

## CARACTERIZACIÓN DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE PROTEÍNAS DE ORIGEN ANIMAL

**Xavier Flotats<sup>1,2</sup> , Belén Fernández<sup>1</sup> , Jordi Palatsi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *GIRO Centro Tecnológico, Rambla Pompeu Fabra 1, E-08100 Mollet del Vallès, xavier.flotats@giroct.irta.cat*

<sup>2</sup> *Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología. Universitat Politècnica de Catalunya. Campus Mediterrani de la Tecnologia, Edificio D4, E-08860 Castelldefels*

**Resumen:** El objetivo del presente trabajo es estudiar la cinética de la descomposición anaerobia de la fracción proteica de residuos de la industria cárnica, adoptando como proteínas modelo la gelatina y las harinas de carne, y como modelo matemático de referencia el ADM1. Para la identificación práctica de parámetros cinéticos se han diseñado y ejecutado experimentos discontinuos simultáneos (EDS). Los resultados obtenidos de la constante de hidrólisis para las dos proteínas estudiadas son similares y coincidentes con la constante estimada de residuos cárnicos frescos, comprendida entre 0,6 y 0,7 d<sup>-1</sup>. La constante de saturación del proceso de acidogénesis también ha presentado un valor coincidente, pero la tasa de consumo de substrato ha sido significativamente más elevada en las harinas que en la gelatina, probablemente debido a una mayor actividad metanogénica en los viales con harinas. Los valores relativos de los parámetros obtenidos indican una rápida acidogénesis y una más lenta hidrólisis, considerándose la hidrólisis la fase limitante del proceso de descomposición de estas proteínas.

**Palabras clave:** SANDACH, nitrógeno amoniacal, hidrólisis, acidogénesis.

### CHARACTERIZATION OF THE ANAEROBIC DIGESTION OF PROTEINS FROM ANIMAL BYPRODUCTS

**Abstract:** The aim of the present study was to characterize the anaerobic decomposition of the proteins contained in slaughterhouse industry waste, taking gelatine and meat&bone meal as protein models, and ADM1 as mathematical reference model. Simultaneous batch experiments (SBE) were designed for the practical identification of kinetic parameters. Experiments produced a unique set of parameters that characterizes the hydrolysis of proteins and the acidogenesis of amino acids, with high statistical significance. The results obtained for the first order hydrolysis constant for the two protein models studied are similar and consistent with the constant value for fresh meat waste, estimated between 0.6 and 0.7 d<sup>-1</sup>. The saturation constant for the acidogenesis process has also presented a coincident value, but the substrate consumption rate was significantly higher in meat meal than in gelatine, probably due to a higher methanogenic activity in meat&bone meal vials. The relative values of the parameters obtained indicate a rapid acidogenesis and a slower hydrolysis rate, being hydrolysis the rate limiting step of the decomposition of these proteins.

**Key words:** Animal by-products, ammonia nitrogen, hydrolysis, acidogenesis.

### 1. Introducción

En las últimas décadas el tratamiento habitual de los subproductos animales (SPA) ha sido la transformación en harinas de carne (proceso de *rendering*), con separación de grasas, y su aprovechamiento para alimentación animal (Woodgate y van der Veen, 2004). Sin embargo, la promulgación de la legislación que reglamenta la gestión de los SPA (Reglamento CE 1774/ 2002 del Parlamento Europeo), junto con las modificaciones posteriores (Reglamentos CE 92/2005, CE 208/2006, CE 1576/2007 y CE 1069/2009 de la Comisión) restringe su uso como alimentación y obliga a la

aplicación de técnicas como la incineración, la disposición en vertedero, la producción de biogás, el compostaje o la producción de biodiesel, según la tipología y riesgo sanitario de los SPA. La digestión anaerobia, con aprovechamiento energético del biogás y reciclaje del digerido en sistemas agrarios, se configura como uno de los procesos a impulsar para reducir los costes de gestión asociados a los SPA (SANDACH, 2007).

A pesar de los elevados potenciales de producción de biogás de los SPA, su digestión anaerobia está limitada por la inhibición de la población metanogénica acetoclástica por nitrógeno amoniacal, producto de descomposición de la fracción proteica, y por la inhibición por ácidos grasos de cadena larga, producto de degradación de la fracción de grasa (Palatsi, 2010).

La gelatina es una mezcla heterogénea de proteínas solubles en agua con un alto peso molecular, no se encuentra en la naturaleza y se obtiene a partir del colágeno. El colágeno es una proteína fibrosa constitutiva de la piel, cartílagos, huesos y otros tejidos conectivos, haciendo de la gelatina una proteína modelo para estudios de tratamiento de residuos cárnicos.

La hidrólisis de proteínas se modeliza usualmente mediante una cinética de primer orden, sin que esté afectada por inhibición alguna según ADM1 (Batstone *et al.*, 2002), aunque existe controversia sobre su inhibición por ácidos grasos volátiles (AGV). Mientras Breure *et al.* (1986) y Yu y Fang (2003) concluyeron que los AGV no inhiben la descomposición de la gelatina, González *et al.* (2005) concluyeron que su hidrólisis estaba severamente inhibida por ácido acético a pH 7. Flotats *et al.* (2006) comprobaron que esta inhibición no era significativa.

