



SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

“2019 Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“INFLUENCIA DEL D-LIMONENO COMO INHIBIDOR
DEL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA
PARA PRODUCIR UN BIOENERGÉTICO”.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

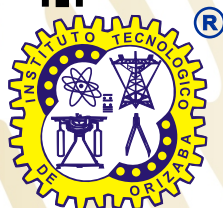
I.Q. Sergio Reyes Rosas

DIRECTOR DE TESIS:

M.I. Norma Alejandra Vallejo Cantú

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan Manuel Méndez Contreras



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

ENERO 2019



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

FECHA: 29/01/2019
DEPENDENCIA: POSGRADO
ASUNTO: Autorización de Impresión
OPCIÓN: I

C. SERGIO REYES ROSAS

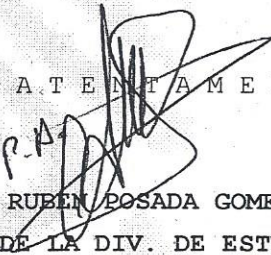
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:
CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"INFLUENCIA DEL D-LIMONENO COMO INHIBIDOR DEL PROCESO DE DIGESTION ANAEROBIA PARA PRODUCIR UN BIOENERGETICO".

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E


DR. RUBÉN POSADA GÓMEZ
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO

C.A. TITULACIÓN

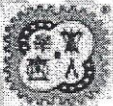


SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO
TECNOLÓGICO
DE ORIZABA

Avenida Oriente 9 Núm. 852, Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, Veracruz; México

Tel. 01 (272) 7 24 40 96, Fax. 01 (272) 7 25 17 28 e-mail: orizaba@itorizaba.edu.mx

www.orizaba.tecnm.mx





SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

FECHA : 24/01/2019

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. DR. RUBEN POSADA GOMEZ
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACION.
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

SERGIO REYES ROSAS

la cual lleva el título de:

"INFLUENCIA DEL D-LIMONENO COMO INHIBIDOR DEL PROCESO DE DIGESTION ANAEROBIA PARA PRODUCIR UN BIOENERGETICO".

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : M. I. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTU

SECRETARIO : DR. JUAN MANUEL MENDEZ CONTRERAS

VOCAL : DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN

VOCAL SUP. : DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO

FIRMA
FIRMA
FIRMA
FIRMA

EGRESADO(A) DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

OPCION: I Tesis



DEDICATORIAS

A **Dios** por el don de la vida, porque nunca me ha abandonado y siempre está presente en los momentos más difíciles de mi vida.

Un agradecimiento singular debo a mis asesores de tesis: A la **Maestra Norma Alejandra Vallejo Cantú** y al **Dr. Alejandro Alvarado Lassman**, que como profesores y directores de este trabajo, en todo momento me han orientado, animado, apoyado y corregido, pero sobre todo por haberme tenido una valiosa e incondicional paciencia.

Al **Dr. Juan Manuel Méndez Contreras** por su amabilidad, por sus consejos y por las asesorías impartidas

A mi alma mater el **Tecnológico de Orizaba**, espero poner siempre muy en alto su nombre y demostrar el gran plantel de talento que es.

A mis padres **Aurelia** y **Andrés**, mis hermanos; **Bernarda, Narcizo, Alejandro, Ramón y Carlos**, y a mi familia en general, por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de estos años, por motivarme aún más en momentos difíciles, por todo muchas gracias.

A mi esposa **Sandra Salas Hernández**, por su comprensión, cariño, paciencia y amor, dándome siempre ánimos para seguir adelante.

A mis compañeros y amigos por su gran apoyo durante la realización de esta tesis así como por su valiosa amistad; **Luis Alfredo, Oscar, Erik, Atenodoro, Erubiel, Víctor, Denisse, Luis Pablo, Paco, Nativitas, Kelvin, Gerardo, Laura, Karina, Diana, Viridiana, Josefina, Dolores** y a todos aquellos que no terminaría por mencionarlos.

RECONOCIMIENTO

A la **Maestra Norma Alejandra Vallejo Cantú** y al **Dr. Alejandro Alvarado Lassman** que han colaborado en el desarrollo de esta investigación como directores de tesis.

A mis revisores, la **Dra. Guadalupe Luna Solano** y **Dr. Juan Manuel Méndez Contreras**, por su amabilidad, por sus consejos, por sus recomendaciones desde el principio de la investigación y por toda su gentileza.

Al **Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza** por las valiosas aportaciones a la investigación y la contribución de los trabajos presentados en los congresos CIM y AMIDIQ.

A **CONACYT** por otorgarme la beca con número de registro **709581**, para realizar mis estudios de posgrado en esta institución.

RESUMEN

Influencia del D-limoneno como inhibidor del proceso de digestión anaerobia para producir un bioenergético

Elaborado por: I.Q. Sergio Reyes Rosas

Dirigido por: M.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú
Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

En la digestión anaerobia de efluentes de la industria citrícola, la producción de metano puede ser inhibida por un compuesto de carácter bactericida de nombre D-limoneno, en esta investigación se desarrollaron pruebas cinéticas de degradación con diferentes concentraciones de D-limoneno. Las pruebas de inhibición por D-limoneno fueron realizadas en dos etapas, la primera etapa se efectuó en cuatro reactores de mezcla completa en modo batch. El objetivo de éstas primeras pruebas consistió en conocer y elegir las dosis idóneas para observar la inhibición del proceso, la cual se analizó de acuerdo con el monitoreo de los parámetros, pH, DQO_s y volumen de biogás acumulado. La segunda etapa fue basada en las relaciones sustrato/biomasa (S_0/X_0) y D-limoneno/Sustrato de la primera etapa que fueron elegidas para mostrar de mejor manera la inhibición, las cuales fueron aplicadas al RLSFI que operó también en modo batch. Los resultados experimentales obtenidos fueron utilizados para la obtención de valores cinéticos los cuales fueron K_m , V_{max} , $K_{m\ ap}$, $V_{max\ ap}$, K_{ii} , K_{ic} y K_i para los modelos de Michaelis-Menten, inhibición no competitiva mixta e inhibición no competitiva pura.

Se encontró que a concentraciones de inhibidor menores a 616 mg/L de D-limoneno, $K_m=1,870$ mg/L, V_{max} por debajo de 124 mg/Lh, K_{ii} en el intervalo de 230-4905, y K_{ic} alrededor de 886 mg/L. Se utilizó también una dosis mayor de 952 mg/L de inhibidor, el valor de K_m es igual a 3600 mg/L aplicados al reactor RLSFI, $V_{max\ ap}$ disminuye con relación a V_{max} del control. Para la validación se compararon promedios de los valores de las constantes $K_{ii}=K_{ic}=K_i= IC_{50}$ de D-limoneno, respectivamente y se obtuvo una correlación mayor con una $R^2=0.9970$.

ABSTRACT

Influence of D-limonene as an inhibitor of the anaerobic digestion process
to produce a bioenergetic

By: I.Q. Sergio Reyes Rosas

Advisor(s): M.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú

Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

In the anaerobic digestion of effluents from the citrus industry, the production of methane can be inhibited by a bactericidal compound called D-limonene, in this investigation kinetic degradation tests were developed with different concentrations of D-limonene. The inhibition tests by D-limonene were carried out in two stages, the first stage was carried out in four reactors of complete mixture in batch mode. The objective of these first tests was to know and choose the appropriate doses to observe the inhibition of the process, which was analyzed according to the monitoring of the parameters, pH, COD and accumulated biogas volume. The second stage was based on the substrate/biomass relationships (S_0/X_0) and D-limonene / Substrate of the first stage that were chosen to show better inhibition, which were applied to the RLSFI that also operated in batch mode. The experimental results obtained were used to obtain kinetic values, which were K_m , V_{max} , $K_{m\ ap}$, $V_{max\ ap}$, K_{ii} , K_{ic} and K_i for the Michaelis-Menten models, non-competitive mixed inhibition and pure non-competitive inhibition.

It was found that at concentrations of inhibitor less than 616 mg/L of D-limonene, $K_m=1,870$ mg/L, V_{max} below 124 mg/L.h, K_{ii} in the range of 230-4905, and K_{ic} around 886 mg/L. A higher dose of 952 mg/L of inhibitor was also used, the value of K_m is equal to 3600 mg/L applied to the RLSFI reactor, $V_{max\ ap}$ decreases in relation to V_{max} of the control. For the validation, averages of the values of the constants $K_{ij}=K_{ic}=K_i=IC_{50}$ of D-limonene were compared, respectively, and a greater correlation was obtained with $R^2 = 0.9970$.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS.....	VII
NOMENCLATURA	VIII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS PARTICULARES:	3
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
1.1 Importancia de la producción de cítricos.....	5
1.1.1 Producción de cítricos en México.....	5
1.1.2 Producción de cítricos en el estado de Veracruz.	6
1.1.3 La Industria cítrica y sus efluentes	7
1.2 La Naranja y su composición.....	9
1.2.1 Valorización de los residuos de la naranja.....	10
1.2.2 Los aceites esenciales de cítricos y sus características.....	11
1.2.3 Características generales del aceite esencial D-limoneno	12
1.4 Digestión anaerobia de los residuos cítricos	13
1.4.1 Hidrólisis.....	14
1.4.2 Acidogénesis.....	15
1.4.3 Acetogénesis.....	15
1.4.4 Metanogénesis.....	15
1.4.5 Efecto inhibitor del D-limoneno en la digestión anaerobia.....	16

1.5	Parámetros de control en la digestión anaerobia.....	17
1.5.1	Temperatura.....	18
1.5.2	Macronutrientes y Micronutrientes	19
1.5.3	Alcalinidad y pH.....	19
1.5.4	Carga volumétrica aplicada (Cva)	20
1.6	Modelos matemáticos en la digestión anaerobia	20
1.6.1	Tipos de Inhibición en la digestión anaerobia	21
1.6.2	Estimación de parámetros biocinéticos	23
CAPITULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS		27
2.1	Preparación del sustrato cítrico	28
2.1.1	Acondicionamiento del sustrato cítrico	29
2.1.2	Caracterización del sustrato de la industria cítrica	29
2.2	Alimentación al reactor RLSFI	30
2.2.1	Operación y monitoreo del RLSFI	31
2.2.2	Medición de pH	31
2.2.3	Determinación de sólidos totales y sólidos volátiles (ST Y SV).....	32
2.2.4	Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO)	33
2.2.5	Medición del biogás y rendimiento de metano	33
2.2.6	Biopelícula en el soporte	34
2.2.7	Determinación de la Materia Volátil Adherida (MVA)	34
2.2.8	Estabilización del RLSFI	35
2.3	Pruebas de inhibición por D-limoneno en la Digestión anaerobia.....	35
2.4	Pruebas de inhibición en reactores de mezcla completa (Etapa I)	36
2.4.1	Acondicionamiento del inóculo anaerobio y el sustrato cítrico	36

2.4.2 Montaje de los experimento de inhibición por D-limoneno	37
2.4.3 Monitoreo de los parámetros.....	38
2.5 Pruebas de inhibición en el RLSFI (Etapa II)	39
2.5.1 Pruebas cinéticas para la cuantificación de la biomasa	39
2.5.2 Monitoreo del RLSFI de modo continuo a modo batch	40
2.5.3 Cinéticas sin inhibidor en RLSFI en modo batch.....	40
2.5.4 Cinéticas con D-limoneno en RLSFI en modo batch.....	41
2.6 Obtención de parámetros biocinéticos.....	41
2.6.1 Modelo lineal de Lineweaver-Burk	41
2.6.2 Modelo de inhibición no competitiva Pura	42
2.6.3 Modelo de inhibición no competitiva mixta	44
2.7 Evaluación de la inhibición por d-limoneno.....	47
2.7.1 Validación de los modelos matemáticos	47
CAPITULO 3 RESULTADOS	49
3.1 Preparación del sustrato cítrico	49
3.1.1 Caracterización del sustrato de la industria citrícola	49
3.2 Operación y monitoreo del RLSFI.....	50
3.2.1 Medición de pH	50
3.2.2 Determinación de sólidos totales y sólidos totales volátiles (ST Y STV) ...	51
3.2.3 Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO)	53
3.2.4 Medición del biogás y rendimiento de metano	55
3.2.5 Biopelícula en el soporte	57
3.2.6 Determinación de la Materia Volátil Adherida (MVA)	57
3.3 Pruebas de inhibición en reactores de mezcla completa (Etapa I)	58

3.3.1 Comportamiento del pH en las pruebas de inhibición	58
3.3.2 Monitoreo de la DQOs en la pruebas de inhibición	59
3.3.3 Monitoreo de biogás en las pruebas de inhibición	61
3.3.4 Réplicas de los experimentos con D-limoneno	62
3.4 Pruebas de inhibición en el RLSFI (Etapa II)	64
3.4.1 Pruebas cinéticas para la cuantificación de la biomasa	65
3.4.2 Monitoreo del RLSFI de modo continuo a modo batch	67
3.4.3 Cinéticas sin inhibidor en RLSFI en modo batch.....	69
3.4.4 Cinéticas con D-limoneno en RLSFI en modo batch.....	74
3.4.5 Proceso reversible en cinéticas sin D-limoneno.....	78
3.5 Estimación de parámetros biocinéticos de las pruebas de inhibición Etapa I..	80
3.5.1 Patrón de inhibición de las pruebas etapa I	81
3.5.2 Obtención de valores biocinéticos etapa I.....	82
3.6 Estimación de parámetros biocinéticos de las pruebas de inhibición Etapa II .	84
3.6.1 Patrón de inhibición de las pruebas etapa II	84
3.6.2 Obtención de valores biocinéticos etapa II.....	85
3.7 Validación de los modelos matemáticos aplicados.....	87
CONCLUSIONES.....	91
RECOMENDACIONES	93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Principales productores de Cítricos en el mundo (FAOSTAT, 2015).....	6
Figura 1.2 Diagrama del proceso de jugo de naranja (Rezaadori et al., 2012).....	8
Figura 1.3 a) CEO en los cítricos b) Estructura Química del D-limoneno.....	11
Figura 1.4 Etapas de la digestión anaerobia (Pavlostathis y Gómez, 1991).....	16
Figura 1.5 Tipos de inhibición en reacciones enzimáticas (Fogler, 2008).....	22
Figura 1.6 Curva de sustrato por el modelo de Michaelis-Menten.....	24
Figura 1.7 Representación lineal de Lineweaver-Burk (doble recíproca).....	25
Figura 2.1 Etapas de la metodología para esta investigación.....	27
Figura 2.2 Obtención del concentrado cítrico de la cáscara de naranja.....	28
Figura 2.3 Reactor RLSFI.....	30
Figura 2.4 Potenciómetro Orion Model 250 ^a	32
Figura 2.5 Determinación de ST y STV.....	32
Figura 2.6 Medición del biogás por cromatografía.....	33
Figura 2.7 Determinación de la MVA.....	34
Figura 2.8 Esquema detallado para el montaje de la pruebas de inhibición.....	38
Figura 2.9 Gráfica de Lineweaver-Burk para inhibición no competitiva pura.....	44
Figura 2.9 Gráfica de Lineweaver-Burk para inhibición no competitiva mixta.....	46
Figura 3.1 Cambio de la placa interna semifluidizada del RLSFI.....	50
Figura 3.2 Monitoreo del pH en el RLSFI.....	51
Figura 3.3 Monitoreo de ST en el RLSFI	52
Figura 3.4 Monitoreo de STV en el RLSFI.....	52
Figura 3.5 Monitoreo de DQO _T en el RLSFI.....	53
Figura 3.6 Monitoreo de DQO _S en el RLSFI.....	54
Figura 3.7 Remociones de la DQO _T y DQO _S	55
Figura 3.8 Producción diaria de biogás en el RLSFI.....	56
Figura 3.9 % de CH ₄ y Y _{CH4} durante el monitoreo del RLSF.....	56
Figura 3.10 Vistas microscópicas del soporte del RLSFI a 40X.....	57

Figura 3.11 Monitoreo de la MVA en el soporte del RLSFI.....	57
Figura 3.12 Comportamiento del pH en las pruebas de inhibición.....	58
Figura 3.13 Degradación del sustrato en las pruebas de inhibición.....	59
Figura 3.14 Tendencia del % DQOs removida.....	60
Figura 3.15 Producción acumulada de biogás en las pruebas de inhibición.....	61
Figura 3.16 % DQOs removida en la pruebas de inhibición.....	62
Figura 3.17 Volumen de biogás en las pruebas de inhibición.....	63
Figura 3.18 Sustrato cítrico centrifugado.....	66
Figura 3.19 Biomasa del reactor EGSB.....	66
Figura 3.20 Monitoreo de STV en pruebas de crecimiento de biomasa.....	67
Figura 3.21 Monitoreo del pH a carga de 15 gDQO/L.d en el RLSFI.....	68
Figura 3.22 % DQOs removida a carga de 15 gDQO/L.d en el RLSFI.....	69
Figura 3.23 Monitoreo del pH en pruebas sin inhibidor en el RLSFI.....	70
Figura 3.24 Monitoreo de la DQOs en pruebas sin inhibidor en el RLSFI.....	71
Figura 3.25 % DQOs removido en las pruebas sin inhibidor en el RLSFI.....	72
Figura 3.26 % CH ₄ y volumen de biogás generado en el RLSFI.....	73
Figura 3.27 Monitoreo de Y _{CH₄} en la pruebas sin inhibidor en el RLSFI.....	74
Figura 3.28 Comparación del pH de pruebas con y sin inhibidor en el RLSFI.....	75
Figura 3.29 Monitoreo de la DQOs removida en las pruebas con inhibidor.....	76
Figura 3.30 % DQOs removida en las pruebas con inhibidor en el RLSFI.....	77
Figura 3.31 % CH ₄ y Y _{CH₄} en las pruebas con inhibidor en el RLSFI.....	78
Figura 3.32 Recuperación de Y _{CH₄} (proceso reversible).....	79
Figura 3.33 Recuperación de % CH ₄ (proceso reversible).....	80
Figura 3.34 Patrón de inhibición de los datos experimentales de la etapa I.....	81
Figura 3.35 Patrón de inhibición de los datos experimentales de la etapa II.....	85
Figura 3.36 Datos modelados vs datos experimentales.....	88

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Producción de cítricos en el estado de Veracruz.....	7
Tabla 1.2 Composición de la Naranja (Cerón-Salazar y Cardona-Alzate, 2011).....	9
Tabla 1.3 Composición química de los CEO (%) en naranja <i>citrus sinensis</i>	12
Tabla 1.4 Propiedades físicas y químicas de D-limoneno (Hazra et al., 2002).....	12
Tabla 1.5 Caracterización de los efluentes de la industria cítrica.....	18
Tabla 1.6 Rangos de temperatura para diversas bacterias (Metcalf y Eddy, 1985).....	18
Tabla 2.1 Micro y Macronutrientes necesarios para el sustrato cítrico.....	29
Tabla 2.2 Características del reactor RLSFI.....	31
Tabla 2.3 Resultados de la operación del RLSFI (Domínguez-Hernández, 2015).....	35
Tabla 2.4 Diseño de fase experimental.....	37
Tabla 2.5 Parámetros empleados para el monitoreo de las pruebas de inhibición.....	39
Tabla 2.6 Condiciones iniciales para las pruebas de crecimiento de biomasa.....	40
Tabla 3.1 Caracterización del Concentrado Cítrico (CC)	49
Tabla 3.2 Caracterización de los efluentes de la industria cítrica.....	49
Tabla 3.3 Condiciones base para las pruebas de inhibición en el RLSFI.....	64
Tabla 3.4 Condiciones nuevas para las pruebas de inhibición en el RLSFI.....	65
Tabla 3.5 Caracterización del sustrato y biomasa.....	66
Tabla 3.6 Cinéticas sin inhibidor en el RLSFI en modo batch 1.....	69
Tabla 3.7 Cinéticas sin inhibidor en el RLSFI en modo batch 2.....	75
Tabla 3.8 Valores biocinéticos experimentales.....	82
Tabla 3.9 Valores biocinéticos optimizados.....	83
Tabla 3.10 Valores biocinéticos experimentales en el RLSFI etapa II.....	86
Tabla 3.11 Valores biocinéticos optimizados en el RLSFI etapa II.....	86
Tabla 3.12 Valores biocinéticos experimentales y optimizados de etapa II.....	87
Tabla 3.13 Coeficientes de correlación modelados vs experimentales etapa I.....	88
Tabla 3.14 Coeficientes de correlación modelados vs experimentales etapa II.....	89

NOMENCLATURA

Abreviatura	Significado	Unidades
AGV's	Ácidos Grasos Volátiles	
CEO	Citrus Essential Oils (por sus siglas en inglés) Aceites Esenciales de los Cítricos	
CC	Concentrado Cítrico	
Cva	Carga volumétrica aplicada	gDQO/L.d
DQO _T	Demanda Química de Oxígeno Total	mg/L
DQO _S	Demanda Química de Oxígeno Soluble	mg/L
K _m	Constante de Michaelis	mg/L
V _{max}	Constante Velocidad Máxima	mg/L.h
K _{m ap}	Constante de Michaelis aparente	mg/L
V _{max ap}	Constante Velocidad Máxima aparente	mg/L.h
K _{ij}	Constante de inhibición	mg/L
K _{ic}	Constante de inhibición que afecta unión IE	mg/L
K _i	Constante de inhibición que afecta complejo ES	mg/L
TRH	Tiempo de Residencia Hidráulica	d
gSV	Gramos de Sólidos Volátiles	gSV
S ₀ /X ₀	Relación Sustrato Biomasa	
MVA	Materia Volátil Adherida	gSV/mL
ST	Sólidos Totales	mg/L
STV	Sólidos Totales Volátiles	mg/L
RLSFI	Reactor de Lecho Semi-fluidizado Inverso	
Y _{CH₄}	Rendimiento de Metano	mLCH ₄ /gDQO _{rem}

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cítricos es una industria importante y componente significativo de la economía, por lo que México es quinto lugar en la producción mundial de cítricos (FAOSTAT, 2015). El 70 % de la producción de cítricos se utiliza para la fabricación de jugos y mermeladas, mientras que aproximadamente el 50-60 % de la fruta procesada se transforma en residuos de cáscara de cítricos (Wilkins et al., 2007). Los residuos cítricos tienen pH bajo de entre 3 y 4, 80 % de agua y 95 % de ST, estas características hacen que los residuos cítricos no deben ser desechados sino que deben llevar una disposición adecuada (Ruiz et al., 2014). Por otra parte se sabe que la industria citrícola al procesar 100 T/h de fruta genera un total de 300,000 L/h de efluentes los cuáles tienen impacto negativo al ambiente (Antonio-Quaia, 2011).

Los aceites esenciales de los cítricos son líquidos volátiles que se encuentran en pequeñas vesículas situadas en la cáscara de los cítricos los cuales presentan propiedades antimicrobianas que son bien conocidos y han sido reportadas y se utilizan con fines medicinales. Los componentes principales son los monoterpenos que representan alrededor del 97 % de los aceites esenciales (Fisher y Phillips, 2008), por esta razón, el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales se le atribuye al aceite esencial D-limoneno, ya que es su componente principal (Bakkali et al. 2008).

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el que la materia orgánica, en ausencia de oxígeno y mediante la acción de un grupo de bacterias específicas, se descompone en biogás, el cuál es una mezcla gaseosa de metano (50 a 70 %) y dióxido de carbono (30 a 50 %) con pequeñas proporciones de otros componentes, como lo son; nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, sulfuro de hidrógeno, y un efluente estabilizado (Acosta et al., 2005). Las ventajas de la digestión anaerobia incluyen niveles bajos de lodos biológicos, los requerimientos de nutrientes bajos, alta eficiencia y la producción de metano, que se puede utilizar para la calefacción y la electricidad (Gunaseelan, 2009). La actividad de las bacterias implicadas en el proceso varía con

su edad, la morfología y la temperatura óptima, sin embargo una amplia variedad de sustancias inhibitoras son la causa principal de la alteración o el fracaso en el rendimiento de los reactores anaerobios (Chen et al., 2008).

En la digestión anaerobia de efluentes de la industria cítrica la producción de metano puede ser inhibida por un compuesto de carácter bactericida, por lo que en recientes investigaciones se ha dado a conocer que en la digestión anaerobia de efluentes cítricos el principal inhibidor es el D-limoneno, el cual es aún objeto de estudio (González-Paz, 2015; Calabrò et al., 2016).

Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue realizar pruebas de inhibición en la digestión anaerobia de un efluente de la industria cítrica, en donde los datos experimentales obtenidos fueron evaluados con modelos matemáticos de tipo enzimático con el fin de mostrar la simulación del sustrato respecto al tiempo.

En el capítulo 1 se presenta el impacto al medio ambiente que provocan los residuos generados de la industria cítrica, se propone la digestión anaerobia como mejor ruta para el tratamiento de los efluentes cítricos así como la obtención de bioenergéticos como beneficio a la sociedad, y por último se analizan los estudios realizados donde el aceite esencial D-limoneno inhibe los procesos de digestión anaerobia.

En el capítulo 2 se presentan los materiales y técnicas que se utilizaron para las pruebas de inhibición por D-limoneno, dichas pruebas se efectuaron en dos etapas distintas pero consecutivas, ya que en la etapa I se realizaron pruebas con concentraciones de D-limoneno como inhibidor sobre biomasa suspendida, de donde los resultados obtenidos sirvieron para la etapa II donde se realizaron pruebas de inhibición sobre biomasa fija en un reactor RLSFI.

Finalmente en el capítulo 3 se presentan los objetivos cumplidos de esta tesis, donde los datos experimentales del capítulo 2 se analizan con los parámetros biocinéticos de los modelos matemáticos, se validan y se define en cuál de ellos se interpretan mejor los resultados.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el grado de inhibición de la digestión anaerobia por la presencia de D-limoneno utilizando un efluente de la industria citrícola.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener el inóculo anaerobio para realizar las pruebas de inhibición.
- Evaluar la inhibición de la digestión anaerobia por D-limoneno en reactores de mezcla completa.
- Modelar la inhibición por D-limoneno de un efluente de la industria citrícola.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Importancia de la producción de cítricos

En la actualidad, los cítricos representan el cultivo de mayor valor e importancia en términos de comercio internacional, esto debido a la gran derrama económica que tiene incluso en su transformación industrial. Existen dos mercados claramente distinguibles dentro de este sector; el mercado de frutos frescos y el mercado de jugos. En el mercado de frutos frescos predomina el comercio de la naranja, sin embargo, en las dos últimas décadas ha aumentado considerablemente el comercio internacional de otros cítricos pequeños, fundamentalmente de tangerinas, clementinas y mandarinas. (SAGARPA, 2015)

1.1.1 Producción de cítricos en México.

México se posiciona en quinto lugar en la producción mundial de cítricos, de 2013 a 2014 se produjeron 7.6 millones de toneladas (FAOSTAT, 2015). La producción de cítricos es una actividad de gran importancia económica y social debido a que se realiza en poco más de medio millón de hectáreas en regiones con clima tropical y sub-tropical en 23 entidades federativas del país. De esa superficie, aproximadamente el 80 % se destina a los denominados cítricos dulces, cuya producción es del orden de 4.9 millones de toneladas por cosecha, principalmente de naranja con 83 % del total, 8 % toronja, 5 % mandarina y 4 % tangerina. El cultivo de cítricos dulces representa una fuente importante de ingresos en las zonas rurales donde se lleva a cabo. Se estima que cerca de 69 mil familias dependen de esta actividad, con un valor superior a siete mil 100 millones de pesos. Los estados de mayor importancia en la producción son Veracruz con 55 % del total nacional, San Luis Potosí y Tamaulipas, que en conjunto representan el 22 % de la superficie sembrada y cosechada, así como Puebla y Nuevo León (SAGARPA, 2015).

En México el cultivo de naranja es una gran fuente industrial además de ser una fuente de ingreso económica para las zonas productoras. Únicamente en 2010, la producción de naranja alcanzó los 4 millones de toneladas, de la cual aproximadamente el 40% se convierte en residuos sólidos. En este contexto la disposición de estos residuos es una gran preocupación ambiental. (López-Velázquez et al., 2013)

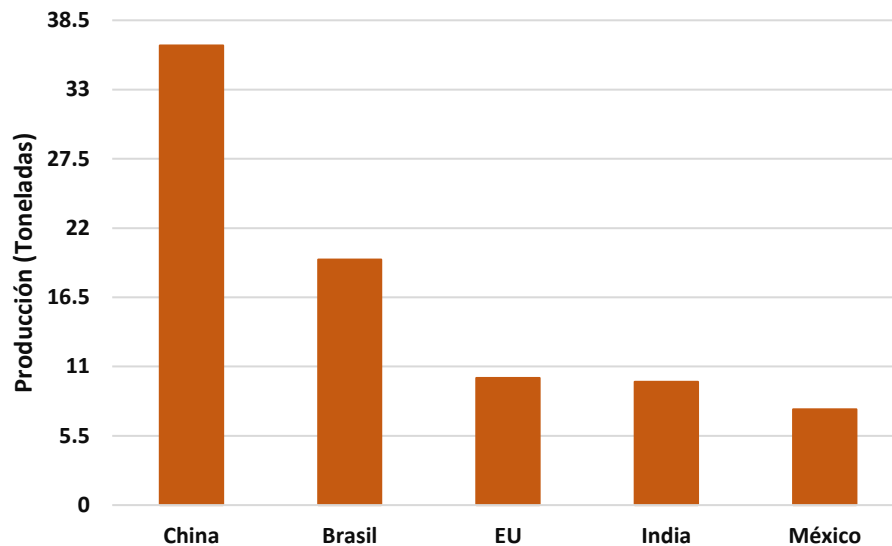


Figura 1.1 Principales países productores de Cítricos en el mundo (FAOSTAT, 2015)

1.1.2 Producción de cítricos en el estado de Veracruz.

En el estado de Veracruz la producción de cítricos es de aproximadamente 2.3 millones de toneladas al año. En la Tabla 1.1 se muestran datos de superficie sembrada y cosechada así como también de los principales municipios productores de cítricos. De esta manera observamos que el cultivo de cítricos es una actividad predominante en muchos municipios del estado (SIAP, 2014).

Por tal razón la industria cítrica se ha establecido principalmente en regiones tropicales y subtropicales en dónde los principales productos son la naranja (*Citrus Sinensis*), ya que tienen condiciones favorables para su correcto crecimiento (Consejo Cítrico Mexicano, 2007).

Tabla 1.1 Producción de cítricos en el estado de Veracruz

Municipio	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)
Castillo de Teayo	10,746.00	9,432,131.76	124, 313.76
Chicontepec	8,000.00	7,980.00	123,690.00
Martínez de la Torre	9,698.00	9,338.00	133,647.00
Papantla	15,470.00	15,425.00	190,800.00
Tehuacán	13,940.00	13,850.00	174,648.50
Álamo Temapache	43,609.50	42,911.50	745,802.00

1.1.3 La Industria cítrica y sus efluentes

La industria cítrica se caracteriza por un consumo elevado de agua durante el proceso de elaboración de sus diferentes productos, mientras que procesa 100 Ton/h de fruta independiente del tipo de proceso, genera un total de 300,000 L/h de efluentes que provienen de diversas etapas del proceso (Antonio-Quaia, 2011).

