35:1 el efecto que se tendrá dentro del sistema será igualmente negativo pues todo el proceso se ralentiza, ya que las bacterias no tienen el nitrógeno disponible para la generación de nuevas células y deben esperar a la lisis celular por parte de ellas mismas, es decir, la reproducción de bacterias es mínimo y por lo tanto la velocidad de producción de biogás es muy baja (Varnero M., 2011).

1.4.2.1.4 Codigestión con lactosuero

Bajo condiciones anaerobias, la lactosa es degradada rápidamente y convertida en pequeñas cadenas de ácidos grasos que pueden ser aprovechadas por las bacterias metanogénicas para la obtención de diversos productos con mayor valor agregado, pero debido a que el lactosuero tiene una muy baja capacidad buffer este hace que el medio se acidifique rápidamente inhibiendo la actividad bacteriana, haciendo que la producción sea casi nula.

A fin de corregir este defecto y lograr el tratamiento y el aprovechamiento del lactosuero se han probado diversos sistemas de codigestión de tal manera que pueda ser compensada la falta de nutrientes y la acidificación del suero (Jasko *et al.*, 2011).

Una vez que se hubo identificado las variables del proceso de biodigestión anaerobia se ha usado para el tratamiento de diversos sustratos, variando los parámetros para obtener diversos productos de uso cotidiano y que en general implican procesos químicos. Ejemplo de los diversos sistemas de tratamiento y obtención de productos de mayor valor agregado son mencionados a continuación.

1.4.2.2 Hidrólisis de la lactosa

La hidrólisis de la lactosa se ha convertido en uno de los procesos más importantes como tratamiento del lactosuero ya que debido a que en la naturaleza existen un número de microorganismos capaces de metabolizar la glucosa y la galactosa que es significativamente mayor a aquellos que son capaces de desintegrar directamente la lactosa (Berruga *et al.*, 1997). Es por ello que se ha descrito la hidrólisis de la lactosa como un método efectivo para el pretratamiento del lactosuero usando la lactosa contenida en este, con un menor costo que otros procesos similares (Berruga *et al.*, 1997).

La hidrólisis de la lactosa se puede llevar a cabo por dos vías distintas, la primera es Hidrólisis química y la segunda es la Hidrólisis enzimática. En la hidrólisis química, el proceso se caracteriza por llevarse a cabo en condiciones

ácidas (pH <1.5) y temperaturas muy altas (mayores a 150 °C), para poder lograr el proceso completo de hidrólisis es necesario agregar algún tipo de ácido, como el ácido sulfúrico (H₂SO₄), un ácido sólido o alguna resina de intercambio catiónico (Berruga *et al.*, 1997). Esto ayuda a la descomposición de la lactosa en otros compuestos más pequeños que pueden además ser sintetizados más fácilmente como la glucosa y la galactosa, como se ve en la figura 1; desafortunadamente, este proceso es muy agresivo y puede causar al mismo tiempo la desnaturalización de las proteínas presentes en el suero (González S., 1996).

Debido a estas pequeñas desventajas en la hidrólisis química del lactosuero que se ha optado por usar otro método que es la hidrólisis enzimática, la cual se logra gracias a la enzima lactasa que se encuentra en animales, plantas, algunos tipos de hongos, y lo que hace es degradar la lactosa a componentes más sencillos como lactosa disacárida, monosacárida, glucosa y galactosa. Las bacterias mejor adaptadas y que contiene este tipo de enzimas son *Aspergillus* y *Kluyveromyces* (González S., 1996). Debido a que es imposible la reutilización de la lactasa este proceso es considerado como económico poco viable.

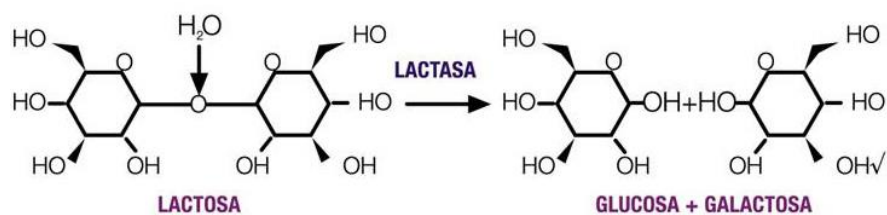


Figura 1.1: Hidrólisis de lactosa vía enzimática.

El principal problema al que se han enfrentado en la hidrólisis de la lactosa vía enzimática es que muchas veces las bacterias o enzimas no forman los productos deseados invirtiendo el proceso que lleva a una polimerización de la lactosa y la galactosa formando oligosacáridos (Gekas y López-Leiva,

1985) y el segundo problema es la limitación que tiene la lactosa a la transferencia de masa al interior de las células (Joshi *et al.*, 1987).

1.4.2.3 Producción de Etanol vía fermentación.

Este proceso ha alcanzado gran importancia como medio de tratamiento del lactosuero debido a que ofrece una propuesta importante en el ámbito de las energías verdes, ya que además de ser obtenido a partir de lo que es considerado un desecho, es biodegradable y renovable, reduce las emisiones de CO₂ y otros gases nocivos, es relativamente fácil de producir y almacenar, entre otro (Sansonezzi *et al.*, 2009).

Los primeros intentos de tratar el suero de quesería datan de 1940 con la producción de etanol vía fermentación y desde entonces se ha hecho una amplia investigación cambiando las variables del proceso. Por ejemplo, la producción de etanol usando lactosuero crudo (Zafar y Owais, 2006), lactosuero permeado por ultrafiltración (Sansonezzi *et al.*, 2009), soluciones de lactosuero en polvo (Ozmihci y Kargi, 2007) e inclusive suero desproteinizado, (Dragone *et al.*, 2011) con la única constante para este tratamiento que es el requerimiento de bacterias específicas y cuidadosamente adaptadas como *Torula cremoris*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudotropicalis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Rogosa *et al.*, 1947; Zafar y Owais, 2006; Sansonezzi *et al.*, 2009; Dragone *et al.*, 2011).

Como cualquier otro proceso fermentativo, la producción de etanol a partir del suero de quesería requiere de condiciones específicas, ya que al tratar con microorganismos la mínima variación puede llevar a la obtención de productos no deseados o bajar el rendimiento del etanol. Por ejemplo, una concentración excesiva de sustratos puede afectar el rendimiento del etanol y el consumo de sustrato debido a la inhibición parcial del sistema (altas presiones osmóticas), (Ozmihci y Kargi, 2007) también una aireación excesiva puede ser contraproducente ya que disminuye su producción (Ghaly y El-Taweel, 1995).

Lo interesante de este proceso es que las reacciones descritas por la bio-conversión de la lactosa en etanol es el rendimiento que se obtiene, ya que

por cada kilogramo de lactosa consumido se obtiene aproximadamente 0.538 Kg de etanol (Sansonetti *et al.*, 2009). Adicionalmente se ha obtenido un residuo producto de la fermentación donde se ha observado la notable reducción de DQO (15 Kg/m³) (Sansonetti *et al.*, 2009) y la reducción significativa de olores.

Uno de los problemas que sea tenido en la producción de etanol vía fermentativa anaerobia es que las bacterias que lo degradan solo producen enzimas que no consumen la lactosa directamente es por eso que necesita un pretratamiento, es decir, la hidrólisis de lactosa que se puede hacer usando directamente la enzima β -galactosidasa (Guimarães *et al.*, 2008), lo que implica es que el proceso aumente su costo ya que la obtención de esta enzima es muy caro y además el proceso degradativo muy lento.

La obtención de etanol a partir de lactosuero ha permitido que este sea usando en las diferentes industrias, ya sea en alimentos, químicos, farmacéuticas y la industria de los cosméticos también (Ghaly y El-Taweel, 1995).

1.4.2.4 Producción de Hidrógeno.

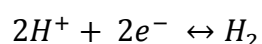
La necesidad de reducir la dependencia a los combustibles fósiles ha fomentado el desarrollo e investigación de procesos alternativos para el desarrollo de energías que sean amigables con el medio ambiente, un ejemplo es el desarrollo e impulso que ha tenido la investigación en la producción de hidrógeno vía biológica y en la carrera por las energías verdes ha saltado la producción de bio-hidrógeno a partir del lactosuero.