La acidogénesis de los aminoácidos (AA) se modeliza en el ADM1 mediante una cinética de Monod. Este proceso produce una mezcla de AGV, CO<sub>2</sub> y nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), e H<sub>2</sub> en función de la vía de descomposición (Barker, 1981). Los AA se degradan vía reacciones de oxidación-reducción, en las cuales actúan como dadores o aceptores de electrones. Algunos AA se descomponen por vía oxidativa, otros por vía reductiva, mientras que otros son ambivalentes y siguen las dos vías. En las reacciones Stickland (Nisman, 1954), un AA es oxidado mientras otro es reducido, con un balance global nulo en la producción de protones (H<sup>+</sup>).

Las reacciones Stickland son termodinámicamente más favorables que las de reducción o de oxidación únicamente, mientras que estas últimas, con producción de H<sub>2</sub>, se ven favorecidas en cultivos con actividad metanogénica, creándose una sinergia trófica con los microorganismos metanogénicos hidrogenófilos (Örlygsson *et al.*, 1995). Nagase y Matsuo (1982) concluyeron que la descomposición de proteínas no depende significativamente de la presencia de actividad metanogénica, en contraposición con Miron *et al.* (2000), los cuales concluyeron que la hidrólisis y acidogénesis de proteínas tan solo es posible en condiciones de actividad metanogénica.

Con el objetivo de sistematizar un método para establecer la estequiometría global de la reacción de descomposición del conjunto de aminoácidos presentes en una proteína, Ramsay (1997) creó un sistema de cálculo matricial a partir de la elección de la reacción individual de descomposición, priorizando en esta elección las reacciones que pudieran seguir el esquema Stickland. En un estudio posterior con caseína, Ramsay y Pullammanappallil (2001) comprobaron que cerca del 60% de las reacciones no seguían el esquema Stickland. El modelo ADM1 (Batstone *et al.*, 2002) propone el método de Ramsay (1997) para estimar los productos de la acidogénesis.

Un método experimental para estimar parámetros cinéticos, o estequiométricos, de un modelo matemático que represente la descomposición de uno o varios substratos es el

uso de experimentos discontinuos simultáneos (EDS). Este método se basa en la medida de la evolución de algunos componentes (función respuesta) en un conjunto de viales con diferentes concentraciones iniciales para algunos componentes e iguales condiciones iniciales para otros (Flotats *et al.*, 2003). El diseño del experimento ha de permitir la estimación unívoca de los parámetros incógnita, entre los que está la concentración inicial de los microorganismos involucrados.

El diseño experimental óptimo está influenciado por los valores de los parámetros, *a priori* no conocidos, por lo es necesaria información previa a fin de tener una primera estimación de los parámetros a determinar y escoger las condiciones iniciales adecuadas (Flotats *et al.*, 2010). Los parámetros cinéticos de la hidrólisis de proteínas y acidogénesis de AA presentan un amplio rango de valores en la literatura. De la revisión incluida en Batstone *et al.* (2002), se obtienen rangos de la constante de hidrólisis entre 0,0096 y 1,0 d<sup>-1</sup>, o de la constante máxima de crecimiento de la población acidogénica entre 2,36 y 16,0 d<sup>-1</sup>. Consecuentemente, se parte de un alto grado de incertidumbre para escoger las condiciones iniciales para los EDS. A partir de datos de Flotats *et al.* (2006), Flotats *et al.* (2010) concluyen que es necesario realizar EDS con muy baja relación inóculo/proteína para caracterizar unívocamente los parámetros relativos a la hidrólisis y acidogénesis, mientras que la relación usualmente utilizada en ensayos de biodegradabilidad permite la determinación de la constante de hidrólisis.

El objetivo del presente trabajo es la caracterización cinética y estequiométrica de la descomposición anaerobia de proteínas presentes en residuos cárnicos. Para ello se elige como método experimental los EDS y como proteínas modelo, la gelatina y la fracción proteica de harinas de carne.

## 2. Materiales y métodos

Se utilizó gelatina comercial (Gelatina Bacteriológica 170-180 Blooms, Cultimed-Panreac, 13% humedad y 1% cenizas) y harina de carne procedente de la instalación de *rendering* del matadero l'Agudana (Cervera). Se siguió MAPA (1994) para la determinación de lípidos, Soufleros *et al.* (2003) para la determinación de AA, y *Standard Methods* (APHA, 1995) para el resto de determinaciones analíticas. Los ensayos se realizaron por triplicado en viales de 1000 ml, con un volumen de medio de 500 ml compuesto por una solución de nutrientes, proteína ensayada e inóculo. Se prepararon ensayos control con un medio compuesto por nutrientes e inóculo. Los viales se incubaron a 35°C durante 30 días, sobre un agitador orbital a 110 rpm. Se siguió la evolución de la acumulación de metano y la concentración de AGV según la metodología descrita en Campos *et al.* (2008), midiendo también el pH y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de cada muestra. Se estimó la evolución de la concentración de N-NH<sub>3</sub> (Bonmatí y Flotats, 2003), a fin de detectar si esta concentración podía dar lugar a inhibición.