Debido a la naturaleza misma del proceso en una planta procesadora de jugo de naranja se generan enormes cantidades de aguas residuales. Las aguas residuales provenientes de las industrias cítricas típicamente contienen condensados, agua de lavado y licor proveniente del prensado. La forma más común de tratar este tipo de aguas residuales es usando lagunas o procesos de lodos activados, pero los elevados costos de combustible y electricidad así como la disposición de los lodos ha aumentado enormemente el interés por usar procesos de digestión anaerobia. (Koppar y Pullammanappallil, 2013).

Migliavacca (2011) describe las partes del proceso en una planta cítrica que generan mayor cantidad de efluentes cítricos:

- Procesos de lavado, zaranda y prensado de la cáscara
- Centrífugas del proceso de extracción de aceite esencial y jugos concentrados

- Pre-secador y secador; del proceso de extracción de jugo
- Procesos de lavado de columnas, filtros y planta en general cuando se termina la producción diaria
- Recambio de aguas de lavado

Debido a la naturaleza misma del proceso en una planta procesadora de jugo de naranja se generan enormes cantidades de aguas residuales tal como lo muestra la Figura 1.2.

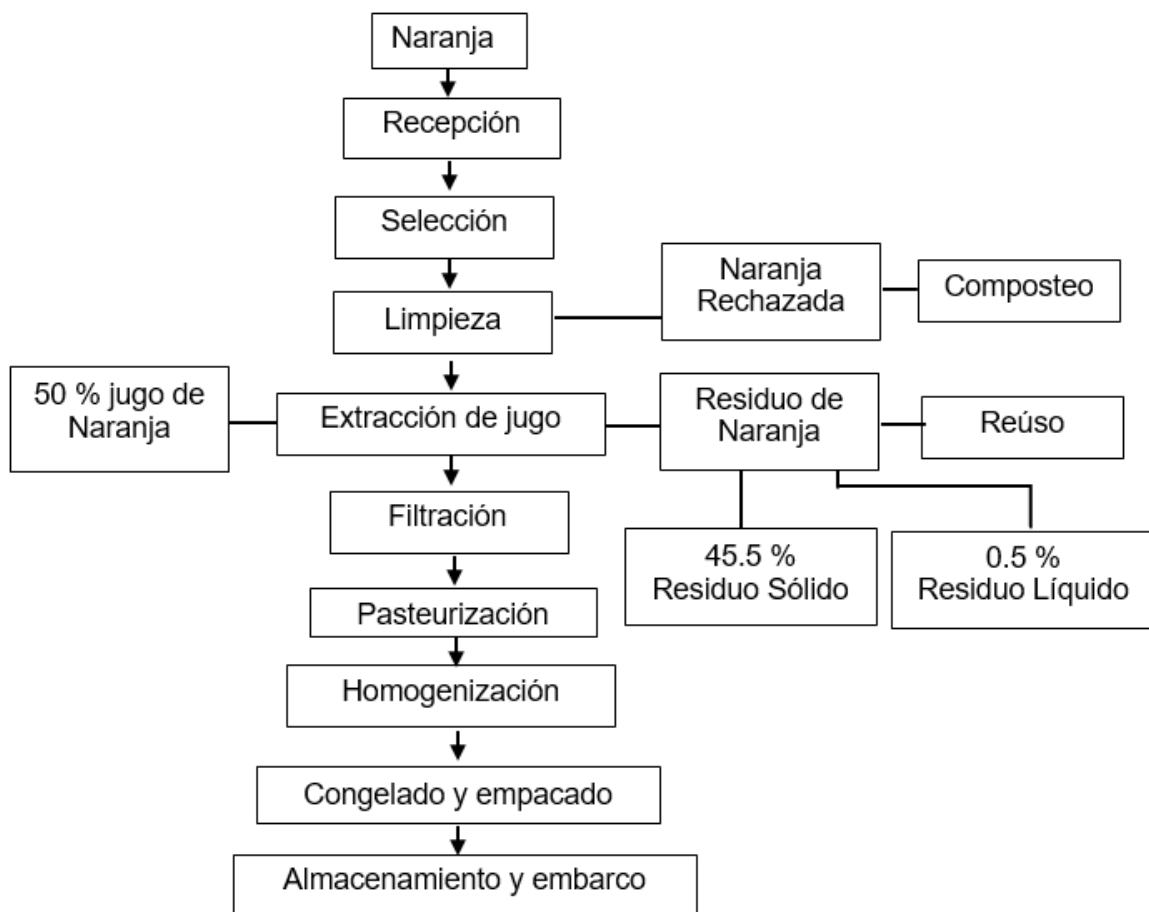


Figura 1.2 Diagrama del proceso de jugo de naranja (Rezaadori et al., 2012)

De esta manera los efluentes procedentes de la industria cítrica presentan una considerable carga orgánica con una alta concentración de sólidos en suspensión, así como valores de pH ácidos. Es por ello que para el tratamiento de estos efluentes se

realiza habitualmente en primer lugar un desbaste de sólidos gruesos, seguido por una homogenización del vertido en balsas abiertas y neutralización del pH para su posterior tratamiento mediante un sistema biológico (Martín et al., 2010).

1.2 La Naranja y su composición

En general la naranja está conformada en una gran cantidad por agua, contiene niveles moderados de proteínas. Los principales carbohidratos incluyen monosacáridos como la glucosa y fructuosa, oligosacáridos como la sucrosa y polisacáridos como las pectinas. La naranja (*Citrus Cinensis*) es una fruta cítrica mayormente consumida en grandes cantidades alrededor del mundo, en su forma natural sin cáscara o como jugo. Es asociada generalmente con un bajo costo y contiene muchos nutrientes incluyendo vitamina C, A y B, minerales (calcio, fósforo y potasio), fibra dietética y muchos fitoquímicos incluyendo flavonoides, aminoácidos, ácidos fenólicos y carotenoides (Rezzadori et al., 2012). De los frutos cítricos todas las partes pueden ser aprovechadas industrialmente, obteniendo como producto principal el zumo del cítrico en forma simple y concentrada. Le sigue en importancia los aceites esenciales, con el 31 % del valor de la producción de la industria cítrica, y la cáscara deshidratada, con el 14 %.

Tabla 1.2 Composición de la Naranja (Salazar y Alzate, 2011)

Parámetro	Valor
Sólidos Solubles (° Brix)	7.1 ± 1.2
pH	3.93 ± 0.03
Total de acidez (g de ácido cítrico / 100 mL)	0.29 ± 0.03
% de Humedad	85.9 ± 1.6
% de Grasas materia seca	1.55 ± 0.17
% de Cenizas materia seca	3.29 ± 0.19
% de Proteínas materia seca	6.16 ± 0.23
% de Carbohidratos materia seca	89 ± 1.1
% de Pectina materia seca	17 ± 5

Los residuos cítricos se componen principalmente de: los residuos generados por la industria de fabricación de jugo, que consiste en la cáscara y la pulpa prensada; la fruta descartada por razones comerciales (fruta dañada); y la fruta descartada debido a las regulaciones que limitan la producción. Este material no se le permite entrar en la cadena alimentaria, por lo que es considerado como desecho. La cantidad de residuos generados depende de la cosecha, ya que es una fracción de la cantidad total de fruta producida. El procesamiento de cítricos para la extracción de jugo produce alrededor de 500 toneladas de residuos por 1,000 toneladas de fruta procesada. El porcentaje de fruta desechada debido a cuestiones comerciales o de regulación es más difícil de calcular, pero varía de 2 % a 10 %, dependiendo del tipo de cítricos considerados y los aspectos ambientales. (Lohrasbi et al., 2010)

1.2.1 Valorización de los residuos de la naranja

Los residuos cítricos tienen pH bajo entre 3 y 4, 80 % de agua y 95 % ST, estas características hacen que los residuos cítricos no deben ser desechados sino que deben llevar una disposición adecuada. Sin embargo, la industria citrícola se enfrenta actualmente en una dificultad en la gestión de sus residuos, debido a la saturación del mercado. Los planes de gestión de residuos no peligrosos no suelen aceptar los residuos cítricos para el compostaje, debido a su bajo pH, la presencia de aceites esenciales que inhiben el proceso de compostaje y la biodegradación rápida de estos residuos. Por otro lado la fabricación de bioetanol a partir de residuos cítricos ha sido recientemente evaluado como una alternativa de valorización, un rendimiento de bioetanol de 50 a 60 L por 1 tonelada de residuos (Boluda-Aguilar y López-Gómez, 2013). Por otra parte, la inversión necesaria para instalar una planta de bioetanol es grande, es por ello que desde el punto de vista de la energía, esta opción de valorización no es tan eficaz como la producción de metano (biogás) a través de la digestión anaerobia de residuos cítricos. Por todas estas razones, la digestión anaerobia es una alternativa sólida para la valorización de los residuos cítricos, sin embargo su aceite esencial inhibe los bioprocesos. (Ruiz y Flotats, 2014)

1.2.2 Los aceites esenciales de cítricos y sus características

Los aceites esenciales de los cítricos o bien los CEO (Citrus Essential Oils, por sus siglas en inglés) son líquidos volátiles que se encuentran en pequeñas vesículas situadas en el flavedo de los cítricos (Figura 1.3 a), los cuales contienen una variedad extremadamente amplia de compuestos orgánicos como el D-limoneno (Figura 1.3 b).



Figura 1.3 a) CEO en los cítricos

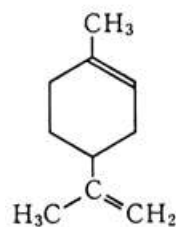


Figura 1.3 b) Estructura química del D-limoneno

Sus propiedades antimicrobianas son bien conocidos y han sido reportadas y se utilizan con fines medicinales por lo menos desde el siglo cuarto. La composición de los CEO varía, por lo general el número de componentes es de entre 20 y 60. De éstos, 85 a 99 % son compuestos volátiles: el restante 15.1 % son compuestos no volátiles. Los compuestos volátiles son una mezcla de monoterpenos (limoneno, entre otros), sesquiterpenos y sesquiterpenoides tales como aldehídos, cetonas, ácidos, alcoholes y ésteres. Los componentes principales son los monoterpenos que representan alrededor del 97 % de los aceites esenciales; alcoholes, aldehídos y ésteres, representan un mayor 1.8-2.2 % de los CEO. (Fisher y Phillips, 2008)

En la literatura existen algunas referencias que dan la composición química de los CEO en la variedad *citrus cinensis* y únicamente en la clasificación de monoterpenos los cuales algunos de ellos se resumen en la Tabla 1.3, donde podemos observar que el componente principal es el D-limoneno ya que en su mayoría presenta los mayores porcentajes respecto a la composición química de los CEO. Es por ello que su concentración en el aceite esencial puede variar entre 32 % y 98 %, dependiendo de

la variedad: 32 a 45 % en la bergamota, el 45-76 % de limón y en este caso particularmente de 68 a 98 % en naranja de variedad *citrus cinensis*.

Tabla 1.3 Composición química de los CEO (%) en naranja *citrus sinensis*

MONOTERPENOS				
	(Moufida y Marzouk, 2003)	(Droby et al., 2008)	(Badee et al., 2011)	(Espina et al., 2011)
D-limoneno	88.19	86.80	96.11	85.50
α-pineno	6.37	0.71	0.15	0.30
sabineno	0	0.39	1.57	0.43
β-pineno	0.08	0	0	0.06
Mirceno	0	2.12	0.04	0.92
p-cimeno	2.36	0	0	0.10

Por esta razón, el efecto antimicrobiano de los CEO se atribuye al aceite esencial D-limoneno, ya que es su componente principal (Bakkali et al., 2008).

1.2.3 Características generales del aceite esencial D-limoneno

El limoneno es un monoterpeno cuya fórmula empírica es $C_{10}H_{16}$. Es un líquido incoloro a temperatura ambiente. Existe como de dos ópticos isómeros D- y L-limoneno. La fragancia de limoneno difiere dependiendo del isómero. El D-limoneno tiene una fragancia de naranja, mientras que la fragancia de L-limoneno es el de trementina. Las propiedades físicas y químicas de limoneno se resumen en la tabla 1.4.

Tabla 1.4 Propiedades físicas y químicas de limoneno (Hazra et al., 2002)

Peso molecular(mol)	136.23
Punto de fusión (°C)	74.35
Punto de ebullición (°C)	175.5 -176.0
Densidad (g/cm ³ a 20 °C)	0.84
Presión de vapor (Pa a 20 °C)	190
Solubilidad en agua (mg/L a 25 °C)	13.8

Otros usos del limoneno incluyen fragancias en cosméticos y productos alimenticios, como un componente en disolventes industriales y aromaterapia. El método de extracción varía dependiendo de la aplicación final (Bakkali et al., 2008).

1.4 Digestión anaerobia de los residuos cítricos

La digestión anaerobia es un tratamiento biológico llevado a cabo en ausencia de oxígeno para estabilizar la materia orgánica mientras se produce biogás, el cual es una mezcla formada principalmente por metano y dióxido de carbono. (Mata- Álvarez et al., 2014).

La digestión anaerobia de los residuos cítricos (cáscara de naranja y aguas residuales) puede producir combustible en forma de gas metano y de la misma manera mitigar el impacto ambiental. La digestión anaerobia puede llevarse a cabo tanto en rangos de temperatura mesofílicos o termofílicos. En temperaturas termofílicas las tasas de degradación y gasificación son más rápidas y tiene mayor potencial de destruir maleza así como plantas patógenas lo cual es especialmente benéfico para el residuo que no se digirió con un breve post tratamiento y así poder regresar sus nutrientes a las tierras de cultivo (Koppar y Pullammanappallil, 2013).

Martín et al. (2010) demostraron que los residuos de cáscara de naranja son un recurso potencialmente valioso que puede ser convertido en productos de alto valor, como el metano. Después de un pre-tratamiento para extraer D-limoneno, la digestión anaerobia de residuos de cáscara de naranja se evaluó a escala laboratorio y piloto bajo condiciones mesófilas y termófilas. El traslado de D-limoneno de 70 % se alcanzó con pre-tratamiento. Los resultados mostraron la conveniencia de condiciones termófilas para el tratamiento de estos residuos como la tasa de producción de metano y la biodegradabilidad fueron más altos que a temperatura mesófila. A escala piloto, se empleó un reactor de tanque agitado continuamente termófila y se trabajó en modo semi-continuo. Fue encontrado que el mejor intervalo de la Cva era de 1.20-3.67 kg DQO/m³.d; el rango más adecuado para trabajar bajo condiciones estables fue de TRH de 25 días.

Martín et al. (2013) realizaron la co-digestión anaerobia de residuos de cáscara de naranja y glicerol en modo semi-continuo, consideraron que podría ser una alternativa interesante en las zonas donde se generan ambos sustratos simultáneamente. Los resultados obtenidos a través de esta investigación revelaron que el proceso de biometanización es más adecuado en condiciones mesófilas donde la producción de metano fue de 0.33 ± 0.051 LCH₄/gSV, y la Cva alcanzó un valor medio de 1.91 ± 0.37 kgSV/m³.d (17.59 ± 2.78 kg mezcla/m³.d). Sin embargo, se observó un fenómeno de inhibición a cargas orgánicas más altas que 2.10 gSV/L debido a la acumulación de ácidos volátiles en los digestores, con la consiguiente disminución en el pH.

Koppar y Pullammanappallil (2013) operaron un digestor anaerobio en un régimen termofílico (55°C) usando como sustrato el residuo proveniente de la cáscara de naranja y de las aguas residuales de la industria cítrica. El tiempo de retención dentro del digestor fue de 25 días y el reactor se operó por 76 días. En promedio la carga orgánica fue de 0.5 kgDQO/m³.d. No se reportó toxicidad debido a la presencia de limoneno. Concluyeron que tanto la cáscara de naranja como las aguas residuales cítricas son una fuente de energía y ofrece un balance positivo tanto económico como energético.

1.4.1 Hidrólisis

Durante la hidrólisis los componentes orgánicos macromoleculares como la celulosa, lípidos y proteínas son transformados hidrolíticamente a sustancias más simples tales como aminoácidos, azúcares y ácidos grasos. Las partículas poliméricas y sustancias coloidales consisten principalmente en carbohidratos, lípidos y proteínas. Estas sustancias poliméricas que son moléculas insolubles consisten en pequeñas moléculas constituyentes unidas entre sí a través de enlaces químicos. Las bacterias hidrolíticas son capaces de romper los enlaces químicos, hidrólisis es la separación (lisis) de compuestos complejos a componentes más fácilmente degradables (Lorenzo, 2005).

1.4.2 Acidogénesis

La acidogénesis involucra la producción de ácidos grasos con bajo número de carbonos como el ácido acético, fórmico, propiónico y butírico a su vez también se genera hidrógeno gas, alcoholes, compuestos orgánicos nitrogenados y algunos compuestos sulfurados, el ácido más importante generado en esta etapa es el acetato. La presencia de compuestos orgánicos nitrogenados y sulfurados se debe a la degradación de aminoácidos y proteínas presentes en el sustrato (Mata- Álvarez et al., 2014).

1.4.3 Acetogénesis

El acetato puede ser producido no solamente por fermentación de compuestos orgánicos también se genera a través de la acetogénesis la cual ocurre simultáneamente junto con la acidogénesis. Aquí en esta etapa muchos ácidos y alcoholes, por ejemplo el butirato, propionato y etanol producidos durante la acidogénesis pueden ser degradados a acetato el cual es usado directamente por las bacterias metanogénicas, si las bacterias metanogénicas por algún motivo no transforman estos ácidos, se genera una acidez en el proceso la cual merma significativamente la producción de biogás (Gerardi, 2003).

1.4.4 Metanogénesis

Las bacterias metanogénicas convierten el acetato a metano y CO₂, o reducen el CO₂ a metano. Estas transformaciones involucran dos tipos de bacterias que son las encargadas de llevar a cabo las transformaciones mencionadas anteriormente: acetotróficas e hidrogenotróficas. En menor proporción, compuestos como el metanol, las metilaminas y el ácido fórmico pueden también ser usados como sustratos del grupo metanogénico (Vaccari et al., 2006). La descomposición de compuestos orgánicos complejos a metano, procede tan rápido como las bacterias metanogénicas sean capaces de convertir los sustratos, generalmente el paso limitante es la producción y asimilación del acetato (Gerardi, 2003).

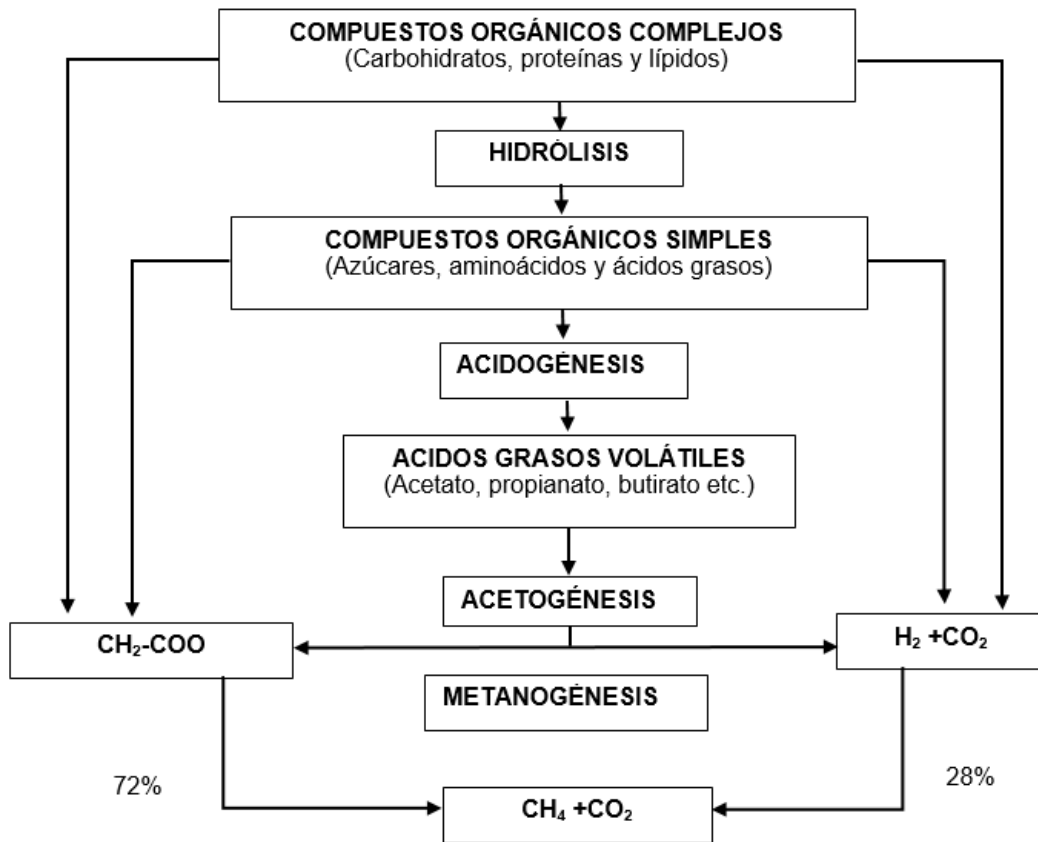


Figura 1.4 Etapas de la digestión anaerobia (Pavlostathis y Gómez, 1991)

1.4.5 Efecto inhibitor del D-limoneno en la digestión anaerobia

Se ha demostrado que el D-Limoneno inhibe al bioproceso de digestión anaerobia, ya que este aceite esencial tiene un efecto bactericida hacia las bacterias hidrolíticas, acidogénicas, y metanogénicas (Forgács et al., 2011).

González-Paz (2015), utilizó un reactor híbrido (FA/RLFI), alimentado con un efluente cítrico, observando una remoción 50-70 %, pH 4-6 y rendimiento de metano 0.25-0.05 LCH₄/gDQO_{rem}, trabajando con carga de 8 gDQO/L.d, se logró mantener la remoción; sin embargo, el rendimiento de metano fue bajo, consideró que una de las causas a esto puede ser por la elevada concentración de SST, SSV y al pH ya que diversos autores atribuyen la inhibición a la digestión anaerobia por la elevada concentración

de sólidos y la acumulación de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's), concluyó que debido a la composición del sustrato en las aguas residuales cítricas el potencial inhibitor puede ser el aceite esencial en su mayoría D-limoneno.

Domínguez-Hernández, (2016), operó en continuo por 190 días un Reactor de Lecho Semi-fluidizado Inverso (RLSFI) alimentándolo con sustrato cítrico, logró llegar a operar con Cva de hasta 40 gDQO/L.d sin mostrar problemas de acidificación, con remociones de DQO de hasta el 60 %, alcanzando producciones de biogás diarias de hasta 30 L, de esta manera demostró que operar los RLFI en régimen semi-fluidizado trae consigo el aumento de remoción, estabilidad biológica y capacidad de tratamiento con altas cargas orgánicas, además en esas condiciones de operación no observó el efecto inhibitor del D-limoneno.

Calabrò et al. (2016) realizaron pruebas de biodegradabilidad, y mostraron resultados que indican que la cáscara de naranja puede producir hasta aproximadamente 0.37 LCH₄/KgSV en condiciones mesófilas y hasta aproximadamente 0.30 LCH₄/KgSV en condiciones termófilas. Concluyeron que La presencia de cada vez más altas concentraciones de aceite esencial inhibe la producción de metano, pero de acuerdo con los resultados de los ensayos por lotes, se reinició la producción de metano, mientras que D-limoneno fue parcialmente degradado a través de una vía que requiere su conversión en p-cimeno como el principal intermedio.

1.5 Parámetros de control en la digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un tratamiento biológico llevado a cabo en ausencia de oxígeno para estabilizar la materia orgánica mientras se produce biogás, el cual es una mezcla formada principalmente por metano y dióxido de carbono. (Mata- Álvarez et al., 2014).

La producción de metano puede ser inhibida por los parámetros ambientales (Temperatura y pH), pero también por la presencia de un compuesto tóxico para los

microorganismos. Pero no todos los microorganismos se ven afectados de la misma forma por los mismos compuestos; los inhibidores pueden ser especies que interactúan con los microorganismos, ocasionando que sean ineficientes para catalizar una reacción específica, la presencia del inhibidor puede causar que el microorganismo ya no participe en su ruta metabólica y ocasionar que toda la ruta deje de funcionar (Calabrò et al., 2016).

Kaparoju y Rintala (2010) y González-Paz (2015) realizaron la digestión anaerobia utilizando como sustrato efluentes de la industria cítrica, previamente caracterizados, los resultados de la caracterización se muestra en la tabla 1.5.

Tabla 1.5 Caracterización de los efluentes de la industria cítrica

Parámetro	Kaparoju y Rintala (2010)	González-Paz (2015)
pH	3.5	4.1
ST (%)	11.6	19.36
STV (%)	95.4	95.4
DQO _T (g/L)	92	28.38
DQO _S (g/L)	164	34.64

1.5.1 Temperatura

La mayoría de las bacterias formadoras de metano son activas en dos rangos de temperatura. Estos rangos son la gama mesófila 30-35 °C y la gama termofílica de 50 a 60 °C. Cabe destacar que cuanto mayor sea la temperatura, mayor es la tasa de destrucción de los sólidos volátiles y la producción de metano (Ruiz y Flotats, 2014).

Tabla 1.6 Rangos de temperatura para diversas bacterias (Metcalf y Eddy, 1985)

Tipo	Intervalo óptimo (°C)
Psicrófilas	12-18
Mesófilas	25-40
Termófilas	55-65

1.5.2 Macronutrientes y Micronutrientes

Las necesidades de nutrientes para las bacterias en el tratamiento biológico pueden ser agrupadas como macronutrientes y micronutrientes, ya que existen diferencias significativas en las necesidades de nutrientes.

Los macronutrientes nitrógeno y fósforo, son nutrientes que son requeridos en cantidades relativamente grandes de todas las bacterias. Los micronutrientes como cobalto y níquel, son nutrientes que se requieren en cantidades relativamente pequeñas por la mayoría de las bacterias. Alvarado-Lassman et al., (2008) estudiaron la adición de nutrientes para mantener la estabilización de un reactor tipo LFI, observaron una recuperación rápida en el arranque, después retiraron la adición de los nutrientes y oligoelementos y en consecuencia los valores de pH y la remoción de DQO cayeron drásticamente, observaron que la ausencia de nutrientes y oligoelementos afecta principalmente a las bacterias metanogénicas con una disminución significativa en la producción de biogás.

1.5.3 Alcalinidad y pH

La alcalinidad es esencial para el control adecuado de pH. La alcalinidad sirve como un tampón que impide un cambio rápido en el pH. La actividad enzimática es influenciada por el pH. Es aceptable considerar que la actividad enzimática de las bacterias productoras de ácido se produce por encima de pH 5, pero la actividad enzimática aceptable de las bacterias formadoras de metano no se produce por debajo de pH 6.2. La mayoría de las bacterias anaerobias, incluyendo las bacterias formadoras de metano, se desempeñan bien dentro de una gama pH de 6.8 a 7.2. (Gerardi, 2003).

El pH de un sistema anaerobio es afectado significativamente por el contenido de dióxido de carbono del biogás. La estabilidad de un digestor se ve reforzada por una concentración elevada de alcalinidad. Una disminución de la alcalinidad por debajo del nivel de funcionamiento normal se ha utilizado como un indicador de fracaso. Una

disminución de la alcalinidad puede ser causada por ciertas razones, por lo tanto un descenso en la alcalinidad por lo general precede a un rápido cambio en el pH. (González-Paz, 2015).

1.5.4 Carga volumétrica aplicada (Cva)

La carga orgánica es uno de los parámetros más útiles para describir las condiciones de alimentación (concentración y volumen), ya que si se pretende que el proceso sea continuo es importante determinar la cantidad de materia orgánica al alimentar en un determinado Tiempo de Residencia Hidráulica (TRH), de lo contrario se excede la carga orgánica ocasionando que el proceso se desestabilice debido a que las bacterias acidogénicas produzcan ácidos rápidamente provocando una disminución del pH y las metanogénicas no podrían consumir éstos ácidos a la misma velocidad de producción, si el pH disminuye se inhiben las bacterias metanogénicas y se detiene el proceso de la digestión anaerobia. Un indicador de esto sería la baja producción de biogás en un pH ácido (González-Paz, 2015).

1.6 Modelos matemáticos en la digestión anaerobia

En un proceso biológico es necesario analizar los sistemas complejos que lo forman, por ello se han desarrollado modelos matemáticos, los cuales permiten la representación de los aspectos principales que ocurren en el proceso de digestión anaerobia. La ventaja de los modelos matemáticos es que mejoran la comprensión, la formulación y validación de algunas hipótesis, la predicción del comportamiento a diferentes condiciones. De esta manera se logran reducir los requerimientos de información experimental, los costos, el riesgo y el tiempo (Ruiz y Flotats, 2016).

Los modelos cinéticos tipo Monod han sido ampliamente utilizados para describir el proceso cinético de reactores anaerobios. Aunque ha habido algo de éxito en la aplicación de la cinética de tipo Monod en digestión anaerobia, algunos investigadores tuvieron dificultades para aplicarlos para sus trabajos (Martín et al., 1994; Hu et al., 2002).

Siles et al. (2008), determinaron tres constantes cinéticas, K_0 de la materia orgánica a productos intermedios, K_1 de productos intermedios a AGV's y K_2 de AGV's a metano, para la digestión anaerobia de agua residual del proceso de prensado de cáscara de naranja. Los valores de K_0 fueron $0.85 - 0.18 \text{ h}^{-1}$, para $K_1 = 0.90 - 0.30 \text{ h}^{-1}$ y $K_2 = 0.50 - 0.15 \text{ h}^{-1}$. Concluyen que las constantes disminuyen con el aumento de carga orgánica, mostrando inhibición. El decremento más pronunciado fue para K_0 , lo cual indica que la hidrólisis es el paso más afectado por la inhibición.

Martín et al. (2010), encontraron siete constantes cinéticas ($K_0, K_1, K_2, K_3, K_4, K_5$ y K_6) con un modelo más detallado al de (Siles et al., 2008). Concluyen que la mejor relación inóculo/sustrato fue $1.70 - 1.75 \text{ gSSV/gDQO}$ y que el fenómeno de inhibición ocurre cuando disminuye la relación inóculo/sustrato.

En general, los objetivos más importantes de utilizar un modelo matemático son; comprender el comportamiento del sistema y la interacción de los componentes, expresar cuantitativamente o verificar una hipótesis y predecir el comportamiento del sistema en el futuro o bajo otras circunstancias similares (Jakeman et al., 2006).