Éste representa una energía limpia que no contribuye a los gases de efecto invernadero o a la lluvia ácida, debido a su baja solubilidad puede ser separado fácilmente del agua y purificado, además de su alto rendimiento energético alrededor de 122 kJ/g i.e. lo que significa 2.75 veces más potencial energético que cualquier hidrocarburo (Kapdan y Kargi, 2006).

Aplicando la tecnología de la fermentación anaerobia al tratamiento del suero se han logrado obtener avances importantes para la producción de

hidrógeno, lo que ha representado una vía económica para la producción de éste. Se ha probado este tipo de tratamiento usando lactosuero crudo, diluciones de lactosuero (Azbar *et al.*, 2009), soluciones de lactosuero en polvo (Dávila-Vazquez *et al.*, 2009) e inclusive lactosuero permeado en polvo (Yang *et al.*, 2007) y la adición de bacterias se han logrado buenos resultados en cuanto a la producción de hidrógeno.

Los procesos de generación de hidrógeno por vía biológica se fundamentan en la presencia de una enzima capaz de catalizar la reacción:



Actualmente solo se conocen dos enzimas que son capaces de llevar a cabo esta reacción y son la nitrogenasa y la hidrogenasa (Fe-hidrogenasa y NiFe-hidrogenasa) (Hallenbeck y Benemann, 2002).

La fermentación anaerobia para la producción de hidrógeno se lleva a cabo gracias a la acción de diferentes grupos de bacterias entre los que se encuentran especies de *Clostridium* (*Clostridia butyricum*, *Clostridium pasteurianum* y *Clostridium beijerinckii*) y además bacterias anaerobias facultativas como *Enterobacter*, *Citrobacter sp.* y *Escherichia coli* (Dávila-Vazquez *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2007). Se han hecho pruebas con diferentes tipos de bacterias e inclusive con mezclas de diferentes comunidades microbianas todas ellas llevadas a cabo bajo condiciones mesofílicas (30-38°C) y también se ha probado su efectividad a mayores temperaturas alcanzando rango termofílicos (< 55°C) (Azbar *et al.*, 2009).

Desde un punto de vista medio ambiental este tipo de tratamiento ha logrado la reducción de la carga orgánica en el lactosuero pues se ha logrado una reducción hasta del DQO del 80% al 90% y un consumo del azúcar presente en éste de hasta 90% (Azbar *et al.*, 2009).

1.4.2.5 Obtención de ácido láctico.

Otro de los tratamientos que se le ha dado al lactosuero ha servido para la producción de ácido láctico. La importancia de este tratamiento radica en el

uso comercial que se le puede dar a éste, ya que es la base de varios procesos químicos industriales además de que gracias a la producción biológica de este compuesto ha logrado reducir el costo en la obtención por diferentes vías (Plessas *et al.*, 2008).

Actualmente una importante fracción del suero generado alrededor del mundo es pre-tratado con membranas de ultrafiltración para recuperar la mayor cantidad de proteínas presentes en el suero lo que deja en el residuo una gran cantidad de lactosa y sales minerales libres (Baker R., 2004).

A partir del suero ultrafiltrado se ha logrado la producción de ácido láctico usando bacterias específicas, la mayoría de estos microorganismos pertenecientes a la familia de los lactobacillus como es el caso de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus salivarius*, *K. marxianus*, etc. y solo algunos pocos experimentos han usado cultivos mixtos de estas mismas especies (Plessas *et al.*, 2008; Tango y Ghaly, 1999; Vasala *et al.*, 2005).

Un aspecto importante a considerar en la producción de ácido láctico a partir del suero permeado es que no requiere la adición de nutrientes para que se lleve a cabo la transformación, pero por el contrario la gran limitante de este proceso es que la producción de ácido láctico es muy baja pues solo se obtiene de 3.8 a 12 gramos por cada metro cúbico de suero permeado (Tango y Ghaly, 1999).

Como en los casos anteriores se han buscado las condiciones óptimas para que este proceso se desarrolle, pero de igual manera se han probado sistemas en los que las condiciones son diferentes a las óptimas con buenos resultados, por ejemplo el TRH se ha incrementado de 48 horas hasta 60 horas y se ha probado en rangos de temperatura termofílicos de 42°C con cultivos mixtos de microorganismos dando como resultado una producción máxima de 20kg por cada metro cúbico de suero.

1.4.2.6 Producción de electricidad a partir de celdas de combustible microbiana.

Uno más de los tratamientos que se han propuesto para el lactosuero es la producción de electricidad a partir de las celdas de combustible microbiana, MFCs (Microbial Fuel Cells), a pesar de que es un método muy parecido a la producción de metano (CH_4) e hidrógeno (H_2) ya que implica la acción de microorganismos y bacterias, los tratamientos antes mencionados no generan en si electricidad, lo que ha hecho de este proceso un importante medio para la producción de energía que es amigable con el medio ambiente (Carvalho *et al.*, 2013).

El tratamiento con MFCs consiste en crear un sistema compuesto de diferentes elementos. Por principio, este sistema consta de dos cámaras una aerobia y otra anaerobia, el proceso se inicia en la parte anaerobia donde se lleva a cabo la producción de gases y la segunda fase de proceso consta de la cámara aerobia donde se tiene acceso al oxígeno del medio ambiente que contendrá un ánodo y un cátodo respectivamente (Rachinski *et al.*, 2010).

En la parte anaerobia se colocan los residuos orgánicos, en este caso el lactosuero, dejando que los microorganismos fermentativos degraden la materia para formar dióxido de carbono CO_2 , protones (H^+) y electrones (e^-); los protones migrarán hacia la cámara aeróbica que es donde se encuentra el cátodo gracias a una membrana de intercambio catódico, mientras los electrones son transferidos al cátodo a través de un circuito externo (Rachinski *et al.*, 2010; Antonopoulou *et al.*, 2010). Al momento en el que los electrones pasan a la cámara catódica van atrapando el oxígeno que se encuentra en el ambiente para que una vez que llegue a la cámara éste sea liberado y se pueda unir a los protones formando así agua. El flujo de estos electrones a través del circuito genera una corriente eléctrica que puede ser medida (Stamatelatou *et al.*, 2011).

Este tratamiento ha sido usado de manera exitosa con el lactosuero ya que no requiere un pretratamiento, se puede usar el suero crudo y no necesita ser diluido tampoco, lo que implica que no hay que invertir más recursos para

su aplicación, es también efectivo cuando se use suero permeado, ultrafiltrado y suero diluido (Antonopoulou *et al.*, 2010; Stamatelatou *et al.*, 2011).

Analizado desde un punto de vista medio ambiental se ha logrado la reducción del DQO hasta un 100% para una reacción que tomó aproximadamente 50 horas en llevarse a cabo (Rachinski *et al.*, 2010).

Bibliografía del Capítulo 1

1. Alatríste-Mondragón, F., Samar, P., Cox, H.H.J., Ahring, B.K., Iranpour, R. 2006. Anaerobic codigestion of municipal, farm, and industrial organic wastes: A survey of recent literature., *Water Environment Research*, Vol. 78.p 12.
2. Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Bebelis, S., Lyberatos, G. 2010. Electricity generation from synthetic substrates and cheese whey using a two chamber microbial fuel cell. s.l. : *Biochemical Energy Journal*, Vol. 50. P. 7,11.
3. Azbar, N., Dokgöz, F.T.Ç, Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M. 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions., *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 34, 17,p 5,6.
4. Baker, R. W. 2004. *Membrane technology and applications.*, Jhon Wiley and Sons, p 13-16.
5. Berruga M. I., Jaspe A., SanJose C. 1997. Selection of Yeast Strains for Lactose Hydrolysis in Dairy Effluents . Madrid, España : *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 40, p 8-11.
6. Blonskaja, V., Vaalu, T. 2006. Investigation of different schemes for anaerobic treatment of food industry wastes in Estonia. Estonia : *Proc. Estonian Academy Science of Chemistry* , Vol. 12, p 18
7. Callejas, J., Prieto, F., Reyes, V., Marmolejo, Y. y Méndez, M. 2012. Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencial de recuperación de fósforo., *Acta Universitaria* 22, p 10-14.
8. Carvalho F., Prazeres A. R., Rivas J. 2013. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. Badajoz, España : *Science of the Total Environment*, p 15,16.
9. Cordi, L., Almeida, E.S., Assalin, M.R., Duran, N. 2007. Intumescimento Filamentoso no Processo de Lodos Ativados Aplicado ao Tratamento de Soro de Queijo: Caracterização e Uso de Floculantes para melhorar a

Sedimentabilidad. Brasil : Engenharia Ambiental-Espírito Santo do Pinhal, Vol. 4, p 3-7.

10. Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., León-Rodríguez, A. 2009. Continuous biohydrogen production using cheese whey: improving the hydrogen production rate., *Hydrogen Energy*, Vol. 34, p 10-14.

11. Decara, L., Sandoval, G. and Funes, C. 2004. El uso de biodigestores caprinos de la provincia de Córdoba., *Universidad Nacional del Rio Cuarto, Córdoba*, p 15-25.

12. Donoso A, Carballa M., Ruiz G, Chamy R. 2009. *Treatment of low strength sewage with high suspended organic matter content in a anaerobic sequenci batch reactor and modeling application.*, *Electronic journa of biotechnology*, Vol. 12, p 10,11.

13., p Erguder, T.H.; Tezel, U.; Guven, E.; N.Demirer, G. 2000. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of chesse whey in batch and UASB reactors. Ankara, Turquia : *Waste management*, Vol. 21, p 10-15.

14. Fernández Rodríguez C. 2014. Obtención de biogás e hidrógeno a partir del lactosuero. León, España : Instituto de medio ambiente, recursos naturales y biodiversidad. Área de Ingeniería Química, Universidad de León, p 15-25, 20-24.

15. Ghaly, A. E. 1996. *A Compartive study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure ina atwo-stages reactor* . *Biosource technology*, 1996, Vol. 61, p 7-8.

16. Ghaly, A.E., El-Taweel, A.A. 1995. Effect of nutrient supplements addition on ethanol production from cheese whey using *Candida pseudotropicalis* under batch conditions., *Applied Environmental Biotechnology* , Vol. 53, p 4-6.

17. Gannoun, H., Khelifi, E., Bouallagui, H., Touhami, Y., Hamdi, M. 2008. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter., *Bioresource and technology*, Vol. 99, p 14-17.

18. Gekas, V., López-Leiva, M. 1985. Hydrolysis of lactose: a literature review. s.l. : Process biochemical, Vol. 20, p 13-15.
19. Grady C.P.L., Daigger, G.T., Lim, H.C. 1999. *Biological wastewater treatment*. U.S.A., Marcel Dekker, Inc., p 12,13.
20. Grandison, A. S. y Lewis, M. J. 1996. Separation processes in the food an biotechnology industries: Principles and Applications. England : Woodhead Publishing Ltd, p 15-19.
21. González, M. 2012. *Aspectos medioambientales asociados a los procesos de la industria láctea*, Mundo pecuario, Vol. 8, p 4-9.
22. González Siso M. I. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review . Coruña, España : Bioresource Technology. Vol. 11, p 12-18.
23. Guerrero, W., Gómez, C., Castro, J., González, C., Santos, E. 2010. Caracterización fisicoquímica del lactosuero en el Valle de Tulancingo., XIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, p 6-11.
24. Guimarães, P., Teixeira, J. y Domingues, L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Biotechnology Advances* , Vol. 28, p 8-11.
25. Guimarães, P.M.R., François, J., Parrou, J.L., Teixeira, J.A., Domingues, L. 2008. Adaptive evolution of a lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* recombinant., *Applied Environmental Microbiological*, Vol. 76, p 6-9.
26. Jasko, J., Dublovskis, V., Zabarovskis, E. y Kotelenecs, V. 2011. *Biogas production from cheese whey in two phase anaerobic digestión.*, Jelgava, Vol. 26, p 12-15.
27. Joshi, M.S., Gowda, L.R., Bhat, S.G. 1987. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by cetyltrimethylammonium bromide, *Biotechnology Lett.*, Vol. 9, p 8-14.

28. Kapdan, I.K., Kargi, F. 2006. Review: bio-hydrogen production from waste materials . s.l. : Enzyme Microbiological Technology, Vol. 38, p 5-8.
29. Kroeker, E.J., Schulte, D.D., Sparling, A.B., Lapp, H.M. 1979. *Anaerobic treatment process stability.*, Water Pollution, Control Fed, Vol. 51, p 13,14.
30. Lorenzo Acosta, Y. y Obaya Abreu, M. C. 2005 La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte 1. Ciudad de la Habana, Cuba : ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, Vol. 39, p 11-15.
31. Mara, D., Horan, N.J. 2003. The handbook of water and wastewater microbiology., U.K. : Academic Press, Vol. 26, p 7-12.
32. Montero B., Garcia-Morales J.L., Sales D., Solera R. 2008. *Evolution of microorganisms in thermophilic-dry anaerobic digestion .*, Biosource technology, Vol. 99, p 5-10.
33. Morr, C.V., Barrantes, L. 1998. Lactose-hydrolysed cottage cheese whey nanofiltration retentate in ice cream., *Milchwissenschaft*, Vol. 53, p 10-12.
34. Mukhopadhyay, R., Talukdar, D., Chatterjee, B.P., Guha, A.K.,. 2003. Whey processing with chitosan and isolation of lactose., *Process Biochemical.*, Vol. 39, p 12-18.
35. Nielsen, H.B., Mladesnokova, Z y Westerman, P, Ahring, B. K. 2004. *Comparison of two-stages thermophilic (68 degrees C/55 degreesC) anaerobic digestion with one stage thermophilic (50 degreesC) digestion of cattle manure .*, *Biotechnology and bioengineering* , Vol. 83, p 6-11.
36. Ozmihci, S., Kargi, F.,. 2007. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP), *Enzyme Microbiological Technology*, Vol. 41, p 6-9.
37. Parra Huertas R. A. 2012. Anaerobic digestion of whey: effect of high points loads. *Facultad Nacional de Agronomía Medellín* , Vol. 63, p 7-10.

38. Parra, H. R. 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín , Vol. 62, p 7-9.
- 39 Prazeres A. R., Carvalho F., Rivas J.. 2012. Cheese whey management: A review. Badajoz, España : Journal of Environmental Managemen, Vol. 48, p 6-10.
40. Rachinski, S., Carubelli, A., Mangoni, A.P., Mangrich, A.S. 2010. Revisão: Pilhas de combustíveis microbianas utilizadas na produção de eletricidade a partir de rejeitos orgânicos: uma perspectiva de futuro. Quimica Nova, Vol. 33, p 10-15.
41. Ramalho S. R. 2003. Tratamiento de aguas residuales. Madrid, España : Reverté, p 5-12.
42. Resinos Rivas L., Guerrero Saz O. 2006. Caracterización del suero lácteo y diagnóstico de alternativas de sus usos potenciales en el Salvador, Universidad del Salvador, p 12-16.
43. Robbins, C.W., Lehrs, G.A. 1992. Effects of acidic cottage cheese whey on chemical and physical properties of a sodic soil., Arid Soil Research and Rehabilitation, Vol. 6, p -7.
44. Sansonetti, S., Curcio, S., Calabrò, V., Iorio, G. 2009. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source, Biomass and bioenergy, Vol. 33, p 7-11.
45. Stamatelatou, K., Antonopoulou, G., Tremouli, A., Lyberatos, G. 2011. Production of gaseous biofuels and electricity from cheese whey. Ind. Eng. Chem. Res., Industrial and Engineering Chemistry Research, Vol. 50, p 11-15.
46. Tango, M.S.A., Ghaly, A.E. 1999. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using Lactobacillus helveticus under batch conditions. s.l. : Biomass and Bioenergy, Vol. 16,p 6-9.
47. Valencia Montoya G. 2009. Digestión aeróbica. Cali, Colombia : Universidad del Valle, p 24-34.

