



ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

Máster Universitario de Investigación en
Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos



EFECTO DE BIOSURFACTANTES EN EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA DE GRASAS

PAULA MARTÍNEZ BOLAÑOS

2021

EFECTO DE BIOSURFACTANTES EN EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA DE GRASAS

Vº Bº DIRECTORA

ADRIANA
ARTOLA
CASACUBERTA -
DNI 46670892M

Digitally signed by
ADRIANA ARTOLA
CASACUBERTA - DNI
46670892M
Date: 2021.07.02
16:27:29 +02'00'

Adriana Artola Casacuberta

Vº Bº CODIRECTORA

RAQUEL
BARRENA
GOMEZ - DNI
44019399K

Digitally signed by
RAQUEL BARRENA
GOMEZ - DNI
44019399K
Date: 2021.07.02
17:27:03 +02'00'

Raquel Barrena Gómez

ALUMNA

Paula Martínez Bolaños



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza a la alumna D^{ña}. Paula Martínez Bolaños, a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Efecto de biosurfactantes en el proceso de digestión anaerobia de grasas”, bajo la dirección de D^{ña}. Adriana Artola Casacuberta y D^{ña}. Raquel Barrena Gómez (Departamento de Ingeniería Química Biológica y Ambiental, Universitat Autònoma de Barcelona), debiendo cumplir las normas establecidas para la redacción del mismo que están a su disposición en la página Web específica del Master.

Orihuela, 2 de julio de 2021

La Directora del Máster Universitario de Investigación en Gestión, Tratamiento y Valoración de Residuos Orgánicos

CONCEPCION | PAREDES | GIL
Firmado digitalmente por
CONCEPCION|PAREDES|GIL
Fecha: 2021.07.02 09:57:53
+02'00'

Fdo.: Concepción Paredes Gil

| TRIBUNAL | |
|-------------|--------|
| FECHA: | |
| | |
| PRESIDENTE: | FIRMA: |
| | |
| VOCAL: | FIRMA: |
| | |
| VOCAL: | FIRMA: |
| | |

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

IDENTIFICACIONES

Autor: Paula Martínez Bolaños

Título: Efecto de biosurfactantes en el proceso de digestión anaerobia de grasas

Title: Effect of biosurfactants in the anaerobic digestion of fats

Director/es del TFM: Adriana Artola Casacuberta y Raquel Barrena Gómez

Año: 2021

Titulación: Máster en Gestión, Tratamiento y Valorización de residuos orgánicos

Tipo de proyecto: Experimental

Palabras claves: Digestión anaerobia, biosurfactante, soforolípido, grasa, residuo de winterización del aceite de girasol (WOC)

Keywords: Anaerobic digestion, biosurfactant, sophorolipid, fat, winterization oil cake

Nº citas bibliográficas: 38

Nº de tablas: 12

Nº de figuras: 10

RESUMEN

En este trabajo, los biosurfactantes y en concreto, los soforolípidos, son probados en el proceso de digestión anaerobia de grasas. Los soforolípidos (SLs) son producidos a partir del proceso de fermentación en estado sólido de una mezcla de residuos: residuo de winterización del aceite de girasol (WOC), melaza de remolacha y paja de trigo. Para conocer el efecto de los SLs en el proceso de digestión anaerobia de grasas se llevan a cabo ensayos BMP (Potencial bioquímico del metano) de una grasa pura, aceite de oliva y una grasa residual, WOC y se prueban tres dosis diferentes de SL (0,14, 0,28 y 0,55g). Además, se lleva a cabo la simulación de la producción de metano mediante el modelo de Gompertz. Finalmente, se concluye que el uso de SLs aumentan la producción de metano, con una dosis de 0,14 g de SL, y que los ensayos BMP de grasas a de durar un mínimo de 40 días.

ABSTARCT

In this project, biosurfactants and, more specifically, sophorolipids, are tested in the process of anaerobic digestion of fats. Sophorolipids are produced from the process of solid state fermentation of a waste mixture: winterization oil cake (WOC), sugar beet molasses and wheat straw. In order to establish the effects of sophorolipid in the anaerobic digestion of fats, BMP (Biochemical Methane Potential) tests are carried out on a pure fat, olive oil and a residual fat, WOC, and three different doses are tested (0,14, 0,28 y 0,55g). In addition, the simulation of methane production is carried out using Gompertz model. Finally, it is concluded that the use of SL increases the production of methane, with a dose of 0,14g of SL, and that the BMP test of fats has to last a minimum of 40 days.