1.6.1 Tipos de Inhibición en la digestión anaerobia

Los inhibidores son moléculas que interfieren disminuyendo la velocidad de las reacciones. Los tipos de inhibición pueden ser identificados según como (Fogler, 2008), quien menciona que los tres tipos más comunes de inhibición reversibles que ocurren en reacciones enzimáticas son básicamente:

- **Inhibición competitiva;** el sustrato y el inhibidor suelen ser moléculas similares que compiten por el mismo sitio en la enzima.
- **Inhibición no competitiva;** el inhibidor desactiva el complejo enzima-sustrato, en ocasiones adhiriéndose con las moléculas de sustrato y la enzima del complejo.

- **Inhibición no competitiva mixta;** sucede cuando las enzimas contienen por lo menos dos tipos de sitios distintos.

En la Figura 1.5 se muestran los comportamientos gráficos de cada uno de los tipos de inhibición reversibles.

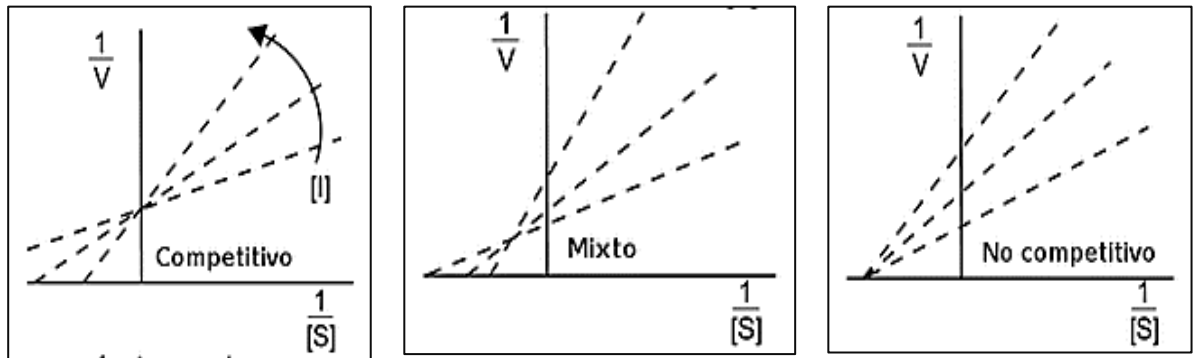


Figura 1.5 Tipos de inhibición en reacciones enzimáticas (Fogler, 2008)

Una sustancia puede juzgarse inhibitoria cuando la tasa de crecimiento de alguno o algunos de los grupos microbianos involucrados es disminuido o se detiene totalmente, produciéndose un cambio adverso en la población en general (Ward et al., 2008).

Los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia trabajan dentro de estrechos niveles de presión de hidrógeno, temperatura, concentración de sustrato, contenido de sulfato, entre otros. Debe tomarse en cuenta que las bacterias formadoras de ácido y los microorganismos productores de metano difieren ampliamente en términos de fisiología, necesidades nutrimentales, cinética de crecimiento y por lo tanto la sensibilidad que cada uno ofrece a las condiciones ambientales es muy variable (Chen et al., 2008).

Una gran variedad de compuestos orgánicos se ha reportado que pueden inhibir los procesos anaerobios. Entre los compuestos orgánicos que se han reportado tóxicos a este proceso se incluyen alquilbencenos, nitrobencenos, bencenos halogenados,

alcoholes y fenoles, alcanos, éteres, aminas, amidas, y también los ácidos grasos de cadena larga han reportado efectos adversos en la degradación anaerobia. Todas las causas de la inhibición pueden ser evitadas en primera instancia cuando se consideran los parámetros operacionales y de diseño y su relación y/o efecto con la microbiología del proceso, ya que los factores ambientales internos del reactor se ven fuertemente influenciados por las características del mismo. Un control sobre estas variables puede asegurar un proceso favorable (Ward et al., 2008).

1.6.2 Estimación de parámetros biocinéticos

La estimación y utilización de las constantes biocinéticas es útil para predecir la eficiencia de un proceso biológico y, de esta manera, poder diseñar los biorreactores de manera adecuada (Donoso-Bravo, 2011).

El modelo tipo enzimático de Michaelis-Menten (Ecuación 1.1) simula el comportamiento de una reacción enzimática en condiciones ideales, es decir sin inhibición y al mismo tiempo permite obtener parámetros biocinéticos como pauta para el estudio de tipos de inhibición reversibles (Lehninger, 2002).

El modelo de Michaelis-Menten en forma gráfica se presenta en la Figura 1.6, donde la curva es una hipérbola rectangular que pasa por el origen y, cuyas asíntotas son $[S] = K_m$ y $V = V_{max}$.

$$v = \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad 1.1$$

Donde:

V = Velocidad de reacción en un tiempo determinado (mg/L.h)

$[S]$ = Concentración inicial de sustrato (mg DQO_S/L)

t = Tiempo (h)

V_{max} = Velocidad máxima de reacción (mg/L.h)

K_m = Constante de Michaelis (mg/L)

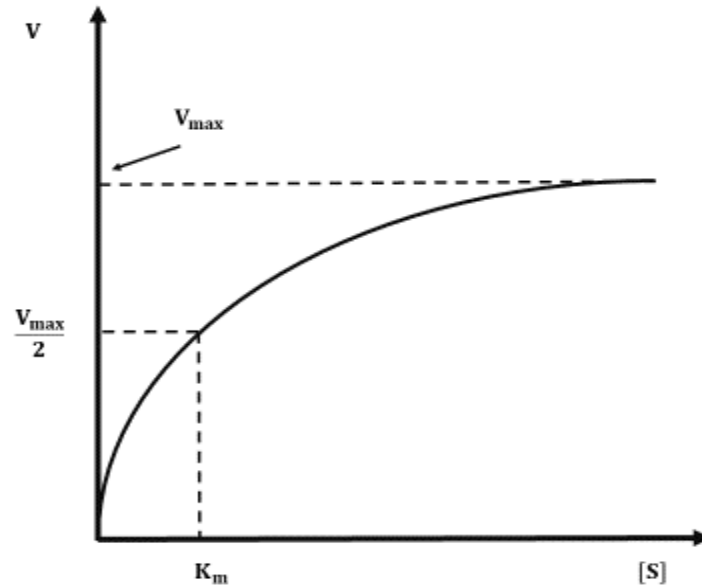


Figura 1.6 Curva de sustrato por el Modelo de Michaelis-Menten (Lehninger, 2002).

Diversos métodos han sido propuestos para determinar K_m y V_{max} en forma gráfica: Hanes-Woolf, Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk, etc. Todos ellos se basan en modificaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para que responda a la ecuación de una recta. (Nelson y Cox, 2008)

Partiendo del método de la doble inversa (Lineweaver-Burk), se invierte y reordena el modelo de Michaelis-Menten y así se obtiene la linealización del modelo de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad 1.2$$

Donde:

$1/v$ = Corresponde a los valores del eje “y”

K_m/V_{max} = Es la pendiente “m”

$1/[S]$ = Corresponde a los valores del eje “x”

$1/V_{max}$ = Es la ordenada al origen “b”

Al graficar $1/v$ en función de $1/[S]$ se obtiene la Figura 1.7. De la intersección de la recta con la ordenada se obtiene $1/V_{\max}$ y de la intersección de la recta con la abscisa se obtiene $-1/K_m$.

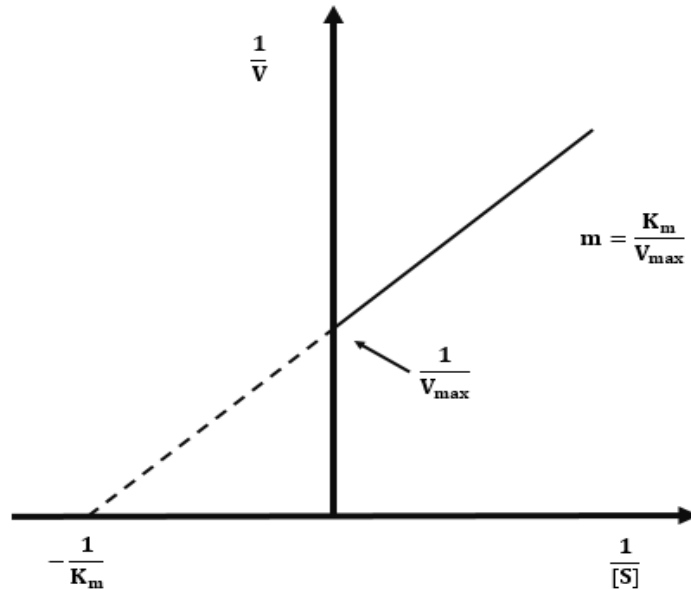


Figura 1.7 Representación lineal, doble recíproca de Lineweaver-Burk. (Lehninger, 2002)

La ventaja del uso del método de la doble recíproca respecto a los otros métodos gráficos radica en la determinación más precisa de V_{\max} y por su gran utilidad para el análisis y determinación del tipo de inhibición. (Chen et al., 2014)

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPITULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 2.1 se presentan de manera general las etapas de la metodología, los cuales se aplicaron en ése orden para el cumplimiento de los objetivos establecidos para la presente investigación.

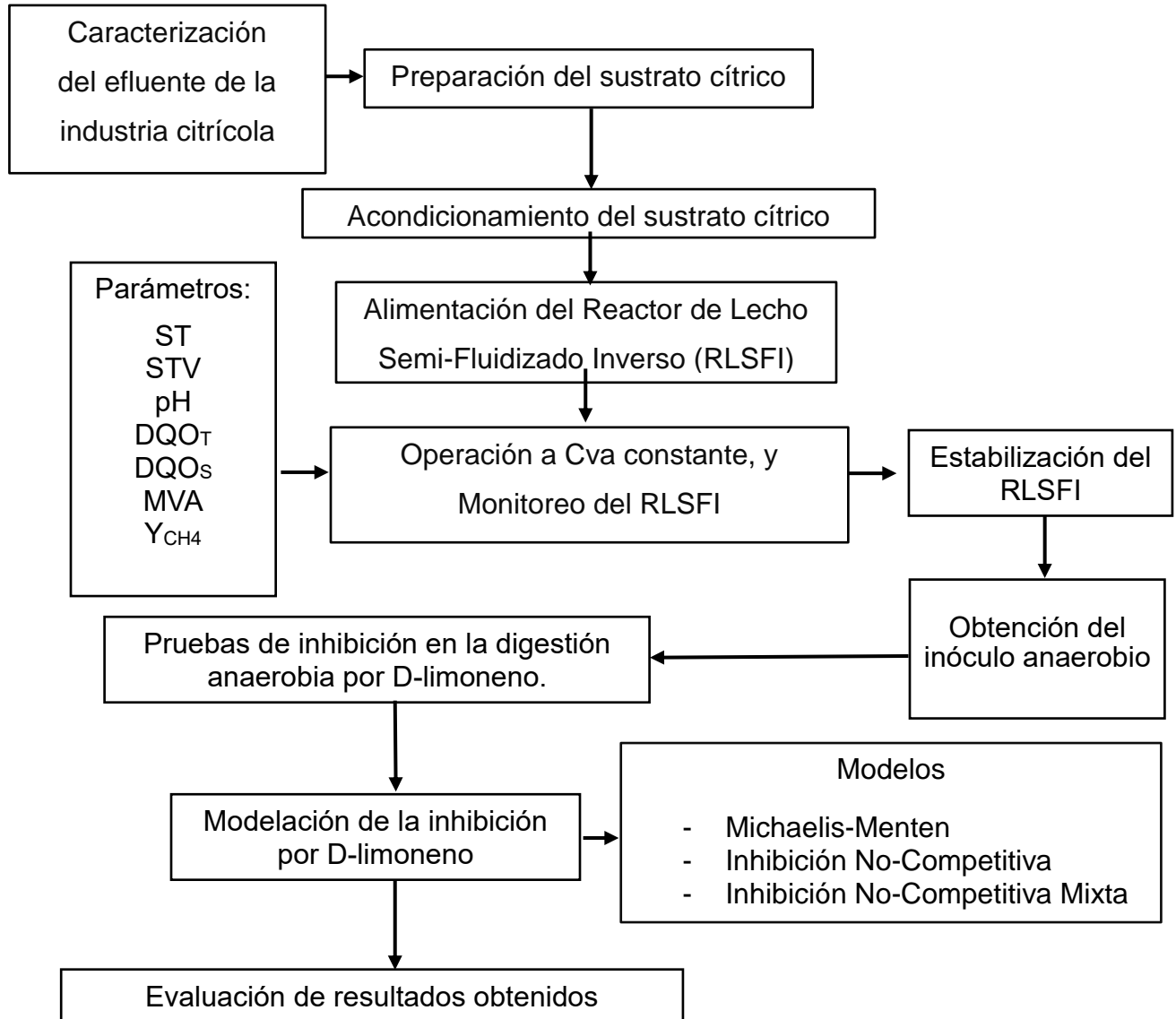


Figura 2.1 Etapas de la metodología para esta investigación.

2.1 Preparación del sustrato cítrico

Para la alimentación del reactor RLSFI se realizó un sustrato cítrico con las características semejantes al efluente de la industria cítrica. Para ello se utilizó cáscara de naranja (*Citrus Sinesis*) el cual se adquirió en locales de venta de jugo natural, ya que en ellos se sabe que no le dan ningún uso y comúnmente es desechado.

Una vez recolectadas las mitades de cáscaras de naranja se les retiraron las semillas y también se les aplicó un exprimido manual con el fin de retirar jugo aun contenido entre los gajos, este paso fue importante ya que el jugo de naranja eleva aún más la acidez del concentrado que se busca obtener. Una vez picadas las cáscaras manualmente con una cuchilla se procedió a una molienda con una licuadora casera, para ello se aplicó una proporción de 3 naranjas en 1 L de agua. Posteriormente se aplicó un tamizado en una coladera y por último se filtró en un tamiz de poro fino de tela. De esta manera se obtuvo el Concentrado Cítrico (CC) como sustrato requerido para ser alimentado al RLSFI.

Fue necesario acondicionar el pH con el uso de bicarbonato de sodio comercial como agente neutralizante (González-Paz, 2015).



Figura 2.2 Obtención del concentrado cítrico de la cáscara de naranja

2.1.1 Acondicionamiento del sustrato cítrico

Por razones de que el sustrato cítrico no ofrece todos los elementos nutricionales que necesita el consorcio bacteriano para desarrollarse y observar buenas remociones de DQO y rendimiento en el reactor, se adicionaron micro y macronutrientes en concentraciones y relaciones de 3,000 mg/L aumentándose la concentración de los micronutrientes a 10X y a 50X para los macronutrientes (Michaud et al., 2001).

Tabla 2.1 Micro y Macronutrientes necesarios para el sustrato cítrico

Componente	Sustancia	Concentración (g/L)
Micronutrientes	Cloruro de Potasio (KCl)	0.005
	Cloruro de Cobalto (CoCl ₂)	0.001
	Cloruro Ferroso (FeCl ₂)	0.005
	Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	0.005
Macronutrientes	Cloruro de Amonio (NH ₄ Cl)	6.250
	Fosfato Monobásico de Potasio (K ₂ HPO ₄)	75.000
	Fosfato Dibásico de Potasio (KH ₂ PO ₄)	45.000

2.1.2 Caracterización del sustrato de la industria citrícola

Se contó con una muestra de efluente de la industria citrícola otorgado por una empresa citrícola ubicada en Martínez de la Torre, Ver., dicha muestra fue caracterizada en pH, DQO_T y DQO_s.

En una primera etapa la muestra se utilizó en su forma bruta para realizar las primeras pruebas de inhibición por D-limoneno en un total de 72 horas, donde se monitorearon únicamente pH, DQO_s y volumen de biogás generado. En segunda etapa se realizaron otras pruebas cinéticas para cuantificar el crecimiento de biomasa en términos de STV, para ello la muestra bruta de la industria citrícola fue centrifugada a 3500 rpm durante 5 min, con el fin de obtener una muestra más fina y de esta manera en las pruebas obtener datos más precisos para la cuantificación de la biomasa.

2.2 Alimentación al reactor RLSFI

A escala laboratorio se utilizó un Reactor de Lecho Semi fluidizado Inverso (RLSFI) ubicado en el laboratorio de ingeniería ambiental I de la división de estudios de posgrado e investigación del Instituto Tecnológico de Orizaba, el cual fue alimentado con sustrato cítrico, este reactor fue implementado y operado por Domínguez-Hernández (2016) durante 190 días. Por lo que se procedió a continuar su operación y monitoreo a Cva constante.

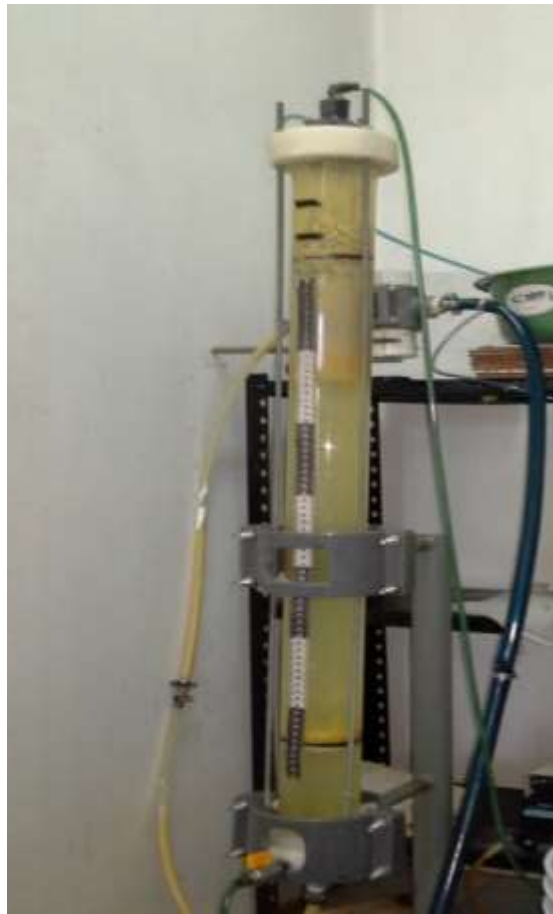


Figura 2.3 Reactor RLSFI (Domínguez-Hernández, 2016)

Las características que se encontraron para la continuidad en alimentación y operación de éste reactor fueron los siguientes.

Tabla 2.2 Características del reactor RLSFI (Domínguez-Hernández, 2016)

Forma geométrica	Cilindro Alargado
Altura total	97 cm
Diámetro	7 cm
Material	Acrílico
Tipo	Lecho Semifluidizado
Tipo de soporte	Extendosphere
Cantidad de soporte	10%

Como podemos ver en la tabla 2.2 y de acuerdo con Domínguez-Hernández (2016), se contó con 1 L de soporte equivalente al 25 % del reactor, sin embargo luego de más de 6 meses en operación continua y sin control de los parámetros fisicoquímicos, se encontró que el reactor ya solo contaba con el 10 % de soporte, por lo que se procedió en su operación por un periodo de 70 días más controlando los parámetros, esto con el fin de estabilizar el reactor en esas condiciones encontradas.

2.2.1 Operación y monitoreo del RLSFI

Para fines de esta investigación fue necesario re estabilizar al RLSFI, con el fin de dar el primer paso para efectuar este proyecto, se realizó en un periodo de 35 días el monitoreo de los parámetros físicos y químicos en la alimentación y en la salida del reactor así como también la composición de biogás, pero con la condición de que se contó únicamente con el 10 % de soporte. Posteriormente se continuó la operación adicionando soporte limpio y logrando así en el interior del RLSFI aproximadamente el 30 % de medio de soporte.

2.2.2 Medición de pH

La determinación del pH se realizó con un potenciómetro Orion Model 250A al influente, interior y efluente del reactor.



Figura 2.4 Potenciómetro Orion Model 250^a

Cabe destacar que el pH del influente (sustrato) fue en cada lote de alimentación amortiguado con bicarbonato de sodio comercial.

2.2.3 Determinación de sólidos totales y sólidos volátiles (ST Y SV)

La determinación de sólidos totales y volátiles se realizó por el método gravimétrico según la norma NMX-AA-034-SCFI-2001, en una Mufla Furnace 1300 (Barnstead/thermolyne) para calcinación y con una estufa Riossa, modelo: H-33 para la eliminación de humedad, los resultados fueron reportados en mgST/L y mgSTV/L determinándose en el lote de entrada y en la salida del RLSFI.



Figura 2.5 Determinación de ST Y SV

2.2.4 Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La Demanda Química de Oxígeno, total y soluble se determinó por el Micrométodo Colorimétrico 5220 D Standard Methods, para lo cual se utilizaron una placa digestora (COD Reactor) marca Hach para suministrar el calor de reacción, una centrifuga Beckman Allegra para la centrifugación de la DQO soluble, un espectrofotómetro ODYSSEY DR250 y pipetas automáticas Eppendorf para tomar las muestras a analizar y así realizar las determinaciones expresadas en mgDQO_T/L y mgDQO_S/L.

2.2.5 Medición del biogás y rendimiento de metano

La medición del volumen generado en L del biogás fue obtenido por desplazamiento de agua con el contenedor que tiene adaptado el RLSFI, cabe destacar que dicho contenedor con agua fue acidificado con HCl concentrado hasta pH de 3 a 4 con el fin de eliminar el CO₂ producido y así poder cuantificar el metano. En base al volumen captado por día, se procedió a tomar muestras de biogás los cuáles fueron útiles para determinar cantidad de biogás y así calcular el rendimiento del metano.



Figura 2.6 Medición del biogás por cromatografía

Es por ello que se utilizó un cromatógrafo de gases BuCK 310 con detector de conductividad térmica y columna empacada All Tech CTR-I, utiliza Helio a una presión de 70 psi como gas de arrastre, la temperatura de la columna es de 36 °C y la del

detector es de 121 °C, la dosis de la muestra es de 2 ml por inyección. El rendimiento del metano se expresó en base al volumen generado de biogás por la DQO removida de un día a otro, éste parámetro fue expresado en base a los promedios en producción de volumen de biogás diario y la DQO removida obteniéndose así rendimientos por semana los cuales se expresaron en $LCH_4/gDQO$ removida.

2.2.6 Biopelícula en el soporte

Las biopelículas son ampliamente utilizadas en la biotecnología ambiental porque los reactores de biopelículas pueden funcionar a altas concentraciones de biomasa para el tratamiento de los grandes volúmenes de soluciones acuosas diluidas que son típicos de residuos industriales y municipales sin la necesidad de la separación de la biomasa y el efluente tratado (Nicolella et al., 2000).

2.2.7 Determinación de la Materia Volátil Adherida (MVA)

La determinación de MVA al soporte del reactor se realizó por gravimetría. Para ello se tomó una muestra de 1 mL de soporte y se depositó a una charola de aluminio previamente a peso constante, posteriormente se llevó a la estufa a 100°C por 24 horas y por último a la mufla a 550°C por 2 horas, el resultado se obtuvo en g MVA/mL Soporte.



Figura 2.7 Determinación de la MVA

2.2.8 Estabilización del RLSFI

En operación en modo continuo se buscó lograr resultados obtenidos por Domínguez-Hernández (2015) los cuáles se muestran en la tabla 2.3, esto con el fin de lograr el 80 a 90 % de soporte colonizado, y así se continuó con la segunda etapa de esta investigación, que consistió en obtener como inóculo el extensphere colonizado a plena carga y operación en modo continuo del RLSFI.

Tabla 2.3 Resultados de la operación del RLSFI (Domínguez-Hernández, 2015)

Operación a Cva	40 g DQO/L.d
Remociones de DQO	60 %
Producción de Biogás	30 L/d
Rendimiento de metano	0.19 L _{CH₄} / gDQO

2.3 Pruebas de inhibición por D-limoneno en la Digestión anaerobia

Las pruebas de inhibición por D-limoneno en la digestión anaerobia fueron realizadas en dos etapas, la primera etapa se efectuó en cuatro reactores de mezcla completa en modo batch. El objetivo de éstas primeras pruebas consistió en conocer y elegir las dosis idóneas para observar la inhibición del proceso, la cual se analizó de acuerdo con el monitoreo de los parámetros, pH, DQO_s y volumen de biogás acumulado. En base a ello fueron importantes conocer las relaciones sustrato/biomasa (S_0/X_0) y D-limoneno/Sustrato.

La segunda etapa de esta investigación fue basada en las relaciones sustrato/biomasa (S_0/X_0) y D-limoneno/Sustrato de la primera etapa que fueron elegidas por mostrar de mejor manera la inhibición, las cuales fueron aplicadas al RLSFI que operó también en modo batch. Los resultados experimentales obtenidos fueron utilizados para la obtención de parámetros cinéticos y aplicación en modelos matemáticos, y finalmente de esa manera la evaluación de la inhibición.

2.4 Pruebas de inhibición en reactores de mezcla completa (Etapa I)

Para los fines de modelado de este trabajo en esta primera etapa de la experimentación únicamente se tuvo por objetivo estudiar el efecto inhibitorio de 3 concentraciones máximas diferentes de D-limoneno como inhibidor así como lo recomienda Chen et al., (2014), por lo que se realizaron 4 experimentos utilizando lodo anaerobio proveniente de un reactor EGSB, efluente cítrico con promedio de 3000 mgDQO/L y aceite esencial de naranja D-limoneno el cual fue facilitado por una industria citrícola (Tabla 2.4). Las pruebas de inhibición se realizaron en modo batch y fueron monitoreadas durante un total de 72 horas, en condiciones mesofílicas.

La industria citrícola reporta valores de 520 mg/L de grasas y aceites, y como DQO_T de 45,500 mg/L resultando una razón de grasas y aceites de aproximadamente 0.011, por lo que considerando que el 98 % de grasas y aceites representan al D-limoneno (Martín et al., 2010), se utilizaron concentraciones de 0, 308, 616 y 952 mg/L, dichas concentraciones fueron utilizadas para superar 10, 20 y 30 veces la concentración que reporta la industria citrícola.

2.4.1 Acondicionamiento del inóculo anaerobio y el sustrato cítrico

Se utilizaron reactores de 500 mL en los cuáles en cada uno se vertieron 200 mL de lodo anaerobio como inóculo metanogénicamente activa de un reactor piloto de lecho granular expandido (EGSB) ubicado en el Instituto Tecnológico de Orizaba, el cuál es un reactor alimentado con la fracción líquida de residuos sólidos orgánicos que son obtenidos del Mercado Municipal Emiliano Zapata. El lodo anaerobio fue caracterizado y presentó una composición de 12.30 gSTV/L.

El volumen útil de cada reactor fue de 300 mL de sustrato cítrico con concentraciones en promedio de 3000 mgDQO/L, cabe destacar que una vez vertidos y mezclados el inóculo y el sustrato cítrico estos fueron neutralizados a pH cercanos a 7.2 con

bicarbonato de sodio como agente neutralizante, con fin de iniciar correctamente la condición necesaria de pH para iniciar el proceso de digestión anaerobia.

2.4.2 Montaje de los experimento de inhibición por D-limoneno

Se realizaron 4 experimentos, teniendo en cada reactor inóculo y sustrato, en el primero no se suministró D-limoneno con la finalidad de tener una referencia y así comparar el efecto inhibitor respecto a los experimentos 2, 3 y 4, cuyas concentraciones de D-limoneno se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Diseño de fase experimental

Experimento	D-limoneno suministrado (mL)	Concentración D-limoneno (mg/L)	DQO _s alimentada (mg/L)	S ₀ /X ₀	D-limoneno/sustrato
1	0	0	2,988.96	0.36	0
2	0.11	308	2,957.04	0.36	0.10
3	0.22	616	2,920.16	0.35	0.21
4	0.34	952	2,834.16	0.34	0.34

Para cada experimento se montaron 2 reactores anaerobios tipo batch con un volumen total de 550 mL por reactor; de los cuales 200 mL fueron para inóculo, 300 mL para sustrato y 50 mL para cámara de biogás.

En el montaje de las pruebas, un reactor sirvió para tomar las muestras y el otro para la captación y cuantificación del biogás generado. En total se montaron 8 reactores, los cuales fueron colocados en un agitador orbital Labline instruments con el fin de mantener homogéneo el contenido del inóculo, sustrato y el aceite esencial D-limoneno (Figura 2.8).

La temperatura fue un parámetro de control necesario para mantener la experimentación en condiciones mesofílicas de 35 °C, por otro lado el pH también fue acondicionado para ser de un pH ácido por el carácter propio de los efluentes cítricos

a un pH cercano a la neutralidad de 6.8 a 7.2, utilizando bicarbonato de sodio comercial como agente alcalino, de esta manera se inició el monitoreo de los reactores en condiciones adecuadas para la digestión anaerobia.

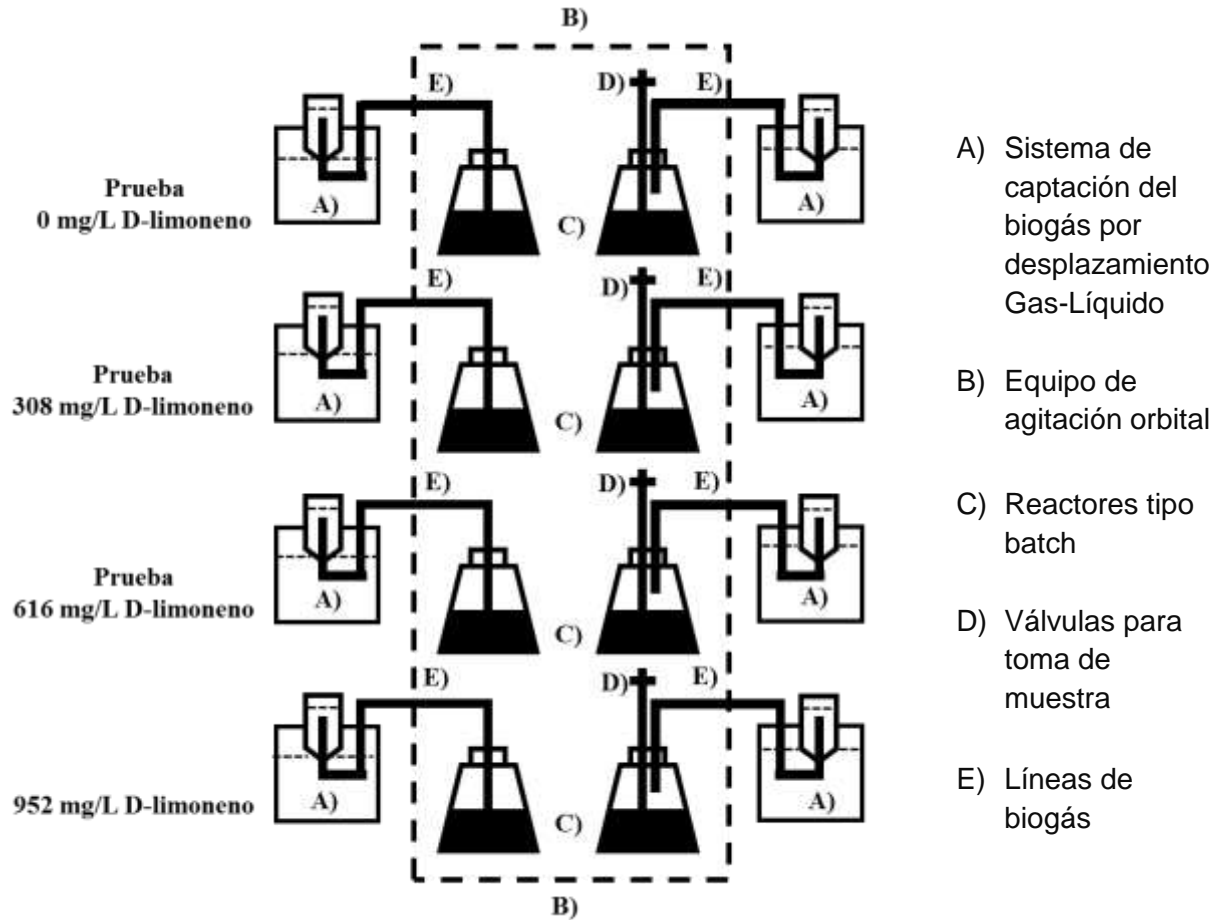


Figura 2.8 Esquema detallado para el montaje de la pruebas de inhibición

2.4.3 Monitoreo de los parámetros

En la Tabla 2.5 se muestran los parámetros monitoreados, los cuáles fueron medidos en función del tiempo, cada uno de ellos fueron realizados al tomar 10 mL de muestra a cada reactor durante las primeras 8 horas y posteriormente a las 24, 48, y 72 horas, siendo éstos intervalos de tiempo suficientes e incluso en exceso para evaluar la biodegradabilidad completa de un ensayo cinético así como (Siles et al., 2008),

quienes para fines de modelado cinético de la digestión anaerobia de aguas residuales derivadas del prensado de cáscara de naranja, utilizaron como mínimo 30 horas suficientes para la primera etapa de dicho estudio.

