(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 837 496**

(21) Número de solicitud: 201931156

(51) Int. Cl.:

C12P 5/02 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

26.12.2019

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

30.06.2021

(71) Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (84.0%)
Avda. Maria Luisa s/n - Pabellón de Perú
41013 Sevilla (Sevilla) ES y
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (16.0%)

(72) Inventor/es:

RINCÓN LLORENTE, Bárbara María;
FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, Maria José;
DE LA LAMA CALVENTE, David;
BORJA PADILLA, Rafael y
JIMÉNEZ-RODRÍGUEZ, Antonia

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE METANO MEDIANTE CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA ALPERUJO-MICROALGA**

(57) Resumen:

Procedimiento de producción de metano mediante co-digestión anaerobia alperujo-microalga.

La presente invención se enmarca en el sector del aprovechamiento de los subproductos de la industria alimentaria. Particularmente, el objeto de la presente invención es un procedimiento mejorado para la producción de metano a partir de la codigestión anaerobia del alperujo, principal subproducto generado en la elaboración del aceite de oliva, con la microalga *Dunaliella salina*.

ES 2 837 496 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE METANO MEDIANTE CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA ALPERUJO-MICROALGA

La presente invención se enmarca en el sector del aprovechamiento de los subproductos de la industria alimentaria. Particularmente, el objeto de la presente invención es un procedimiento mejorado para la producción de metano a partir de la co-digestión anaerobia del alperujo, principal subproducto generado en la elaboración del aceite de oliva, mediante el sistema de elaboración por centrifugación en dos fases, con la microalga *Dunaliella salina*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El alperujo es el principal subproducto resultante de la extracción del aceite de oliva en las almazaras, y muestra un alto contenido en agua (56%), un pH ácido (5,4) y un elevado contenido en materia orgánica (91%), gran parte de ella de naturaleza lignínica (35%). Además, el alperujo presenta un elevado contenido graso (3-4%) y también de polifenoles hidrosolubles (0,9%), fracciones que le otorgan propiedades fitotóxicas. El contenido en potasio (K) es relativamente bajo, mostrando también bajos contenidos de fósforo (P), micronutrientes y metales pesados. Además, el alperujo es deficitario en nitrógeno, por lo tanto, el proceso de digestión anaerobia del mismo lleva asociada una carencia de nitrógeno que se ve reflejada en el metabolismo de los microorganismos y por tanto en los rendimientos de producción de biogás y metano. En conclusión, el alperujo es muy problemático tanto por sus características (bajos pH, alta carga orgánica, alto contenido en azúcares reductores, etc.) como por las cantidades en que se genera (de 2.000.000-4.000.000 t/año) y su tratamiento se hace muy necesario.

Dentro de los métodos empleados para la valorización de este subproducto se encuentra su digestión anaerobia, obteniéndose metano de alto poder calorífico, que lo hace útil para distintas aplicaciones como su uso en motores de cogeneración para producir calor y electricidad.

Por otro lado, la co-digestión anaerobia del alperujo con un co-sustrato que complemente esta carencia en nitrógeno puede mejorar los rendimientos de metano

finales. En este sentido, se ha estudiado la co-digestión anaerobia de distintos porcentajes de mezcla entre distintas especies de microalgas y el alperujo. Son conocidos procesos de co-digestión anaerobia del alperujo con diferentes microalgas como *Scenedesmus quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii* 6145, *Chlamydomonas reinhardti cw15*, y *Dunaliella salina*.

Los resultados de la co-digestión del alperujo con estas microalgas en los porcentajes estudiados no da siempre buenos resultados, de lo que se desprende un interés creciente por el desarrollo de procesos que permitan un mejor aprovechamiento de productos como el alperujo para la producción de metano con mejores resultados en cuanto a rendimiento y cinética.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El alperujo, como se ha comentado anteriormente, es deficitario en nitrógeno, por lo tanto, su proceso de digestión anaerobia lleva asociada una carencia de nitrógeno que se ve reflejada en el metabolismo de los microorganismos y por tanto en los rendimientos de producción de biogás y metano. La co-digestión anaerobia del alperujo con un co-sustrato que complemente esta carencia en nitrógeno mejora los rendimientos de metano finales. Es por esto que en la presente invención se ha estudiado la co-digestión anaerobia de distintos porcentajes de mezcla entre *Dunaliella salina* y el alperujo, lo que permitirá a la industria oleícola poder tratar sus subproductos mediante co-digestión anaerobia obteniendo un beneficio energético extra en forma de metano que podría emplearse en la propia almazara y supondría un ahorro en los gastos de energía de las mismas.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de metano a partir de alperujo o residuos sólidos de almazara (OMSW), mediante co-digestión anaerobia de un sustrato que comprende alperujo con microalga, caracterizado por que la microalga es *Dunaliella salina* y por que se parte de una proporción de alperujo:microalga que está comprendida entre 85:15 y 95:5.

En una realización preferida el sustrato comprende una mezcla de alperujo y *Dunaliella salina* en una relación comprendida entre 90:10 y 95:5 en sólidos volátiles, y más preferiblemente donde el sustrato consiste en una mezcla de alperujo y *Dunaliella salina*

95:5 en sólidos volátiles.

En otra realización más preferida el procedimiento anterior comprende las siguientes etapas:

(a) adición de un sustrato que consiste en una mezcla de alperujo y *Dunaliella salina* al reactor de digestión;

(b) adición de inóculo microbiano al reactor de digestión en proporción en sólidos volátiles de inóculo:sustrato comprendida entre 3,0 y 0,5;

(c) adición de una solución de elementos traza a la mezcla inóculo:sustrato de la etapa (b);

(d) cierre del reactor de digestión y desplazamiento con gas inerte, preferentemente nitrógeno gas, del aire del espacio de cabeza;

(e) digestión durante un periodo comprendido entre 30 y 50 días a una temperatura mesofílica de entre 20 y 39 ºC, y a una velocidad de agitación comprendida entre 200 y 500 rpm.

La digestión anaerobia de un sustrato de naturaleza lignocelulósica, como el alperujo, puede verse limitada en la primera etapa o etapa de hidrólisis-acidogénesis por la presencia de las estructuras complejas de hemicelulosa, celulosa y lignina. El uso de algún pretratamiento previo a la digestión anaerobia, dígase pretratamiento térmico, ultrasonidos, o microondas, podría favorecer la rotura de estas estructuras complejas permitiendo obtener mejores resultados en los rendimientos de metano y las cinéticas de producción obtenidas.

Por otro lado, la utilización de un inóculo microbiano adecuado en la etapa (b) del procedimiento es esencial para el buen desarrollo de estos procesos de digestión anaerobia. En una realización preferida, el inóculo de la etapa (b) se selecciona de entre lodos anaerobios procedentes de las plantas o estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), o inóculos microbianos maduros procedentes de reactores de industrias agroalimentarias.