AGRADECIMIENTOS

Para empezar, quiero agradecer a mis tutoras Adriana Artola Casacuberta y Raquel Barrena Gómez por la propuesta de este trabajo y por incluirme en el Grupo de Investigación de Compostaje. Gracias por guiarme durante todo el camino y por siempre estar presentes.

Además, quiere agradecer especialmente a mi compañera Nathaly. Quiero agradecer que siempre ha estado ahí: apoyándome, motivándome, enseñándome, acompañándome y haciéndolo siempre con alegría y pasión. No podría haber tenido mejor compañera y mentora.

Por otro lado, agradecer a todos los compañeros que me han ayudado en este camino, por resolver mis dudas, facilitarme el trabajo y sentirme una más del grupo. Gracias a Paula, David, Esther, Pilar, Paul, Dani y Jimmy.

Agradecer de igual manera al Grupo de Investigación de Compostaje (GICOM) del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona por poder llevar a cabo el proyecto ahí y permitirme emplear las instalaciones y materiales necesarios para la realización de este trabajo.

| | |
|---|-----------|
| LISTADO ALFABÉTICO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS | 9 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 10 |
| 1.1. Proceso de la digestión anaerobia | 10 |
| 1.1.1. Fundamentos..... | 10 |
| 1.1.2. Etapas del proceso de digestión anaerobia | 12 |
| 1.1.3. Factores que influyen en el proceso de digestión anaerobia | 13 |
| 1.1.4. Digestión anaerobia de grasas | 14 |
| 1.2. Biosurfactantes | 15 |
| 1.2.1. Soforolípidos | 17 |
| 1.3. Residuos orgánicos utilizados para la síntesis de SLs por FES..... | 18 |
| 1.3.1. Residuo de winterización de aceite de girasol | 19 |
| 1.3.2. Melaza de remolacha azucarera | 19 |
| 1.3.3. Paja de trigo | 20 |
| 2. OBJETIVOS..... | 21 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 22 |
| 3.1. Producción de soforolípidos..... | 22 |
| 3.2. Producción de biogás..... | 24 |
| 3.2.1. Ensayos BMP con grasa pura: Experimento 1 | 25 |
| 3.2.2. Ensayos BMP con grasa residual: Experimento 2..... | 26 |
| 3.3. Métodos analíticos utilizados | 27 |
| 3.3.1. Producción de soforolípidos..... | 27 |
| 3.3.2. Producción de biogás | 29 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 31 |
| 4.1. Producción de soforolípidos por fermentación en estado sólido..... | 31 |
| 4.2. Evolución de la producción de biogás y metano en la digestión anaerobia de grasa pura (Experimento 1) | 32 |
| 4.3. Evolución de la producción de biogás y metano en la digestión anaerobia de grasa residual (Experimento 2) | 36 |
| 4.4. Modelización de los resultados de los ensayos BMP | 39 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 44 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 45 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Producción de biogás o metano en diferentes residuos orgánicos | 11 |
| Tabla 2: Resultados de ST, SV y pH del sustrato inicial. | 23 |
| Tabla 3: Resultados de ST, SV, pH y DA del inóculo a utilizar. | 25 |
| Tabla 4: Peso del inóculo y la celulosa y volumen de la grasa a introducir en las diferentes pruebas BM | 25 |
| Tabla 5: Valores de los pesos a introducir en las botellas del Experimento 1 | 25 |
| Tabla 6: Resultados de ST y SV del WOC..... | 26 |
| Tabla 7: Peso del inóculo, celulosa y WOC a introducir | 26 |
| Tabla 8: Valores de los pesos a introducir en las botellas del experimento 2 | 27 |
| Tabla 9: Valores de los ST, SV, pH, la concentración de SL y pH de SL al principio y al final | 31 |
| Tabla 10: Producción final de biogás y metano, con el inóculo restado, de las 5 muestras del Experimento 1 | 33 |
| Tabla 11: Producción final de biogás y metano, con el inóculo restado, de las 5 muestras del Experimento 2 | 37 |
| Tabla 12: Parámetros de la ecuación de Gompertz para el Experimento 1 | 40 |
| Tabla 13: Parámetros de la ecuación de Gompertz para el Experimento 2 | 42 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Esquema del proceso de digestión anaerobia. Fuente: (Parra, 2015) | 12 |
| Figura 2: Diagrama esquemático de la interacción entre materia orgánica hidrofóbica, moléculas de agua y SL y las variaciones de tensión superficial: Fuente: (Xu et al., 2019) | 18 |
| Figura 3: Perfil respirométrico de la FES de la mezcla de paja, WOC y melaza | 32 |
| Figura 4: Producción de biogás y su contenido en metano, con el inóculo restado, de las 5 muestras del Experimento 1 | 33 |
| Figura 5: Volumen acumulado de metano de la celulosa y el AO, por gramo de sólidos volátiles, con el inóculo restado, en el Experimento 1..... | 35 |
| Figura 6: Producción de biogás y su concentración de metano, con el inóculo restado, de las 5 muestras del Experimento 2 | 37 |
| Figura 7: Volumen acumulado de metano de la celulosa y el WOC, entre los sólidos volátiles, con el inóculo restado, en el Experimento 2..... | 38 |