Tabla 2.5 Parámetros empleados para el monitoreo de las pruebas de inhibición

Parámetro	Unidad	Método
pH	-----	Potenciómetro Orion Model 250
DQO _s	mg/L	Colorimétrico APHA-1995
Biogás	mL	Desplazamiento Gas-Líquido

2.5 Pruebas de inhibición en el RLSFI (Etapa II)

En esta segunda etapa las pruebas con inhibidor D-limoneno fueron basadas de acuerdo a las relaciones S_0/X_0 y D-limoneno/Sustrato de la etapa I que presentaron de manera notoria la inhibición. Por otro lado antes de ser aplicadas estas pruebas se procedió a cambiar el modo de operar del RLSFI de modo continuo a modo batch, esto mismo obligó a cambiar las condiciones de carga del reactor.

2.5.1 Pruebas cinéticas para la cuantificación de la biomasa

Antes de iniciar las pruebas con inhibidor se realizaron pruebas cinéticas preliminares con el fin de cuantificar el crecimiento de la biomasa en términos de STV. Éstas pruebas fueron necesarias para corroborar lo que mencionan Martín et al., (2010) quienes realizaron modelado matemático basado en datos experimentales considerando que la biomasa es constante y por ello no considerable en el modelado matemático. Fue entonces necesario experimentar esa consideración para nuestro caso de estudio, por ello se utilizó efluente de la industria citrícola previamente centrifugada a 3500 rpm durante 5 min, se montaron 4 cinéticas y en cada una de ellas se cuantificó el crecimiento de los STV de acuerdo a diferentes condiciones de pH (Tabla 2.6).

Cada reactor tipo batch contenía un volumen útil de 300 ml de sustrato y 3 ml de lodo anaerobio (proveniente del reactor EGSB) el monitoreo se realizó durante un total de 96 horas tomando 2 ml de muestra cada 24 horas.

Tabla 2.6 Condiciones iniciales para las pruebas de crecimiento de biomasa

Reactor Batch	Composición	Adición de Bicarbonato (agente alcalino)	pH
1	300 mL de sustrato	No	3.9
2	300 mL de sustrato + 3 mL Lodo anaerobio	Si	7.2
3	300 mL de sustrato	No	3.9
4	300 mL de sustrato + 3 mL Lodo anaerobio	Si	7.2

2.5.2 Monitoreo del RLSFI de modo continuo a modo batch

Luego de 150 días de operación, monitoreo y estabilización en modo continuo del RLSFI, se procedió a cambiar la operación a modo batch. La finalidad del cambio fue para acondicionar el volumen útil a carga menor de 25 g DQO/L a hasta 3-5 g DQO/L, pero antes de ello se operó el reactor solo 8 días más en modo continuo a carga de 15 g DQO/L, esto para no afectar drásticamente el cambio de operación e incluso el cambio de carga.

2.5.3 Cinéticas sin inhibidor en RLSFI en modo batch

La operación a modo batch obligó a cambiar la operación del RLSFI cambiando de dirección las líneas de alimentación y recirculación, pero manteniendo el mismo flujo de recirculación, el cuál fue de 3.72 L/h. Se realizaron dos experimentos en el RLSFI a cargas de 3 y 5 g DQO/L con respectivas réplicas, con el objetivo de elegir las mayores remociones del sustrato y en base a ello se realizaron finalmente las pruebas con inhibidor.

2.5.4 Cinéticas con D-limoneno en RLSFI en modo batch

Las pruebas cinéticas con inhibidor en el RLSFI fueron realizadas con la carga de 3 gDQO/L debido a que fue la carga que mejor presentó resultados en cuanto a los parámetros monitoreados en las pruebas sin inhibidor, además fue la más adecuada con respecto a las pruebas anteriormente realizadas en los reactores de mezcla completa, y también a manera de facilitar la adecuación de las relaciones de S_0/X_0 utilizadas en las pruebas anteriores. Se monitorearon pH, DQOs, volumen de biogás acumulado y Y_{CH_4} . La operación y monitoreo fue durante 72 horas por cada réplica.

2.6 Obtención de parámetros biocinéticos

En esta sección se presentan los modelos matemáticos empleados para la obtención de los parámetros biocinéticos, los cuales se aplicaron tanto para los datos experimentales obtenidos por las pruebas tipo batch con biomasa suspendida (etapa I) y de la misma forma también para las pruebas realizadas en el reactor RLSFI con biomasa fija (Etapa II), donde se utilizaron concentraciones de D-limoneno como inhibidor. Cabe destacar que en este trabajo los modelos empleados consideran únicamente el comportamiento del sustrato para conocer su efecto y tipo inhibitorio los cuales servirán para estudios a futuro con modelos más complejos, donde se consideren incluso otros factores.

2.6.1 Modelo lineal de Lineweaver-Burk

El modelo y gráfico lineal de Lineweaver-Burk (doble recíproca) de la sección 1.6.2 se empleó como pauta para el modelado, de esa manera se obtuvieron los valores velocidad inicial de reacción (V), velocidad inicial máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis (K_m). Este método es recomendado por Chen et al., (2014), ya que con él se obtienen resultados precisos para las constantes de inhibición K_i , K_{ii} , y K_{ic} , y por lo tanto así se logró conocer el tipo de inhibición que presentan las pruebas de inhibición.

2.6.2 Modelo de inhibición no competitiva Pura

Es un modelo tipo enzimático para el análisis del comportamiento de los experimentos con diferentes concentraciones de inhibidor.

$$v = \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right)} \quad 2.1$$

Donde:

V = Velocidad de reacción en un tiempo determinado (mg/L.h)

[S] = Concentración inicial de sustrato (mg DQOs/L)

t = Tiempo (h)

V_{\max} = Velocidad máxima de reacción (mg/L.h)

K_m = Constante de Michaelis (mg/L)

[i] = Concentración del inhibidor (mg D-limoneno/L)

K_i = Constante de inhibición (mg/L)

Para un análisis de inhibición no competitiva pura es necesario obtener el valor de la constante K_i el cuál despejada de la Ecuación 2.1 se obtiene como:

$$K_i = \frac{[i]}{\frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} - 1} \quad 2.2$$

De acuerdo a los datos experimentales obtenidos en las pruebas, se calcularon primero las velocidades de consumo de sustrato para cada prueba y cada cinética. Para ello se utilizó la ecuación de velocidad media formulada en términos de concentración de DQOs como sustrato;

$$V_m = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} \quad 2.3$$

Donde:

V_m = Velocidad media (mg DQO/L.h)

$\Delta[S]$ = Cambio de la concentración (mg DQO/L)

Δt = Cambio del tiempo (h)

En base a las velocidades medias estimadas de los datos experimentales, se obtuvieron las constantes biocinéticas de K_m , V_{max} y K_i , a partir de las gráficas de Lineweaver-Burk, en el que la ecuación no competitiva pura en forma de dobles recíprocos se transforma a su forma lineal, quedando:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{maxap}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maxap}} \quad 2.4$$

ó también

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) \quad 2.5$$

Donde:

$1/v$ = Corresponde a los valores del eje "y"

$K_m/V_{max} \cdot (1 + [i]/K_i)$ = Es la pendiente "m"

$1/[S]$ = Corresponde a los valores del eje "x"

$1/V_{max} \cdot (1 + [i]/K_i)$ = Es la ordenada al origen "b"

De acuerdo con Nelson y Cox, (2008), la inhibición no competitiva tiene la peculiaridad de que K_m permanece constante, es decir; el valor de K_m sin inhibidor (control) será el mismo para los experimentos con concentraciones variables de inhibidor. Por otra

parte V_{\max} se ve afectada por la presencia de inhibidor, siendo V_{\max} menor a mayores concentraciones, llamándose velocidad máxima aparente ($V_{\max \text{ ap}}$), definida como:

$$V_{\max \text{ ap}} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right)} \quad 2.6$$

La gráfica patrón de Lineweaver-Burk que muestra la inhibición no competitiva pura se muestra en la Figura 2.9.

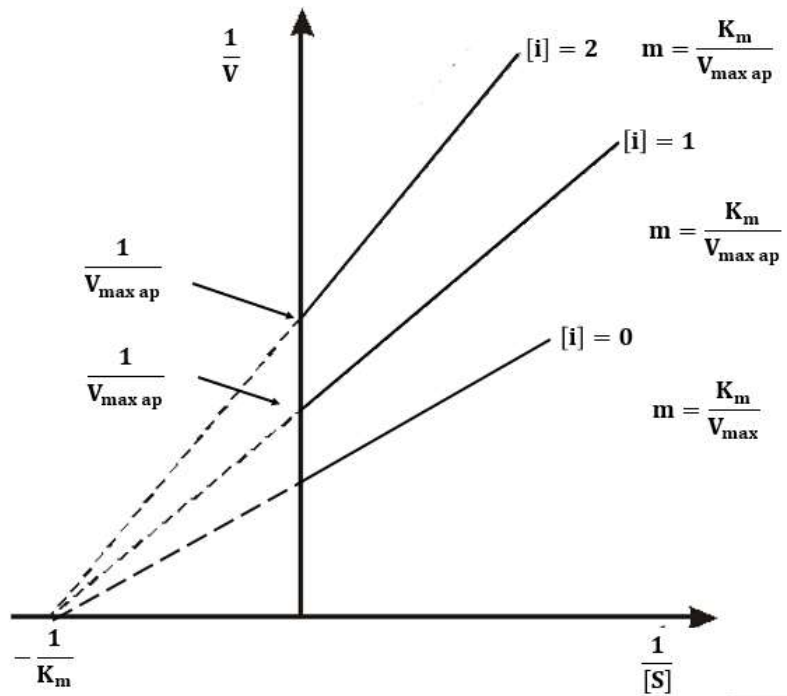


Figura 2.9 Gráfica de Lineweaver-Burk para inhibición no competitiva pura

2.6.3 Modelo de inhibición no competitiva mixta

De acuerdo a Campbell y Farrell, (2016) una variante del modelo de inhibición no competitiva, es el modelo de inhibición no competitiva mixta. Éste modelo es un tipo de inhibición no competitiva más común, en donde V_{\max} se reduce y K_m aumenta con

el incremento de concentración del inhibidor. La ecuación diferencial o en forma hiperbólica de la inhibición no competitiva mixta se presenta en la Ecuación 2.7:

$$v = \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max ap} \cdot [S]}{K_{m ap} + [S]} \quad 2.7$$

De donde:

$$V_{\max ap} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[i]}{K_{ii}}\right)} \quad 2.8$$

y

$$K_{m ap} = K_m \frac{\left(1 + \frac{[i]}{K_{ic}}\right)}{\left(1 + \frac{[i]}{K_{ii}}\right)} \quad 2.9$$

En las Ecuaciones 2.8 y 2.9 las constantes de inhibición no competitiva mixta son K_{ii} y K_{ic} , de donde:

K_{ii} = Corresponde a la unión entre la enzima y el inhibidor

K_{ic} = Corresponde a la unión entre el inhibidor con el complejo enzima-sustrato

La forma lineal de tipo $y=mx+b$ de la Ecuación 2.7 (no competitiva mixta) se presenta en la Ecuación 2.10:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m ap}}{V_{\max ap}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max ap}} \quad 2.10$$

La gráfica patrón de Lineweaver-Burk que muestra la inhibición no competitiva mixta se muestra en la Figura 2.10.

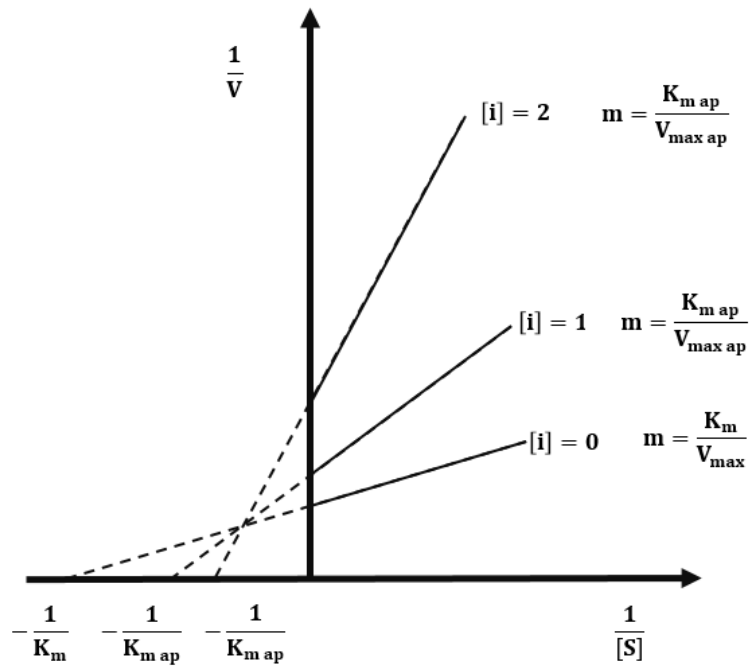


Figura 2.10 Gráfica de Lineweaver-Burk para inhibición no competitiva mixta

Para encontrar los valores de K_{ii} y K_{ic} se tienen las siguientes ecuaciones:

$$K_{ii} = \frac{[i]}{\left(\frac{V_{\text{max}}}{V_{\text{max ap}}} - 1\right)} \quad 2.11$$

$$K_{ic} = \frac{[i]}{\left(\frac{K_{m \text{ ap}}}{V_{\text{max ap}}}\right)\left(\frac{V_{\text{max}}}{K_m}\right) - 1} \quad 2.12$$

2.7 Evaluación de la inhibición por D-limoneno

La obtención de los parámetros biocinéticos K_m , V_{max} , $K_{m\ ap}$, $V_{max\ ap}$, K_{ii} y K_{ic} fueron muy necesarios para efectuar la evaluación de la inhibición por D-limoneno, por lo que se procedió a resolver las Ecuaciones 2.1 y 2.7 mediante el método numérico Runge-Kutta de cuarto orden (RK 4), tomando como valores iniciales las concentraciones de DQOs en los experimentos de las etapas I y II. La simulación del consumo de sustrato respecto al tiempo se realizó con el Software Berkeley – Madonna Versión 8.3.14.

2.7.1 Validación de los modelos matemáticos

Basándonos en las metodologías similares a Martín et al., (2010) y Chen et al., (2014) se validaron los datos modelados, para ello se graficaron las concentraciones simuladas de sustrato contra las concentraciones de sustrato experimentales ambos en términos de DQOs, de ésta manera se obtuvieron coeficientes de correlación R^2 . Dichos resultados sirvieron para demostrar que los modelos utilizados representaron a los experimentos con buena precisión.

CAPITULO 3

RESULTADOS

CAPITULO 3 RESULTADOS

3.1 Preparación del sustrato cítrico

La Tabla 3.1 proporciona una visión de los resultados obtenidos de la caracterización de CC, se puede observar que el sustrato es de alta carga orgánica ya que contiene altas concentraciones de DQO_T y DQO_S , ST y STV, ésto puede atribuirse debido a los componentes que puede presentar como lo son en su mayor parte los carbohidratos y proteínas (Cerón-Salazar et al., 2011).

Tabla 3.1 Caracterización del concentrado cítrico (CC)

Parámetros	Concentrado Cítrico
DQO_T	54,431 mg/L
DQO_S	49,265 mg/L
ST	26,489 mg/L
STV	23,788 mg/L
pH	3.87

3.1.1 Caracterización del sustrato de la industria citrícola

Al igual que el CC que se utilizó para la alimentación del reactor, también se caracterizó el efluente cítrico de la industria citrícola. En la tabla 3.2 se presentan las características, en los cuáles se puede notar que contienen altas concentraciones de DQO y bajos pH, sin embargo el efluente de la industria citrícola posee mayor concentración de materia orgánica de DQO_T y DQO_S . Una vez obtenido el CC se procedió a diluirlo con agua de acuerdo a los cálculos correspondientes para mantener en el RLSFI una alimentación a C_{va} constante de 40 gDQO/L.d, volumen de alimentación de 8.64 L/d y volumen útil de 1.7 L.

Tabla 3.2 Caracterización de los efluentes de la industria citrícola

Parámetros	Efluente de la industria citrícola	Concentrado Cítrico
DQO_T	84,195 mg/L	54,431 mg/L
DQO_S	59,900 mg/L	49,265 mg/L
pH	3.29	3.87

3.2 Operación y monitoreo en continuo del RLSFI

El RLSFI fue operado en un total de 150 días en modo continuo, se inició operando con solamente un 10 % de soporte durante 35 días. Posteriormente se le fue adicionado el 20 %, y se siguió operando a la misma carga de 40 gDQO/L.d. Para el día 58 el reactor presentó una ruptura en el accesorio de la semi-fluidización y se decidió detener la operación para realizar un mantenimiento preventivo y correctivo durante 2 días. Para el arranque después del mantenimiento se tomó la decisión de operar a una carga más baja de 25 gDQO/L.d lo que permitió que en poco tiempo el reactor retomara su estabilización.



Figura 3.1 Cambio de la placa interna semi-fluidizada del RLSFI

3.2.1 Medición de pH

Antes de ser alimentado el reactor con el CC a éste se le amortiguó el pH a 7.3, así entre los días 15 y 27 el pH interno logró neutralizarse cerca del 7.2, mientras que para el día 30 al 45 éste mostró una ligera tendencia a la baja, esto debido a la desestabilización que tuvo el reactor al ser adicionado el 20 % de soporte limpio. Sin embargo al día 50 a 57 éste logro estabilizarse nuevamente pero en el día 58 se presentó una falla en la operación, por acumulación de biomasa en el reactor por lo que fue necesario un nuevo mantenimiento que obligó al cambio de placa interna del reactor. Con una carga de 25 gDQO/L.d, a partir del día 60 el pH interno del reactor nuevamente logró acondicionarse a la neutralidad por lo que la digestión anaerobia se recuperó y estabilizó correctamente.

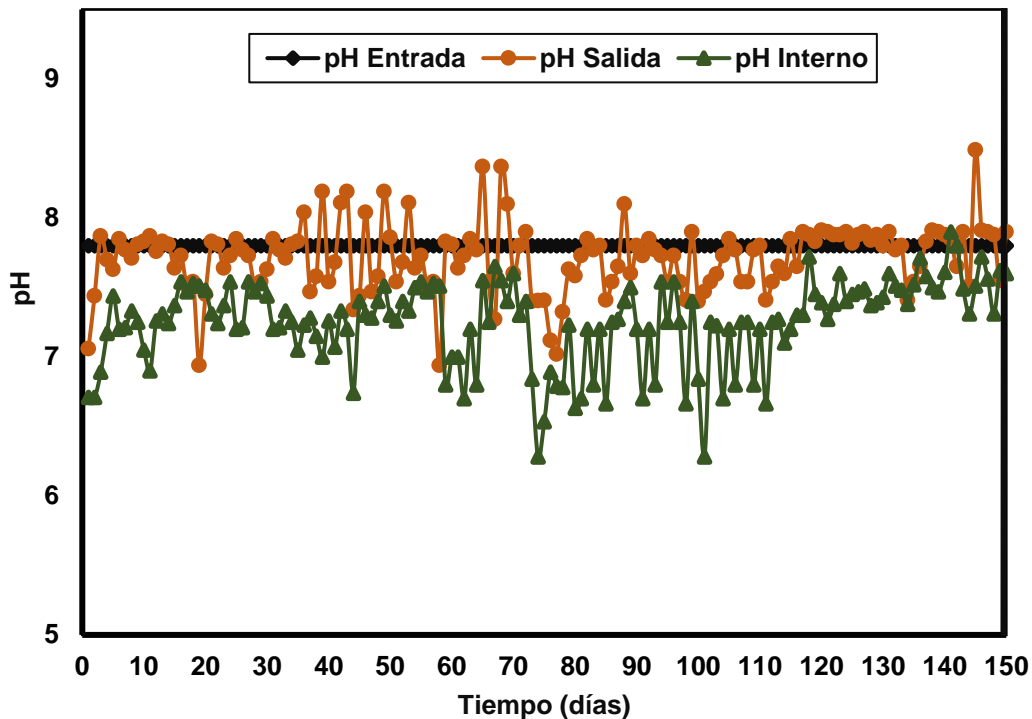


Figura 3.2 Monitoreo del pH en el RLSFI

3.2.2 Determinación de sólidos totales y sólidos totales volátiles (ST Y STV)

En la Figura 3.3 se muestra el comportamiento de los ST, Cabe mencionar que el contenido alto de ST puede provocar que la biopelícula sufra perturbaciones y deficiencias en su funcionamiento ya que los sólidos pueden ocasionar el desprendimiento de la biopelícula (Gerardi, 2003).

Los rangos de ST que podemos observar se mantuvieron entre los 6000 mg/L, a pesar de soporte agregado al reactor la tendencia de ST se mantuvo, sin embargo en el cambio de carga a 25 gDQO/L.d presentó una tendencia por debajo de 5000 mg/L. En la Figura 3.4 podemos observar también los comportamientos que presentó el monitoreo de los STV.

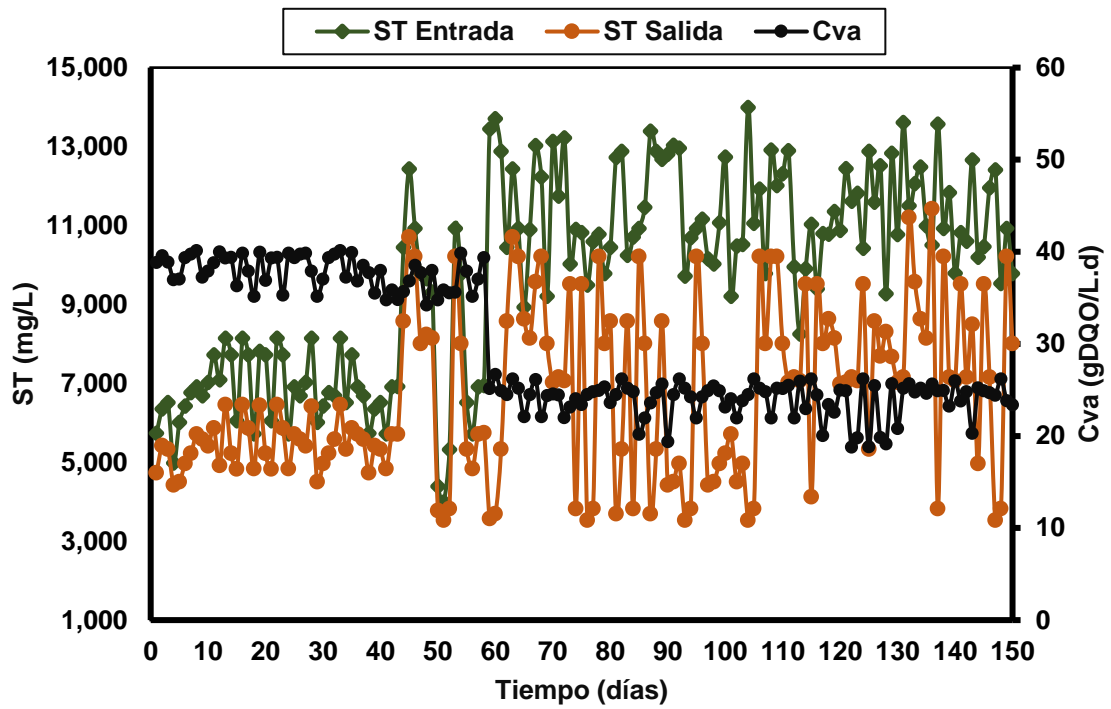


Figura 3.3 Monitoreo de ST en el RLSFI

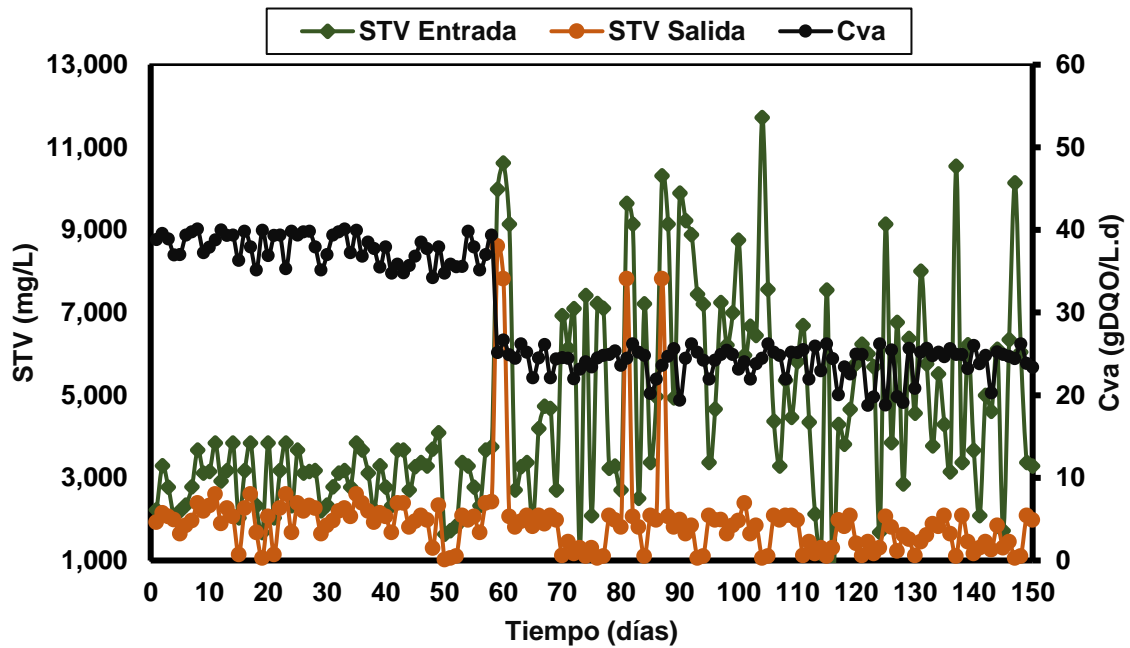


Figura 3.4 Monitoreo de STV en el RLSFI

3.2.3 Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO)

En el proceso de re estabilización del reactor se buscó obtener valores cercanos al 60 % de remoción de DQO ya que éste fue el valor logrado por Domínguez-Hernández (2015) en operación continua del RLSFI, a Cva de 40 gDQO/L.d con concentraciones de entrada de DQO_T que oscilan entre 7000 mg/L.

El monitoreo de la degradación de la DQO_T durante los 35 días de operación a 40 g DQO/L.d resultó satisfactoria, de entre 7000 mg/L.d a 4500 mg/L.d, mientras que con soporte limpio la degradación también fue de entre 7000mg/L.d a 6000 mg/L.d esta degradación ligera es por la desestabilización que provocó el soporte agregado. Por otra parte al día 58 luego de la falla en la operación la carga de 25 gDQO/L.d permitió rango de 4000 mg/L.d a la entrada y de entre 2800 mg/L.d a la salida, podemos observar que la degradación se siguió dando a pesar de un cambio de carga inmediato.

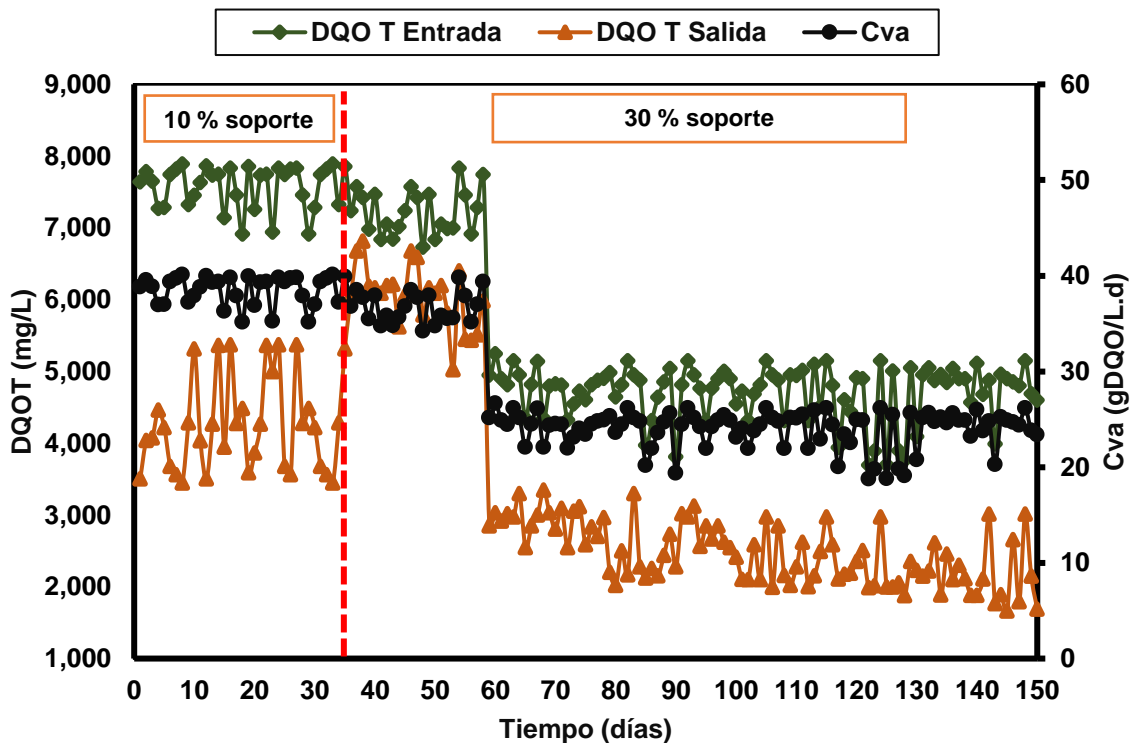


Figura 3.5 Monitoreo de la DQO_T en el RLSFI

En la figura 3.6 podemos observar la tendencia similar que tuvo la degradación de la DQO_s durante el día 73 de operación, se notó que luego del cambio de la carga a 25 gDQO/L.d, la de DQO_s degradó solamente de entre los 3500 mg/L.d a 2500 mg/L.d.