La concentración inicial del inóculo en los viales fue de 0,18±0,02 g SSV ·l<sup>-1</sup> para los experimentos de gelatina y de 0,18±0,01 g SSV ·l<sup>-1</sup> para los experimentos con harinas de carne. La concentración inicial de amonio en los viales fue de 73±10 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>·l<sup>-1</sup>.

Se seleccionaron tres niveles de concentración de gelatina comercial, con las siguientes concentraciones iniciales de proteína: 7,6±1,1; 4,0±0,2 y 2,2±0,1 g DQO·l<sup>-1</sup>. A partir de la concentración en aminoácidos, la fórmula estimada de la gelatina fue  $CH_{2.0585}O_{0.6204}N_{0.3091}S_{0.0017}$ , su contenido en nitrógeno N<sub>aa</sub> fue 0,141 g N·(g DQO)<sup>-1</sup> y su DQO fue 1.079 g DQO ·kg<sup>-1</sup>. Se seleccionaron dos niveles de concentración de harina de carne, 1,4±0,2 y 2,0±0,5 g DQO·l<sup>-1</sup>, dando lugar a las siguientes concentraciones iniciales de proteína: 1,0±0,1 y 1,4±0,4 g DQO·l<sup>-1</sup>, y una fracción proteica del 71,7±0,4 % de la DQO total. A partir de la concentración inicial de aminoácidos, la fórmula

estimada de las proteínas en la harina de carne fue  $CH_{2.0064}O_{0.5653}N_{0.2780}S_{0.0030}$ , su contenido en nitrógeno  $N_{aa}$  fue  $0,12 \text{ g N} \cdot (\text{g DQO})^{-1}$  y su DQO fue  $1.196 \text{ g DQO} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

Se ha considerado también en la Tabla 1 que los productos fenólicos de los aminoácidos aromáticos son lentamente biodegradables y que no será posible medir sus productos durante el ensayo. La fracción de la DQO inicial debida a proteínas que quedará en el medio en forma de compuesto fenólico sin pasar a AGV y metano ( $f_{l \text{ arom}}$ ) se ha estimado en 3,74% para la gelatina y en 8,67% para harinas, a partir de su concentración en AA aromáticos.

Se utilizaron los mismos métodos matemáticos y computacionales que en Flotats *et al.* (2006) y el modelo se simplificó al no considerarse inhibición de la hidrólisis por AGV (Tabla 1). La función respuesta está constituida por la concentración de  $N-NH_4^+$  y/o por la suma de la DQO equivalente de los AGV y metano, utilizada por Nagase y Matsuo (1982). Debido a que se espera que una fracción de las proteínas en la harina de carne no sea biodegradable (Palatsi *et al.*, 2006), se ha introducido esta fracción ( $\beta$ ) como incógnita en el presente modelo, evaluando la proteína disponible en cada instante según la expresión sugerida por Vavilin *et al.* (2008).

Tabla 1. Matriz de coeficientes bioquímicos y tasas de reacción del modelo de descomposición de la gelatina ( $\beta=0$ ) y de las proteínas de la harina de carne ( $\beta>0$ )

Componente → Proceso ↓	$S_{aa}$	$S_{AGV} + S_{CH_4}$	$\bar{s}$	$\bar{S}_N$	$X_C$	$X_{pr}$	$X_{aa}$	Tasa de reacción
Hidról. de prot.	1					-1		$k_{hyd.pr} (X_{pr} - \beta \cdot X_{pr\_ini})$
Consumo de AA	-1	$(1-Y_{aa}) \cdot (1-f_{l \text{ arom}})$	$(1-Y_{aa}) \cdot f_{l \text{ arom}}$	$\frac{N_{aa}}{Y_{aa} N_{bac}}$			$Y_{aa}$	$k_{m,aa} \frac{S_{aa}}{K_{aa} + S_{aa}} X_{aa}$
Lisis de $X_{aa}$					1		-1	$k_{lis.Xaa} X_{aa}$

$$k_{lis.Xaa} = 0,05 k_{m,aa} Y_{aa}$$

### 3. Resultados y discusión

El valor del coeficiente de transformación del sustrato en biomasa ( $Y_{aa}$ ) se ha estimado a partir de la relación entre DQO total de los productos y DQO debida a la concentración inicial de gelatina, teniendo en cuenta la fracción de productos aromáticos. Este valor ha presentado una media de  $0,078 \text{ g DQO} \cdot (\text{g DQO AA})^{-1}$ , valor muy cercano a 0,08 propuesto por el modelo ADM1 (Batstone *et al.*, 2002), el cual se ha adoptado en el presente trabajo. El coeficiente de producción de  $N-NH_4^+$  calculado para la gelatina utilizada [ $N_{aa} = 0,141 \text{ g N} \cdot (\text{g DQO})^{-1} = 0,153 \text{ g N} \cdot (\text{g proteína})^{-1}$ ] es diferente al valor para la gelatina en Flotats *et al.* (2006) y al de la harina de carne.