| | |
|--|----|
| Figura 8: Volumen acumulado de metano del WOC y del WOC con diferentes pesos de SL, entre los sólidos volátiles, con el inóculo restado, en el Experimento 2 | 39 |
| Figura 9: Modelización del Experimento 1 con la ecuación de Gompertz..... | 41 |
| Figura 10: Modelización del Experimento 2 utilizando la ecuación de Gompertz..... | 43 |

LISTADO ALFABÉTICO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AGCL: Ácidos grasos de cadena larga

AO: Aceite de oliva

AGV: Ácidos grasos volátiles

BMP: Potencial bioquímico del metano, por sus siglas en inglés, *Biochemical Methane Potential*

FS: Fermentación sumergida

FES: Fermentación en estado sólido

FORM: Fracción orgánica de residuos municipales

MS: Materia seca

OUR: Consumo específico de oxígeno

SL: Soforolípido

SLs: Soforolípidos

ST: Sólidos totales

SV: Sólidos volátiles

RIS: Relación inóculo-sustrato

WOC: Residuo de winterización del aceite de girasol, por sus siglas en inglés, *Winterization Oil Cake*

1. INTRODUCCIÓN

El cambio del modelo lineal de consumo y producción hacia una economía circular reúne el consenso de organizaciones y autoridades a todos los niveles. Para el cumplimiento de los objetivos de la economía circular, la reducción en la generación de residuos es imprescindible y por este motivo encontrar formas de valorizar los residuos es primordial. El uso de residuos como materia prima tiene dos ventajas: se añade un valor comercial a estos residuos o subproductos y segundo, se resuelve el problema de su eliminación.

Una de las opciones para la valorización de residuos orgánicos biodegradables que está cogiendo cada vez más fuerza es la digestión anaerobia o metanización. A través de este proceso se evita la eliminación de este residuo convirtiéndolo en productos de nuevo: biogás y digestato. Se alcanza tanto una valorización energética, a través del biogás, como una valorización agronómica, a través del digestato.

1.1. Proceso de la digestión anaerobia

1.1.1. Fundamentos

El proceso de digestión anaerobia consiste en la descomposición biológica de la materia orgánica en ausencia de oxígeno. En este proceso se obtienen dos productos: biogás y digestato. El biogás es el producto gaseoso obtenido y está constituido aproximadamente por un 65% de metano y un 35% de dióxido de carbono. El biogás puede utilizarse como fuente de energía para la producción de calor y electricidad. El segundo producto que se obtiene es el digestato, que es el material sólido remanente que queda tras el proceso de digestión anaerobia y que puede utilizarse como fertilizante (Campos & Flotats, 2004). Aun así, en muchas ocasiones, es necesaria su estabilización mediante compostaje

Actualmente se valorizan una gran variedad de residuos mediante digestión anaerobia, algunos con potencial de producción de metano más altos que otros (Lora Grando et al., 2017). Sobre todo, se encuentran buenos resultados en la codigestión (digestión de mezclas de residuos en distinta proporción) de residuos y en la digestión de grasas (Tabla1). En la Tabla 1 se pueden observar algunos datos de producción de biogás o metano de diferentes residuos orgánicos.