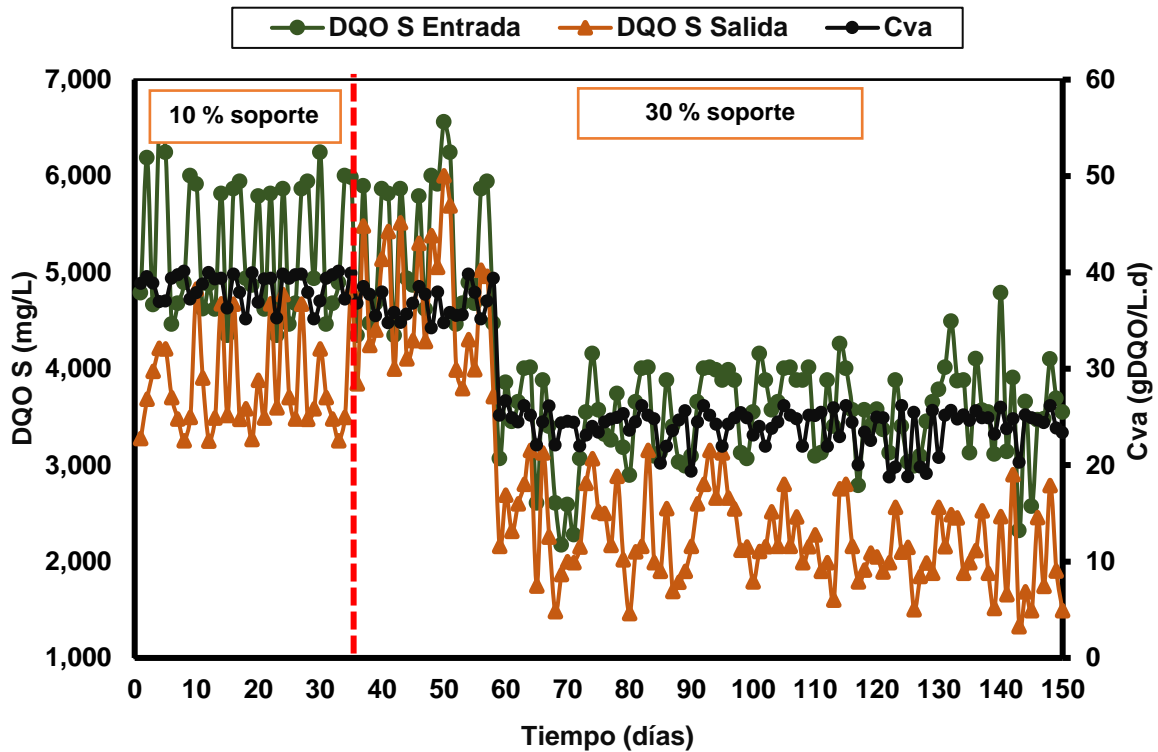


Figura 3.6 Monitoreo de la DQO_s en el RLSFI

En la Figura 3.7 se muestra las remociones logradas, en 35 días con 10 % de soporte y a carga de 40 gDQO/L.d se lograron remociones cercanas al 60 %, pero al ser adicionado el 20 % más de soporte limpio la remoción era esperado que descendiera al 20 % de DQO_s removida, consecutivamente en el día 58 se paró la operación del reactor debido a que se determinó un desgaste en la placa interna del reactor por lo que se procedió a sustituir una nueva placa la cual da el carácter semi-fluidizado al reactor debido a que tiene la función de retener el soporte cuando éste se expande por la acción de la recirculación. Debido a lo anterior se continuó con la operación a carga de 25 gDQO/L.d donde la remoción de DQO se estabilizó en promedio a 40 %, éste resultado fue considerable ya que se operó a una carga menor respecto a las condiciones iniciales de la operación.

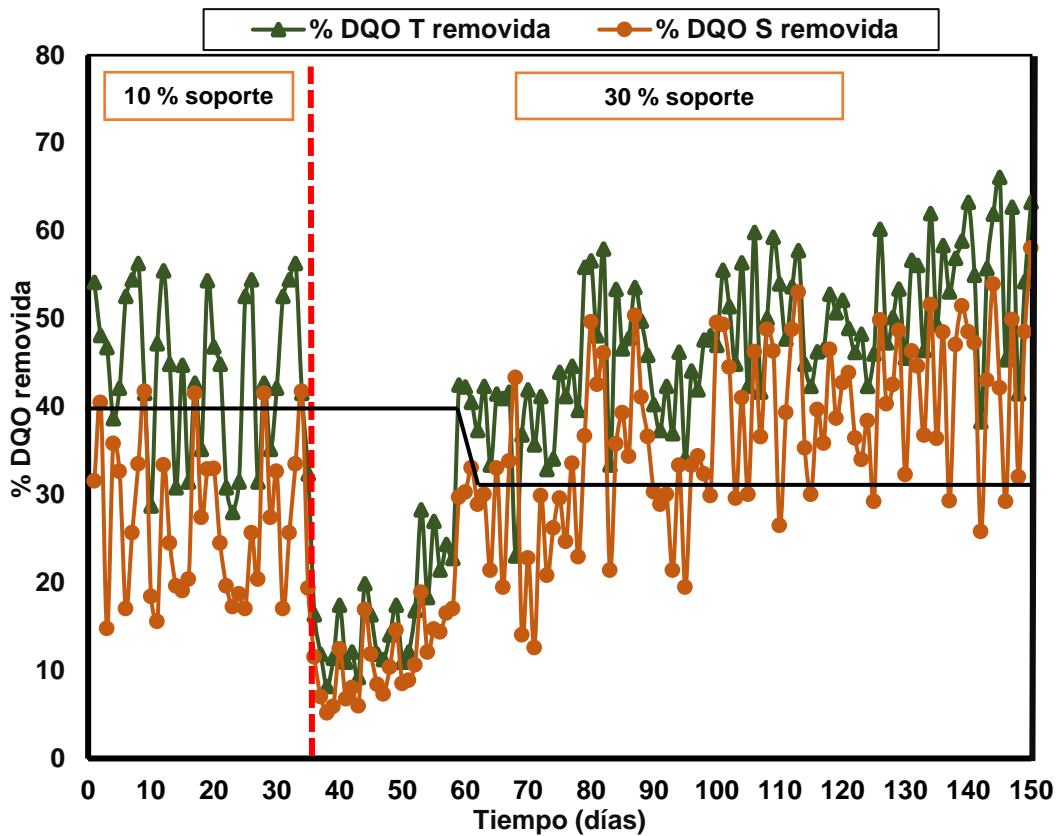


Figura 3.7 Remociones de DQO_T Y DQO_S

3.2.4 Medición del biogás y rendimiento de metano

Se monitoreó diariamente el volumen de biogás por el desplazamiento de agua, se observó que en los últimos 50 días en promedio la generación de biogás fue estable siendo con un promedio 9.5 L/d, con ello se consideró y confirmó la estabilidad del reactor a Cva constante de 25 gDQO/L.d.

Por otro lado, también se procedió a la lectura de % de metano en el equipo de cromatografía una vez por semana. Los resultados fueron que se obtuvo un promedio del 66.4 % CH_4 , logrando rendimientos hasta de 0.25 $L_{CH_4}/gDQO$. De acuerdo a Michaud et al., (2002), este rendimiento logrado es muy considerable ya que es cercano al valor teórico óptimo de 0.35 $L_{CH_4}/gDQO$ para la operación de un reactor en modo continuo a altas cargas por arriba de 30 gDQO/L.d.

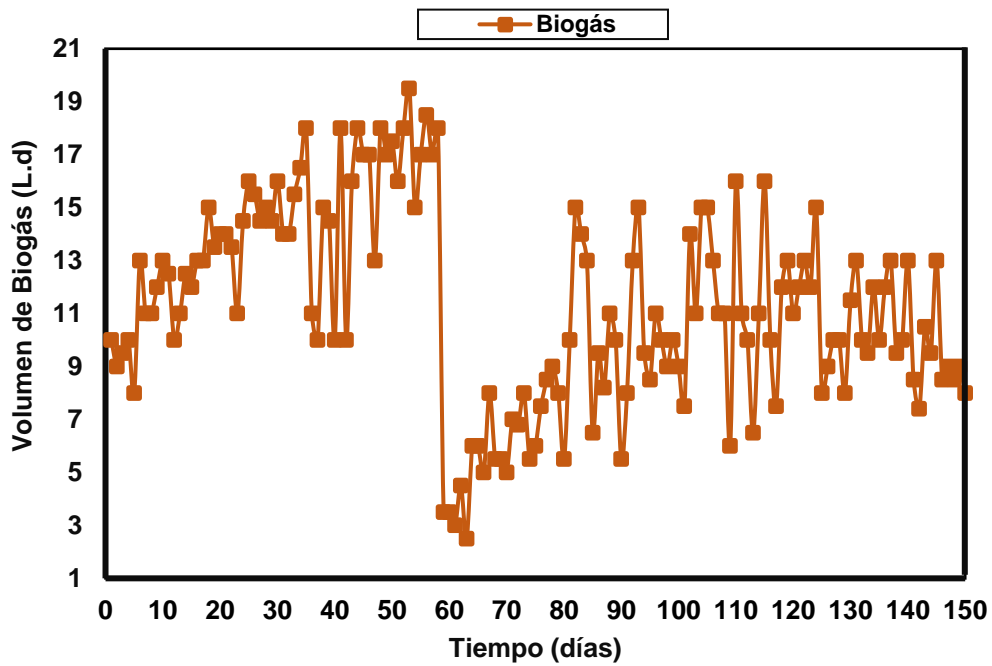


Figura 3.8 Producción diaria de biogás en el RLSFI

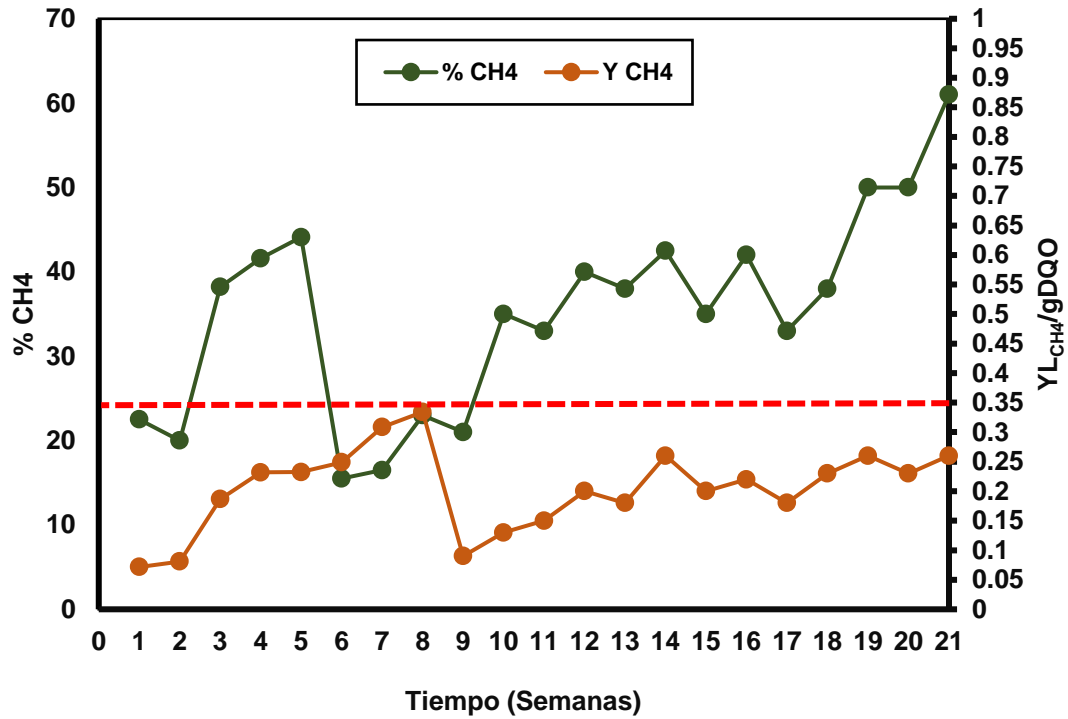


Figura 3.9 % de CH₄ y Y_{CH4} durante el monitoreo del RLSFI

3.2.5 Biopelícula en el soporte

Luego de haber operado durante 35 días el RLSFI con tan solo el 10 % de soporte, se procedió a la adición del 20 % más, pero antes fue analizado en el microscopio el crecimiento de la biopelícula el cual se aprecia con partes colonizadas.

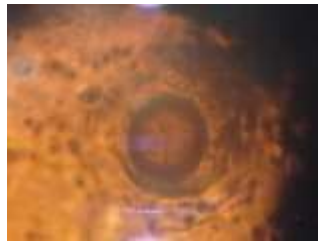


Figura 3.10 Vistas microscópicas del soporte del RLSFI a 40X

3.2.6 Determinación de la Materia Volátil Adherida (MVA)

Se realizó la cuantificación de la MVA, la cual al día 30 de operación fue de 0.0072 gSV/mL, y luego de operar 141 días ésta fue de 0.0217 gSV/mL, el cual representó un 80 % de grado de colonización del soporte.

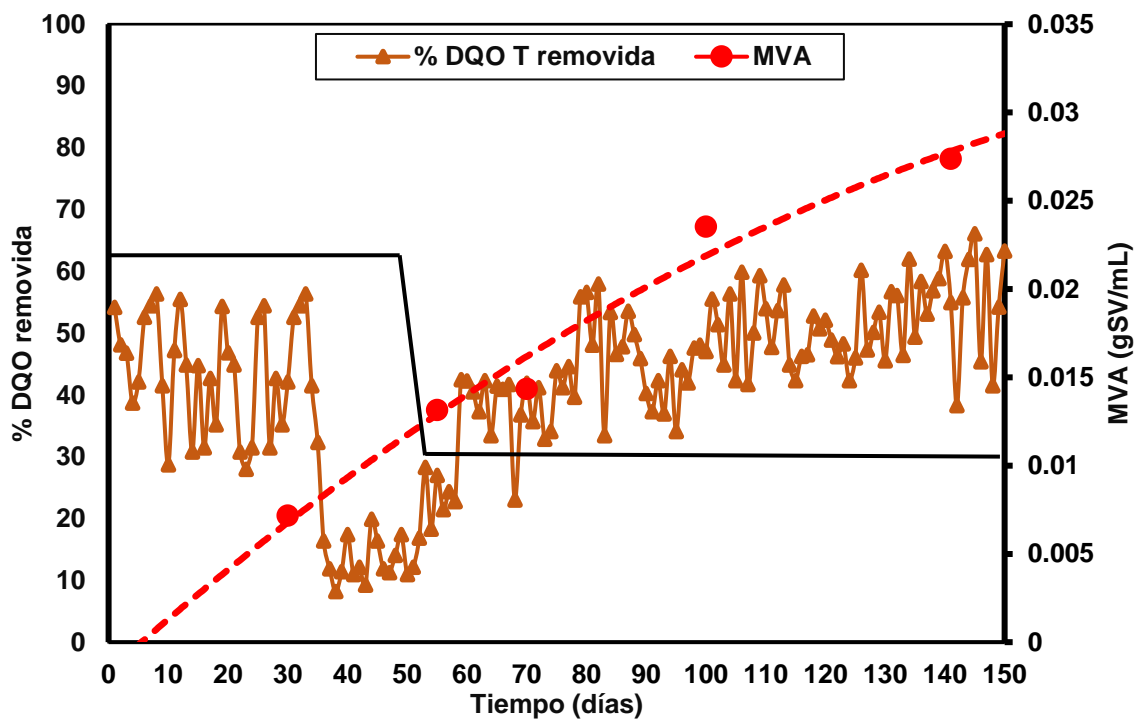


Figura 3.11 Monitoreo de la MVA en el soporte del RLSFI

3.3 Pruebas de inhibición en reactores de mezcla completa (Etapa I)

A continuación se muestran los resultados obtenidos de los 4 experimentos, los cuales fueron monitoreados con los parámetros pH, DQOs, y volumen de biogás, en un total de 72 horas, iniciando el monitoreo en las primeras 8 horas. Por otra parte cabe destacar que esta experimentación se efectuó con un total de 5 réplicas, es decir en un total de 360 horas.

3.3.1 Comportamiento del pH en las pruebas de inhibición

La estabilidad del proceso se evaluó en base a la evolución del pH durante el proceso de digestión anaerobia del sustrato, y resultó que fue efectiva en éstas pruebas desde la primera experimentación, ya que una vez acondicionado el pH en cada reactor al inicio y durante las primeras 8 horas, presentaron en promedio un pH de 8.17, pero transcurridas las 24 horas se obtuvieron en promedio valores de 7.20, esto mismo se observó en las 42 y 72 horas oscilando ligeramente el pH y de ésta manera ajustándose así la condición óptima para efectuarse la digestión anaerobia.

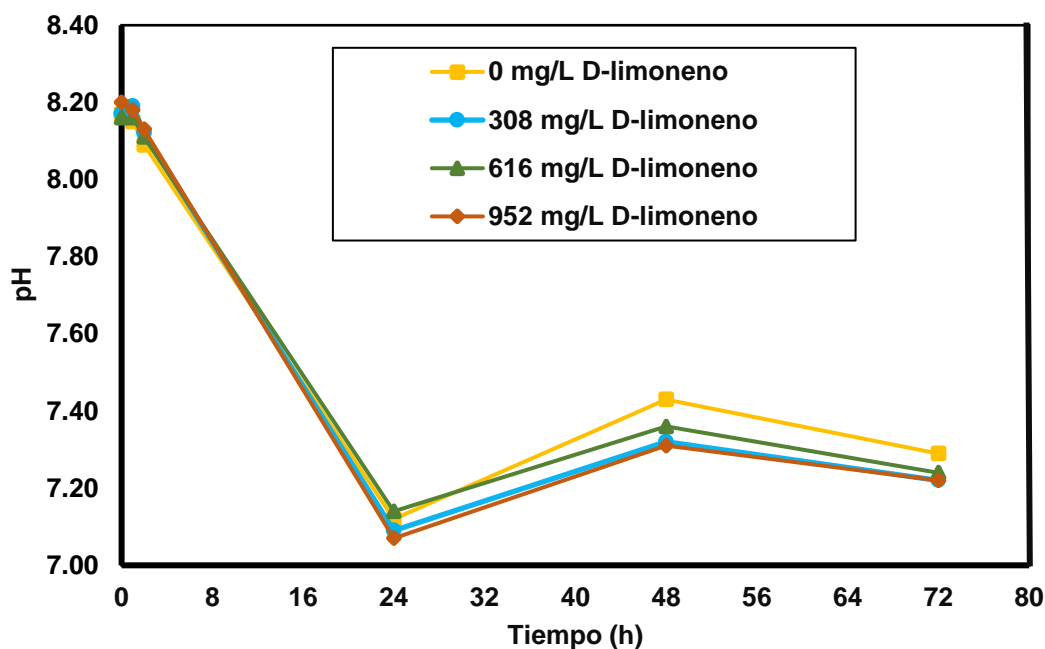


Figura 3.12 Comportamiento de pH en las primeras pruebas de inhibición

Estos valores de pH son cercanos a los obtenidos por Santos et al. (2010), quienes realizaron una prueba de digestión anaerobia de las aguas residuales derivadas del prensado de cáscara de naranja producida en la fabricación de jugo de naranja, donde también se evaluaron la relación acidez volátil/alcalinidad resultando valores inferiores a 0.30 y 0.40, lo que indicó que el proceso se efectuó sin riesgos de acidificación, por lo que en estas pruebas se destaca que por las altas concentraciones de D-limoneno dosificadas tampoco se presentó una acidificación que perturbara el proceso de digestión anaerobia.

3.3.2 Monitoreo de la DQO_s en la pruebas de inhibición

En la Figura 3.13 se muestra el monitoreo de la DQO_s de la primera experimentación, el cual fue estandarizada desde el inicio a concentraciones de DQO_s de 3000 mg/L, pero a las primeras 8 horas se observó considerablemente que las pruebas 2, 3 y 4 consumieron inmediatamente el sustrato cítrico comparados con la prueba 1 que tenía 0 mg/L de D-limoneno.

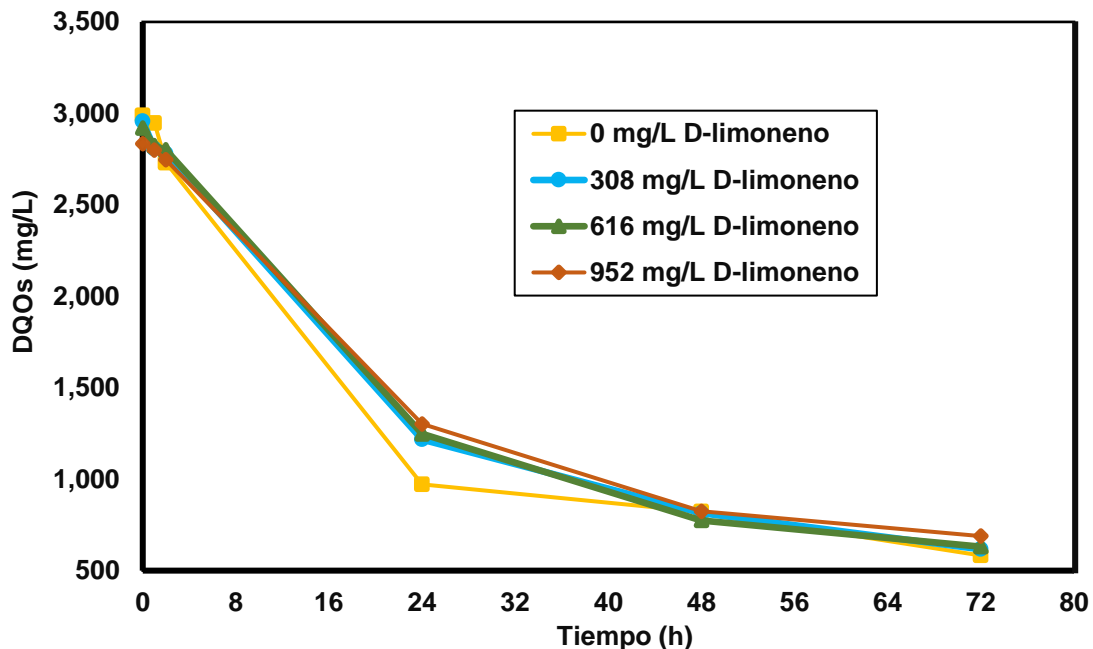


Figura 3.13 Degradación del sustrato en las pruebas de inhibición

Transcurridas las 24 horas la degradación de la DQOs de la prueba 1 fue de mayor consumo obteniendo una DQOs de 971.62 mg/L, mientras que el resto de las pruebas obtuvieron en promedio un menor consumo de DQOs de 1255.6 mg/L. A las 48 y 72 horas la degradación disminuyó notablemente, por lo que de esta manera se observó que a mayor cantidad de D-limoneno menor es el consumo de sustrato.

El estudio de la DQOs removida es tan importante así como la evaluación del rendimiento de metano para determinar la biodegradabilidad de los efluentes cítricos así como lo menciona Siles et al., (2008), para fines de este trabajo en las Figuras 3.13 y 3.14 se muestran los resultados en cuanto a la degradación del sustrato en términos de DQOs y % DQOs removida, se mostró que el efecto del D-limoneno es significativo en la biodegradación del sustrato cítrico, esto debido a que se reflejó considerablemente a las 24 horas el mayor porcentaje de DQOs, de esta manera en la prueba 1 se logró hasta 67 % DQOs removida.

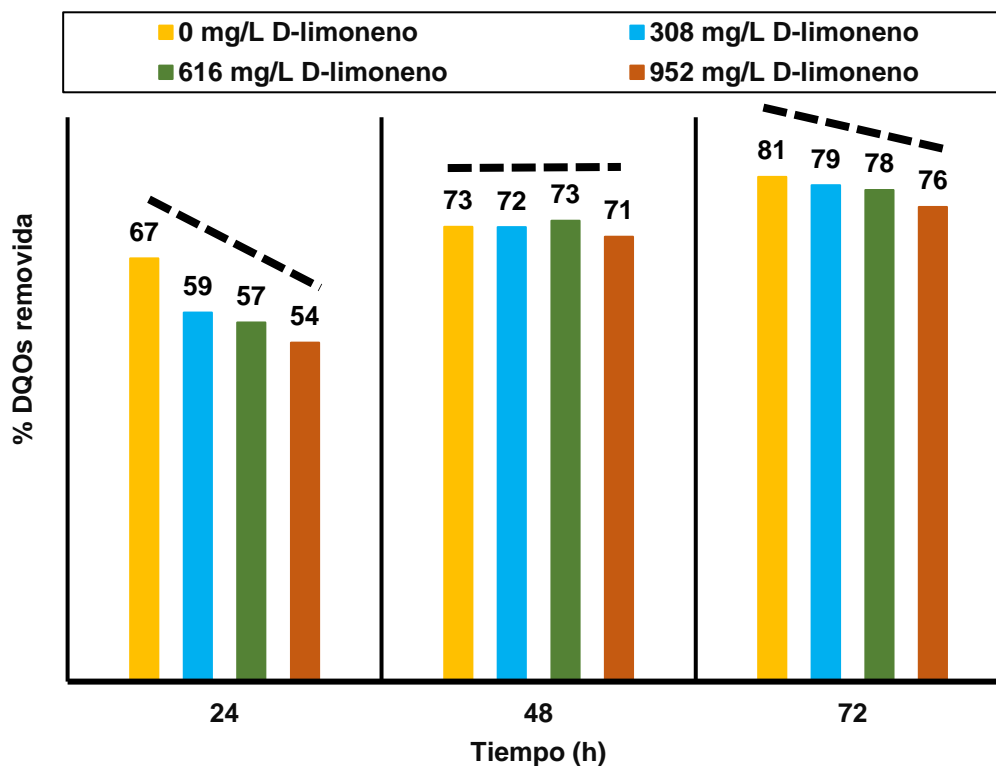


Figura 3.14 Tendencia del % DQOs removida

Por otro lado el resto de las pruebas con 308, 616 y 952 mg/L de D-limoneno presentaron menores % DQOs removida, entre 59, 57 y 54 % de remoción, la tendencia entre ellas fue muy notable. En cambio en las horas 48 y 72 los % de remoción fueron poco significativos, ya que se observaron valores muy similares de entre 72 ± 1 % para las horas 48 y 78 ± 2 % para las horas 72.

3.3.3 Monitoreo de biogás en las pruebas de inhibición

En la Figura 3.15 se puede observar que la producción de biogás fue poco significativa a las 8 horas, esto debido a que las bacterias fueron asimilando lentamente el sustrato. Se confirmó éste proceso cuando a las 24 horas se obtuvieron 320, 310, 300 y 270 mL de biogás para cada una de las pruebas.

Por último a las 48 y 72 horas el efecto del D-limoneno sobre la producción del biogás fue ligeramente menor, asumiéndose así que a esos tiempos la DQOs ya se había removido en su mayor cantidad, de esta manera se destaca que a mayor concentración del aceite esencial D-limoneno, menor es la producción de biogás.

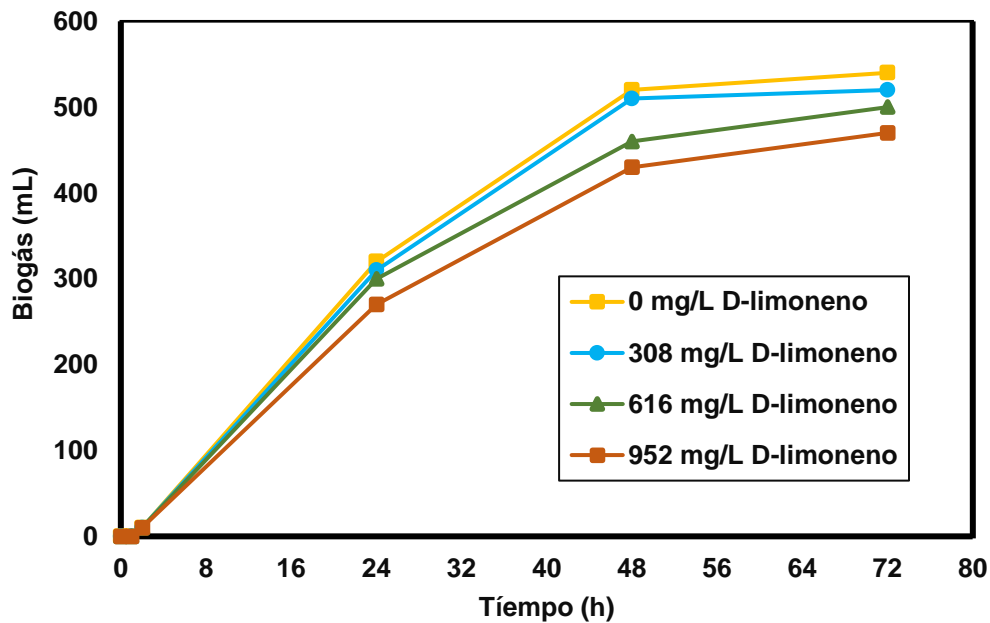


Figura 3.15 Producción acumulada de biogás en las pruebas de inhibición

3.3.4 Réplicas de los experimentos con D-limoneno

Los experimentos fueron realizados de la misma manera en un total de 5 réplicas, en la Figura 3.16 se muestra que las pruebas sin inhibidor mostraron hasta 65 % DQOs removida en las horas 24 y más aún hasta el 85 % DQOs removida a las horas 72. Con las dosis de 308 mg/L y 612 mg/L de D-limoneno se observaron en las 24 horas ligeramente menores porcentajes de remoción respecto a las pruebas sin inhibidor de hasta 60 % DQOs removida, pero a las 72 horas las remociones aumentaron hasta 80 % DQOs removida.