El pH se ha mantenido en todos los viales entre 7,0-8,5 y la concentración estimada de  $N-NH_3$  se ha mantenido por debajo de  $0,11 \text{ g N} \cdot \text{NH}_3 \cdot \text{l}^{-1}$ , indicando que no ha habido inhibición por  $NH_3$ . La concentración de AGV en los viales control se mantuvo por debajo de  $0,06 \text{ g DQO} \cdot \text{l}^{-1}$ , por lo que no son de esperar interferencias por descomposición de compuestos residuales del inóculo.

#### 3.1. Descomposición de la gelatina

La función respuesta utilizada para el proceso de identificación de los parámetros fue la DQO acumulada, suma de la DQO debida a AGV y metano. La evolución de  $N-NH_4^+$  para cada vial se ha utilizado como variable de comprobación final. La fracción no biodegradable  $\beta$  se ha supuesto nula para la gelatina.

La evolución de la DQO acumulada en los viales se indica en la Figura 1, junto con el ajuste del modelo para los parámetros que presentan un mejor ajuste global (Tabla 2). Los coeficientes de determinación han estado comprendidos entre 0,82 y 0,99. Del análisis de los datos obtenidos (Tabla 2), se concluye que los tres parámetros cinéticos quedan bien determinados, con niveles de significación superiores al 95%. La constante de hidrólisis se encuentra dentro del rango estimado por Flotats *et al.* (2006) sin estar afectada por la menor concentración de inóculo, a diferencia de los resultados de Sanders (2001), y con valores tres veces superiores a los indicados en el ADM1 (Batstone *et al.*, 2002), mientras que los parámetros que caracterizan la acidogénesis son del mismo orden de magnitud que los indicados en esta referencia. Con los valores anteriores, y en términos relativos, se puede afirmar que la acidogénesis es un proceso más rápido que la hidrólisis y que ésta es la etapa limitante del proceso de descomposición de proteínas.

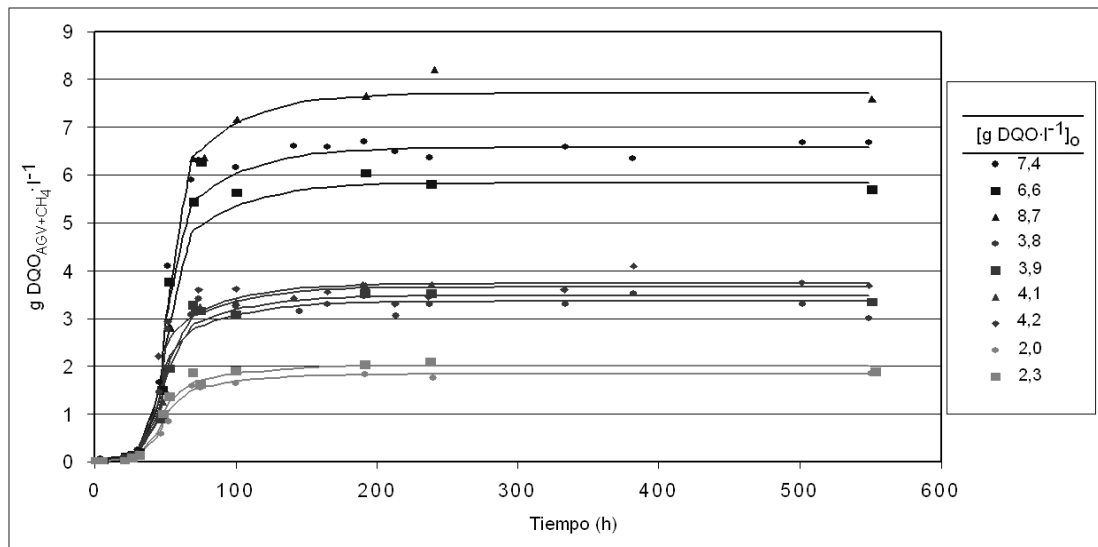


Figura 1. Evolución de la DQO acumulada (AGV y metano) para cada vial, con la concentración inicial de gelatina indicada. Los puntos son datos experimentales y las líneas la evolución predicha con los parámetros indicados en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de los parámetros estimados y su significancia estadística, según estimación lineal, para el mejor ajuste global para la gelatina.

Matriz de correlación	Hidrólisis		Acidogénesis de AA	
	$k_{hyd,pr}$ ( $d^{-1}$ )	$k_{m,aa}^{(1)}$ ( $g DQO_{AA}/g DQO_b \cdot d$ )	$K_{S,aa}$ ( $g DQO \cdot l^{-1}$ )	$(X_{aa})_0$ ( $g DQO \cdot l^{-1}$ )
$k_{hyd,pr}$	1,00			
$k_{m,aa}$	-0,02	1,00		
$K_{S,aa}$	0,09	-0,46	1,00	
$(X_{aa})_0$	0,02	-0,97	0,66	1,00
Valor parámetro	0,601	38,511	0,172	$8,25 \cdot 10^{-4}$
Desv. típica	0,017	7,167	0,075	$9,7 \cdot 10^{-4}$
IC (95%)	$\pm 0,034$	$\pm 14,176$	$\pm 0,149$	$\pm 1,9 \cdot 10^{-3}$
Valor t-test	34,88	5,37	2,28	0,85
Prob. t-test (%)	100	99,99	98,78	80,05

<sup>(1)</sup>El valor de  $k_{m,aa}$  corresponde a  $\mu_{max,aa}=3,12 d^{-1}$ .