48. Varnero Moreno M. T. 2011. Manual del biogas. Santiago de Chile : FAO. p 18-15.
49. Vasala, A., Panula, J., Neubauer, P.,. 2005. Efficient lactic acid production from salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp. J. Biotechnology, Vol. 117,p 4-9.
50. Velazco Bretón E. A. 2014. Modelamiento matemático de la producción de biogás a partir de lactosuero. Veracruz, México : Universidad de Veracruz, p 12-19.
51. Veyna, S. 2007. *Efecto de control de pH, temperatura y adición de nitrógeno sobre la digestión anaerobia de residuos hortícolas*. Instituto Politécnico Nacional, p 12-20.
52. Víquez, J. 2012. Conversión de suero lácteo a biogás: un potencial invaluable. UTN informa , Vol. 60, p 11-15.
53. Yan, J. Q., Lo, K. V. & Liao, P. H. 1989. *Anaerobic digestion of cheese whey using upflow anaerobic sludgeblanket reactor*. Biogical wastes, Vol. 27, p 12-15.
54. Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J.A., Benemann, J.R. 2007. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities., Hydrogen Energy, Vol. 32, p 16-19.
55. Ye Chen, Jay J. Cheng , Kurt S. Creamer. 2008. *Inhibition of anaerobic digestion process: A review.*, Biosource technology , Vol. 99, p 13-16.

Capítulo 2: Metodología

En este apartado se describe la metodología empleada en este trabajo de investigación. A continuación se detalla la metodología utilizada en cada ensayo, así como los materiales y métodos de análisis.

2.1 Lactosuero

El sustrato usado en estas pruebas fue suero de quesería crudo, sin tratamientos previo (ver figura 2.1) procedente de una quesería en la comunidad de San Antonio Soledad, Puebla. Las muestras fueron recogidas quincenalmente en la quesería y fueron almacenadas a 4°C hasta su utilización.



Figura2.1: a) Lactosuero

La caracterización del lactosuero se realizó con el Lactoscan La50 con número de serie 7849, el cual determina los porcentajes de grasa, proteínas, lactosa, ceniza, agua y la densidad promedio presentes en el lactosuero.

2.2 Inóculo

Durante los ensayos realizados de codigestión anaerobia se utilizó como inóculo abono de vaca, la recolección de las muestras se hizo en dos establos de vacas localizados dentro de la comunidad de San Antonio Soledad. La frescura del excremento fue variable, ya que dentro de los establos, se encuentra mezclado el abono recién evacuado con el seco. Cada vez que se hacía una experimentación, se recolectaba 4 porciones de estiércol en cada corral, los cuales se mezclaban para formar la materia prima de la

experimentación cuidando que fuera lo más fresca posible y además homogénea.

El estiércol se dejó fermentar por 24 horas en agua estéril a una temperatura de 37°C, dejando sedimentar los sólidos para usar únicamente el lixiviado.

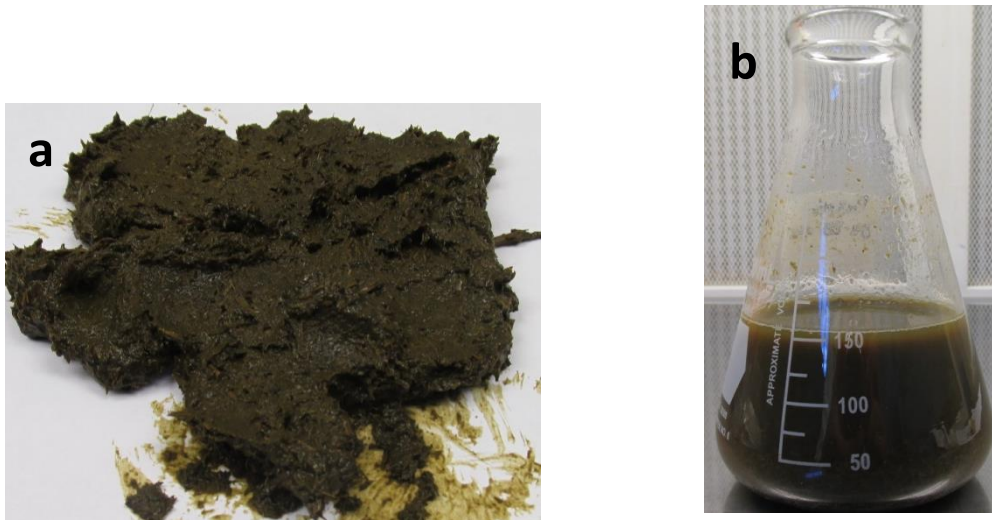


Figura 2.2: a) Estiércol de vaca fresco, b) Inóculo fermentado durante 24 horas.

2.3 Medio Basal

Se preparó un medio basal para la adición de nutrientes a la mezcla en codigestión, se dispuso un litro de medio basal que constó de dextrosa ($C_6H_{12}O_6$) 20 g, Peptona de caseína 5g, fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 0.5g, sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 25 mg. (Abreu S. J, 2013)

2.4 Ensayos en codigestión

Los ensayos de codigestión de lactosuero y abono de vaca se realizaron para verificar la posible producción de biogás. Éstos se llevaron a cabo en un prototipo de biodigestor de tipo salchicha de polipropileno, simulada con bolsas para suero de uso médico marca Delmed llenas con una solución de dextrosa al 5% con capacidad de 250mL.

Se realizaron tres pruebas distintas, la primera identificada como P1-50, la segunda como P2-30 y la tercera como P3-00. Para las tres pruebas

experimentales se siguió el mismo procedimiento solo variando el contenido de cada bolsa. A continuación se hace la descripción detallada del procedimiento para la primera prueba P1-50.

En la prueba uno primero se mezcló el lactosuero con el medio en una proporción de 50%-50% en volumen, se corrigió el pH de la mezcla recién mencionada con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 1M hasta alcanzar un valor de 6.2 de pH aproximadamente. Ésta mezcla ligeramente ácida se inyectó a las bolsas para que la proporción de esta fuera igual al 90% de volumen total de reacción.

Una vez que se tenía el sustrato (lactosuero más el medio) en las bolsas de bioreacción se agregó un 10% de lixiviado del inóculo, correspondiente a 15mL, como se muestra en la figura 2.3.

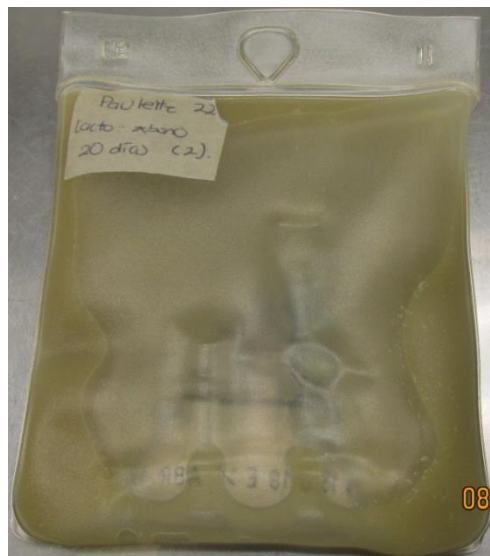


Figura 2.3: Bolsa de biodigestión con lactosuero, medio e inóculo

Listas las bolsas de bioreacción se les extrajeron todo el aire y se llevaron a incubación por 48 horas a una temperatura constante de 37°C. dichas condiciones se adaptaron a las propuesta por Ghaly (1996).

Para las prueba P2-30 y P3-00 se siguió el mismo procedimiento solo cambiando la proporción de medio agregada a cada bolsa. La prueba P2-30 contiene solo un 30% de medio y un 70% de lactosuero y la prueba P3-00 no contiene medio basal, solo se uso como sustrato el lactosuero y el inóculo.

En la figura número 2.4 se muestran las dos últimas bolsas de digestión, aquella donde no hay medio (P3-00) y la otra cuya relación es de 70-30% del lactosuero con el medio (P2-30).