En una realización más preferida la proporción en sólidos volátiles de inóculo:sustrato es de 2:1. Esta proporción en sólidos volátiles se calcula en base a los sólidos volátiles que contenga tanto el inóculo como el sustrato o sustratos de partida (alperujo y/o microalga *Dunaliella salina* o ambos), de acuerdo con el Ejemplo 1 de la presente

invención.

Por otro lado, dependiendo del origen del inóculo microbiano que se emplee en la etapa (b), éste puede contener aún restos sin digerir del sustrato alimentado en el reactor de procedencia. Éste es el caso de inóculos procedentes de reactores industriales o de las EDARs. Si no se eliminan previamente, estos restos, podrían alterar los resultados de la digestión anaerobia de un nuevo sustrato a tratar mediante digestión anaerobia. Por lo tanto, en una realización preferida, se debe dejar pasar un intervalo de tiempo de entre 36 a 48 horas desde que se recoge el inóculo el inóculo hasta que se añade en la etapa (b) del procedimiento de la invención.

Los diversos microorganismos que componen el inóculo microbiano, preferentemente bacterias y aqueas, y que participan en el proceso de la digestión anaerobia, tienen unos requerimientos nutricionales de macro y micro nutrientes para el mantenimiento de su metabolismo y su reproducción. En algunas ocasiones la composición del sustrato alimentado a los reactores anaerobios puede cubrir esas necesidades esenciales. No obstante, para asegurar el buen comienzo y desarrollo de la digestión anaerobia, inicialmente en el momento de la inoculación de los reactores anaerobios con los microorganismos, se puede añadir cierta cantidad de elementos traza para asegurar que no existe carencia de los mismos y que hay una buena puesta en marcha del proceso activando los sistemas enzimáticos microbianos. Estos elementos traza juegan un papel crucial en el crecimiento y metabolismo de los microorganismos anaerobios, siendo esenciales para muchos procesos bioquímicos y fisiológicos. Algunos elementos trazas como Níquel, Cobalto o Molibdeno actúan como co-factores en enzimas implicadas en el proceso de formación de metano. Por otra parte, la bio-accesibilidad de los elementos traza en las rutas metabólicas de los microorganismos anaerobios está relacionada en la mayor parte de los casos, no con la cantidad total de estos metales, sino con la fracción que se encuentra en solución. Otros factores como el pH del medio o la temperatura pueden originar la precipitación y/o quelación de estos metales traza reduciendo así su bio-accesibilidad. Por tanto, el añadir los elementos traza en el arranque de los digestores tiene como principal objetivo favorecer el metabolismo y la actividad de los microorganismos implicados en el proceso.

Es por esto que, en otra realización preferida, la solución de elementos traza de la etapa (c) comprende sales de elementos metálicos seleccionados de entre hierro, cobre, zinc,

cobalto, manganeso, molibdeno, níquel, aluminio, selenio, y cualquiera sus mezclas. En una realización más preferida las sales metálicas de la solución de elementos traza se seleccionan de entre Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Al^{3+}, Se^{4+} Mo^{6+}; y cualquiera de sus mezclas; y en una realización aún más preferida la solución de elementos traza comprende al menos dos sales que se seleccionan de entre $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_2 \cdot 4H_2O$, H_3BO_3, $ZnCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$, y EDTA.

En una realización aún más preferida, la solución de elementos traza de la etapa (c) comprende $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_2 \cdot 4H_2O$, H_3BO_3, $ZnCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ y EDTA.

Finalmente, es interesante mencionar que la velocidad de agitación de los digestores en la etapa (e) del procedimiento de la invención debe ser seleccionada cuidadosamente ya que velocidades muy lentas podrían dar lugar a una baja interacción o transferencia inóculo sustrato y por lo tanto dar lugar a la obtención de bajos rendimientos de metano, mientras que, por otro lado, velocidades de agitación muy elevadas podrían dar lugar a la rotura de los flóculos formados por los microorganismos anaerobios en los digestores dando lugar igualmente a la obtención de bajos rendimientos de metano. La elección de una velocidad de agitación adecuada es esencial para el buen desarrollo del proceso.

En conclusión, mediante el procedimiento de la invención, para la mezcla de co-digestión alperujo-microalga con la microalga *Dunaliella salina* (*D. salina*) y el porcentaje de mezcla 95% de alperujo-5% de *D. salina*, trabajando en condiciones mesófilas de operación (35°C), se han conseguido:

- Mejoras en el rendimiento de producción de metano, puesto que los rendimientos de metano obtenidos fueron de 491±1 mL CH_4/g SV $_{añadidos}$ (SV: sólidos volátiles), este valor supone un incremento de un 29,2% en la producción de metano con respecto a la obtenida en el proceso de digestión anaerobia del alperujo por sí sólo, 380±1 mL CH_4/g SV $_{añadidos}$.
- Aumento de la cinética de producción de metano en un 35%, en términos de mL de metano producidos/g SV·día. Pasando de obtenerse 40,6 mL de metano/g SV·día para la digestión del alperujo por sí solo, a obtenerse 54,7 mL de metano/g SV·día en la mezcla de co-digestión señalada. En el porcentaje de mezcla alperujo-*D.salina* que se presenta, sí existe una mejora en la cinética. Existe, por tanto, para este

porcentaje de mezcla tanto una mejora en la cantidad de metano obtenida, o rendimiento, como en la velocidad en la que se produce, o cinética.

En la presente invención se entiende por sólidos volátiles (SV) la porción de la materia orgánica que puede eliminarse o volatilizarse cuando una materia orgánica se quema en un horno mufla a una temperatura de entre 400 ºC a 900 ºC. Particularmente, la proporción de inóculo:sustrato se expresa en SV como medida del contenido en materia orgánica de el/los sustrato/s independientemente de la humedad que éstos posean. El contenido en agua del alperujo, por ejemplo, puede alcanzar entre el 65 y el 90% en peso.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Evolución de la demanda química de oxígeno soluble (DQOs) en los experimentos de digestión anaeróbica de residuos sólidos de almazara o alperujo (RSA), RSA que han sido pretratados hidrotérmicamente en condiciones suaves (RSA PHS) y co-digestión de una mezcla de RSA: *Dunaliella salina* 95:5 en sólidos volátiles.

Figura 2: Rendimiento de metano obtenido en los experimentos de digestión anaeróbica en discontinuo de residuos sólidos de almazara obtenidos por el sistema de elaboración por centrifugación en dos fases (RSA), RSA con pretratamiento hidrotérmico suave (RSA PHS) y co-digestión de una mezcla de RSA: *Dunaliella salina* 95:5 en sólidos volátiles.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Métodos analíticos

Todos los análisis se realizaron de acuerdo con los Métodos Estándar de la Asociación Estadounidense de Salud Pública (APHA–AWWA–WPCF, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation, Washington DC). Se midieron los siguientes parámetros: demanda química total de oxígeno (DQO), demanda química de oxígeno soluble (DQOs), sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), alcalinidad total (AT), pH, nitrógeno total Kjeldahl (NTK) y ácidos grasos volátiles (AGV). Los parámetros solubles se determinaron después de la centrifugación (Eppendorf, 10.000 rpm, 10 min) y filtración (filtro de fibra de vidrio de 47 mm) de la muestra.