El parámetro que presenta un mayor grado de incertidumbre es la concentración inicial de biomasa acidogénica  $(X_{aa})_0$ . La pequeña variación en la concentración inicial de

inóculo entre viales ( $0,18 \pm 0,02 \text{ g SSV} \cdot \text{l}^{-1}$ ) puede haber afectado al grado de determinación de este parámetro.

La evolución de la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  en los viales se ha estimado mediante el modelo (Tabla 1), utilizando los parámetros de la Tabla 2, considerando que se libera al medio en el mismo momento que los AGV, obteniéndose un grado elevado de predicción de los datos experimentales (datos no mostrados).

### **3.2. Descomposición de la fracción proteica de harina de carne**

Para el experimento con harina de carne, se comprueba (datos no mostrados) una detención en la producción de AGV hacia las 200 h, con un aumento posterior de la concentración de ácido acético (Ac). Se estima que este Ac suplementario es producto de la descomposición de lípidos. Palatsi *et al.* (2007) comprobaron, con residuo cárnico fresco y en ensayos de biodegradabilidad simultáneos con diferentes relaciones proteína/grasa, que la fracción de proteínas se descomponía rápidamente, siendo la hidrólisis la fase limitante, y que la degradación de los lípidos era un proceso dependiente del crecimiento de la biomasa cuya tasa de transformación en Ac era medible posterior e independientemente a la acumulación de AGV procedentes de la proteína. Habiendo utilizado en el presente trabajo concentraciones de inóculo inferiores a las concentraciones usuales en ensayos de biodegradabilidad para retardar la evolución de la función respuesta, se considera que utilizando los datos correspondientes a las muestras tomadas con anterioridad a las 200 h se minimiza el error por interferencia de la descomposición de lípidos.

Considerando la fracción de proteína no biodegradable  $\beta$  como incógnita, se han obtenido los valores de los parámetros indicados en la Tabla 3, tomando como función respuesta la evolución de la DQO debida a AGV y metano, y los parámetros indicados en la Tabla 4, tomando como función respuesta la evolución de la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  en el medio líquido. En la Figura 2 se muestra el ajuste correspondiente a los parámetros de la Tabla 4 para la evolución del  $\text{N-NH}_4^+$ . Los coeficientes de determinación en el ajuste de la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  están comprendidos entre 0,95-0,99 y en el ajuste de la DQO de AGV y metano entre 0,96-0,98.

Los parámetros estimados a partir de los datos de la evolución de la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  (Tabla 4 y Figura 2) presentan, en general, una mayor significancia estadística que los obtenidos a partir de la evolución de AGV y metano (Tabla 3). Por otro lado, las predicciones cruzadas indican que la concentración de DQO de AGV y metano es superior a la que correspondería a la evolución del  $\text{N-NH}_4^+$ , si tan solo se degradase la proteína, hacia las 200 h de proceso (datos no mostrados). Por ello, y a fin de evitar la interferencia de productos de la descomposición de lípidos en la identificación de parámetros cinéticos de las proteínas, se valora como más adecuado el uso de la evolución del  $\text{N-NH}_4^+$  como función respuesta, en contraste con el caso de la gelatina y con la conclusión de Flotats *et al.* (2006), cuando no hay interferencia con lípidos.

En las Tablas 3 y 4 se comprueba que la significancia estadística del valor estimado de la concentración inicial de biomasa acidogénica es superior a la obtenida con gelatina (Tabla 2), probablemente debido a una menor variación de las concentraciones de inóculo. Las constantes de hidrólisis obtenidas en las Tablas 3 y 4 son del mismo orden de magnitud que la obtenida para gelatina (Tabla 2) y que la obtenida ( $0,65 \text{ d}^{-1}$ ) en el ensayo de Flotats *et al.* (2006). La constante de hidrólisis de la fracción proteica estimada para residuos cárnicos frescos obtenida por Palatsi *et al.* (2007) también fue del mismo orden de magnitud ( $0,7 \text{ d}^{-1}$ ), así como la obtenida por Sanders *et al.* (2003) para la fracción proteica de lodos de depuración ( $0,67 \text{ d}^{-1}$ ).