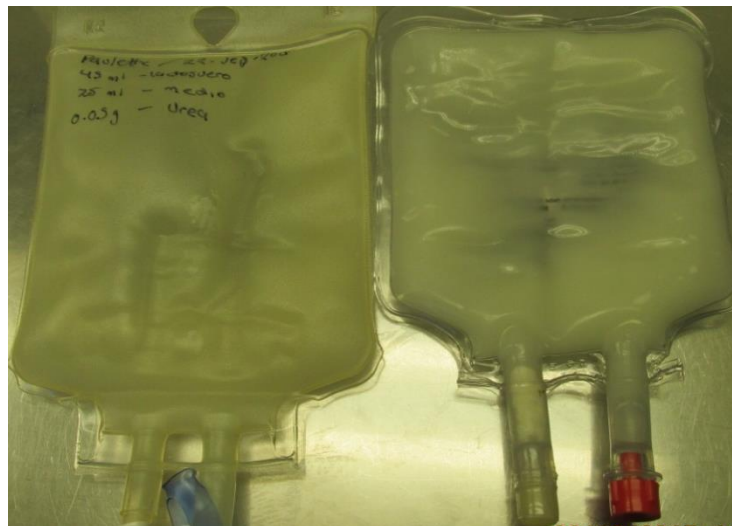


Figura 2.4: Bolsas de biodigestión izquierda P2-30, bolsa del lado derecho P3-00.

2.5 pH

La medición del pH fue llevada a cabo mediante un pHmetro marca Thermo, modelo Orion 4 Star. Se midió el pH inicial del lactosuero solo y después de la mezcla con medio final hasta mantener un valor de pH final igual a 6.2.

2.6 Cromatografía de gases.

Los productos de la biodigestión fueron analizados por cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas. Todos los análisis se realizaron con el cromatógrafo de gases modelo VARIAN CP 3800 conectado a un detector SQ Mass Spectrometer modelo VARIAN 320-MS con un cuadrupolo sencillo.

2.7 Incubación.

Las bolsas de bioreacción se llevaron a incubación durante 48 horas a temperatura constante de 37 °C en el horno de incubación marca AESA modelo CV 300.

Capítulo 3: Resultados

A lo largo de esta sección se presentan los resultados obtenidos en este trabajo de investigación. En primer lugar se presentan los resultados de la caracterización del lactosuero, posteriormente los resultados de los ensayos sin adición de nitrógeno (N₂) y la adaptación de las bacterias y finalmente los resultados de la producción del biogás.

3.1 Caracterización del lactosuero

En la tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos a partir de las muestras recolectadas en diferentes días.

Tabla 3.1: Caracterización del lactosuero.

Parámetro	Recolección día 1 (%)	Recolección día 2 (%)	Recolección día 3 (%)
Grasa	0.90	0.88	0.82
Sólidos no grasos	6.29	6.30	6.32
Lactosa	2.82	2.83	2.84
Sólidos (Cenizas)	0.46	0.46	0.47
Proteínas	2.97	2.98	2.99
Agua	86.56	86.55	86.57
Densidad	23.35	23.44	23.56
Temperatura	21.9	22.3	22.2
Punto de congelación (°C)	-0.330	-0.331	-0.331

Se puede observar que las muestras elegidas arrojaron resultados similares entre ellas pero además son similares a los parámetros de caracterización generales para el lactosuero ácido obtenido a partir de la fabricación de quesos frescos (Guerrero *et al.*, 2010).

Los parámetros que más efecto tienen en la fermentación anaerobia son la lactosa, cuando el sustrato contiene un promedio mayor a 1.5% y el

porcentaje de grasa que sea menor al 1%. Sin duda el parámetro de mayor relevancia en este tipo de procesos es la cantidad de lactosa presente en el sustrato ya que este permite ver la viabilidad del proceso, entre mayor sea el porcentaje de lactosa contenido en el medio más rápido será el proceso de biodigestión, como se observa cumple esta condicionante. (Ghaly A., 1996)

Los nutrientes presentes en el lactosuero representan un aspecto importante en la fermentación anaerobia. Las proteínas constituyen un sustrato importante debido a que además de ser una fuente de carbono y energía, los aminoácidos derivados de su hidrólisis tienen un elevado valor nutricional. Las proteínas hidrolizadas son utilizadas directamente en la síntesis de nuevo material celular (Varnero M., 2011).

Los hidratos de carbonos son los compuestos más difíciles a degradar, la velocidad de degradación de los compuestos lignocelucósico, que son añadidos por la codigestión con el abono de vaca, están conformados generalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa es tan lenta que suele ser considerada como la etapa limitante dentro del proceso de hidrólisis. Aunque estos compuestos son complejos y difíciles a degradar suelen aportar gran cantidad de precursores para las etapas siguientes del proceso (Varnero M., 2011).

3.2 Resultados de la muestra sin adición de nitrógeno (N₂) ni corrección de pH.

En el primer experimento se usó solo lactosuero e inóculo en una proporción de 90% suero y el resto de inóculo sin la corrección de pH. Los resultados arrojados no fueron satisfactorios ya que como se muestra en la figura 3.1, no hubo producción de ningún tipo de gas y por el contrario hubo la formación de sobrenadante (Ghaly A., 1996; Mockaitis G. *et al.*, 2004).



Figura 3.1: Bolsas de biodigestión con sobrenadante.

El sobrenadante o biomasa es un tipo de lama que se observa en la superficie de las bolsas es un efecto del desequilibrio en la relación de carbono-nitrógeno ya que en este tipo de tratamientos donde se busca la producción de gas vía anaerobia, las bacterias involucradas en la degradación de la materia consumen 30 veces más carbono que nitrógeno la relación óptima de estos dos elementos es de 30:1 (Veyna S., 2007).

El efecto que se tuvo se debió a que la relación de carbono- nitrógeno no estaba en el intervalo necesario para la obtención de productos, debido al contenido de lactosa y proteínas del suero hay una mayor cantidad de carbono que de nitrógeno lo que da como consecuencia que las bacterias no tengan el nutriente necesario para la producción de nuevas células y, por lo tanto, la reproducción de bacteria disminuye (Velazco B., 2014). Con ello, la producción de gas se vio afectada completamente ya que fue nula.

3.3 Resultados de la adaptación de bacterias.

Otra prueba más consistió en adaptar las bacterias, es decir, a partir del inóculo de abono ya fermentado durante las 24 horas se incubaron grupos de bacterias para lograr así fortalecer su crecimiento y su supervivencia en el sistema de biodigestión. Se ha podido observar en experimentos similares que la adaptación de bacterias específicas incrementa la generación de los productos deseados, al tener las bacterias que solo consumen lactosa, por ejemplo, se puede ahorrar el tiempo de degradación de las proteínas más grandes o evitar que las bacterias produzcan subproductos de bajo interés. (Plessas *et al.*, 2008; Tango y Ghaly, 1999; Vasala *et al.*, 2005).

Se obtuvieron varios grupos de bacterias diferentes, como puede observarse en la figura 3.2, ya que a simple vista se ven colonias con forma circular y algunas otras colonias con formas de nervaduras y en algunas otras colonias verrugosas, esperando que entre ellas se encontraran bacterias metanogénicas ya que estas se desarrollan principalmente en ambientes anaerobios ricos en materia orgánica y en ambientes con temperaturas elevadas como las que se cultivaron. En ninguna de las pruebas de cultivo se obtuvo hongos o levaduras que son fácilmente identificables por la formación de pequeños filamentos que generalmente se ramifican hacia arriba (Purvis W., 2000).

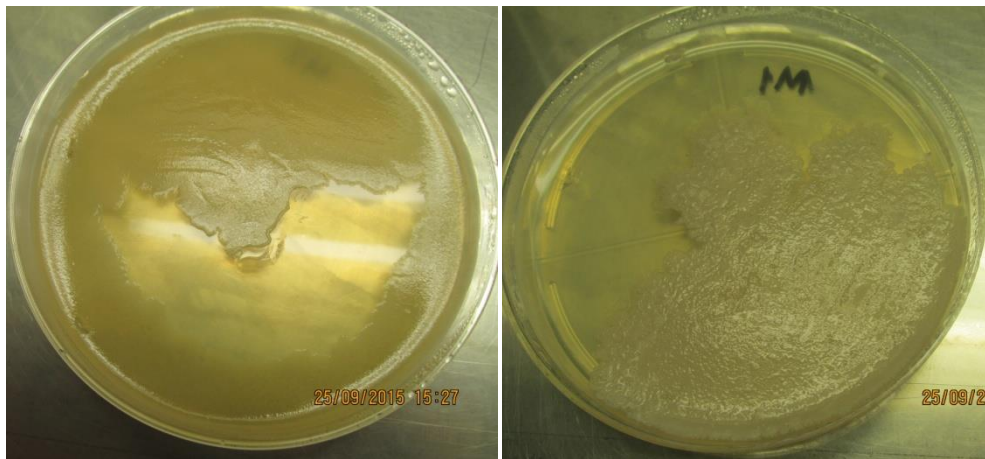


Figura 3.2: Bacterias incubadas obtenidas del inóculo.