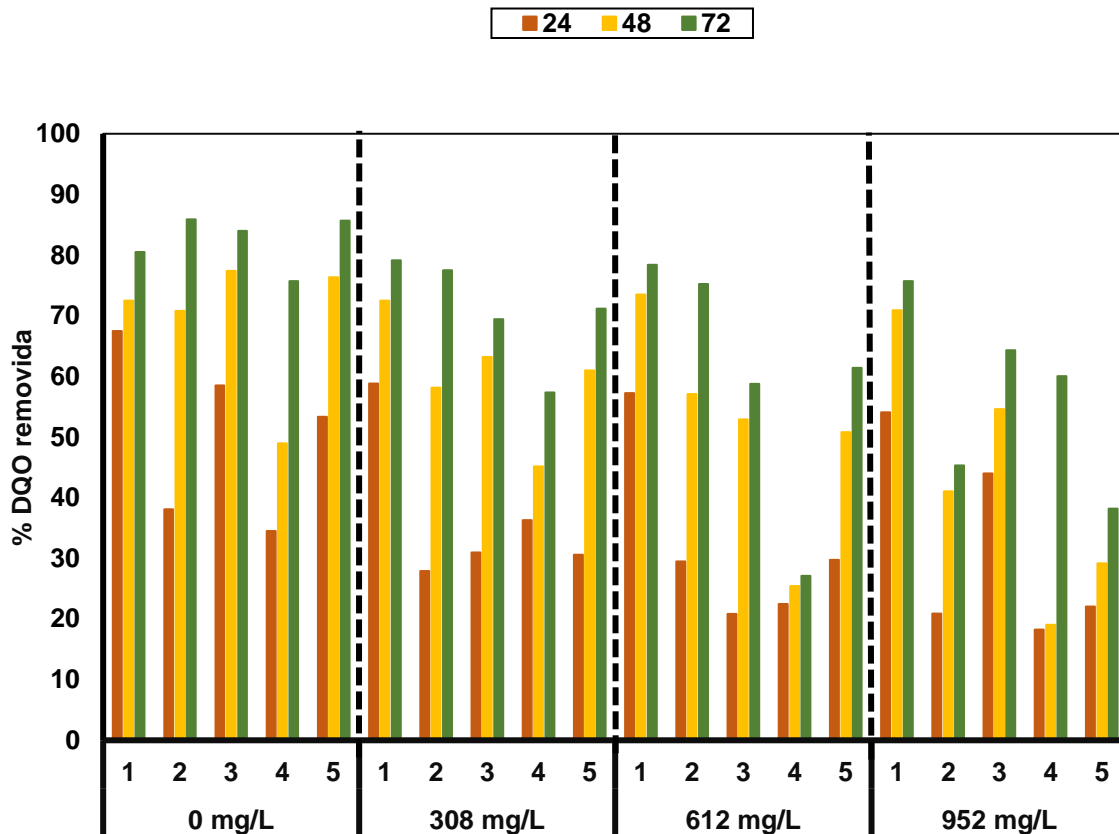


Figura 3.16 % DQOs removida en las Pruebas de inhibición utilizando D-limoneno

De manera significativa las pruebas con 952 mg/L de D-limoneno mostraron mayor la inhibición del proceso de digestión anaerobia, ya que se logró hasta el 20 % DQOs removida a las 24 horas, pero a las 72 horas aumentaron solamente hasta 40 % DQOs removida por lo que con ello se concluyó que fue la mejor dosis para observar la

inhibición de manera muy notoria. De esta manera se eligió la mayor dosis de inhibidor el cual sirvió como base para posteriormente continuar las pruebas en el RLSFI, así asegurar la inhibición del cual se obtuvieron los datos experimentales para utilizarlos en la obtención de parámetros cinéticos para el modelado matemático. En la Figura 3.17 se muestra por completo el monitoreo del biogás durante las 5 réplicas de las pruebas de inhibición en los matraces de mezcla completa en modo batch, en ellos también se notaron volúmenes de biogás acumulado desde las 24 horas, los cuales en donde se dosificó inhibidor mostraron menor volúmenes de biogás. En los experimentos sin inhibidor se obtuvieron 300 mL de biogás a las 24 horas, 500 mL de biogás a las 48, y hasta 540 mL de biogás a las 72 horas. Comparando estos resultados con los experimentos con inhibidor de 308 mg/L, 612 mg/L, y 952 mg/L de D-limoneno se observó que la producción de biogás fue menor.

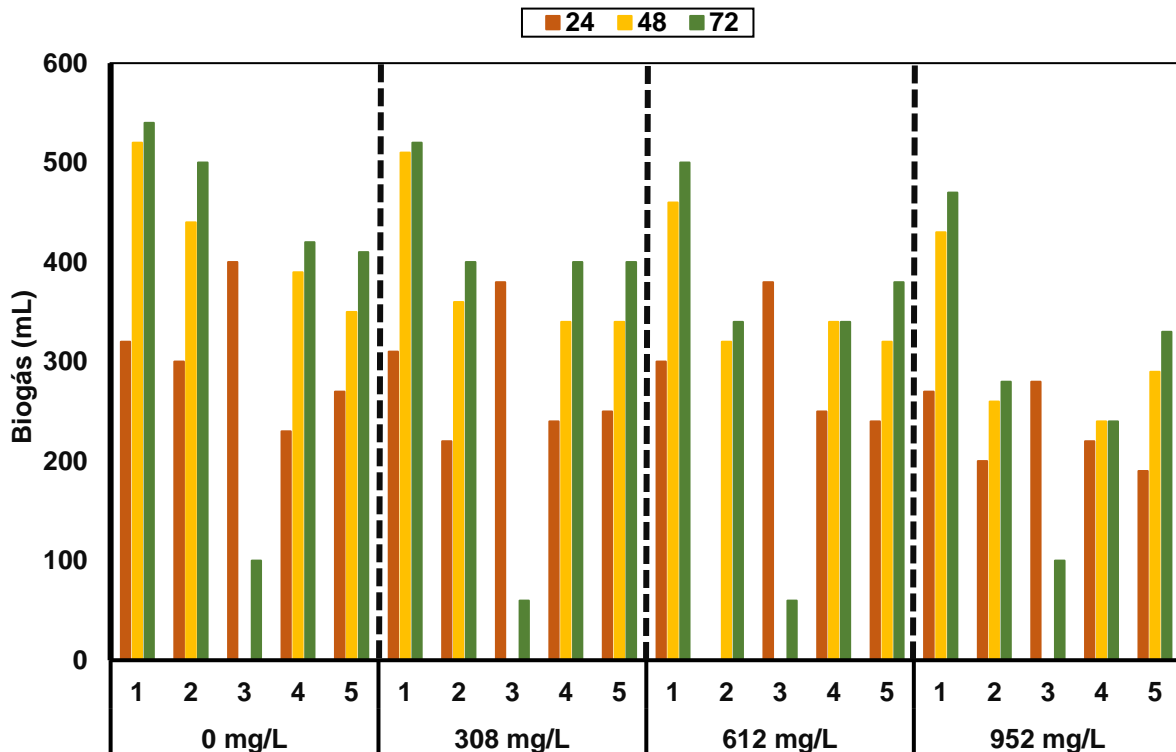


Figura 3.17 Volumen de biogás en las Pruebas de inhibición utilizando D-limoneno

Aunque aún no se evaluó el Y_{CH_4} , se notó claramente que a mayor concentración de inhibidor menor es la producción de biogás, ya que en las 24 horas se observaron 250 mL de biogás acumulados pero conforme transcurrió el tiempo se notaron menores volúmenes de 100 mL, 80 mL, y hasta 50 mL de biogás acumulado, por lo que con ello se confirmó que la dosis de 952 mg/L de D-limoneno fue el que mejor logró notar la inhibición en la digestión anaerobia.

3.4 Pruebas de inhibición en el RLSFI (Etapa II)

Antes de iniciar las pruebas se cuantificó la biomasa una vez más del RLSFI, el cual contó con 600 mL de soporte colonizado con 27 gSV/L. Se realizaron las pruebas de inhibición basados en las cinéticas en reactores de mezcla completa anteriormente realizadas, de las cuales se eligió como mejor concentración de inhibición el del experimento 4, ya que fue el que mostró menores % DQOs removida y menor volumen de biogás acumulado, por lo tanto fue la prueba que mejor mostró la inhibición. Cabe destacar que el experimento 4 representa 30 veces la relación D-limoneno/Sustrato, es decir $520 \text{ mg/L}/45,500 \text{ mg/L} = 0.0114$, siendo éste valor el que reporta la industria citrícola, por lo que también en condiciones de relación S_0/X_0 éste resulta con un valor de 0.34 que representa la concentración de D-limoneno=952mg/L. En la Tabla 3.3 se muestra marcada la condición que se tomó para proceder a las pruebas siguientes en el RLSFI.

Tabla 3.3 Condiciones base para la pruebas de inhibición en el RLSFI

Experimento	D-limoneno suministrado (mL)	Concentración D-limoneno (mg/L)	DQOs alimentada (mg/L)	S_0/X_0	D-limoneno/sustrato
1	0	0	2,988.96	0.36	0
2	0.11	308	2,957.04	0.36	0.10
3	0.22	616	2,920.16	0.35	0.21
4	0.34	952	2,834.16	0.34	0.34

Estos resultados se adaptaron para el RLSFI tomando en cuenta el volumen útil y la carga, resultando un cambio en la relación D-limoneno/Sustrato, los resultados se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Condiciones nuevas para las pruebas de inhibición en el RLSFI

Pruebas en RLSFI	Valores	Unidades
Volumen útil	1.7	L
Carga de volumen útil	5	gDQO/L
Volumen de soporte colonizado	0.650	L
MVA de soporte colonizado	23.1	gSV/L
Relación S_0/X_0	0.56	----
Concentración de D-limoneno	952	mg/L

Se tomó en cuenta la densidad del D-limoneno siendo de 0.84 g/mL y la relación S_0/X_0 que es 0.56, de ésta forma resultó una relación D-limoneno/Sustrato de 0.59 que en concentración de D-limoneno es de 1680 mg/L. Por lo tanto la dosis de D-limoneno que se suministró al RLSFI fue de 3.4 mL D-limoneno para el volumen útil de 1.7 L. Cabe destacar que en consideraciones razonables los 952 mg/L correspondieron a la relación D-limoneno/Sustrato de 0.34, por lo tanto de ésta manera se procedió a realizar las pruebas con inhibidor con relación S_0/X_0 de 0.56 basados en la consideración de utilizar una relación D-limoneno/sustrato de 0.34 igual al de las pruebas cinéticas realizadas anteriormente.

3.4.1 Pruebas cinéticas para la cuantificación de la biomasa

Se montaron y monitorearon en tiempos cortos cuatro diferentes cinéticas, esto con el fin de conocer el grado de crecimiento de biomasa. En la Tabla 3.5 se observa la caracterización del sustrato y la biomasa en términos de STV y en las Figuras 3.18 y 3.19 se observan las proporciones utilizadas para el montaje de las pruebas.

Una vez acondicionados y caracterizados el sustrato y la biomasa se procedió a realizar las pruebas de crecimiento de biomasa. El volumen total utilizado para cada reactor batch fue de 300 mL de sustrato de los cuales el 1 % fueron de biomasa, por lo tanto solamente se utilizaron 3 mL de lodo metanogénico del reactor EGSB.

Tabla 3.5 Caracterización del Sustrato y Biomasa

MUESTRA	STV (mg/L)
Lodo del EGSB	12,480
Lodo del EGSB (24 horas)	16,240
Sustrato Cítrico Bruto	18,965
Sustrato Cítrico Centrifugado (3500 rpm-5min)	15,020



Figura 3.18 Sustrato Cítrico Centrifugado



Figura 3.19 Biomasa del reactor EGSB

Las tendencias que mostraron los experimentos durante las 72 horas de monitoreo se muestran en la Figura 3.20. Se observó que el sustrato crudo sin pH ajustado se mantuvo constante en valores de 6,600 mgSTV/L, el sustrato ajustado comenzó el proceso de 9,000 mgSTV/L y descendió a 6,200 mgSTV/L a las 24 y 48 horas, el sustrato crudo con inóculo sin pH ajustado inició con 7,000 mgSTV/L y se mantuvo en un promedio de 7,500 mgSTV/L durante las 72 horas. De manera importante el sustrato con inóculo ajustado en pH inició con 6,000 mgSTV/L y a las 24, 48 y 72 horas se mantuvo en un promedio de 8,000 mgSTV/L. Con éstos resultados podemos concluir que la biomasa no crece en grandes cantidades en un tiempo de 72 horas para una experimentación cinética, con estas pruebas se logró demostrar que al

realizar pruebas cinéticas con o sin inhibición, la biomasa se mantiene constante y por lo tanto con esto se hizo válida la consideración de que la biomasa en tiempos cortos se mantiene constante así como lo menciona Martín et al., (2010).

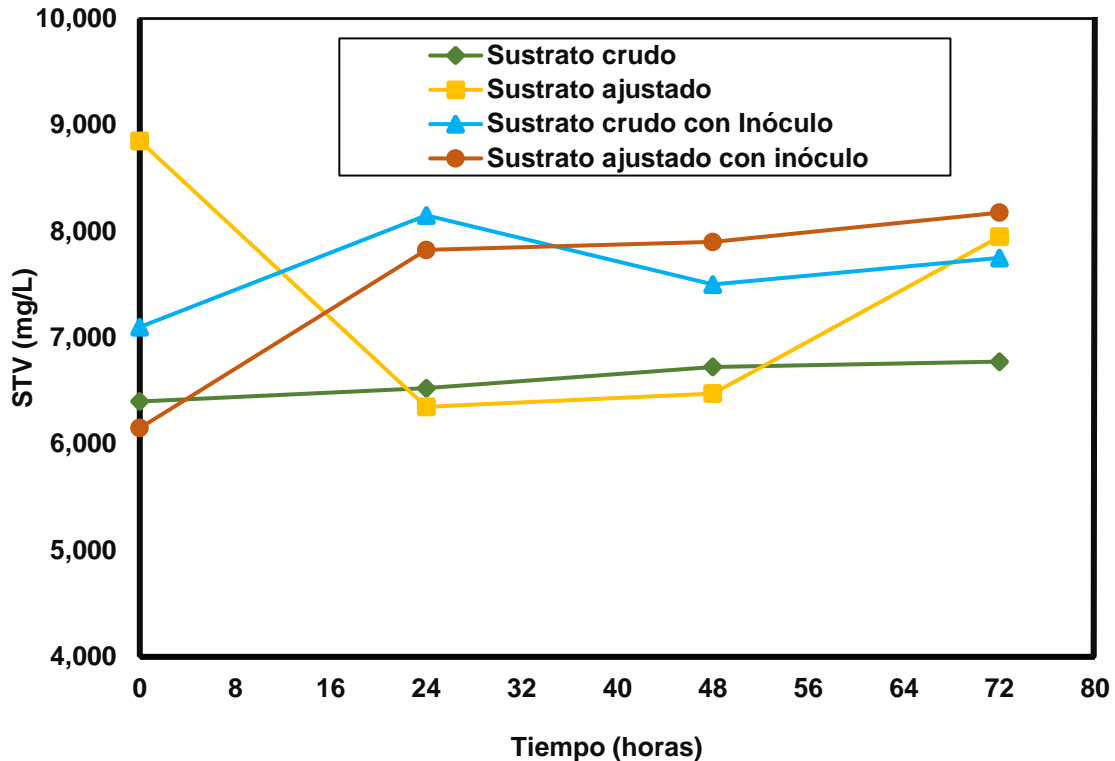


Figura 3.20 Monitoreo de los STV en pruebas de crecimiento de biomasa

3.4.2 Monitoreo del RLSFI de modo continuo a modo batch

Antes de realizar las pruebas cinéticas de inhibición dentro del interior del RLSFI se operó el reactor en un tiempo más de 8 días en modo continuo, con el fin de adaptar las condiciones a carga baja. Se operó a una carga de 15 gDQO/L y se monitorearon pH, DQOs, y volumen de biogás acumulado.

En la Figura 3.21 se muestra que el pH tuvo una tendencia favorable, el pH de entrada fue neutro y la salida con un promedio de 7.19, esto debido a la capacidad buffer

adquirida del reactor durante los 150 días de estabilización, debido a ello se observaron oscilaciones del pH pero no presento problemas de acidificación.

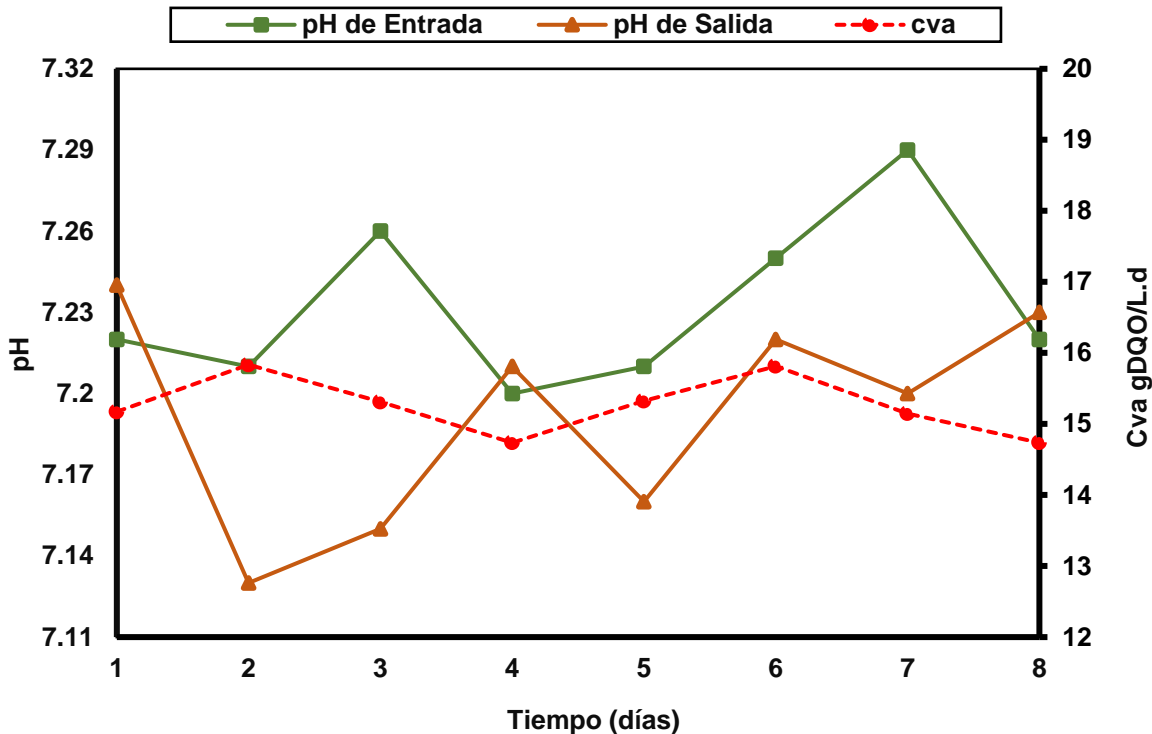


Figura 3.21 Monitoreo del pH a carga de 15 gDQO/L.d en el RLSFI

Como se observa en la Figura 3.22 la remoción de materia orgánica con carga menor también fue muy favorable, ya que se lograron remociones de 44 % DQOs removida, esto indicó que el reactor sin problemas se adaptó a una carga menor pero aun relevante. El objetivo principal del RLFSI es la remoción del sustrato de alimentación lográndose a través de la actividad metabólica del consorcio bacteriano adherido al soporte (Vaccari et al., 2006). Por lo que para este cambio de carga se observó que el reactor se mantenía en condiciones adecuadas en cuanto a la remoción del sustrato cítrico.

El RLSFI mostró producción de biogás menor en los primeros días pero a partir del día 5 la producción del biogás se mantuvo a 1.4 L, a pesar de ello se observó que el reactor no mostró un marcado descenso en la producción de biogás, lo cual confirmó el buen

grado de colonización del soporte y su buen desarrollo durante los primeros 150 días de operación a carga de 25 gDQO/L.d.

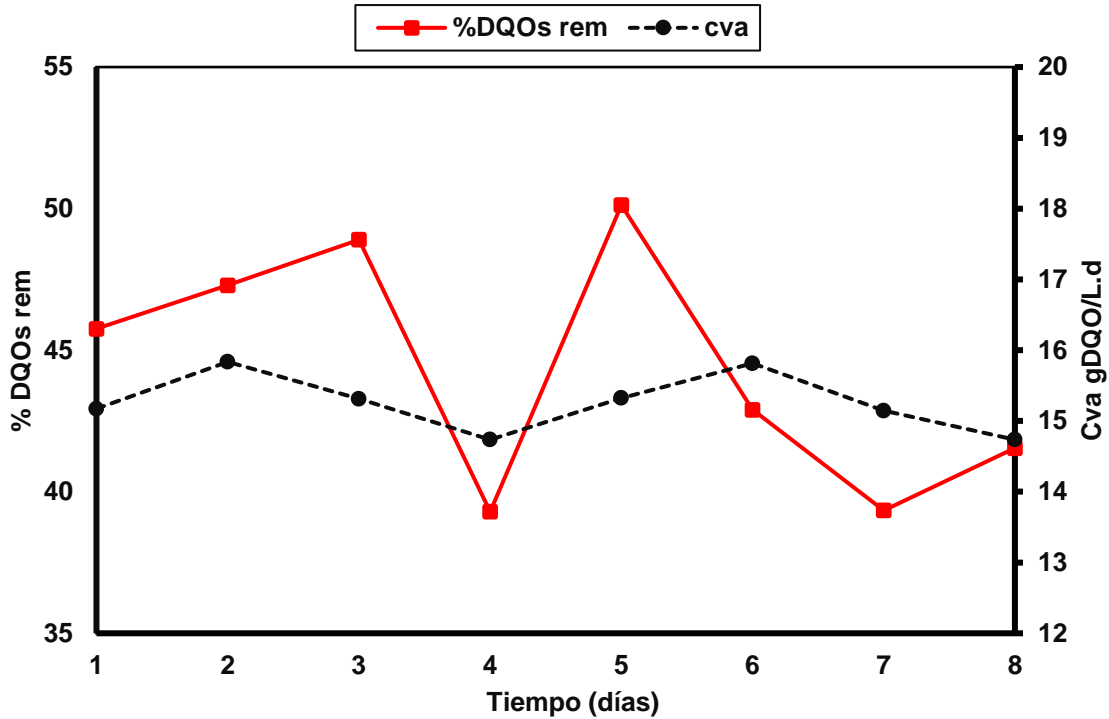


Figura 3.22 Comportamiento del % DQOs removida a carga de 15 gDQO/L.d en el RLSFI

3.4.3 Cinéticas sin inhibidor en RLSFI en modo batch

Se realizaron dos cinéticas sin inhibidor en modo batch con respectivas réplicas dentro del contenido del RSFI, con el objetivo de observar en que relaciones de S_o/X_o se obtenían mejores resultados. En la Tabla 3.6 se muestra de manera ordenada el modo en que cada cinética le fue asignada un número y su respectiva réplica, de esa manera fueron montadas y monitoreadas.

Tabla 3.6 Cinéticas sin inhibidor en RLSFI en modo batch

Número de Cinética	Sustrato	Biomasa	S_0/X_0
C1	3 g DQOs /L	21.7 g SV/L	0.35
C2	3 g DQOs /L	21.7 g SV/L	0.35
C3	5 g DQOs /L	21.7 g SV/L	0.56
C4	5 g DQOs /L	21.7 g SV/L	0.56

En la figura 3.23 se muestran las tendencias que presentaron los pH a la salida. Se observó que a las primeras 8 horas se presentó una ligera acidificación debido al comienzo de la producción de ácidos grasos volátiles en la etapa hidrólisis y acidogénesis de la digestión anaerobia.

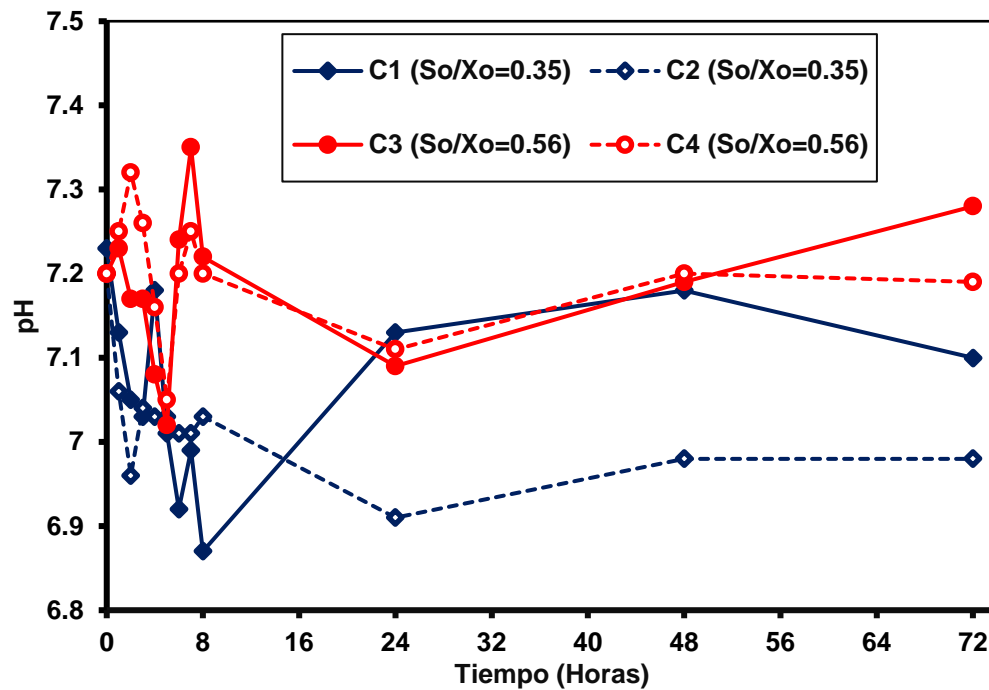


Figura 3.23 Monitoreo del pH en cinéticas sin inhibidor en el RLSFI

De esa manera el pH se mostró a la baja, pero no menor de 6.8, a las horas 24 se mantuvieron en condiciones constantes pero diferentes en el sentido de que las cinéticas con relación de S_0/X_0 de 0.35 se mantuvieron en pH de 7.1, mientras que las

relaciones de S_o/X_o de 0.56 se mantuvieron por debajo de la neutralidad, a pesar de que se cambió el modo de operar el reactor no se presentaron problemas de acidificación.

Las cinéticas C1, C2, C3 Y C4 también fueron monitoreadas a la entrada y a la salida del reactor en DQOs. Se observó que la degradación llevó una misma tendencia, ya que las C1 Y C2 que fueron de relaciones de S_o/X_o de 0.35, iniciaron el proceso con DQOs en promedio de 3,000 mg/L descendiendo a 2,000 mg/L a las 12 horas y finalmente en las horas 48 y 72 se mantuvo hasta DQOs de 1500mg/L, la Figura 3.24 muestra las tendencias de DQOs en todas las pruebas sin inhibidor.

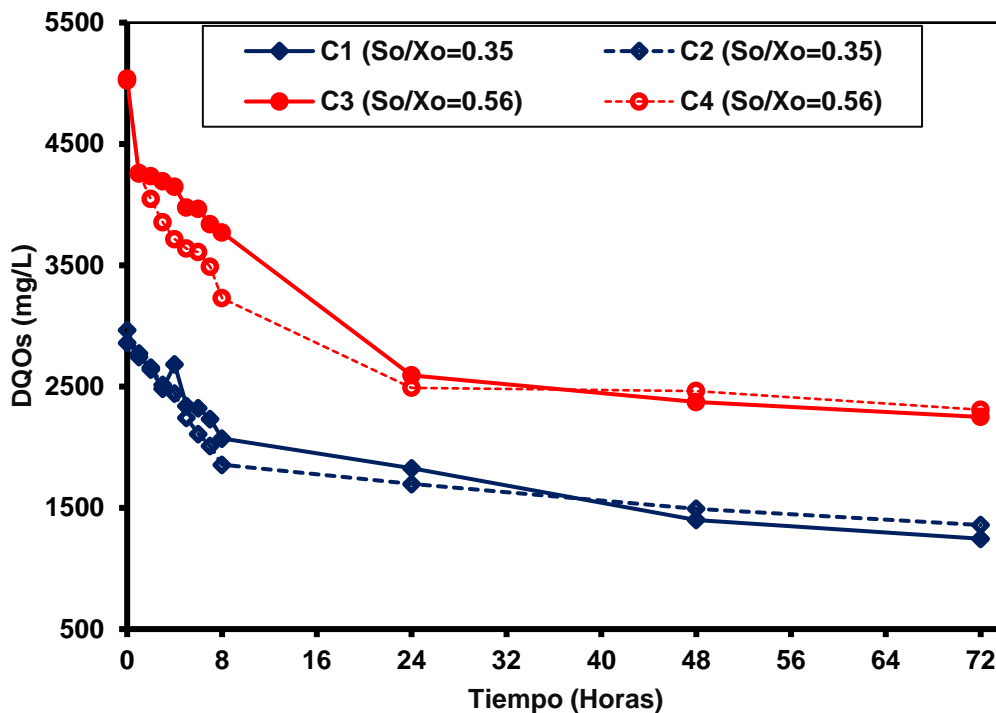


Figura 3.24 Monitoreo de la DQOs en las pruebas sin inhibidor en el RLSFI

Las C3 y C4 también mostraron similar comportamiento con la diferencia de que las cargas iniciales fueron de valores cercanos a 5,000 mg/L de DQOs. Se observó de igual manera que a 2,700 mg/L la materia ya no es fácilmente biodegradable, de ésta

manera se reflejó que del total de materia orgánica biodegradable que entra al proceso de digestión anaerobia, se observa que hay una cantidad considerablemente no biodegradable, ya que la degradación que se observa ya no es tan significativa por esa razón esto se nota claramente en tiempos cortos de monitoreo. Las remociones de materia orgánica en términos de % DQO_s removida mostraron hasta 55 % DQO_s removida, en la Figura 3.25 se observa destacadamente que los valores fueron similares a pesar de que las cargas fueron de 3,000 mg/L y 5,000 mg/L. Se observó que a mayor carga se logran remociones similares esto debido que a pesar de una diferencia en carga de 2,000 mg/L no hace notar un cambio destacable ya que aún esas cargas siguen siendo bajas, por ello se presentó la similitud en degradación.