Los ST y SV se determinaron de acuerdo con los métodos estándar 2540B y 2540E, respectivamente (APHA, 1998); la DQO se determinó mediante el método descrito en detalle en otra parte (Raposo, F., de la Rubia, M. A., Borja, R. and Alaiz, M., 2008.Assessment of a modified and optimised method for determining chemical oxygen demand of solid substrates and solutions with high suspended solid content. Talanta 76(2), 448-453), mientras que la DQOs se determinó utilizando la digestión cerrada y el método estándar colorimétrico 5220D (APHA, 1998). El pH se determinó utilizando un medidor de pH modelo Crison 20 Basic. La AT se determinó por titulación de pH a 4,3 (APHA, 1998). El C y el N se determinaron por medio de un Analizador Elemental LECO CHNS-932 (Leco Corporation, St Joseph, MI, EEUU). El NTK se determinó utilizando un método basado en el 4500-Norg B de Métodos Estándar (APHA, 1998).

Los ácidos grasos volátiles individuales (AGV) de C2 a C7, incluidos iso-C4, iso-C5 e iso-C6, se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC 2010) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar llena de Nukol (polietilenglicol modificado por ácido nitrotereftálico). Antes de la inyección, se mezclaron 900 µL de la muestra con 150 µL de H_3PO_4 (1:2, vol:vol) para ajustar el pH por debajo de 2,0 y 150 µL de una solución de ácido crotónico (2000 mg/L) como patrón interno. Esta mezcla se centrifugó para eliminar los sólidos y se transfirió a un vial de cromatografía de gases de 1500 µL; el volumen de inyección de muestra fue de 1 µL. Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 200 °C y 250 °C, respectivamente, mientras que la temperatura de la columna aumentó de 120 a 160 °C

a una velocidad creciente de 10 °C/min.

Determinación de sólidos volátiles

Los sólidos totales y los sólidos volátiles se determinan por los métodos 2540 B y 2540 E de los Métodos Normalizados (APHA, AWWA, WPCF, 1989), respectivamente. Se basan en la evaporación de una muestra de volumen conocido en una cápsula de porcelana tarada tras ser secada en una estufa a 103-105 ºC durante 1 hora. Tras la evaporación a 103-105 °C, el aumento de peso sobre el de la cápsula vacía representa los sólidos totales (ST), en los que se incluyen tanto los sólidos disueltos como los sólidos en suspensión.

Posteriormente se procede a la incineración del residuo obtenido en la cápsula a una temperatura de 550 ± 50 ºC durante 1h. Transcurrido dicho tiempo la pérdida de peso representa los sólidos volátiles (SV) y los sólidos que aún permanecen en la cápsula constituyen los sólidos minerales (SM).

Ejemplo 1. Cálculo de las cantidades para conseguir la proporción en sólidos volátiles de inóculo:sustrato y alperujo:microalga deseadas

En primer lugar, se determinan los sólidos volátiles del inóculo, del alperujo y de la microalga *Dunaliella salina* y, en base a esos sólidos volátiles, se procede a buscar una relación inóculo sustrato de 2 entre ellos, que no supere en volumen la capacidad del reactor o digestor que se va a usar en la digestión anaerobia y que deje al menos un 20% de espacio de cabeza en el reactor anaerobio.

Para el ejemplo concreto de una relación de 2:1 inóculo:sustrato, si la determinación de SV del inóculo es 0,0209 g $SV_{inóculo}$/g de inóculo y los SV del alperujo son 0,2018 g $SV_{alperujo}$/g alperujo, y considerando un reactor de 250 mL, se tendría que dejar un espacio de cabeza en el reactor de 50 mL. Si se toman 190,15 g de inóculo, equivale a 3,97 g $SV_{inóculo}$ (es decir 190,15 g inóculo X 0,0209 g $SV_{inóculo}$/g de inóculo=3,97 g $SV_{inóculo}$). Para una relación inóculo:sustrato de 2:1 habría que poner la mitad de sólido volátiles de alperujo, esto es, 3,97/2=1,99 g $SV_{alperujo}$ y como el alperujo tiene un contenido en sólidos volátiles de 0,2018 g $SV_{alperujo}$/g alperujo habría que poner un total de 9,85 g de alperujo (1,99g SV alperujo/0,2018 g $SV_{alperujo}$/g alperujo=9,85 g de

alperujo). Con lo cual para una relación inóculo:sustrato de 2:1 es necesario poner 190,15 g de inóculo y 9,85 g de alperujo que en total suman 200.

Tabla 1. Ejemplo de cálculos para una relación inóculo:sustrato 2:1. Cuando el contenido en sólidos volátiles (SV) es 0,0209 g $SV_{inóculo}$/g de inóculo para el inóculo y 0,2018 g $SV_{alperujo}$/g alperujo para el alperujo y considerando un reactor de 250 mL,

inóculo a añadir (g)	SV inóculo (g)	SV Alperujo (g)	Alperujo a añadir (g)	Total (g)
190,15	3,97	1,99	9,85	200

Por otro lado, para el cálculo de las proporciones alperujo:microalga se procedería análogamente, partiendo de un contenido en sólidos volátiles para el inóculo y el alperujo semejante al anterior y un contenido en sólido volátiles para la microalga *Dunaliella salina* de 0,4723 g $SV_{Dunaliella}$/ g *Dunaliella salina*.

Para mantener una relación inóculo:sustrato de 2:1, en un reactor de 250 mL dejando un espacio de cabeza del 20%, se hace una estimación de la cantidad de inóculo necesaria para que el contenido total sean 200 g. Se toman 190,5 g de inóculo, esto es 3,98 g de $SV_{inóculo}$, y 3,98/2=1,99 g de SV sustrato. Como se trata de una co-digestión y se quiere una relación 95:5 alperujo:*Dunaliella salina*, de esos 1,99 g de SV de sustrato, 1,89 g $SV_{alperujo}$ (1,99x 0,95) lo serán de alperujo y 0,10 g $SV_{Dunaliella\ salina}$ (1,99x0,05) lo serán de microalga *D. salina*. Como el contenido de SV del alperujo y de la microalga son conocidos, a continuación, se averigua la cantidad de cada sustrato que hay que añadir: 1,89 g $SV_{alperujo}$/0,2018 g $SV_{alperujo}$/g alperujo =9,372 g de alperujo y 0,10 g $SV_{Dunaliella\ salina}$/0,4723 g $SV_{Dunaliella}$/ g *Dunaliella salina*= 0,211 g del alga *Dunaliella salina*.