Se hicieron dos tipos de incubación, el primero sobre la mezcla de lactosuero básico más un medio de cultivo y el segundo se usó el lactosuero ácido y el mismo medio, esto con el objeto de observar el efecto de la corrección del pH sobre la producción de bacterias y de gas. El medio que se usó se eligió como una corrección del nitrógeno faltante observado en pruebas anteriores y se dejaron incubar las bacterias a 37 °C durante 24 horas y se pasó después a agua estéril para así poder usarlo en las bolsas de biodigestión.

A diferencia del estudio previo hubo formación de gas, como se puede ver en la figura 3.3 pero en cantidades apenas perceptibles que no fueron suficientes para su análisis. Cabe resaltar que en estas pruebas las bolsas de

biodigestión solo contenían el lactosuero más las bacterias adaptadas en el medio ácido.

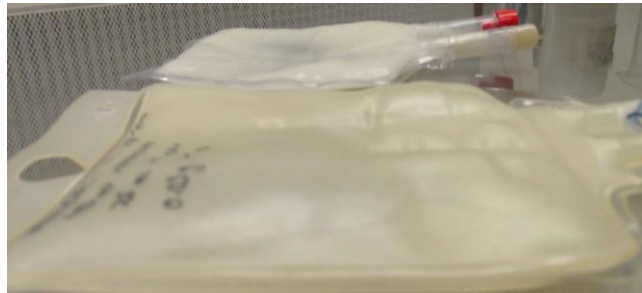


Figura 3.3: Bolsas de biodigestión con bacterias adaptadas

Fue a partir de esta prueba donde se decidió adicionar el medio directamente en las bolsas de biodigestión, pues se notó que el efecto de incubar las bacterias por separado era mínimo.

3.4 Resultados de la adición del medio.

Tras la corrección de los nutrientes hecha después de las primeras pruebas se hicieron los ensayos donde se adicionó el medio basal compuesto de 20 g dextrosa ($C_6H_{12}O_6$), 5 g peptona de caseína, 0.5 g fosfato dipotásico (K_2HPO_4), 25 mg sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) donde los resultados obtenidos fueron favorables.

De acuerdo a los experimentos hechos por Abreu, el efecto de agregar el medio basal directo al sustrato mejoró considerablemente los resultados. Como se observa en la figura número 3.4, dentro de las bolsas de biodigestión se formó un gas llenándolas casi completamente.



Figura 3.4: Bolsas de biodigestión con biogás.

Para la prueba P1-50 donde el sustrato se componía de una mezcla de lactosuero y medio al 50%, los resultados de la producción de gas fueron interesantes, ya que según el análisis del espectrómetro de masas la composición del gas producto fue de aziridina (C_2H_4NH). Como se muestra en la figura 3.5 puede verse el resultado del análisis, donde se muestra que el contenido del gas es prácticamente puro.

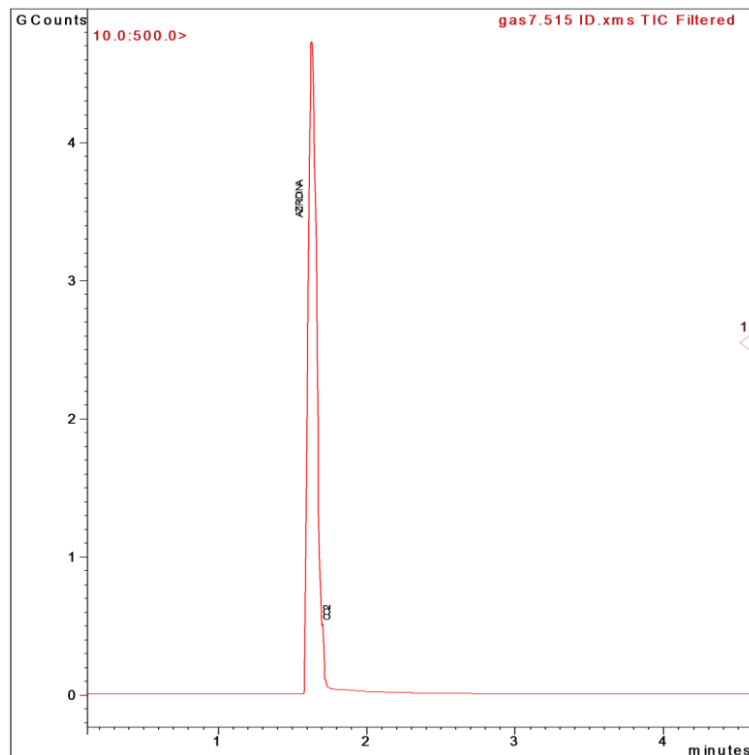


Figura 3.5: Gráfica de aziridina (C_2H_4NH) y dióxido de carbono (CO_2)

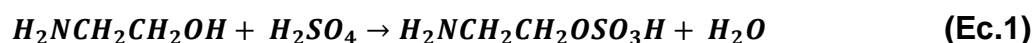
Se cree que la producción de aziridina se detonó a partir de la aplicación del medio basal, pues aceleró la formación de precursores del metano (ácido fórmico, aminas, ácido acético, metanol, hidrógeno y dióxido de carbono) (Graddy *et al.*, 1999; Baserba *et al.*, 2012) y con el exceso de nutrientes las bacterias tomaron las moléculas más sencillas a sintetizar, siendo esta la aziridina. La adición de los nutrientes contenidos en el medio y la corrección de nitrógeno lograron intensificar la producción de uno de los precursores que fue la amina cuya estructura es la más parecida a la de la aziridina.

Según los resultados arrojados por los productos de la metanogénesis los microorganismos completan el proceso de digestión anaerobia mediante la

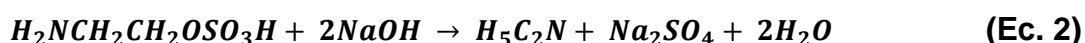
formación de metano a partir de sustratos monocarbonados moléculas que generalmente estén unidas por enlaces covalentes a un carbono como lo son los acetatos, dióxido de carbono, metanol y algunas metilaminas (Baserba *et al.*, 2012). La producción de la aziridina puede explicarse como la producción en exceso de un precursor directo del metano que fue identificado antes de que se terminara la reacción hasta la obtención del metano.

Aunado a esto, las condiciones de reacción no permitieron el reflujo de los gases sobrecargando la atmósfera dentro del sistema de los mismos compuestos con lo que no fue posible la interacción de las bacterias con otro tipo de nutrientes.

Generalmente la aziridina se obtiene por síntesis química en importantes procesos industriales y a partir de diversos compuestos químicos. El proceso más importante de obtención de aziridina es a través de la monoetanolamina (C_2H_7NO) por deshidratación química, como se muestra en la ecuación 1. Los procesos empleados son en dos etapas generalmente, primero se esterifica la etanolamina con ácido sulfúrico del 95% a β -aminoetilsulfúrico. (Weissermel K. y Arpe H. J., 1981)



El semiéster se disocia en la segunda etapa por calentamiento con cantidades estequiométricas de hidróxido de sodio (NaOH) a 220-250°C y 50-80 bars con lo que se produce la ciclación de la imina y se forma sulfato sódico, como se señala en la ecuación número 2 (Weissermel K. y Arpe H. J., 1981).



La aziridina es un compuesto heterocíclico con fórmula molecular C_2H_5N y cuya estructura corresponde a la de un ciclopropano con un grupo metileno sustituido por un átomo de nitrógeno.