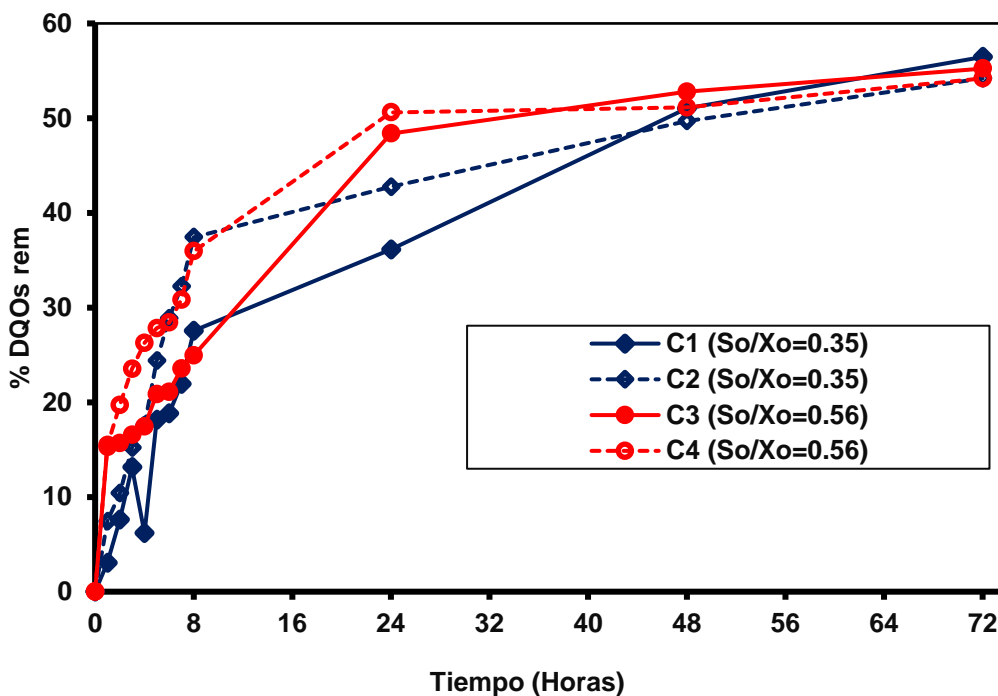


Figura 3.25 % DQO_s removida en las pruebas sin inhibidor en el RLSFI

La producción de biogás fue muy considerable, ya que aunque se observaron valores de misma tendencia en cuanto a DQO_s y % DQO_s removida, para el volumen de biogás acumulado fue diferente y totalmente ventajoso, ya que con relaciones de S_o/X_o de 0.35 la producción de biogás se logró hasta en un total de 1.4 L mientras que en

las relaciones de 0.56 la producción fue de hasta 2.3 L. Con ello se pudo comprobar la ventaja que tuvo de utilizar la carga de 5,000 mg/L de sustrato para las próximas pruebas con inhibidor.

En cada una de las cinéticas realizadas en el RLSFI sin inhibidor, se midió el Y_{CH_4} con el fin de observar de otra manera en cual prueba resultado de mayor ventaja. En la Figura 3.27 se observa que con las C1 y C2 a las 8 horas lograron solamente 0.50 L_{CH_4}/g DQOs removida, pero a las 24 horas aumentaron a 0.100 L_{CH_4}/g DQOs, a las 72 horas se observaron valores en promedio de 0.50 L_{CH_4}/g DQOs por lo que entonces finalmente a las 48 horas se observó que se lograron los mayores rendimientos de hasta 0.200 L_{CH_4}/g DQOs.

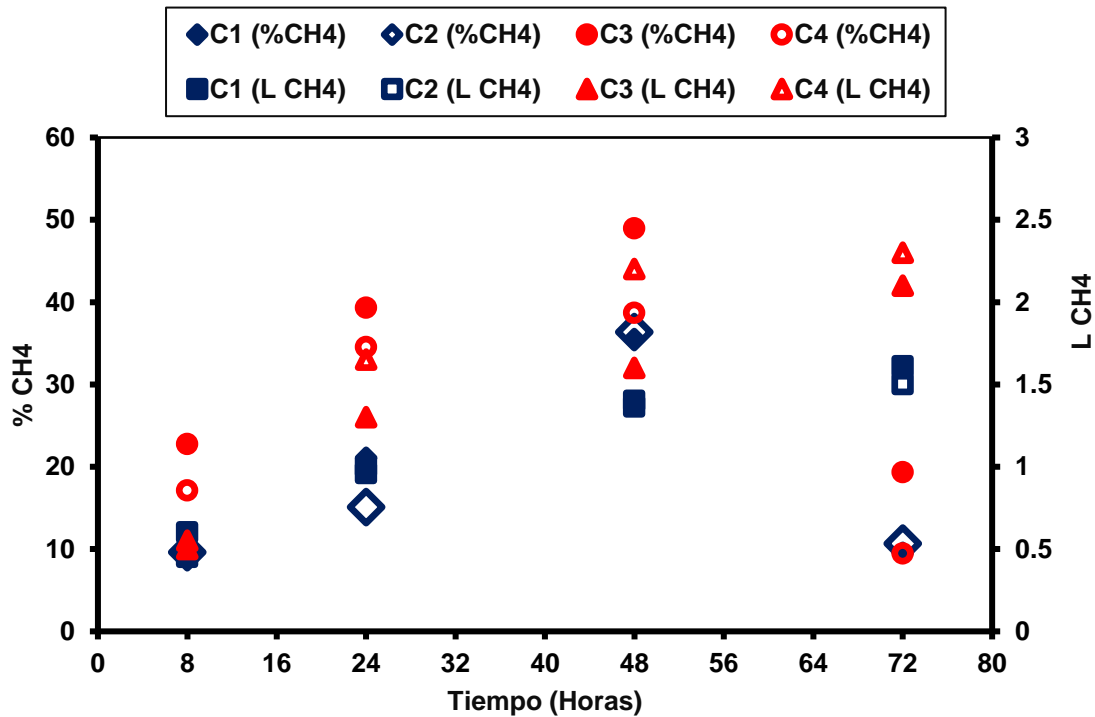


Figura 3.26 % CH4 y volumen de biogás generado sin inhibidor en el RLSFI

Las C3 Y C4 llevaron una similar tendencia respecto a las C1 Y C4, pero con rendimientos aún mayores en las 8, 24 y 72 horas, pero en la hora 48 se observaron

ligeramente menores los rendimientos, a pesar de ello con estas determinaciones se consideraron que las C3 y C4 que presentan relaciones de S_0/X_0 de 0.56 son los que mejor arrojan resultados, y por lo tanto fueron la base para posteriormente efectuar las pruebas con inhibidor en el RLSFI.

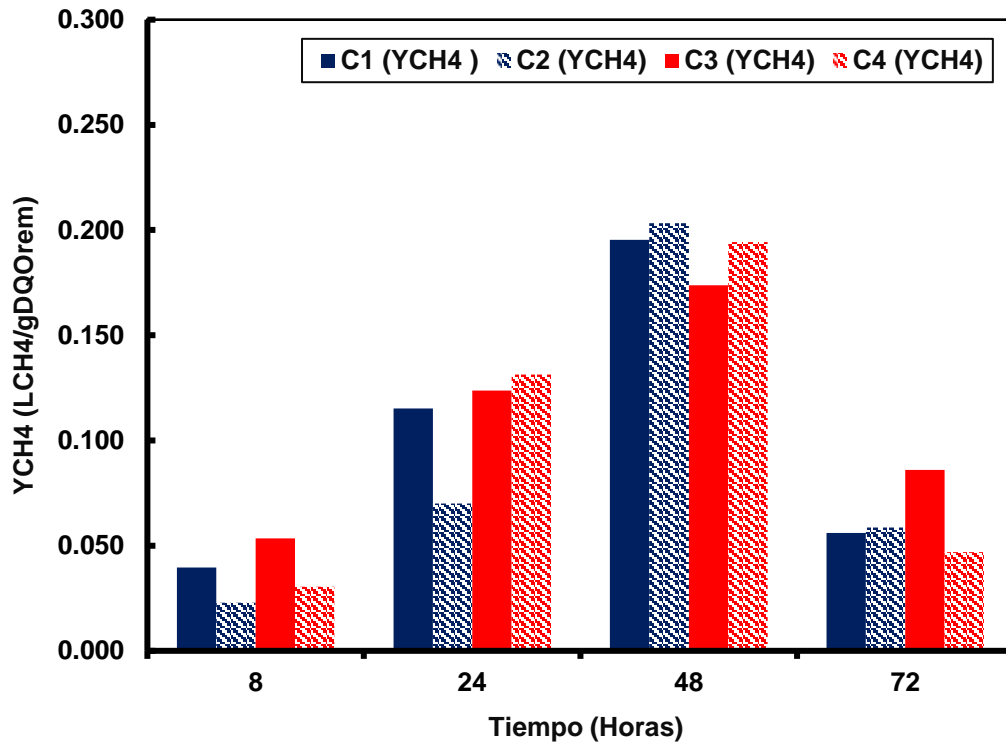


Figura 3.27 Monitoreo del Y_{CH_4} en las pruebas sin inhibidor en el RLSFI

3.4.4 Cinéticas con D-limoneno en RLSFI en modo batch

En base a los resultados obtenidos por las C1, C2, C3 y C4 se procedieron a realizar las pruebas cinéticas con inhibidor en tiempo de 72 horas, de igual manera en modo batch. Se acondicionó el pH a la neutralidad, se monitorearon los parámetros pH, DQOs, biogás y Y_{CH_4} .

Se realizaron en total 3 réplicas más y se compararon con los resultados obtenidos sin inhibidor de las C3 y C4 ya que son los que fueron de la misma carga de 5 g DQOs/L,

esto para verificar los rangos que permitieron observar la inhibición. En la Tabla 3.7 se muestra también de manera ordenada el modo en que cada cinética le fue asignada un número y su respectiva réplica de prueba con inhibidor D-limoneno y de esa manera fueron montadas y monitoreadas.

Tabla 3.7 Cinéticas con inhibidor en RLSFI en modo batch

Número de Cinética	Sustrato	Biomasa	So/Xo	D-limoneno/Sustrato
C5	5 g DQOs /L	23.1 g SV/L	0.56	0.59
C6	5 g DQOs /L	23.1 g SV/L	0.56	0.59
C7	5 g DQOs /L	23.1 g SV/L	0.56	0.59

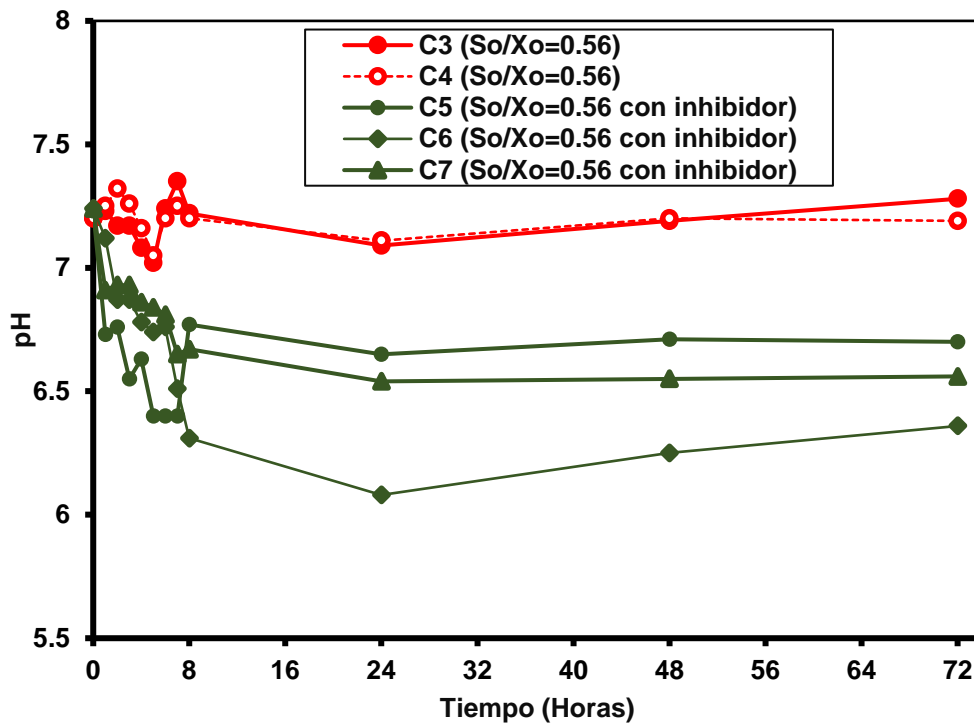


Figura 3.28 Comparación del pH de pruebas con y sin inhibidor en el RLSFI

En la Figura 3.28 se observa que el pH mostró acidificación desde las primeras 8 horas, en la prueba con inhibidor C5 se observó que se mantuvo en pH de 6.7 en las 24, 48,

y 72 horas, pero en cambio en las pruebas con inhibidor C7 se observó que el pH se mostró aún más a la baja de entre pH de 6.4 y 6.1.

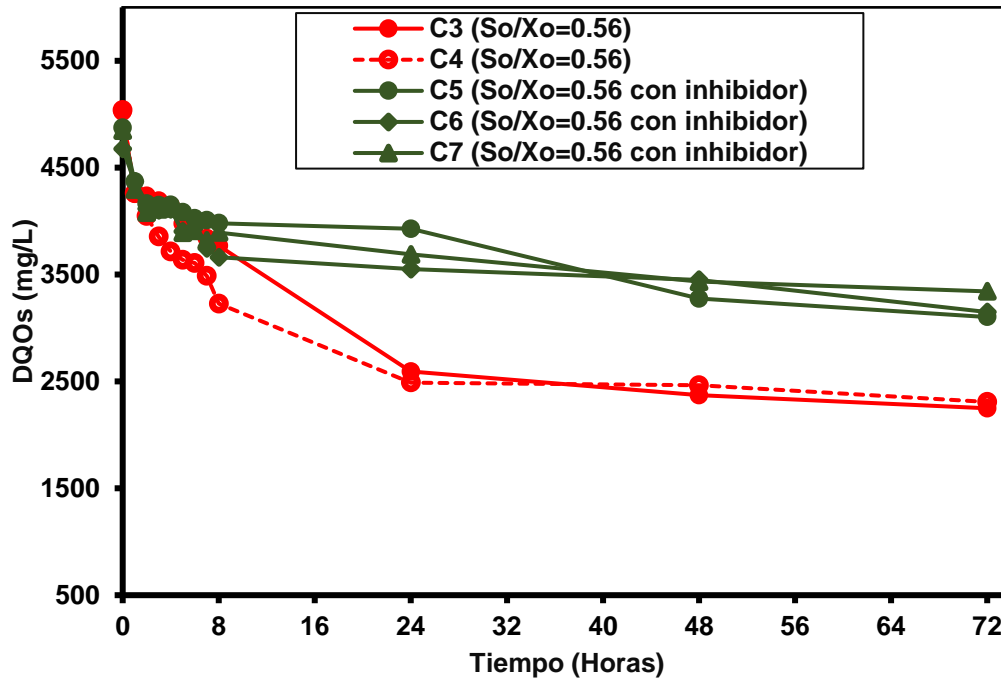


Figura 3.29 Monitoreo de la DQOs en las pruebas con inhibidor en el RLSFI

En la Figura 3.29 se muestra el monitoreo de la DQOs mostró ser similar en ambas réplicas ya que desde las 24 horas mostraron de 3,600 mg/L a 3,700 mg/L de DQOs, de manera notable se observó que a las 72 horas se lograron mantener en para ambos casos 3,500 mg/L de sustrato. Con esto se observó respecto a la prueba sin inhibidor que efectivamente ya se comenzó a efectuar la inhibición pues se notaron diferencias muy significativas que retrasaron el proceso de digestión anaerobia.

La degradación de la materia orgánica en términos de % DQOs removida, también se mostró hasta su punto máximo notándose que desde las 24 horas las remociones iniciaron de entre 18 y 25 % DQOs removida, logrando llegar solamente hasta el 30 a 33 % DQOs removida a las 72 horas. Estos mismo resultados corroboran la inhibición

de un 65 % DQOs removida mientras que sin inhibidor se llegan a obtener solamente hasta el 33 % DQOs removida.

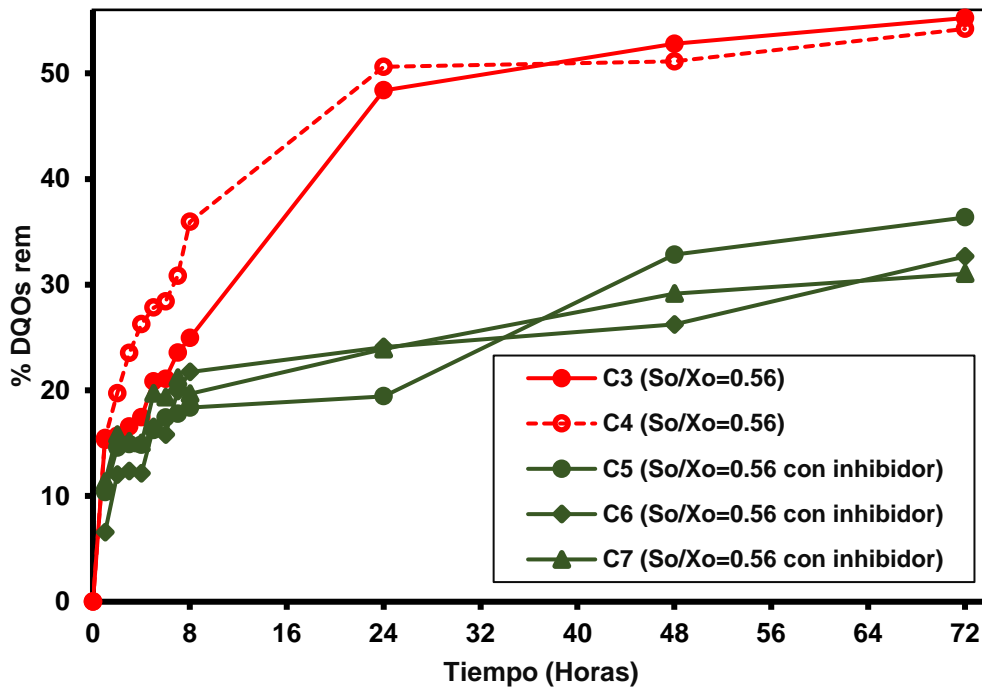


Figura 3.30 %DQOs removida en las pruebas con inhibidor en el RLSFI

Por otro lado y de manera importante, la producción de biogás y rendimientos de metano se mostraron de igual forma a la baja.

En la Figura 3.31 se observa que los Y_{CH_4} fueron menores con respecto a las pruebas sin inhibidor, por lo que con ello se asumió que el D-limoneno logró a esas concentraciones inhibir el proceso y que si se requiere observar que los rendimientos fueran aun menores se podrían realizar aún más pruebas para lograr también notar si el proceso logra adaptarse, es decir que a esas condiciones el inóculo pudiera adaptarse y en algún momento poder elevar de nueva cuenta los valores obtenidos en cuanto volumen de biogás, % de CH_4 , y Y_{CH_4} .

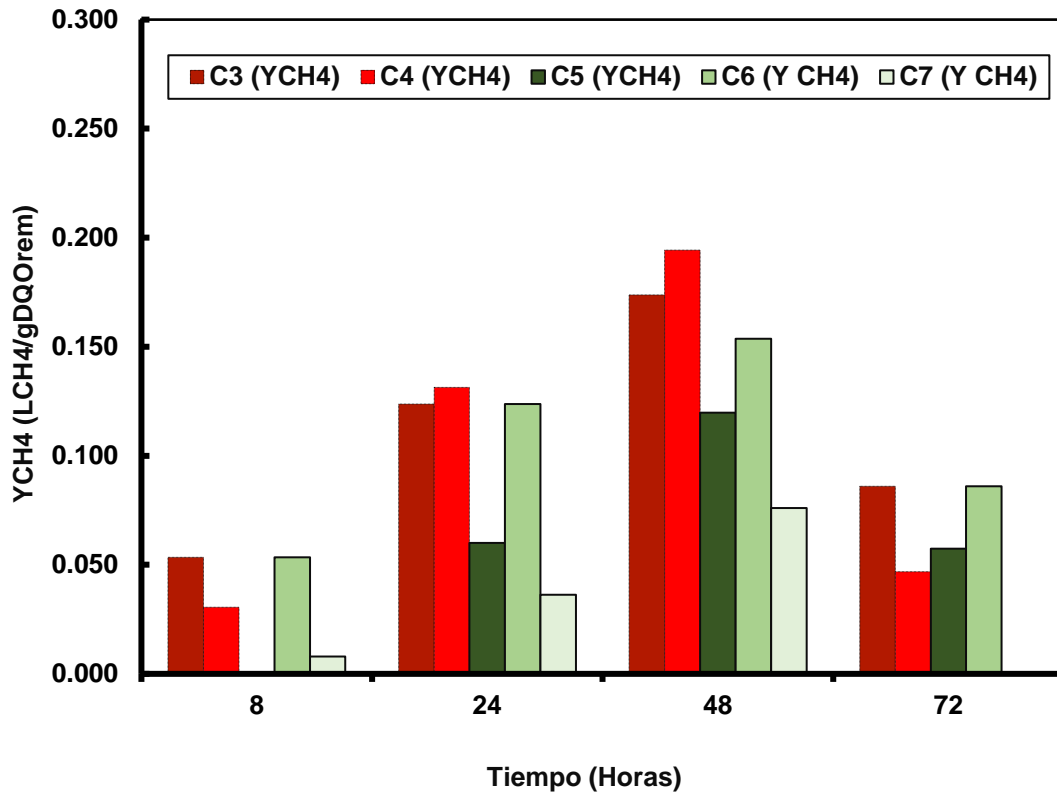


Figura 3.31 Monitoreo del % CH₄ y Y_{CH4} en las pruebas con inhibidor en el RLSFI

La Figura 3.31 muestra la comparación de los Y_{CH4} de entre las réplicas sin inhibidor (C3 y C4) con los obtenidos por la pruebas con inhibidor (C5, C6 y C7). Se aprecia que los rendimientos de la réplica con D-limoneno (C7) inician a la hora 8 con 0.0079 L/gDQOs removida, a la hora 24 con 0.0362 L/gDQOs rem, a la hora 48 con 0.0759 L/g DQOs removida, pero a la hora 72 éste llega a ser despreciable, evidenciándose así el efecto de la inhibición.

3.4.5 Proceso reversible en cinéticas sin D-limoneno

De acuerdo a lo observado en C5, C6 Y C7 se realizaron 3 pruebas más pero sin D-limoneno (C8, C9, C10) de esta manera se observó que el caso fue de un proceso de digestión anaerobia reversible, es decir, las bacterias anaerobias luego de ya no tener interrupción por el inhibidor D-limoneno durante 216 horas se adecuaron de nueva cuenta a una condición estable como el de las pruebas sin inhibidor (C3 Y C4), luego de ser alimentado el reactor a misma carga. Se observó que 216 horas más fueron

suficientes para que el reactor comenzara a acondicionarse a la normalidad respecto a los parámetros monitoreados DQOs y producción de biogás, pero sobre todo reflejándose en la recuperación de los % DQOs removida Y_{CH_4} los cuales iniciaron a notarse desde las primeras horas.

En la Figura 3.32 se muestra que a las 8 horas los rendimientos de las C3, C4, C8, C9 y C10 son en promedio de 0.040 L_{CH_4}/g DQOs removida, pero en las horas 24 y 48 se observa considerablemente la caída de los rendimientos de C8 y C9 ya que C3 Y C4 presentaron 0.125 L_{CH_4}/g DQOs removida y 0.180 L_{CH_4}/g DQOs removida, mientras que C8 y C9 tendieron a la baja en rendimientos a 0.050 L_{CH_4}/g DQOs removida y 0.090 L_{CH_4}/g DQOs removida respectivamente. Por otro lado a la hora 72 se observó de manera significativa un proceso reversible ya que en C8, C9 Y C10 se observaron aumentos considerables de los rendimientos comparados con C3 y C4 de 0.065 L_{CH_4}/g DQOs removida a 0.100 L_{CH_4}/g DQOs removida de C8,C9 y C10.

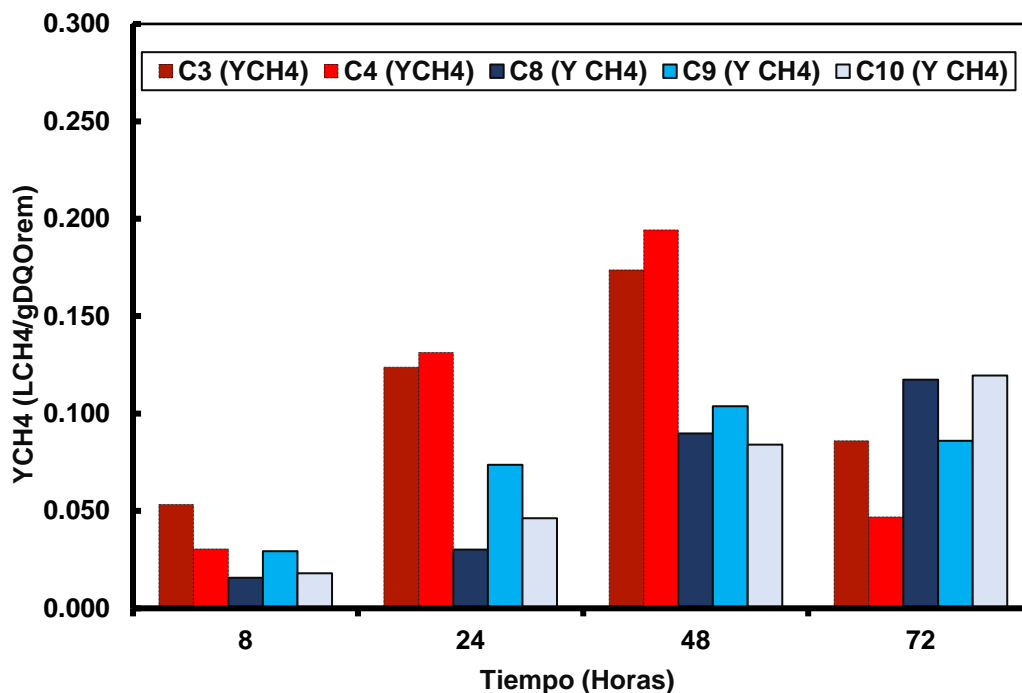


Figura 3.32 Recuperación del Y_{CH_4} (proceso reversible)

En la Figura 3.33 se observa también de manera muy considerable el aumento de los % DQOs removida, ya que a las 72 horas fueron aumentando desde 30 % DQOs removida de C5, C6 y C7 hasta 40 % DQOs removida de C8, C9 y C10. Por lo anterior se puede considerar que si el experimento de reversibilidad se prologara aun en más tiempo se lograría que el reactor retome o incluso rebase las condiciones de C3 y C4 los cuales presentan hasta 0.180 L_{CH4}/gDQOs removida y hasta 55 % DQOs removida.

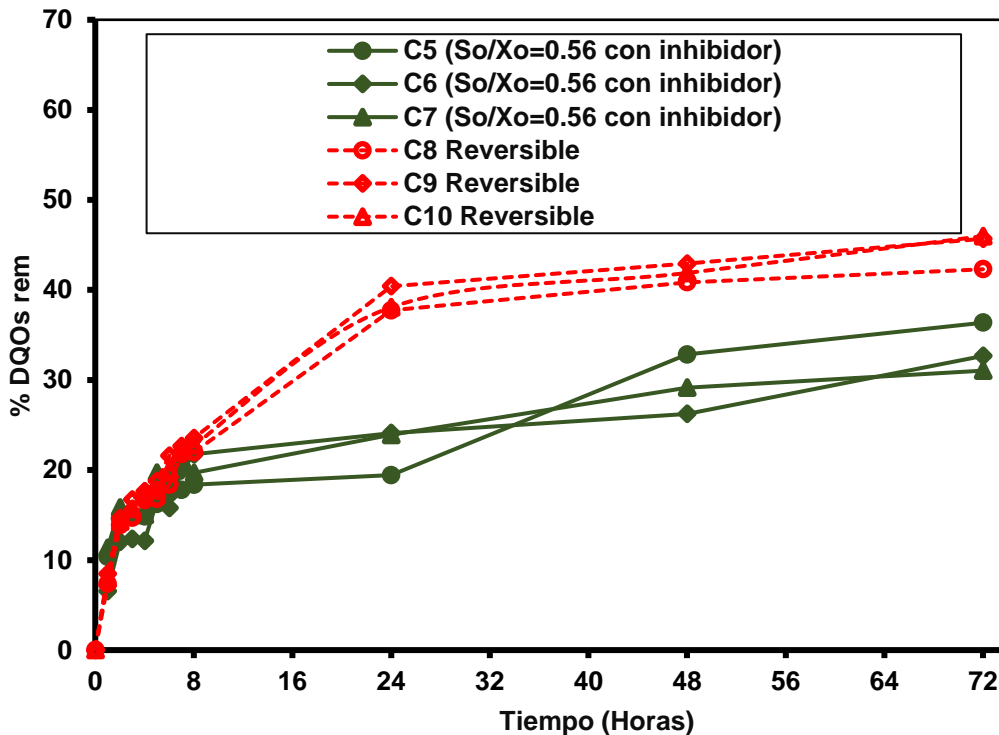


Figura 3.33 Recuperación del % DQOs rem (proceso reversible)

3.5 Estimación de parámetros biocinéticos de las pruebas de inhibición Etapa I

En ésta etapa I se hicieron en total cinco pruebas tipo batch con los cuales se realizó la obtención de los coeficientes biocinéticos a partir de la cinética cinco, ya que fue en ésta cinética donde se apreció un perfil bien definido de inhibición como se describió anteriormente.

3.5.1 Patrón de inhibición de las pruebas etapa I

De acuerdo, al patrón de comportamiento para inhibición no competitiva pura de la Figura 2.9 y de inhibición no competitiva mixta de la Figura 2.10, se puede apreciar en la Figura 3.34 que el tipo de inhibición para la cinética cinco es no competitiva y no competitiva mixta.