Tabla 2. Ejemplo de cálculos para un porcentaje de co-digestión 95% alperujo-5% microalga *Dunaliella salina*, manteniendo la relación inóculo:sustrato 2:1. Cuando el contenido en sólidos volátiles (SV) es 0,0209 g $SV_{inóculo}$/g de inóculo para el inóculo y 0,2018 g $SV_{alperujo}$/g alperujo para el alperujo y el de la microalga *Dunaliella salina* 0,4723 g $SV_{D.\ salina}$/g *D. salina* considerando un reactor de 250 mL.

			95% Alperujo		5% *D. salina*		
Inóculo a añadir (g)	**SV inóculo (g)**	**SV sustrato* (g)**	**SV alperujo (g)**	**Alperujo a añadir (g)**	**SV *D.salina* (g)**	***D. salina* a añadir (g)**	**Total (g)**
190,5	3,98	1,99	1,89	9,372	0,10	0,221	200

* g SV sustrato=de ambos sustratos en total, tanto alperujo como *D.salina*

Ejemplo 2. Estudio comparativo entre la co-digestión en condiciones de proporción de alperujo:*D. salina* es 95:5 con otras mezclas conocidas en el estado del arte

Se probaron diferentes combinaciones alperujo/*D. salina*: 100%. alperujo; 75% alperujo-25% *D. salina*; 50% alperujo-50% *D. salina*; y 25%. alperujo-75% *D. salina*.

Las pruebas del potencial bioquímico de metano (PBM) se llevaron a cabo en un sistema de reactores multi-batch; el volumen efectivo de los reactores fue de 250 mL, en agitación continua por barras magnéticas a 500 rpm y en un baño de agua termostático a temperatura mesofílica (35 ± 2 ºC).

La relación inóculo:sustrato fue de 2:1 (expresada en sólidos volátiles). Para cada reactor que contenía 239 mL de inóculo, se agregó la cantidad de sustrato necesaria para obtener la proporción requerida entre inóculo y sustrato, junto con 239 µL de solución de elementos traza.

La composición de la solución de elementos traza es: $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 2000 mg/L; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2000 mg/L; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 500 mg/L; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 90 mg/L; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 50 mg/L; H_3BO_3, 50 mg/L; $ZnCl_2$, 50 mg/L; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 38 mg/L, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 mg/L, $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ 194 mg/L and EDTA 1000 mg/L.

Tabla 3. Comparativa de rendimiento en metano y velocidad de producción de metano para distintas proporciones alperujo:microalga

Microalga	mL CH_4/g SV	Porcentaje mezcla alperujo-microalga (% en peso*)	Rm mL CH_4/g SV·d
Dunaliella salina	132	25-75	18,8
Dunaliella salina	285	50-50	30,1
Dunaliella salina	330	75-25	48,1
Dunaliella salina	491	95-5	54,7

* % en peso sobre la relación inóculo:sustrato de 2:1

Ejemplo 3. Sustratos e inóculo

Se utilizaron tres sustratos diferentes: (i) RSA, (ii) RSA, pretratados con un pretratamiento hidrotérmico suave a 121 °C, 30 minutos y 1,1 bar (110 kPa) (RSA PHS) y (iii) la mezcla de co-digestión de la mezcla RSA:*Dunaliella salina* de 95:5 en sólidos volátiles. El pretratamiento a 121 °C y 1,1 bar (110 kPa) durante 30 min se eligió en base a los resultados previos obtenidos de diferentes pretratamientos hidrotérmicos suaves realizados en RSA. Se introdujeron 500 g de RSA en una botella autoclavable de 1 litro y a continuación se esterilizó en autoclave en las condiciones seleccionadas. La muestra se enfrió a continuación a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C durante menos de 24 h hasta su uso. La Tabla 4 muestra las características principales de los sustratos y el inóculo utilizado durante los experimentos. El RSA se recogió de la almazara experimental de aceite de oliva ubicada en el Instituto de la Grasa (CSIC), Sevilla (España). Los trozos de hueso de aceituna se eliminaron utilizando una malla de 2 mm. La *Dunaliella salina* (*D. salina*) fue proporcionada como biomasa liofilizada por la Universidad de Huelva, Huelva (España). Las principales características de *D. salina* se presentan en la Tabla 4. Los reactores anaerobios se inocularon con biomasa obtenida de un reactor industrial de flujo ascendente de lodos anaeróbicos para aguas residuales de una cervecera ubicada en Sevilla (España).

Tabla 4. Características principales de los sustratos y el inóculo utilizado durante los experimentos

Parámetros	Valores de inóculo	Valores de RSA*	Valores de *D. salina***
ST (g/kg)	27,7 ± 1,8	231,5 ± 2,3	887,9 ± 7,3
SV (g/kg)	20,9 ± 1,7	201,8 ± 2,6	472,3 ± 8,1
DQO (g de O_2/kg)	nd	325,1 ± 0,4	272 ± 8
DQOs (g de O_2/kg)	nd	144,4 ± 4,1	nd
NTK (g/kg)	nd	nd	7, 9 ± 0,7
pH	7,1 ± 0,2	4,7 ± 0,1	8,22±0,2(1:20)***
AT (g $CaCO_3$/kg)	nd	2,7 ± 0,0	nd

* Concentraciones expresadas como: peso/peso de muestra húmeda.

** Concentraciones expresadas como: peso/peso de muestra liofilizada.

*** (p:v) utilizando agua destilada.

ST: sólidos totales

SV: sólidos volátiles

DQO: demanda química total de oxígeno

DQOs: demanda química de oxígeno soluble

NTK: nitrógeno total Kjeldahl

AT: alcalinidad total

Ejemplo 4. Pruebas del potencial bioquímico del metano (PBM)

Las pruebas se llevaron a cabo en discontinuo en un sistema de reactores múltiples con un volumen efectivo de 200 mL. Los reactores se agitaron continuamente mediante barras magnéticas a 440 rpm y se pusieron en un baño de agua termostático a temperatura mesófila (35 ± 2 °C).

La relación inóculo:sustrato fue de 2:1 (en base a los SV). Cada reactor contenía 150 mL de inóculo, la cantidad de sustrato necesaria para proporcionar la relación requerida de inóculo a sustrato y finalmente se añadieron 150 µl de solución de elementos traza.

La composición de la solución de elementos traza fue: $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 2000 mg/L; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2000 mg/L; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 500 mg/L; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 90 mg/L; $(NH_4)_6Mo_7O_2 \cdot 4H_2O$, 50 mg/L; H_3BO_3, 50 mg/L; $ZnCl_2$, 50 mg/L; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 38 mg/L,

$NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 mg/L, $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ 194 mg/L y EDTA 1000 mg/L. Los reactores con solución de inóculo y elementos traza, pero sin adición de sustrato se usaron como controles.

Los reactores se sellaron desplazando previamente el aire contenido en el espacio de cabeza con nitrógeno al comienzo del ensayo. El biogás producido se pasó a través de una solución de NaOH 3N para capturar el CO_2; se supuso que el gas restante era metano. El volumen de biogás se expresó en condiciones estándar de presión y temperatura (273 K, 1 bar (100 kPa). Los experimentos de digestión anaerobia se realizaron durante un período de aproximadamente 34 días hasta que la producción de gas acumulada permaneció esencialmente sin cambios. Se pusieron 10 reactores de cada experimento y 7 de ellos se sacrificaron para evaluar la evolución de los diferentes parámetros mediante diferentes análisis.