La aziridina o etilenimina es un producto de alto interés químico debido a las múltiples aplicaciones que se le puede dar. Es usada como un reactivo sintón en la síntesis orgánica y en la síntesis de péptidos es también una

importante unidad monomérica en las reacciones de polimerización o como un fármaco natural o sintético (Budziz *et al.*, 2012).

Además la aziridina tiene otros usos industriales como en productos de polimerización; como un monómero para la polietilenimina, como un comonómero para los polímeros, por ejemplo con etilendiamina, y en el papel y textiles, se usa también en productos químicos, adhesivos, aglutinantes, productos químicos del refinado del petróleo, combustibles y lubricantes, resinas de revestimiento, barnices, lacas, productos químicos agrícolas, cosméticos, resinas de intercambio iónico, productos químicos fotográficos y tensioactivos (U.S. Department of Health and Human Services).

Recientemente se ha descubierto que algunas formas de aziridinas o compuestos que contienen este radical se pueden usar como agentes quimioterapéuticos para combatir el cáncer en el proceso bioquímico contra este (Budziz *et al.*, 2012).

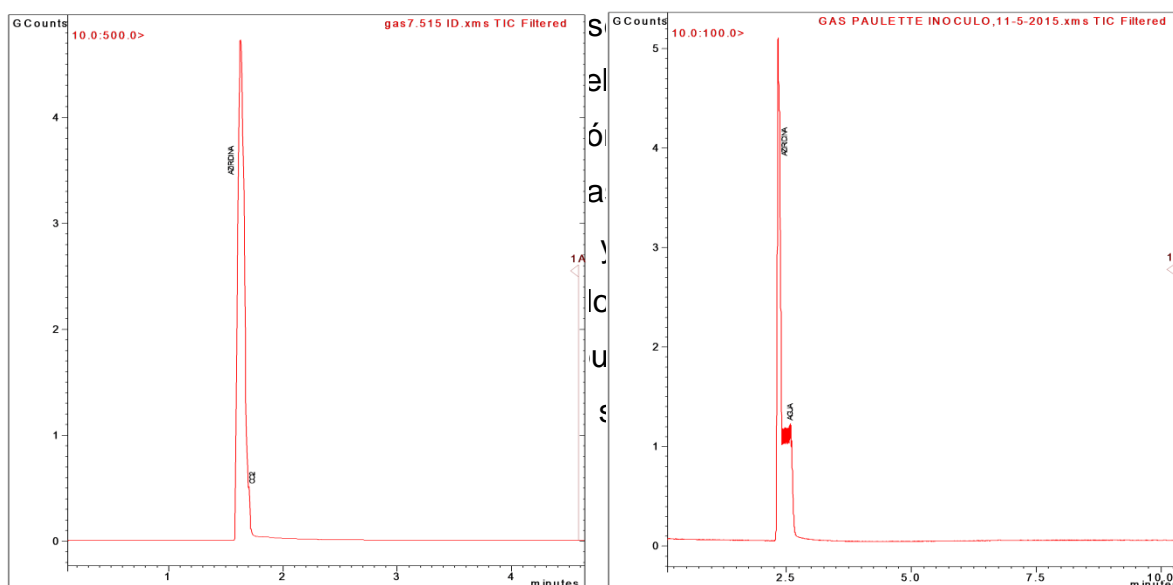


Figura 3.6: Comparación de las gráficas para la prueba P1-50.

Para la prueba P2-30 donde la proporción de medio y lactosuero cambió se obtuvieron nuevamente resultados favorables, si bien disminuyó la proporción del medio, aún se observa una importante formación de aziridina (C_2H_4NH), aunque esta vez se apreció una mayor formación de subproductos crece.

Por ejemplo, en la figura 3.7 se puede ver el análisis del gas que se produjo en la prueba P2-30, donde se apreció que aún hay la producción de aziridina (C_2H_4NH) en su mayor parte, pero también se identificó la presencia de dióxido de carbono (CO_2) y etanol (C_2H_6O) en menor proporción ambos con respecto a la aziridina. Como se puede notar sigue la misma ruta metabólica que cuando la proporción de medio era mayor, solo que el efecto del lactosuero es mayor.

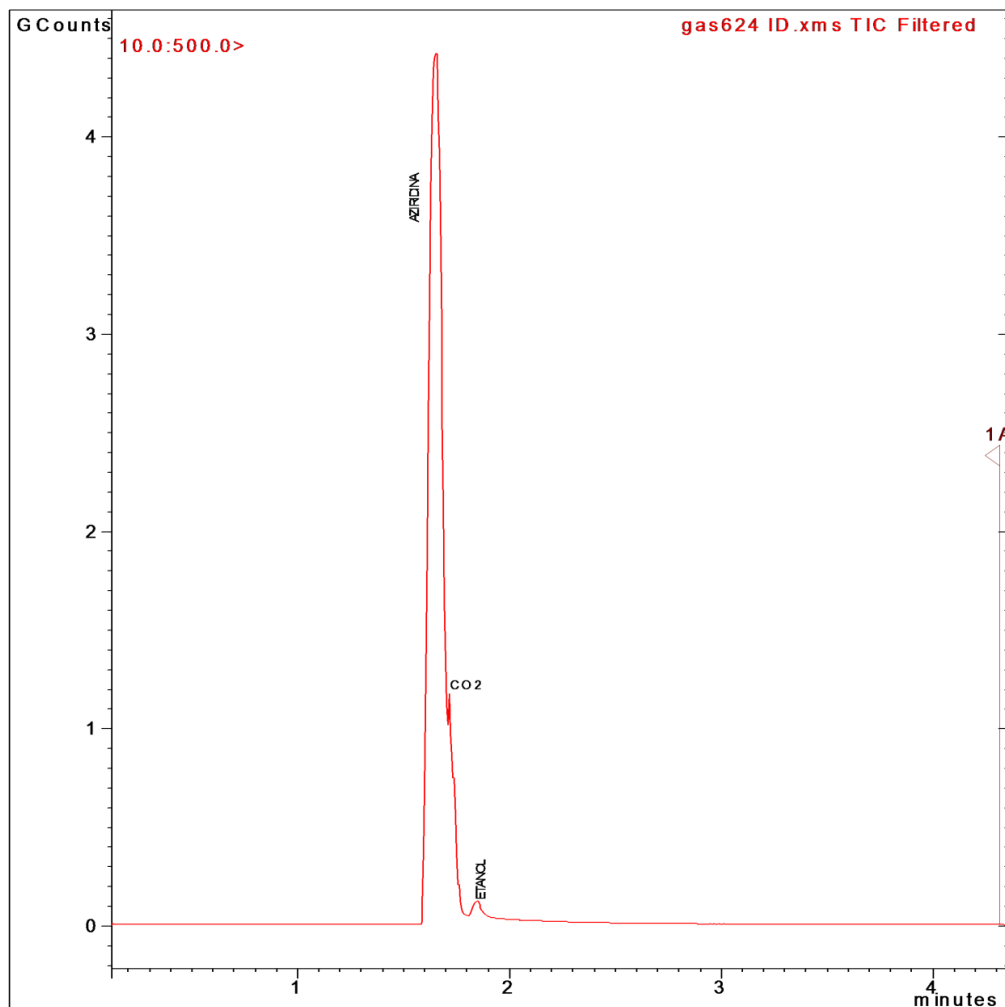


Figura 3.7: Análisis de la prueba P2-30, aziridina (C_2H_4NH), dióxido de carbono (CO_2) y etanol (C_2H_6O).

Al tratarse de una prueba que simula la metanogénesis, es decir, hay condiciones anaerobias, control del pH y rangos de temperatura mesofílicas es normal la obtención de estos subproductos ya que el dióxido de carbono y el

etanol son precursores del metano (Parra H., 2009). Según estudios realizados a los productos obtenidos de la fermentación anaerobia es posible obtener diversos productos como lo son metano (CH₄), hidrógeno, otro tipo de alcoholes y ácidos orgánicos.(Varnero M., 2011)

Finalmente en la prueba P3-00 (ver Figura 3.8), donde se suprimió el uso del medio se vio inhibida completamente la producción de aziridina, produciéndose en su lugar 1-metilurea (C₂H₆N₂O) y algunos subproductos como dióxido de carbono (CO₂) principalmente.