Tabla 1: Producción de biogás o metano en diferentes residuos orgánicos

| Residuo | Producción de biogás/metano | %CH ₄ | Referencia |
|--------------------------------|----------------------------------|------------------|--------------------------|
| Lodos | 322 ml CH ₄ /g SV | | (Silvestre et al., 2011) |
| FORM | 252,75 ml CH ₄ /g SV | | (Abad et al., 2019) |
| FORM | 382 ml CH ₄ /g SV | | (Ponsá et al., 2011) |
| FORM + AO | 699 ml CH ₄ /g SV | | (Ponsá et al., 2011) |
| FORM + Grasa animal | 508 ml CH ₄ /g SV | | (Ponsá et al., 2011) |
| FORM + Celulosa | 254 ml CH ₄ /g SV | | (Ponsá et al., 2011) |
| FORM + Proteína | 288 ml CH ₄ /g SV | | (Ponsá et al., 2011) |
| Aceite de colza | 800-900 ml CH ₄ /g SV | | (Hansen et al., 2004) |
| Deyecciones terneros | 220-300 ml biogás/ g SV | 55-60 | (Campos & Flotats, 2004) |
| Deyecciones vacas | 220-400 ml biogás/ g SV | 55-60 | (Campos & Flotats, 2004) |
| Deyecciones porcino engorde | 300-400 ml biogás/ g SV | 68-70 | (Campos & Flotats, 2004) |
| Deyecciones gallinas ponedoras | 350-450 ml biogás/ g SV | 65-70 | (Campos & Flotats, 2004) |

Aunque es un proceso muy implementado y bien conocido, los sistemas de digestión anaerobia pueden sufrir inestabilidad. Esta inestabilidad suele visualizarse a partir de la caída de la tasa de producción de metano, del pH y una subida de la

concentración de ácidos grasos volátiles (AGV). Posibles causas que pueden determinar el mal funcionamiento del proceso son: sobrecarga de alimento, subcarga de alimento, presencia de inhibidores y un control inadecuado de la temperatura (Lyberatos & Skiadas, 1999). La población microbiana es altamente dependiente del sustrato y la concentración del producto como también de factores ambientales como pH, temperatura, etc.

1.1.2. Etapas del proceso de digestión anaerobia

El proceso de digestión anaerobia consta de varias etapas que se diferencian por la degradación del sustrato y en las cuales intervienen diferentes microorganismos.

En la Figura 1 se puede visualizar un modelo más detallado del proceso de digestión anaerobia.

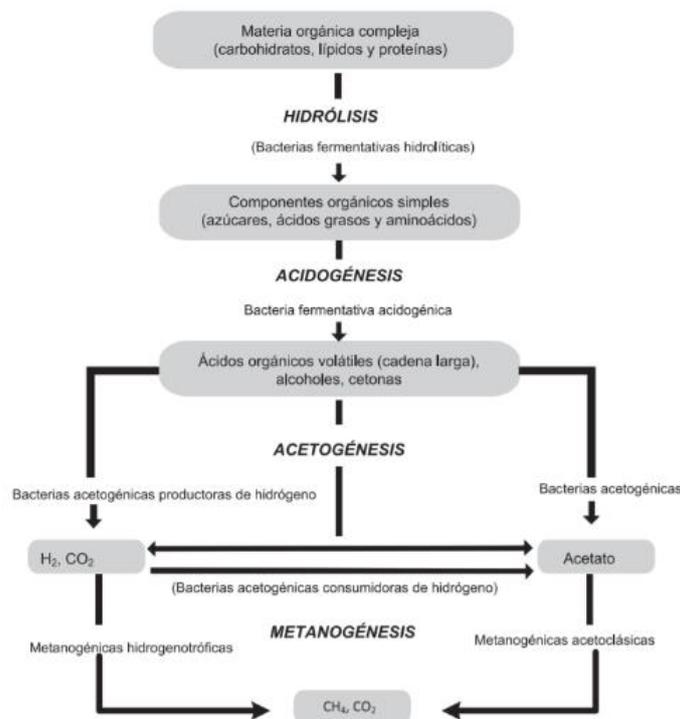


Figura 1: Esquema del proceso de digestión anaerobia. Fuente: (Parra, 2015)