Ejemplo 5. Evolución del pH

La Tabla 5 muestra la evolución del pH, la variación de la AT y los AGV a lo largo del tiempo de los tres experimentos.

Tabla 5. Evolución de ácidos grasos volátiles individuales, ácidos grasos volátiles totales (AGV total), pH y alcalinidad total (AT) en los experimentos de digestión anaeróbica en discontinuo de residuos sólidos de almazara (RSA), RSA pretratados mediante pretratamiento hidrotérmico suave (RSA PHS) y co-digestión de la mezcla RSA: *Dunaliella salina* 95:5 en SV.

Sustrato	Día	Ácido acético (mg/L)	Ácido iso-butírico (mg/L)	Ácido butírico (mg/L)	Ácido valérico (mg/L)	Ácido caproico (mg/L)	AGV Total (mg/L)	pH	AT (mg de CaCO3/L)
RSA	2	NE	422	NE	125	NE	547	7,59	4349±13
	4	NE	762	NE	238	NE	1000	7,81	4481±58
	6	1710	825	NE	448	251	3226	7,81	4364±02
	8	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,79	4528±71
	11	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,88	4040±54
	14	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,86	4216±47

Sustrato	Día	Ácido acético (mg/L)	Ácido iso-butírico (mg/L)	Ácido butírico (mg/L)	Ácido valérico (mg/L)	Ácido caproico (mg/L)	AGV Total (mg/L)	pH	AT (mg de CaCO3/L)
	21	NE	NE	NE	NE	NE	NE	8,08	5551±00
	34	NE	NE	NE	NE	NE	NE	8,32	5190±16
Mezcla RSA: *Dunaliella salina* 95:5 en SV	2	NE	402	NE	NE	NE	402	7,49	4495±12
	4	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,68	4182±61
	6	NE	460	NE	NE	747	1027	7,63	4370±28
	8	NE	578	NE	NE	421	999	7,77	4818±11
	11	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,89	4812±95
	14	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,89	4799±21
	21	NE	NE	NE	NE	NE	NE	8,13	5148±52
	34	NE	NE	NE	NE	NE	NE	8,36	5693±20
RSA PHS	2	NE	318	NE	NE	NE	318	7,46	3828±21
	4	NE	625	477	466	484	2052	7,71	4608±17
	6	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,59	3341±46
	8	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,71	4595±34
	11	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,54	4998±47
	14	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,82	4609±65
	21	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7,94	4986±30
	34	NE	NE	NE	NE	NE	NE	8,30	5534±76

* NE: no encontrado

La tendencia del pH no mostró fluctuaciones relevantes en ninguno de los experimentos. Durante la digestión anaerobia (DA) de RSA, el valor mínimo de pH fue de 7,6 al comienzo del experimento y el valor máximo, de 8,1, se alcanzó al final del experimento. Cuando se realizó la DA de RSA PHS y la co-digestión, los valores de pH estuvieron entre 7,5 y 8. Estos valores permanecieron relativamente constantes en todos los experimentos dentro del rango descrito como óptimo para el crecimiento de arqueas metanogénicas.

La evolución de los valores de AT a lo largo del experimento de RSA varió de 4349 ± 66 mg de $CaCO_3$/L a 5551 ± 62 mg de $CaCO_3$/L, durante el experimento de RSA PHS los valores de AT variaron de 3341 ± 74 mg de $CaCO_3$/L a 5534 ± 67 mg de $CaCO_3$/L y de

4182 ± 68 mg de $CaCO_3$/L a 5693 ± 82 mg de $CaCO_3$/L para el experimento de co-digestión. En los tres casos, el aumento de la alcalinidad en el sistema fue progresivo, alcanzando el valor de AT más alto al final del experimento. Este aumento en los valores de AT coincide con la acumulación de amonio en el sistema debido a la degradación y estabilización de la materia orgánica que se hidroliza. Durante la etapa de hidrólisis del proceso de DA, la materia orgánica compleja se degradó en moléculas solubles más simples que pueden usarse como sustratos para el metabolismo microbiano por hidrólisis y acidogénesis. A continuación, los sustratos se consumieron en las fases de acetogénesis y metanogénesis. A lo largo de los tres experimentos, la concentración final de amonio estuvo por debajo del límite establecido como tóxico para la evolución del proceso de DA. Los valores de AT también fueron relativamente estables, y dentro del rango óptimo para el proceso de DA, lo que indica una buena estabilidad del proceso y capacidad de auto-tamponamiento durante los tres experimentos llevados a cabo.

El contenido de AGV es uno de los parámetros más utilizados para controlar la estabilidad del proceso de DA. La concentración de AGV es el factor principal que afecta la alcalinidad intermedia. La variación en AGV a lo largo del tiempo se resume en la Tabla 5. A lo largo del experimento de RSA PHS, la concentración de AGV fue más alta el día 4. La concentración de ácido isobutírico, ácido butírico, ácido valérico y ácido caproico en el experimento de RSA PHS alcanzó valores de 625 mg/L, 477 mg/L, 466 mg/L y 484 mg/L, respectivamente. La concentración total de AGV alcanzada el día 4 fue de 2052 mg/L. El pretratamiento aceleró la solubilización (hidrólisis) de RSA y redujo el tamaño de partícula de modo que se pudo observar una etapa hidrolítica acortada. Las concentraciones totales de AGV observadas durante la DA de RSA fueron significativamente más altas que las obtenidas para los experimentos de RSA PHS. La acumulación de AGV de RSA comenzó el día 2 y alcanzó su nivel más alto el día 6. A continuación, la concentración de AGV disminuyó hasta 0 el día 8. El pico máximo de AGV se observó dos días más tarde que el observado durante la DA de RSA de SHP. La mayor acumulación de AGV durante la DA de RSA fue el día 6 y consistió principalmente en ácido acético (1710 mg/L), ácido isobutírico (825 mg/L), ácido valérico (448 mg/L) y ácido caproico (251 mg/L), alcanzando una concentración total de AGV de 3226 mg/L. Las bacterias hidrolíticas tardaron más en descomponer el RSA sin tratar o crudo en sustancias más simples, y se observó una gran acumulación de AGV al sexto día del experimento, lo que indica que el proceso de DA no es tan directo como en el caso del pretratamiento. Tanto los RSA PHS como la DA de RSA produjeron una

acumulación de AGV por encima del límite establecido por Siegert y Banks (Siegert, I, Banks, C.J., 2005. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. Process Biochemistry, 40 (11), 3412-3418). Siegert y Banks (2005) informaron de la inhibición de la actividad celulolítica y, por lo tanto, en la tasa de hidrólisis de celulosa cuando la concentración de AGV era igual o mayor que 2 g/l, independientemente del pH del sistema.