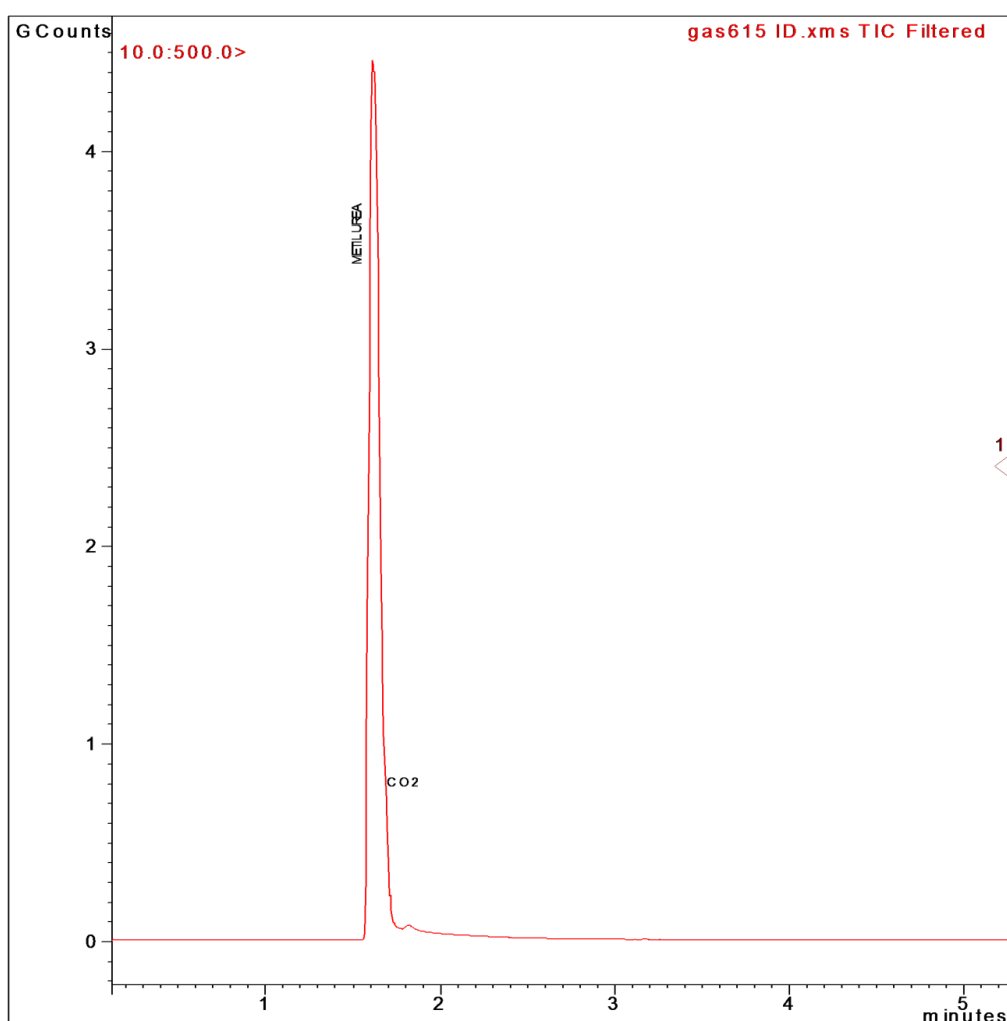


Figura 3.8: Gráfica de metilurea (C₂H₆N₂O) y dióxido de carbono (CO₂)

A partir de los resultados arrojados en la prueba P3-00, se puede decir que si hay efecto del medio mineral en la inhibición de la aziridina, ya que los productos obtenidos fueron completamente diferentes a los anteriores.

El objetivo del medio es propiciar el crecimiento de ciertas bacterias, lo que podemos decir es que al no haber el medio el tipo de bacterias que crecen son distintas a las que hay cuando el medio está presente y por lo tanto las reacciones que causan dentro del sustrato son distintas dando por consiguiente productos diferentes.

Las condiciones propuesta de pH y temperatura en suma con el sustrato de lactosuero y abono de vaca, propiciaron el crecimiento de la enzima ureasa, que es común encontrar en los abonos de bovino y que además está relacionada con la producción directa del la metilurea a ciertas condiciones (Dixon N. *et al.*, 2000).

Bibliografía Capítulo 3

1. Abreu J. S. J. 2013. Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno. Maestro en Ciencias Ambientales. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., p 7-13.
2. Baserba M. G., Angelidaki I., Karakashev D. 2012. Effect of continuous oleate addition in microbial communities involved in anaerobic digestion process. *Biosource Technology*, p 12-16.
3. Budzisz E., Bobka R., Hauss A., Roedel J. N., Wirth S., Lorenz P., Rozalska E., Więckowska M. 2012. Synthesis, structural characterization, antimicrobial and cytotoxic effects of aziridine, 2-aminoethylaziridine and azirine complexes of copper(II) and palladium, *The Royal Society of Chemistry*, Vol. 42, p 5-8.
4. Dixon N., Peter W., Blakeley R. L., Zener B. 1980. Jack bean urease on the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, n-methylurea, and related compounds. *Canadian journal of biochemistry*, Vol. 58, pp 35-44.
5. Ghaly, A. E. 1996. A Comparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in a two-stages reactor. *Biosource technology*, Vol. 61, p 11-14.
6. Grady C. P. L., Daigger G. T., Lim H. C. 1999. *Biological wastewater treatment*. Marcel Dekker Inc., p 13-15.
7. Guerrero, W., Gómez, C., Castro, J., González, C., Santos, E. 2010. Caracterización fisicoquímica del lactosuero en el Valle de Tulancingo. XIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, p 7-10.
8. Parra Huertas R. A. 2012. Anaerobic digestion of whey: effect of high points loads. *Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, Vol. 63, p 11-17.
9. Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Marchant, R., Banat, I.M. 2008. Short communication: lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*, *Bioresource Technology*, Vol. 99, p 13-18.

10. Purvis, W. 2000 Lichens. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, p 15,16.
11. Tango, M. S. A., Ghaly, A. E. 1999. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. *Biomass and Bioenergy*, Vol. 16, p 7-11.
12. U.S. Department of Health and Human Services. Hazardous Substances Data Bank (HSDB, online database). National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD. 1993.
13. Varnero Moreno M. T. 2011. Manual del biogas. Santiago de Chile : FAO, p 20-28, 35-40.
14. Vasala, A., Panula, J., Neubauer, P. 2005. Efficient lactic acid production from salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp. J. *Biotechnology*, Vol. 117, 4, p 7-13.
15. Velazco Bretón E. A. 2014. Modelamiento matemático de la producción de biogás a partir de lactosuero. . Veracruz, México : Universidad de Veracruz, p 30-40.
16. Veyna, S. 2007. *Efecto de control de pH, temperatura y adición de nitrógeno sobre la digestión anaerobia de residuos hortícolas*, Instituto Politécnico Nacional, p 20-35.
17. Weissermel K., Arpe H. J. 1981. *Química orgánica industrial, productos de partida e intermedios más importantes*. Editorial Reverte. España, p 151.

Capítulo 4: Conclusiones

A partir de los análisis hechos al lactosuero bruto se pudo verificar el contenido en nutrientes, proteínas, lactosa y grasa reportados y que según diversos autores son los causantes de los efectos nocivos al medio ambiente.

Se corroboró que el tratamiento del lactosuero sin el control de los diversos parámetros como el pH y la temperatura no es posible.

Se pudo observar que el suero sin pre-tratamiento generó subproductos de bajo interés como la metilurea, aunque aun así son de mayor importancia que el suero solo.

Se pudo comprobar que solo al momento de adicionar ciertos nutrientes se logró la producción de gases, que pudieron ser analizados con el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotometro de masas y que dieron como resultado la identificación de aziridina, un compuesto de alto interés a nivel industrial.

Gracias a la acción del medio mineral se pudo corroborar el efecto que éste tenía en la producción de gases en el tratamiento propuesto para el lactosuero.