Tabla 3. Valores de los parámetros estimados y su significancia estadística, según estimación lineal, para el mejor ajuste global para harinas de carne, usando la evolución de la DQO de AGV y metano como función respuesta

Matriz de correlación	Hidrólisis		Acidogénesis de AA		
	$k_{hyd,pr}$ ( $d^{-1}$ )	$\beta$	$k_{m,aa}^{(1)}$ ( $g DQO_{AA}/g DQO_b \cdot d$ )	$K_{S,aa}$ ( $g DQO \cdot l^{-1}$ )	$(X_{aa})_0$ ( $g DQO \cdot l^{-1}$ )
$k_{hyd,pr}$	1,00				
$\beta$	0,81	1,00			
$k_{m,aa}$	0,05	-0,15	1,00		
$K_{S,aa}$	0,31	-0,01	0,87	1,00	
$(X_{aa})_0$	0,32	0,25	-0,65	-0,21	1,00
Valor parámetro	0,541	0,124	117,634	0,198	$8,79 \cdot 10^{-4}$
Desv. típica	0,025	0,014	66,661	0,151	$8,9 \cdot 10^{-4}$
IC (95%)	$\pm 0,050$	$\pm 0,028$	$\pm 133,388$	$\pm 0,303$	$\pm 1,8 \cdot 10^{-3}$
Valor t-test	21,50	8,79	1,76	1,31	0,99
Prob. t-test (%)	100	100	95,86	90,31	83,64

<sup>(1)</sup>El valor de  $k_{m,aa}$  corresponde a  $\mu_{max,aa}=9,41 d^{-1}$

Tabla 4. Valores de los parámetros estimados y su significancia estadística, según estimación lineal para el mejor ajuste global para harinas de carne, usando la evolución de  $N-NH_4^+$  como función respuesta

Matriz de correlación	Hidrólisis		Acidogénesis de AA		
	$k_{hyd,pr}$ ( $d^{-1}$ )	$\beta$	$k_{m,aa}^{(1)}$ ( $g DQO_{AA}/g DQO_b \cdot d$ )	$K_{S,aa}$ ( $g DQO \cdot l^{-1}$ )	$(X_{aa})_0$ ( $g DQO \cdot l^{-1}$ )
$k_{hyd,pr}$	1,00				
$\beta$	0,74	1,00			
$k_{m,aa}$	0,07	-0,08	1,00		
$K_{S,aa}$	0,33	0,03	0,88	1,00	
$(X_{aa})_0$	0,28	0,15	-0,64	-0,20	1,00
Valor parámetro	0,631	0,203	100,229	0,198	$7,9 \cdot 10^{-4}$
Desv. típica	0,026	0,010	32,862	0,095	$5,0 \cdot 10^{-4}$
IC (95%)	$\pm 0,052$	$\pm 0,019$	$\pm 66,469$	$\pm 0,192$	$\pm 1,0 \cdot 10^{-3}$
Valor t-test	24,63	20,63	3,05	2,09	1,59
Prob. t-test (%)	100	100	99,79	97,84	94,09

<sup>(1)</sup>El valor de  $k_{m,aa}$  corresponde a  $\mu_{max,aa}=8,02 d^{-1}$

El valor estimado en la Tabla 4 de la fracción no biodegradable  $\beta$  es prácticamente el mismo que el obtenido de ensayos de biodegradabilidad de harinas de carne por Palatsi *et al.* (2006). La menor biodegradabilidad de las harinas de carne es debida al proceso térmico de producción, que afecta tanto a la estructura de las proteínas, reduciendo su solubilidad (Tornberg, 2005), como a la biodegradabilidad de algunos aminoácidos (Stuckey y McCarty, 1984).

En algunos viales se comprueba que el modelo subestima las concentraciones de  $N-NH_4^+$  a partir de las 350 h. Este aumento de  $N-NH_4^+$  podría ser debido a un aumento de la actividad metanogénica, que posibilitaría la descomposición de algunos aminoácidos, como los aromáticos, según lo indicado por Miron *et al.* (2000).

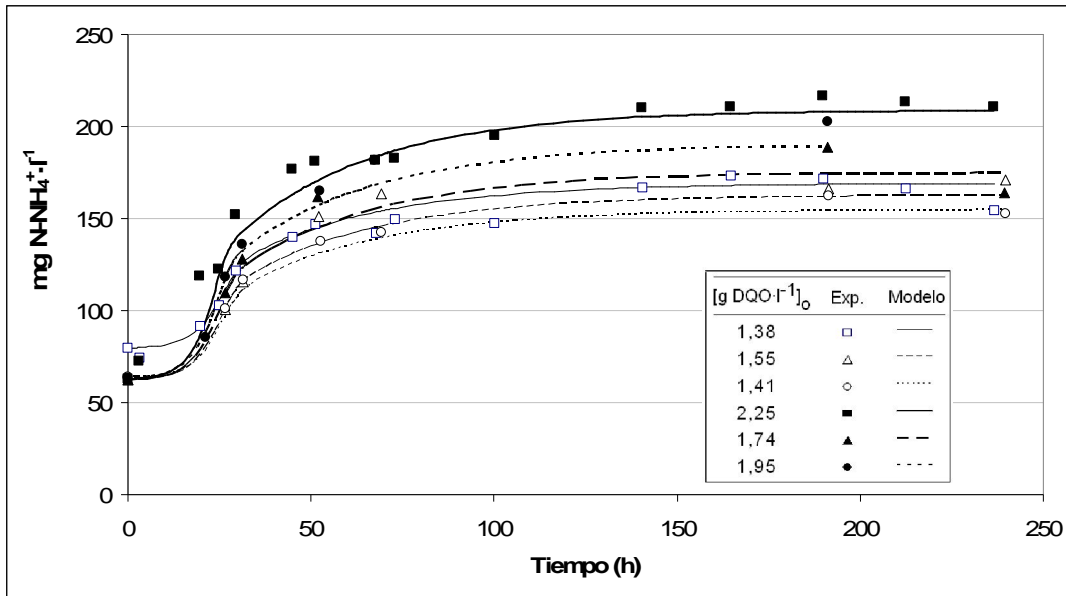


Figura 2. Evolución de la concentración de  $N-NH_4^+$  en el medio líquido para cada uno de los viales, identificados con la concentración inicial de sustrato, y ajuste del modelo con los parámetros obtenidos en la Tabla 4.