Durante el experimento de co-digestión, aunque la mayor parte de la materia orgánica provenía de los RSA, la contribución de las microalgas ayudó a suavizar la etapa hidrolítica, haciéndola más uniformemente espaciada con el tiempo, mejorando así el proceso de DA. La acumulación de AGV disminuyó en comparación con la obtenida para RSA. Las principales concentraciones de AGV fueron ácido caproico (747 mg/L), ácido isobutírico (578 mg/L) y ácido valérico (421 mg/L) el día 6, pero se alcanzaron valores similares el día 8 (ácido isobutírico = 460 mg/L y ácido caproico = 747 mg/L). La acumulación de AGV comenzó el día 2 y se observó hasta el día 8, pero la concentración máxima de AGV total fue menor que la observada durante los experimentos de RSA y RSA PHS y no excedió el límite establecido por Siegert y Banks (2005) como tóxico.

La Figura 1 muestra la evolución de la DQOs a lo largo de los ensayos. La solubilización de la materia orgánica fue bastante diferente a lo largo de los tres experimentos. En el experimento de co-digestión, se observó una concentración constante de materia orgánica soluble. La contribución de las microalgas al sistema añadió una materia orgánica más fácilmente biodegradable que los RSA lignocelulósicos, manteniendo los valores de DQOs casi constantes en torno a 5000 mg de O_2/l. Sólo se observó una disminución en la concentración de materia orgánica soluble entre los días 8 y 10, en los que se alcanzaron valores de DQOs de 3864 mg de O_2/l y 4328 mg de O_2/l, respectivamente (Figura 1). Esta concentración constante de materia orgánica disuelta condujo a una sinergia entre los nutrientes y las bacterias involucradas en el proceso de digestión anaeróbica. La concentración de la DQOs observada durante la co-digestión fue mayor que la observada en los experimentos de RSA PHS y DA de RSA. La concentración de la DQOs en los experimentos de RSA y RSA PHS a menudo fluctúa considerablemente. El valor inicial de la DQOs en el experimento de RSA fue de 2203 mg de O_2/l y 2771 mg de O_2/l para el experimento de RSA PHS. Esta pequeña diferencia se debe al efecto del pretratamiento térmico sobre el sustrato, que ayudó a romper las fibras de lignocelulosa y la materia orgánica solubilizada. También se observó el efecto

del pretratamiento térmico con el tiempo, ya que en el experimento de RSA PHS se observaron dos picos máximos de solubilización de materia orgánica, el primero el día 2 y el segundo el día 14 después del inicio del experimento. Por otro lado, durante la DA de RSA, solo se observó un pico máximo de solubilización de materia orgánica y se retrasó en el tiempo, ya que se observó el día 8. Estas fluctuaciones en la solubilización de materia orgánica no permitieron una sinergia entre nutrientes y la comunidad bacteriana. Durante la DA de RSA, se observó que la hidrólisis era la etapa limitante de la velocidad. La etapa de hidrólisis es el principal cuello de botella durante la DA de sustratos con un alto contenido en lignocelulosa debido a la baja biodegradabilidad del sustrato. El pretratamiento térmico ayudó a romper las fibras de celulosa, hemicelulosa y lignina (Rincón et al., "*Biochemical methane potential of two-phase olive mill solid waste: Influence of thermal pretreatment on the process kinetics*". Bioresource Technology, 140, 249-255, 2013). Sin embargo, la co-digestión, produjo una mejora en la etapa de hidrólisis observándose el efecto sinérgico positivo de la mezcla de co-digestión para equilibrar los nutrientes en el proceso quedando patente el incremento del rendimiento en metano producido por los microorganismos.

Se investigaron el efecto del pretratamiento (RSA PHS) y la co-digestión anaeróbica de RSA y las microalgas *D. salina* en una proporción de mezcla del 95 y el 5 %, respectivamente, en comparación con la DA de RSA sin procesar. Los rendimientos de metano para los tres experimentos se muestran en la Figura 2. Después de 34 días de DA, la producción acumulada de metano mostró la misma tendencia de variación en cada experimento. La producción de metano en toda la prueba creció exponencialmente en los primeros 8 días y entonces se estabilizó. A pesar de ser un sustrato biodegradable difícil, la producción de metano fue inmediata en cada uno de los tres experimentos, posiblemente porque las bacterias usaron una fracción interna que era fácilmente degradable, y, por lo tanto, la etapa de hidrólisis pudiera haber comenzado con esta fracción más disponible. En los tres casos, el rendimiento de metano se estabilizó a partir del día 22 después del comienzo del experimento. Finalmente, se observaron mayores producciones de metano para la co-digestión que, para los sustratos individuales, RSA y RSA PHS. Se determinaron los valores finales de 380 ± 1 mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$ para el RSA, 424 ± 2 mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$ para el RSA PHS y 491 ± 1 mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$ para la mezcla de co-digestión. Se logró un aumento del 29,2 y el 4 % en el rendimiento de metano para la co-digestión y el RSA PHS en comparación con el RSA no tratado, respectivamente. El aumento del rendimiento de

metano obtenido en el RSA PHS en comparación con el RSA bruto (4 %) fue similar al reportado por Rincón et al. (2013) para la prueba de PBM de RSA pretratado térmicamente en comparación con RSA sin procesar (5 %). Rincón y col. (2013) informaron de un rendimiento de metano de 373 ± 4 mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$ para la prueba de PBM de RSA sin procesar y de 392 ± 14 mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$ para la prueba de PBM de RSA pretratado a 120 °C durante 180 min.

La producción diaria máxima de metano de 48 ± 8 mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$ se logró el séptimo día para la prueba de PBM de RSA y de 58 ± 2 y 76 ± 5 mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$ el día 5 para el RSA PHS y la mezcla de co-digestión, respectivamente. Fernández-Rodríguez et al. (2014) (Fernández-Rodríguez et al. "Assessment of two-phase olive mill solid waste and microalgae co-digestion to improve methane production and process kinetics". Bioresource Technology, 157, 263-269, 2014) también obtuvieron una mejora en la producción de metano a través de la co-digestión de RSA-microalga *Dunaliella salina*. Sin embargo, se logró un rendimiento de metano más bajo con la mezcla del 75 % de RSA-25 % de *D. salina* (330 mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$), mejorando la producción de metano de RSA en sólo un 2,8 %.

Ejemplo 6. Estimación de los parámetros del modelo por modelado cinético

Modelo cinético de primer orden

Para estudiar la cinética del proceso y estimar el rendimiento del proceso en la DA y la co-digestión de los tres casos estudiados, se utilizó el siguiente modelo cinético de primer orden:

$$G = G_m \cdot [1 - \exp(-k \cdot t)] \qquad (1)$$

donde G es la producción de metano específica acumulativa (mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$), G_m es la producción final de metano (mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$), k es la constante de velocidad específica (días^{-1}) y t es el tiempo de digestión (días). Este modelo cinético normalmente se aplica para evaluar la cinética de los procesos de DA en discontinuo para diferentes tipos de sustratos biodegradables. Este modelo se basa en el supuesto de que la producción de metano es proporcional a la cantidad de sustrato y no está limitada por la masa celular microbiana.