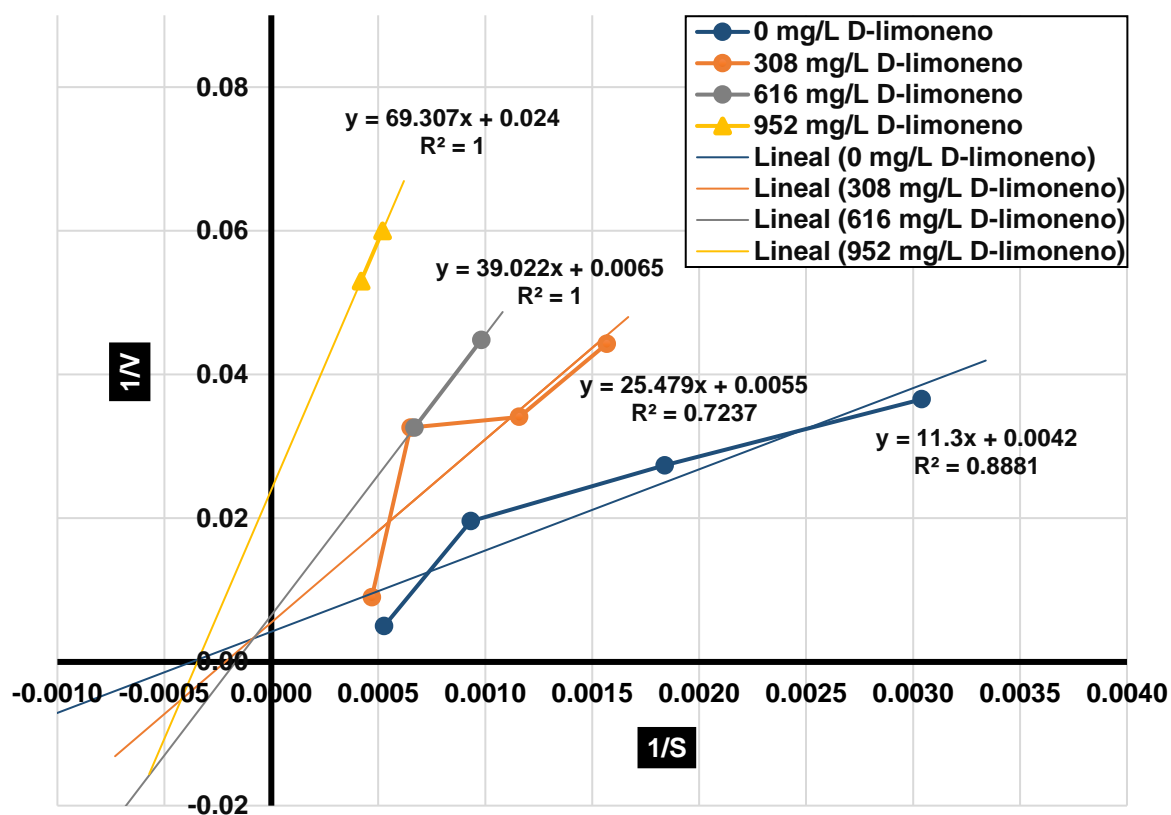


Figura 3.34 Patrón de Inhibición de los datos experimentales de la Etapa I.

Se observa que las intersecciones de la extrapolación de los experimentos con 308 y 616 de D-limoneno no coinciden con la línea extrapolada del experimento control (0 mg/L de D-limoneno), pero el experimento con 952 mg/L si coincide en el eje "x" con el control. Con la linealización de las velocidades de reacción contra las concentraciones de sustrato, se construyó el gráfico de dobles recíprocos o Lineweaver-Burk mostrado en la Figura 3.13.

3.5.2 Obtención de valores biocinéticos etapa I

Se analizó la Figura 3.13 y se encontraron los valores para los coeficientes biocinéticos K_m , V_{max} , $K_{m\ ap}$, $V_{max\ ap}$, K_{ii} y K_{ic} , que se encuentran en la Tabla 3.8. Para obtener los valores de K_m y V_{max} , se usó la Ecuación 1.1, estos valores sirvieron de referencia para calcular $K_{m\ ap}$, $V_{max\ ap}$, K_{ii} y K_{ic} , por medio de las Ecuaciones 2.2, 2.6, 2.8, 2.9, 2.11 y 2.12.

Tabla 3.8 Valores biocinéticos experimentales

PRUEBA	[S] DQOs inicial (mg/L)	[i] D-limoneno (mg/L)	K_m (mg/L)	V_{max} (mg/L.h)	K_{ii} (mg/L)	K_{ic} (mg/L)	$K_{m\ ap}$ (mg/L)	$V_{max\ ap}$ (mg/L.h)
1	2299	0	2690	238	****	****	****	****
2	2212	308	2690	238	1001	246	4632	182
3	2863	616	2690	238	1108	249	6003	153
4	2963	952	2690	238	204	187	2888	42

Estos valores tienen un comportamiento lógico de acuerdo con el patrón de la Figura 3.33, sin embargo; fueron optimizados por medio del Software Berkeley-Madonna Versión 8.3.14 con las herramientas “Curve Fit” y “Define Sliders”.

En la Tabla 3.9 se presentan los valores simulados y en ella se observa que en relación con K_m , para el control se encontró un valor de 1,870 mg/L que es cercano al 50 % de la concentración inicial de sustrato, lo cual demuestra una alta afinidad de las enzimas producidas vía bacteriana con el sustrato.

Cuando se emplearon concentraciones de inhibidor de 308 y 616 mg/L, se observa que sus valores de K_m y por lo tanto sus valores de $K_{m\ ap}$ aumentaron respecto a la K_m del control y respecto a la concentración inicial de sustrato para cada experimento, lo cual indica que a mayor concentración de inhibidor, menor es la afinidad de las enzimas con el sustrato. No obstante, con 952 mg/L de $K_{m\ ap}$ tuvo un valor de 684 mg/L, es decir; cercano al que presentó el control y muy debajo de su respectiva concentración inicial de sustrato.

Tabla 3.9 Valores biocinéticos optimizados

PRUEBA	[S] DQOs inicial (mg/L)	[i] D-limoneno (mg/L)	K _m (mg/L)	V _{max} (mg/L.h)	K _{ii} (mg/L)	K _{ic} (mg/L)	K _{m ap} (mg/L)	V _{max ap} (mg/L.h)
1	2299	0	1870	89	****	****	****	****
2	2212	308	7566	141	2460	808	4922	124
3	2863	616	6700	106	4905	920	3041	79
4	2963	952	7100	126	230	930	684	24

El control presentó una V_{max} de 89 mg/L.h, la tendencia de manera general para cuando se utilizaron concentraciones de aceite esencial es una reducción en $V_{max ap}$ al aumentar las dosis como se muestra en la Tabla 3.10. Los valores de K_{ii} indican el equilibrio para determinar el rompimiento o unión del inhibidor con el complejo enzima-sustrato, con 308 y 616 mg/L de inhibidor se encontraron K_{ii} en aumento proporcional igual a 2,460 y 4,905 mg/L, respectivamente. Pero con 952 mg/L, K_{ii} disminuyó a 230 mg/L.

En el caso de K_{ic} , los valores fueron en aumento gradual conforme se incrementó la dosis de D-limoneno, estos valores indican que el inhibidor se unió a la enzima, formando un complejo enzima-inhibidor, pero los valores resultaron ser muy parecidos promediando 886 mg/L. Las diferencias de los valores de K_{ic} y K_{ii} son amplias, excepto para el Experimento 4, en el que la diferencia es mucho menor, pudiendo asumir que de $K_{ic} = K_{ii}$ y por tanto que $K_{ic} = K_{ii} = K_i$ que es la constante de inhibición no competitiva que es referida a la formación de un complejo enzima-inhibidor.

Por lo tanto, las inhibiciones de los experimentos 2 y 3 respecto al control, son de tipo no competitiva mixta, en la que el sustrato y el inhibidor se unen a la enzima en sitios activos diferentes, pero también el inhibidor afecta la unión del sustrato con la enzima, aumentando los valores de K_m y disminuyendo los valores de V_{max} . Mientras que el Experimento 4 respecto al control presentó una inhibición no competitiva en la que el sustrato y el inhibidor se unen a la enzima en sitios activos diferentes, pero el inhibidor

afecta la catálisis de la reacción, disminuyen V_{max} y teniendo el mismo valor de K_m que el control. Todo esto se puede observar con detalle en la Figura 3.33.

3.6 Estimación de parámetros biocinéticos de las pruebas de inhibición Etapa II

Tomando en cuenta los datos experimentales de las réplicas C3 y C4 sin inhibidor de la sección 3.4.3 y los de la sección 3.4.4 con inhibidor C5, C6, y C7 se siguió un análisis similar al de la sección 3.5 para la estimación de los parámetros biocinéticos.

Para esta segunda etapa solo se consideraron los valores promedio experimentales sin inhibidor C3 y C4, los cuales fueron pauta para conocer el tipo de inhibición con los valores promedio de las pruebas con inhibidor C5, C6 y C6. De acuerdo al planteamiento de la sección 3.4, la diferencia es que aquí se estudiaron y aplicaron los mismos modelos propuestos pero sobre pruebas de inhibición en el RLSFI, dicho reactor se caracteriza por contener biomasa fija.

3.6.1 Patrón de inhibición de las pruebas etapa II

En la Figura 3.35 se muestran los inversos de las velocidades de reacción y de las concentraciones de sustrato los cuáles presentan el patrón de inhibición. De manera destacada se observó una tendencia también de hacia un tipo de inhibición no competitiva pura, lo cual hace suponer que los valores de las constantes K_{ii} y K_{ic} de la inhibición no competitiva mixta tenderán a ser muy parecidos y pudieron así llamarse solamente K_i , que es la constante de inhibición no competitiva que se da entre la unión del inhibidor con la enzima.

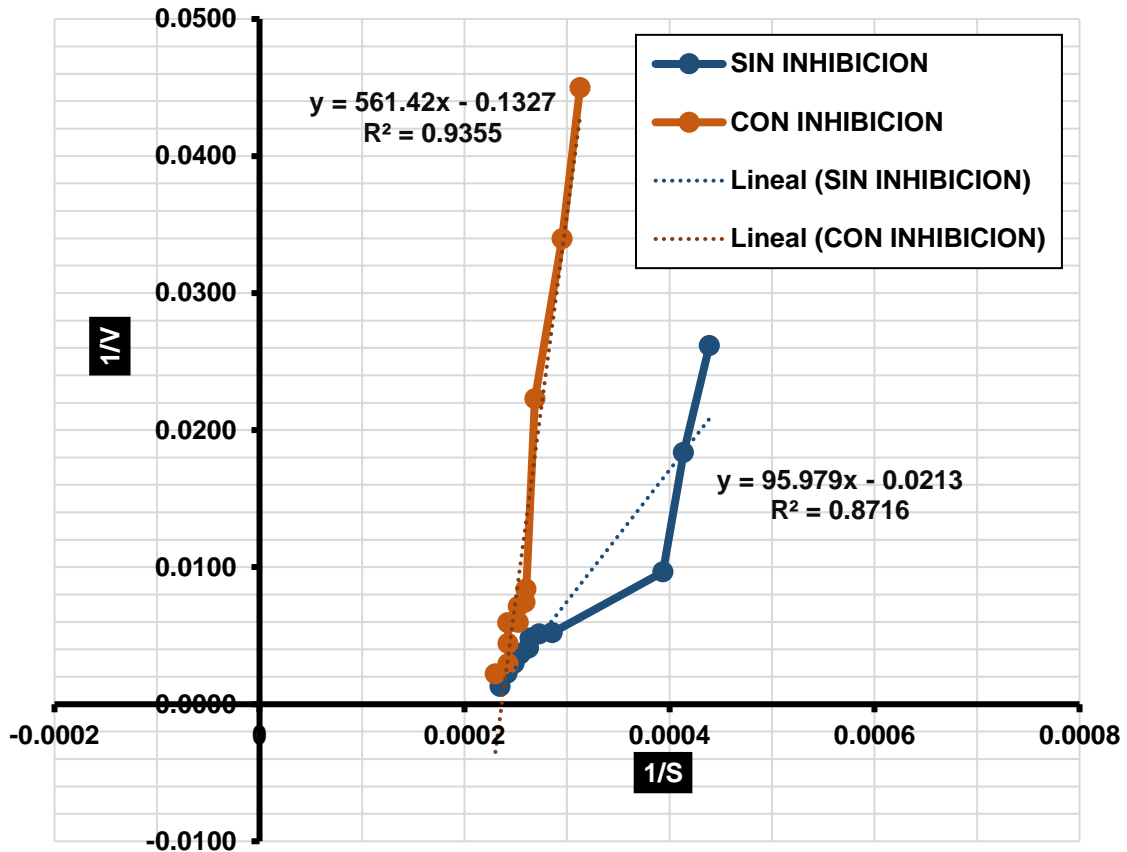


Figura 3.35 Patrón de inhibición de los datos experimentales de la etapa II

3.6.2 Obtención de valores biocinéticos etapa II

Los valores determinados experimentalmente se muestran en la Tabla 3.10, los cuales confirman las observaciones realizadas de manera gráfica, se nota que los valores de K_m con inhibidor son similares de los de K_m del control y a su vez muestran cierta tendencia de afinidad entre la enzima y el sustrato. Por otro lado V_{max} disminuye con el aumento de concentración de D-limoneno. K_{ii} y K_{ic} presentan valores tendientes a la igualdad. Por otra parte, empleando la misma herramienta descrita con anterioridad se obtuvieron los valores optimizados.

Tabla 3.10 Valores biocinéticos experimentales en el RLSFI de la etapa II

Modelo	[S] DQOs inicial (mg/L)	[I] D-limoneno (mg/L)	K _m (mg/L)	V _{max} (mg/L.h)	K _{ii} (mg/L)	K _{ic} (mg/L)	K _{m ap} (mg/L)	V _{max ap} (mg/L.h)
Michaelis-Menten	5030	0	4502	46
No Competitiva Mixta	5030	1680	4502	46	301	324	227	7

Los valores obtenidos en la Tabla 3.10 fueron sometidos y calculados con la ecuación de Michaelis-Menten para los datos experimentales y con ecuación de inhibición no competitiva mixta con los datos experimentales con inhibidor. Estos mismos fueron optimizados y obtenidos en la Tabla 3.11, al comparar los valores optimizados observamos valores muy similares y cercanos.

3.11 Valores biocinéticos optimizados de la etapa II

Modelo	[S] DQOs inicial (mg/L)	[I] D-limoneno (mg/L)	K _m (mg/L)	V _{max} (mg/L.h)	K _{ii} (mg/L)	K _{ic} (mg/L)	K _{m ap} (mg/L)	V _{max ap} (mg/L.h)
Michaelis-Menten	5030	0	3600	113
No Competitiva Mixta	5030	1680	3501	163	331	348	118	26

En la Tabla 3.12 se presentan los valores experimentales y optimizados que fueron obtenidos utilizando los mismos datos con inhibidor anteriores los cuales también fueron probados con el modelo de inhibición no competitiva pura con el fin de conocer y comparar alguna similitud con los valores optimizados del modelo de inhibición no competitiva mixta. De manera destacada se logró observar que las constantes de inhibición de K_{ii}, K_{ic} de las Tablas 3.10 y 3.11 que corresponden al modelo de inhibición mixta, y K_i de la Tabla 3.12 que corresponden al modelo de inhibición no competitiva

pura, son muy similares con un promedio de 334 mg/L. Esto garantiza que la Figura 3.35 presenta con certeza una inhibición del tipo no competitiva pura.

3.12 Valores biocinéticos experimentales y optimizados de la etapa II

Modelo	[S]	[I]	Km	Vmax	Vmax ap	Ki
	DQOs inicial (mg/L)	D-limoneno (mg/L)	(mg/L)	(mg/L.h)	(mg/L.h)	(mg/L)
No Competitiva Pura (Experimental)	4799	1680	4502	46	7	302
No Competitiva Pura (Optimizados)	4799	1680	4101	464	70	402

Las constantes K_i antes mencionadas, pueden ser tomadas como IC_{50} y compararse con las reportadas por Begoña y Flotats, (2016), en la digestión anaerobia de residuos de cáscara de naranja bajo condiciones mesofílicas, con una constante de inhibición al 50 % (IC_{50}) = 423 y 669 mg/L, manejando hasta 3,000 mg/kg de limoneno, en la que mencionan que $K_i = IC_{50}$.

Los valores de IC_{50} obtenidos son inferiores a la concentración habitual de limoneno en los residuos de cítricos (Salgado-Segado et al., 2012) y, por lo tanto, es de esperar una inhibición de la digestión anaeróbica de los residuos de cítricos por D-limoneno.

3.7 Validación de los modelos matemáticos aplicados

Respecto a la etapa I los datos experimentales fueron suficientes para lograr la validación. En la Figura 3.36 se muestran los datos modelados vs los experimentales.

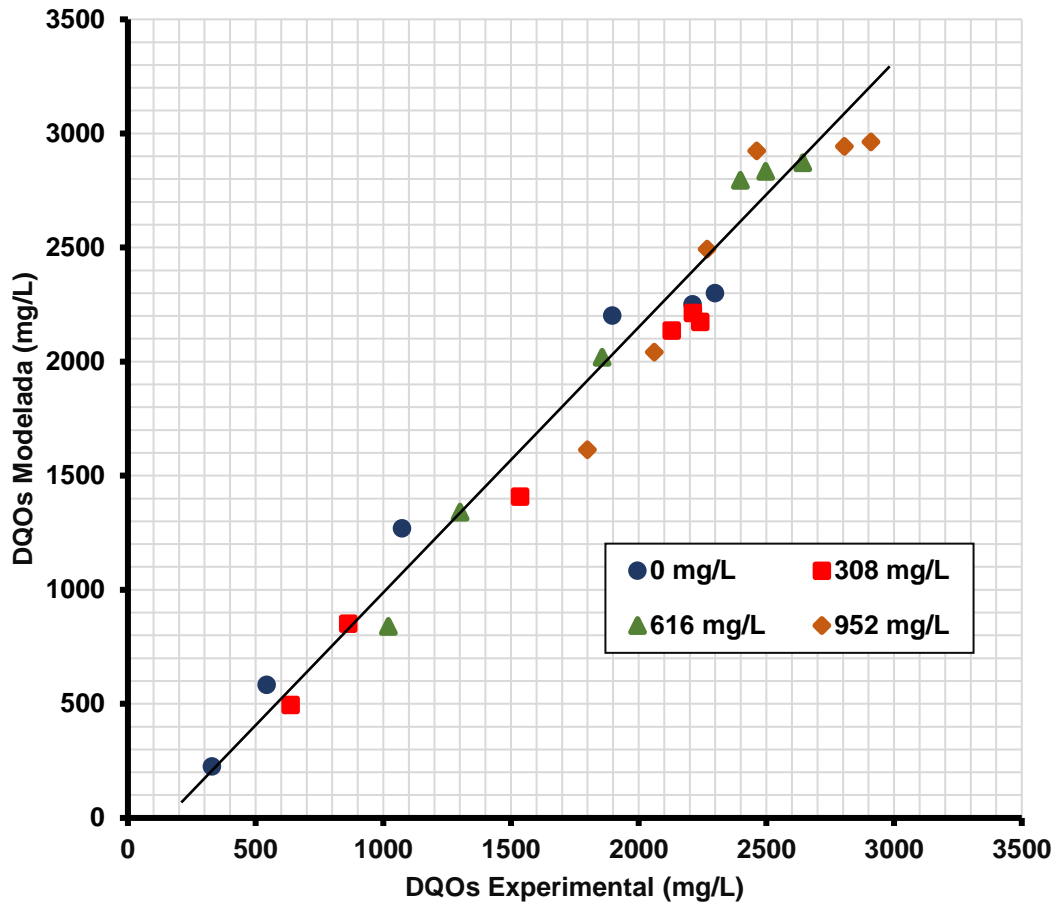


Figura 3.36 Datos modelados vs datos experimentales

Martín et al. (2010) realizaron un método de validación similar y reportan desviaciones de datos modelados contra experimentales entre el 10 y 20%. Siles et al. (2008) reportan desviaciones menores al 20% de datos modelados contra experimentales en el modelado de agua residual proveniente del proceso de prensado de cáscara de naranja.

Tabla 3.13 Coeficientes de correlación modelados vs experimentales etapa I

	[S]	[i]	Correlación
Prueba	DQOs inicial (mg/L)	D-limoneno (mg/L)	R ²
1	2,299	0	0.9884
2	2,212	308	0.9970
3	2,872	616	0.9948
4	2,963	952	0.9360

En la Tabla 3.13 se presenta el coeficiente de correlación R^2 para cada experimento de la etapa I. Se observa que a mayor concentración de inhibidor R^2 disminuye, pero aun si los ajustes presentan valores altos con intervalos similares a los de Martín et al. (2010) y Siles et al. (2008).

Tabla 3.14 Coeficientes de correlación modelados vs experimentales etapa II

Modelo	[S]	[i]	Correlación
	DQOs inicial (mg/L)	D-limoneno (mg/L)	R^2
Michaelis-Menten	5030	0	0.8844
No Competitiva Mixta	4799	1680	0.8381
No Competitiva Pura	4799	1680	0.8481

En la Tabla 3.14 se presentan los coeficientes de correlación R^2 que corresponden a los modelos aplicados en la etapa II de este trabajo. Se observó una correlación de $R^2=0.8481$ lo cual garantiza que el modelo es del tipo no competitivo puro en la experimentación de la inhibición de los experimentos en el RLSFI. De acuerdo a lo observado en todas las tablas anteriores, podemos decir que los coeficientes de correlación son menores cuando se manejan concentraciones de inhibidor mucho más altas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados observados durante el desarrollo del presente trabajo, la operación en modo continuo del RLSFI en 92 días a una carga constante de 25 gDQO/L.d logró hasta el 60 % DQOs removida y 0.0217 gSV/mL de MVA el cual representó el 80 % de grado de colonización del soporte, lo cual garantizó el desarrollo de la biopelícula lográndose así el inóculo anaerobio adecuado para utilizarse en las prueba cinéticas de la etapa II.

Respecto a las pruebas de inhibición de la etapa I, en promedio se utilizaron cargas de 3000 mg/L como sustrato y 12.30 gSV/L de lodo (biomasa suspendida). El D-limoneno fue suministrado en concentraciones de 0, 308, 616 y 952 mg/L, se obtuvieron valores de pH igual a 6.92, 6.84, 6.80 y 6.61. Por otro lado los porcentajes de remoción de DQOs fueron de 82, 71, 60 y 57 %. En cuanto al biogás cuantificado en términos de volúmenes fueron de 313, 277, 244 y 195 mL respectivamente. Se observó un ligero efecto de inhibición por D-limoneno a pesar de que se suministraron concentraciones extremas. Se tomó como base la dosis de 952 mg D-limoneno/L para la obtención de la nueva relación sustrato/biomasa aplicado en el RLSFI para la etapa II de las pruebas de inhibición.

En la etapa II, se adecuó la dosis de D-limoneno para ser aplicado a las condiciones del RLSFI con cargas de sustrato de 5,000 mgDQO/L y 21.7 gSV/L MVA lo que obligó a aumentar la dosis a 1680 mg/L de inhibidor y también con una relación sustrato/biomasa de 0.56. Se observó en promedio que debido a los incrementos de sustrato y una nueva condición de biomasa (suspendida a fija) que a las 72 horas el pH tendió a la acidificación llegando a 6.66, 6.65 y 6.79; los porcentajes de remoción de DQOs disminuyeron a 17, 16 y 18%, respectivamente. De acuerdo a lo evidenciado, la biomasa mostró un efecto de reversibilidad cuando se dejó de suministrar inhibidor

ya que el pH logró incrementar sus niveles a 6.83, 7.08 y 7.10; mientras que la DQOs alcanzó 21, 22 y 23% de remoción.

El modelado matemático en las pruebas de la etapa I, mostró que en concentraciones a partir de 308 hasta 616 mg/L, el D-limoneno actuó como inhibidor no competitivo mixto en la digestión anaerobia de efluentes de la industria citrícola, uniéndose a la enzima y al complejo enzima-sustrato, ya que los valores de K_m fueron aumentando, disminuyendo las V_{max} y con amplias diferencias entre K_{ii} y K_{ic} .

Los coeficientes biocinéticos determinados y aplicados en los modelos de Michaelis – Menten y de inhibición no competitiva mixta presentaron coeficientes de correlación entre $R^2=0.9360$ y $R^2=0.9884$ en referencia con los datos experimentales.

En cuanto al modelado de la etapa II, en concentraciones de 1680 mg/L de inhibidor, el D-limoneno se comportó como inhibidor no competitivo puro, ya que V_{max} disminuye al aumentar sus dosis, pero K_m tiene valores similares, siendo K_{ii} y K_{ic} muy parecidas transformándose en K_i afectando la unión enzima-inhibidor. Se validó el modelo de tipo no competitivo puro debido a que presentó también una mayor correlación de $R^2=0.8481$ respecto al modelo de inhibición no competitiva mixta.

RECOMENDACIONES

Realizar más pruebas de inhibición en modo batch utilizando las concentraciones 0 mg/L, 308 mg/L, 616 mg/L y 952 mg/L D-limoneno, pero con biomasa fija (soporte extensosphere) tomada del reactor piloto (RLSFI) ubicado en el Instituto Tecnológico de Orizaba. De esta manera se adecuarán mejor las pruebas que corresponden a la etapa II de este trabajo. Por otro lado probar la inhibición en modo semi-continuo y continuo de tal forma que se podrán obtener resultados válidos para posteriormente realizar una evaluación general y congruente de la inhibición.

Se recomienda evaluar los datos experimentales con otros modelos matemáticos más detallados como los del tipo Monod, en donde sobre todo se tomen en cuenta otros factores como pH, rendimiento de biogás y de manera precisa el crecimiento de la biomasa. Para ello es primero necesario investigar, aplicar y medir el crecimiento de la biomasa con algún método de cuantificación directa en todas las pruebas para así evitar interferencias.

Analizar los productos intermedios para definir con claridad la ruta metabólica de la digestión anaerobia de efluentes cítricos. De esa manera también aplicar un modelo matemático como el que sugiere Martín et al., (2010), quien formuló y aplicó un modelo matemático basado en cuatro ecuaciones diferenciales asumiendo que una fracción del sustrato cítrico no es biodegradable, y así propuso el estudio por un esquema simplificado donde estudió la hidrólisis y la conversión de compuestos orgánicos, los ácidos grasos volátiles y la metanización de los ácidos grasos volátiles por los microorganismos metanogénicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, Y. L., and Abreu, M. C. O., (2005), “La digestión anaerobia”, Aspectos teóricos, Parte I.

Antonio-Quaia, E. (2011). Reducción de la carga orgánica de las aguas de lavado de cáscara del limón por fermentación con levaduras y obtención del alcohol etílico. Tesis de grado. Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Tecnológica Nacional. Argentina.

Alvarado-Lassman, A., Rustrián, E., García-Alvarado, M. A., RodríguezJiménez, G. C., and Houbroun, E. (2008). Brewery wastewater treatment using anaerobic inverse fluidized bed reactors. *Bioresource technology*. **99**(8): 3009-3015

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*. **46**(2): 446-475.

Boluda-Aguilar, M., and López-Gómez, A. (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*. **41**: 188-197.

Calabrò, P. S., Pontoni, L., Porqueddu, I., Greco, R., Pirozzi, F., and Malpei, F. (2016). Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: Preliminary batch results. *Waste Management*. **48**: 440-447.

Cerón–Salazar I y Cardona–Alzate, C (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de la cáscara de naranja. *Ingeniería y Ciencia*. **7**(13): 65-86.

Chen, Y., Cheng, J. J., and Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource technology*, **99**(10), 4044-4064.

CCM (2007). Consejo Citrícola Mexicano. Informe de la industria mexicana de naranja fresca. Disponible en: <http://www.dimensionx.com.mx/ccm/naranjaES.pdf>. Consultado en febrero 2016

Domínguez-Hernández, E. (2016). Diseño e implementación de un reactor de lecho semifluidizado inverso para el tratamiento anaerobio de un efluente de la industria citrícola. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química, Instituto Tecnológico de Orizaba, México.

FAOSTAT 2015 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. DATA BY EXPLORING. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/home/E>. Consultada en Septiembre de 2016

Fisher, K., and Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. *Trends in food science and technology*. **19** (3): 156-164.

Forgács, G., Pourbafrani, M., Niklasson, C., Taherzadeh, M. J., and Hováth, I. S. (2012). Methane production from citrus wastes: process development and cost estimation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **87**(2): 250-255.

Gerardi, M. H. (2003). *The microbiology of anaerobic digesters*. Ed. Wiley-Interscience. John Wiley and Sons. New Jersey. E.U.

González-Paz, R. (2015). Tratamiento anaerobio del efluente proveniente del proceso de una industria citrícola en un reactor híbrido. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química, Instituto Tecnológico de Orizaba, México.

Gunaseelan, V. N. (2009). Biomass estimates, characteristics, biochemical methane potential, kinetics and energy flow from *Jatropha curcus* on dry lands. *Biomass and Bioenergy*, **33**(4), 589-596.

Hazra, A., Dollimore, D., and Alexander, K. (2002). Thermal analysis of the evaporation of compounds used in aromatherapy using thermogravimetry. *Thermochimica acta*. **392**: 221-229.

Kaparaju, P. L. N., and Rintala, J. A. (2006). Thermophilic anaerobic digestion of industrial orange waste. *Environmental technology*. **27**(6): 623-633.

Koppar, A., and Pullammanappallil, P. (2013). Anaerobic digestion of peel waste and wastewater for on site energy generation in a citrus processing facility. *Energy*. **60**: 62-68.

Lohrasbi, M., Pourbafrani, M., Niklasson, C., and Taherzadeh, M. J. (2010). Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. *Bioresource technology*. **101**(19): 7382-7388.

Lopez-Velazquez, M. A., Santes, V., Balmaseda, J., and Torres-Garcia, E. (2013). Pyrolysis of orange waste: a thermo-kinetic study. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. **99**: 170-177.

Lorenzo, A. Y. y Obaya, A. M. (2005). La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. **39**(1): 35-48.

Martín, M. A., Siles, J. A., Chica, A. F., and Martín, A. (2010). Biomethanization of orange peel waste. *Bioresource technology*. **101**(23): 8993-8999.

Martín, M. A., Fernández, R., Serrano, A., and Siles, J. A. (2013). Semi-continuous anaerobic co-digestion of orange peel waste and residual glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Waste management*. **33**(7): 1633-1639.

Mata-Álvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M. S., Fonoll, X., Peces, M., and Astals, S. (2014). A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **36**: 412-427.

Michaud, S., Bernet, N., Buffie `re, P., Roustan, M., Moletta, R., (2002). Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. *Water Res.* **36**, 1385–1391.

Nelson, D. L. and Cox M.M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed.: W. H. Freeman and Company. New York.

Nicolella, C., Van Loosdrecht, M. C. M., and Heijnen, J. J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of biotechnology*. **80**(1) 1-33.

Rezzadori, K., Benedetti, S., and Amante, E. R. (2012). Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. *Food and bioproducts processing*. **90**(4): 606-614.

Ruiz, B., Flotats, X., (2014). Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: an overview. *Waste Manage.* **34**: 2063–2079.

SAGARPA (2015) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Producción en la Citricultura Nacional. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones>. Consultada en septiembre 2016.

Santos, M. D. L. Á. M., López, J. Á. S., Pérez, A. F. C., and Martín, A. M. (2010). Modelling the anaerobic digestion of wastewater derived from the pressing of orange peel produced in orange juice manufacturing. *Bioresource technology*, **101**(11), 3909-3916.

SIAP (2014) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.

Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/. Consultada en Mayo 2016

Wilkins, M. R., Suryawati, L., Maness, N. O., and Chrz, D. (2007). Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**(8), 1161-1168.