A pesar que la constante  $K_S$  calculada para la acidogénesis de las proteínas en harinas ha sido igual para los dos métodos de estimación utilizados (Tablas 3 y 4), y del mismo orden de magnitud que para la gelatina (Tabla 2), la tasa máxima de consumo de sustrato ha mostrado diferencias significativas entre la harina y la gelatina, lo cual es coherente con una significativamente mayor actividad metanogénica medida en los viales con harina. Mientras que la gelatina ha mostrado según el algoritmo de Ramsay (1997) un balance de  $H_2$  negativo, igual que en el ensayo de Flotats *et al.* (2006), en su aplicación a las harinas este balance ha sido positivo. Parte de los AA pueden haber seguido reacciones Stickland en ambos casos, pero mientras en la gelatina el resto de aminoácidos ha debido seguir una vía de descomposición reductiva, termodinámicamente poco favorable y en competición con los microorganismos metanogénicos por el  $H_2$ , en la harina la vía de descomposición ha debido seguir la vía oxidativa, favorecida por la actividad metanogénica hidrogenófila, permitiendo una mayor velocidad de descomposición (Nagase y Matsuo, 1982; Örlýgsson *et al.*, 1995).

### 3.3. Producción relativa de AGV

La producción relativa de AGV se ha estimado a partir de las velocidades de acumulación de cada AGV hasta las 100 h. En ambos ensayos, los valores calculados se mantienen estables a partir de las 75 horas, con producciones relativas iniciales más elevadas de Ac. En la Tabla 5 se muestran los intervalos de confianza al 95% de la distribución relativa de AGV obtenidos a las 100 h, así como los obtenidos en ensayos de biodegradabilidad de residuos cárnicos frescos a las 24 h (Palatsi *et al.*, 2007). Se comparan los valores obtenidos con la predicción mediante Ramsay (1997).

La producción relativa de AGV para los tres ejemplos de SPA es muy similar, aunque la aplicación del test de separación de medias no permite aceptar la hipótesis de igualdad (nivel de significación del 5%). A pesar de esto, la producción relativa media de los valores experimentales medidos (0,48 Ac: 0,23 Pro: 0,09 Bu: 0,18 Val) puede ser una referencia adecuada para la estimación de la estequiometría de la descomposición anaerobia de proteínas en residuos cárnicos.



Tabla 5. Intervalos de confianza de la distribución relativa de AGV (unidades de DQO) producidos de la descomposición de gelatina, harinas de carne y residuos cárnicos frescos, y estimaciones mediante el algoritmo de Ramsay (1997)

	Gelatina		Harina de carne		Residuo cárnico fresco	
	Exp. 100 h	Ramsay	Exp. 100 h	Ramsay	Exp. 24 h	Ramsay
Acético	0,467±0,050	0,430	0,482±0,047	0,380	0,498±0,034	0,396
Propiónico	0,203±0,015	0,133	0,237±0,017	0,088	0,238±0,023	0,052
Butírico	0,105±0,024	0,141	0,095±0,017	0,231	0,122±0,058	0,289
Valérico	0,225±0,039	0,297	0,186±0,029	0,301	0,142±0,027	0,263

Datos de experimentos descritos en Palatsi *et al.* (2007)

#### 4. Conclusiones

La constante de hidrólisis estimada en los ensayos realizados ha mostrado una elevada significancia estadística, con valores similares para la gelatina y harinas de carne, y coincidentes con valores de otros trabajos sobre proteínas de origen cárnico, estando comprendida entre 0,6 y 0,7 d<sup>-1</sup>. La menor biodegradabilidad de las proteínas de las harinas de carne no se ha traducido en una menor constante de hidrólisis. La acidogénesis de aminoácidos ha mostrado ser un proceso relativamente rápido en comparación a la hidrólisis. La constante de saturación ha presentado valores significativos y similares para gelatina y harinas de carne, pero la tasa máxima de consumo de substrato ha mostrado ser significativamente más elevada para harinas, lo cual se explica por una diferente composición en aminoácidos y una mayor actividad metanogénica en el medio con harinas. Los valores relativos de los parámetros cinéticos obtenidos indican que la hidrólisis es la fase limitante del proceso de descomposición de estas proteínas.