En la primera etapa del proceso de digestión anaerobia las moléculas orgánicas complejas como carbohidratos, grasas y proteínas son biodegradadas, gracias a la acción de enzimas, en sus monómeros, moléculas solubles de menor tamaño, para poder ser utilizadas por los microorganismos como fuente de energía y nutrición (Parra, 2015). La velocidad de descomposición varía según la naturaleza del sustrato.

Posteriormente, en la etapa acidogénica, los monómeros son metabolizados por bacterias originando ácidos orgánicos volátiles como ácido butírico, propiónico y acético además de alcoholes. La acumulación de AGV puede causar un desequilibrio en las siguientes etapas debido a la bajada del pH.

En la etapa de acetogénesis los productos que no han sido directamente convertidos a metano por microorganismos metanogénicos, son convertidos en sustratos metanogénicos como ácido acético, hidrógeno o dióxido de carbono.

Por último, en la fase metanogénica, los microorganismos metanogénicos producen metano a partir de productos intermedios. La producción de metano en concreto se lleva a cabo por dos rutas distintas: la hidrogenotrófica, en la que se utiliza dióxido de carbono e hidrógeno gas como sustratos o la ruta acetoclástica que utiliza acetato como sustrato. Esta última es la ruta predominante.

1.1.3. Factores que influyen en el proceso de digestión anaerobia

Los factores ambientales juegan un gran papel en la evolución del proceso, por eso es necesario el estudio de éstos para un mayor entendimiento de los fenómenos que ocurren dentro del reactor y para una mejor interpretación.

Uno de los parámetros determinantes en el proceso es la temperatura. El proceso de digestión anaerobia puede llevarse a cabo en un rango mesofílico o rango termofílico. En el rango termofílico se consiguen tasas más rápidas de reacción que permite una mayor capacidad de carga y, por tanto, se consigue una mejor productividad. Aun así, trabajar en un rango termofílico implica un proceso más delicado, donde se puede

ocasionar acidificación inhibiendo la producción de biogás, una mayor toxicidad, susceptibilidad a las condiciones ambientales y conlleva una mayor inversión. Por otro lado, los sistemas mesofílicos tienen mejor estabilidad y una mayor riqueza microbiana, pero también se obtienen rendimientos de metano más bajos y una menor tasa de biodegradabilidad (Mao et al., 2015).

Por otro lado, están el pH y la alcalinidad. El rango de pH ideal para el proceso de digestión anaerobia es de 6,8-7,4, aunque para la metanogénesis el rango más eficiente es a un pH de 6,5-8,2 y su pH óptimo es 7 (Mao et al., 2015).

Además, la presencia de sustancias tóxicas o xenobióticos pueden alterar el proceso. Ciertas sustancias pueden causar inhibición de la actividad microbiana a una concentración dada. Aun así, su capacidad inhibitoria no siempre depende de la concentración del sustrato sino de factores ambientales como el pH, temperatura o la concentración de otras sustancias. Algunas de estas sustancias que pueden causar efectos tóxicos son los AGV, el amoníaco o el H₂S (Mata-Alvarez, 2003).

Los xenobióticos son sustancias que son liberadas por las actividades humanas y que pueden estar presentes en los residuos a valorizar. Algunos ejemplos son los solventes, alcoholes, ácidos orgánicos y otras sustancias inorgánicas presentes en residuos industriales.

Por último, como se ha nombrado anteriormente, los AGV, son compuestos intermedios de la descomposición de materia orgánica en condiciones anaeróbicas. Estos compuestos reducen el pH. El aumento de estos es indicativo de posibles problemas con la fase metanogénica.

1.1.4. Digestión anaerobia de grasas

Los residuos ricos en grasas se han convertido en materiales de gran interés para la digestión anaerobia por sus altos rendimientos de producción de biogás, 1425 ml/g y por su alto porcentaje en metano, 70% (Rasit et al., 2015).