La Tabla 6 resume los parámetros cinéticos obtenidos de la Ecuación (1) para la mezcla de co-digestión y los dos sustratos estudiados solos. Los valores situados después de ± representan la desviación típica de cada parámetro. Como puede verse, se obtuvieron desviaciones entre los valores experimentales de G_m (Figura 2) y los teóricos (Tabla 6) inferiores al 7,7 % para todos los casos estudiados. Además, los bajos valores de las desviaciones típicas y los altos valores de coeficientes de determinación demuestran el ajuste apropiado de los resultados experimentales al modelo propuesto.

Como se puede ver en la Tabla 6, la producción final de metano aumentó en un 8,5 % y un 24 % cuando el RSA se pretrató térmicamente y se codigerió con *D. salina* (95 % de RSA-5 % de *D. salina*) respectivamente, en comparación al valor obtenido para el RSA no tratado. Se informó que las pruebas de PBM de mezclas de fuente seleccionada de FORSM (fracción orgánica de residuos sólidos municipales) y lodos de depuradora mostraron un aumento en la producción de metano del 18 % al 47 % en comparación con la DA de lodos de depuración únicos (Cabbai, V., Ballico, M., Aneggi, E., Goi, D., 2013. BMP tests of source selected OFMSW to evaluate anaerobic co-digestion with sewage sludge. Waste Management 33, 1626-1632). La constante cinética, *k*, aumentó en un 12 % cuando el RSA se codigerió con *D. salina* (95 % de RSA-5 % de *D. salina*) en comparación con los valores logrados para el RSA no tratado y el RSA pretratado térmicamente (0,17 días^{-1} en ambos casos).

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos del modelo cinético de primer orden en los experimentos de digestión anaeróbica en discontinuo de RSA, pretratamiento hidrotérmico suave (RSA PHS) y co-digestión de la mezcla RSA: *Dunaliella salina* 95:5 en SV.

Sustrato	G_m (mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$)	*k* (días^{-1})	*R^2	**E.E.E.	***Error (%)
RSA	364 ± 6	0,17 ± 0,01	0,9778	22,09	4,1
RSA PHS	395 ± 6	0,17 ± 0,00	0,9811	22,42	6,3
Co-digestión de la mezcla RSA:	451 ± 5	0,19 ± 0,00	0,9862	22,21	7,7

Dunaliella salina 95:5 en SV					

* R^2: coeficiente de determinación ** E.E.E.: Error estándar de estimación; *** El error se definió como la diferencia entre los valores de rendimiento de metano medidos y predichos.

Modelo cinético modificado de Gompertz

Por otro lado, el modelo cinético modificado de Gompertz es una función sigmoidea que se considera como un tipo de modelo matemático para una serie temporal. Por lo tanto, puede ser una de las mejores funciones para predecir la producción de biogás en un proceso de DA en discontinuo. Muchos investigadores han estudiado la aplicación de diferentes modelos cinéticos y descubrieron que el modelo de Gompertz modificado tiene uno de los mejores ajustes para los datos de la producción de biogás o metano en función del tiempo en procesos anaeróbicos realizados en modo discontinuo.

En el modelo de Gompertz modificado, la producción acumulada de metano está relacionada con el tiempo de digestión a través de la siguiente ecuación:

$$B = B_m * \exp\left[-\exp\left[(R_m * e/B_m) * (\lambda - t) + 1\right]\right] \qquad (2)$$

donde B es la producción acumulada de metano a tiempo t (mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$); B_m es la producción máxima de metano o el potencial de rendimiento de metano (mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$); R_m es la tasa máxima de producción de metano (mL de CH_4/g de $SV_{añadidos}$ · d); λ es el tiempo de retraso (d); t es el tiempo de digestión (d) en el que se calcula la producción acumulada de metano; y finalmente, e es el exp (1) = 2,7183. Los parámetros B_m, R_m y λ se calcularon para cada uno de los experimentos estudiados utilizando el enfoque de regresión no lineal con el software SigmaPlot 11.0. La Tabla 7 muestra los valores para los parámetros del modelo obtenidos del modelo de Gompertz modificado para los tres sustratos analizados. De manera similar a lo que ocurrió con los valores experimentales de producción máxima de metano, la producción teórica máxima de metano fue un 8 y un 23 % mayor cuando el RSA fue pretratado térmicamente y cuando se codigirió con *D. salina* en comparación con el valor obtenido para el RSA no tratado. Por lo tanto, se observó un aumento considerable en la

biodegradabilidad del sustrato cuando el RSA se pretrató o codigirió térmicamente con *D. salina*, especialmente en este último caso, en comparación con el RSA crudo.

Además, se encontró que las diferencias entre los rendimientos de metano medidos y pronosticados eran solo del 6,7, 10,1 y 12,1 % para el RSA no tratado, el RSA pretratado térmicamente y el RSA codigerido con *D. salina*, respectivamente. Los valores altos para los coeficientes de determinación (R^2) y los valores bajos de los errores estándar de las estimaciones (Tabla 7), muestran nuevamente el excelente ajuste de los resultados experimentales al Modelo de Gompertz modificado.

Tabla 7. Parámetros del modelo de Gompertz modificado para los tres sustratos estudiados: residuos sólidos de almazara (RSA), RSA pretratamiento hidrotérmico suave (RSA PHS) y co-digestión de la mezcla RSA: *Dunaliella salina* 95:5 en sólidos volátiles.

Sustrato	B_m (mL de CH_4/g de SV)	R_m (mL de CH_4/g de SV d)	λ (d)	*R^2	**E.E.E.	***Error (%)
RSA	355 ± 6	40,6 ± 2,1	$8 \cdot 10^{-4}$	0,9631	28,73	6,7
RSA PHS	383 ± 6	44,9 ± 2,7	$6 \cdot 10^{-11}$	0,9688	29,11	10,1
Co-digestión de la mezcla RSA: *Dunaliella salina* 95:5 en SV	437 ± 7	54,7 ± 4,1	$1 \cdot 10^{-8}$	0,9751	30,16	12,1

* R2: coeficiente de determinación ** E.E.E.: Error estándar de estimación; *** El error se definió como la diferencia entre los valores de rendimiento de metano medidos y predichos.