#### 5. Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto ENE2004-00724/ALT).

#### 6. Bibliografía

- APHA, 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Assoc., American Water Works Assoc. and Water Environment Federation. 19th edn., Washington DC.
- Barker, H.A. (1981). Amino acids degradation by anaerobic bacteria. *Annual Reviews Biochemistry*, 50, 23-40.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A. (2002). *Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1)*, IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes. IWA Publishing, London.
- Bonmatí, A., Flotats, X. (2003). Air Stripping of Ammonia from Pig Slurry: Characterization and Feasibility as a Pre- or Post-Treatment to Mesophilic Anaerobic Digestion. *Waste Management*, 23(3), 261-272.
- Breure, A.M., Mooijman, K.A., van Andel, J.G. (1986). Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenesis fermentation of gelatine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 426-431.
- Campos, E., Almirall, M., Mtnez-Almela, J., Palatsi, J., Flotats, X. (2008). Feasibility study of the anaerobic digestion of dewatered pig slurry by means of polyacrylamide. *Bioresource Technology*, 99(2), 387-395.
- Flotats, X., Ahring, B.K., Angelidaki, I. (2003). Parameter identification of thermophilic anaerobic degradation of valerate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 109, 47-62.
- Flotats, X., Palatsi, J., Ahring, B.K., Angelidaki, I. (2006). Identifiability study of the proteins degradation model, based on ADM1, using simultaneous batch experiments. *Water Science and Technology*, 54(4), 31-39.

- Flotats, X., Palatsi, J., Fernández, B., Colomer, M. À., Illa, J. (2010). Identifying anaerobic digestion models using simultaneous batch experiments. *Environmental Engineering and Management Journal*, 9(3), 313-318
- González, G., Urrutia, H., Roeckel, M., Aspé, E. (2005). Protein hydrolysis under anaerobic, saline conditions in presence of acetic acid. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 151-157.
- MAPA (1994). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación- Métodos oficiales de análisis de alimentos. Mundi-Prensa. Madrid.
- Miron, Y., Zeeman, G., Van Lier, J.B., Lettinga, G. (2000). The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Research*, 34(5), 1705-1713.
- Nagase, M., Matsuo, T. (1982). Interactions between amino-acids-degrading bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 2227-2239.
- Nisman, B. (1954). The Stickland Reaction. *Annales de l'Institute Pasteur*, 18, 16-42.
- Örlygsson, J., Houwen, F.P., Svensson, B.H. (1995). Thermophilic anaerobic amino acid degradation: deamination rates and end product formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 235-241.
- Palatsi, J., Fernández, B., Flotats, X. (2006). Digestión anaerobia de subproductos animales (SPA). Ensayos de biodegradabilidad. En: *Actas de la reunión de la red META (Mesa Española de Tratamiento de Aguas)*. Valencia, 13 – 14 de marzo de 2006. Pp 229-232.
- Palatsi, J., Fernández, B., Vavilin, V.A., Flotats, X. (2007). Anaerobic biodegradability of fresh slaughterhouse waste: interpretation of results by a simplified model. *11<sup>th</sup> World Congress on Anaerobic Digestion (AD11)*. *Bioenergy for our future*. Brisbane (Australia), 23-27 septiembre 2007.
- Palatsi, J. (2010). Anaerobic Digestion of Slaughterhouse Waste: Impact of the LCFA Inhibition. Ph.D. Thesis, Universidad de Lleida.
- Ramsay, I.R. (1997). Modelling and control of high-rate anaerobic wastewater treatment systems. Ph. D. Thesis. Department of Chemical Engineering. Brisbane, University of Queensland, p. 270.
- Ramsay, I.R., Pullammanappallil, P.C. (2001). Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation*, 12, 247-257.
- Sanders, W.T.M. (2001). Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates. Ph.D. Thesis, Wageningen Universiteit, Wageningen, The Netherlands.
- Sanders, W.T.M., Veeken, A.H.M., Zeeman, G., van Lier, J.B. (2003). Analysis and optimisation of the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste. En: *Mata-Alvarez, J. (Ed.), Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. IWA Publishing Press, Cornwall, UK, pp. 67–89.
- Soufleros E. H., Bouloumpasi Elizabeth, Tsarhopoulos C., Biliaderis C. G. (2003). Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistr.*, 80, 261-273.
- Stuckey, D.C., McCarty, P.L. (1984). The effect of thermal pretreatment on the anaerobic biodegradability and toxicity of waste activated sludge. *Water Research*, 18(11), 1343, 1353.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70, 493, 508.
- Vavilin, V.A (2003). Modelling of anaerobic degradation of slaughterhouse waste. En: *Proceedings of the International Seminar on Anaerobic Digestion of Slaughterhouse Wastes*. Narbonne, September 24th-25th, 2003, pp 2-19.
- Vavilin, V.A., Fernandez, B., Palatsi, J., Flotats, X. (2008). Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview. *Waste Management*, 28(6), 939-951.
- Woodgate, S., van der Veen, J. (2004). The role of fat processing and rendering in the European Union animal production industry. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 8(4), 283-294.
- Yu, H.Q., Fang, H.H.P. (2003). Acidogenesis of gelatine-rich wastewater in an upflow anaerobic reactor: influence of pH and temperature. *Water Research*, 37, 55-66.