La tasa máxima de producción de metano, R_m, para la co-digestión del 95 % de RSA-5 % de *D. salina* y RSA pretratado térmicamente aumentó en un 34,7 y un 10,3 % en comparación con los valores obtenidos para el RSA en bruto. Por lo tanto, el

pretratamiento térmico y la co-digestión de este sustrato con *D. salina* mejoraron la velocidad del proceso de DA de RSA, acelerando la velocidad de producción de metano.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de metano a partir de alperujo mediante co-digestión anaerobia de un sustrato que comprende alperujo con microalga, caracterizado por que la microalga es *Dunaliella salina* y por que la proporción de alperujo:microalga está comprendida entre 85:15 y 95:5 en sólidos volátiles.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 donde la proporción de alperujo:microalga es 95:5 en sólidos volátiles.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
   (a) adición de un sustrato que consiste en una mezcla de alperujo y *Dunaliella salina* al reactor de digestión;
   (b) adición de inóculo al reactor de digestión en proporción en sólidos volátiles inóculo:sustrato de la etapa (a) comprendida entre 3,0 y 0,5;
   (c) adición de una solución de elementos traza a la mezcla inóculo: sustrato de la etapa (b);
   (d) cierre del reactor de digestión y desplazamiento con gas inerte del aire del espacio de cabeza; y
   (e) digestión durante un periodo comprendido entre 30 y 50 días a una temperatura mesofílica de entre 20 y 39 ºC, y a una velocidad de agitación comprendida entre 200 y 500 rpm.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde la proporción en sólidos volátiles de inóculo:sustrato en la etapa (b) es de 2:1.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, donde la solución de elementos traza de la etapa (c) comprende sales de elementos metálicos seleccionados de entre hierro, cobre, zinc, cobalto, manganeso, molibdeno, níquel, aluminio, selenio, y cualquiera de sus mezclas.

6. Procedimiento según la reivindicación 5 donde las sales metálicas de la solución de elementos traza se seleccionan de entre Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Al^{3+}, Se^{4+} Mo^{6+}; y cualquiera de sus mezclas.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 donde la solución de elementos traza comprende al menos dos sales que se seleccionan de entre $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_2 \cdot 4H_2O$, H_3BO_3, $ZnCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$, y EDTA.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, donde la solución de elementos traza de la etapa (c) comprende $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_2 \cdot 4H_2O$, H_3BO_3, $ZnCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ y EDTA.

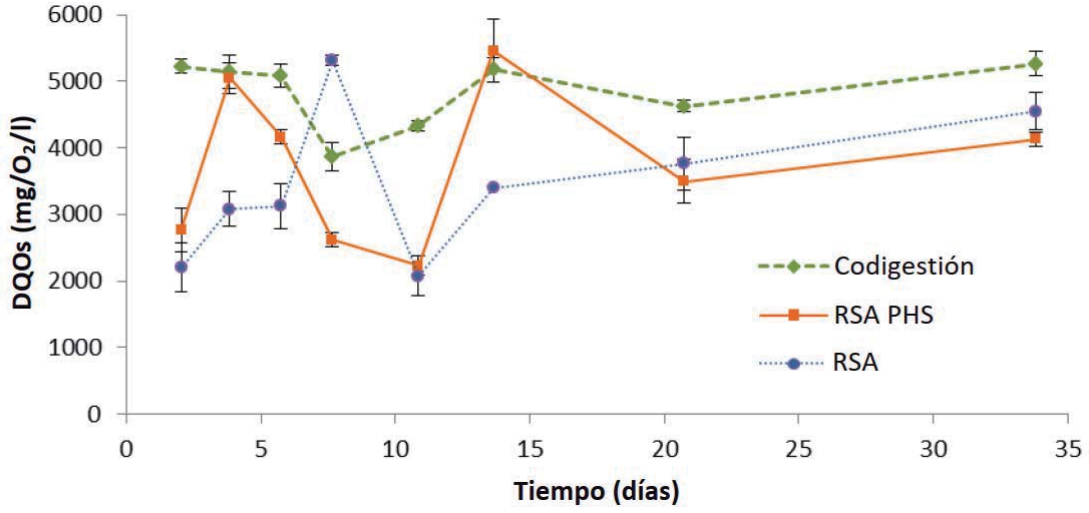
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
DQOs (mg/O2/l)
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo (días)
Codigestión
RSA PHS
RSA

FIG. 1

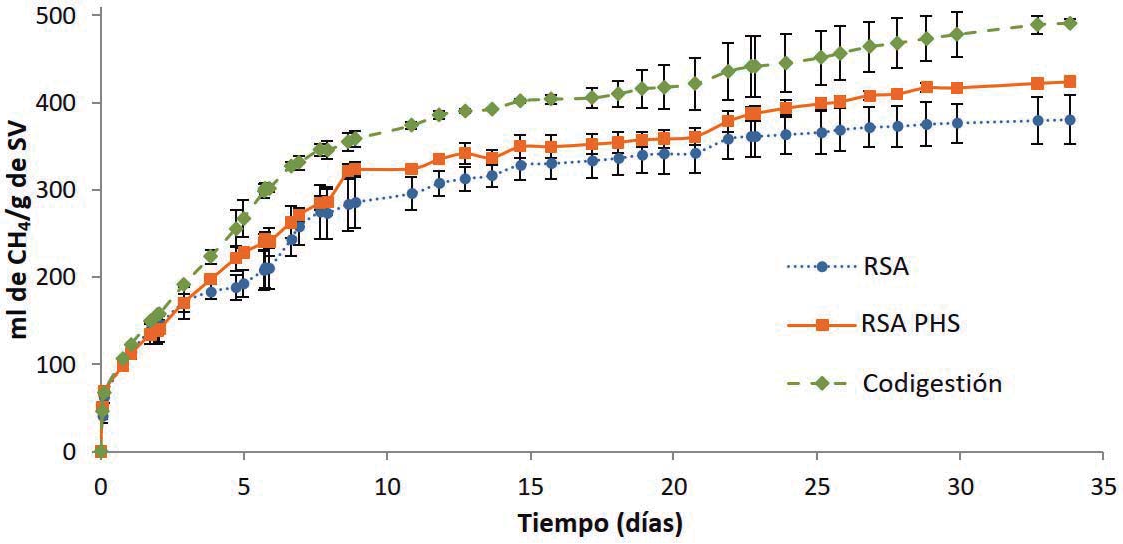
500
400
300
200
100
0
ml de CH4/g de SV
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo (días)
RSA
RSA PHS
Codigestión

FIG. 2

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201931156

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 26.12.2019

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C12P5/02*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FERNANDEZ-RODRIGUEZ M J et al. Assessment of two-phase olive mill solid waste and microalgae co-digestion to improve methane production and process kinetics. Bioresource Technology APR 2014. , 31/03/2014, Vol. 157, Páginas 263-269, ISSN 0960-8524(print) ISSN 1873-2976(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.biortech.2014.01.096>. todo el documento	1-8
A	RINCON B et al. Biochemical methane potential of two-phase olive mill solid waste: Influence of thermal pretreatment on the process kinetics. Bioresource Technology JUL 2013. , 30/06/2013, Vol. 140, Páginas 249-255, ISSN 0960-8524(print) ISSN 1873-2976(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.biortech.2013.04.090>. Todo el documento	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
27.04.2020	A. I. Santos Díaz	1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, Y02E50/343

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, DWPI