Como se muestra en la Figura 1 la materia orgánica a tratar está mayoritariamente compuesta por lípidos, carbohidratos y proteínas. Cada uno de estos componentes es degradado de forma distinta en el proceso de digestión anaerobia. La degradación de las grasas comienza con la ruptura de los lípidos por bacterias hidrolíticas dando lugar a AGCL (ácidos grasos de cadena larga). Estas bacterias rompen el enlace químico y facilitan la solubilización de los AGCL y el glicerol. A continuación, los AGCL son degradados por la ruta β -oxidación donde estos se convierten en acetato e hidrógeno (Alves et al., 2009).

La alta biodegradabilidad de los lípidos se debe a la presencia de un catalizador producido por bacterias acidogénicas. Este catalizador se conoce como la enzima lipasa extracelular y se activa en la β -oxidación y da lugar a una alta biodegradación comparado con la biodegradación de los carbohidratos o proteínas (Sousa et al., 2009).

Se ha comprobado que la acumulación de AGCL en la fase hidrolítica es una de las principales causas de inhibición de la metanogénesis en la digestión de residuos con elevado contenido en grasas. Esta acumulación puede deberse a una menor transferencia de masa que se origina por la dificultad de transporte y solubilización de las grasas (Rasit et al., 2015).

1.2. Biosurfactantes

Los surfactantes son moléculas anfipáticas que reducen la tensión superficial entre dos fases (aire-líquido, líquido-líquido, sólido-líquido) (Maeng et al., 2018). Esto reduce las fuerzas repulsivas entre distintas fases y permite que se mezclen y que los compuestos que se encuentren en ellas reaccionen más fácilmente al aumentar el contacto entre fases. Los surfactantes normalmente están producidos a partir de derivados del petróleo, a través de procedimientos que generan efluentes contaminantes. Cuando estas sustancias acaban en la naturaleza tras su uso, tienen un impacto negativo en los sistemas acuáticos debido a su alta toxicidad y baja tasa de biodegradación (Knepper et al., 2003).

Estas moléculas actúan como detergentes, agentes humectantes, agentes espumantes, emulsionantes y dispersantes por lo que son utilizados en una gran variedad de sectores como el de la cosmética, textiles, industria alimentaria, papelera y farmacéutica (Van Renterghem et al., 2018).

Se ha demostrado que los surfactantes pueden mejorar el rendimiento de la digestión anaerobia. Por ejemplo, la adición de Tween 80 (un surfactante de uso común) a la digestión anaerobia de suero de queso, gallinaza y estiércol de vaca aumentó el contenido de metano de un 62% del control (sin surfactante) a un 70% en el digester con surfactante. Por otro lado, se ha visto que altas dosis de surfactantes pueden inhibir la producción de metano (Hassan & Nelson, 2012).

Los biosurfactantes, en cambio, son surfactantes producidos por microorganismos, en los que se incluye bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Se presentan como una alternativa adecuada a los surfactantes obtenidos por vía química debido a las siguientes razones (Mukherjee et al., 2006):

1. Son producidos por fermentación preferentemente con materias primas baratas o materiales residuales como sustratos.
2. Muestran mejores propiedades espumantes y su actividad es estable a valores extremos de pH, salinidad y temperatura.
3. Son fácilmente biodegradables y tienen una toxicidad baja por lo que son más favorables medioambientalmente hablando.

Sin embargo, su uso no está muy extendido todavía, por su poca disponibilidad y coste elevado de producción. Actualmente, solo una pequeña fracción de biosurfactantes han sido caracterizados y los procesos de producción y extracción siguen investigándose. Los biosurfactantes se pueden clasificar en biosurfactantes de bajo peso molecular compuestos por glicolípidos u oligopéptidos y de alto peso molecular. Entre los de bajo peso molecular destacan los soforolípidos (SLs) (Jiménez-Peñalver et al., 2019).

1.2.1. Soforolípidos

Los SLs son biosurfactantes de tipo glicolípido producidos por microorganismos que constituyen una alternativa amigable a los surfactantes producidos químicamente. Además, han demostrado tener una baja citotoxicidad y son considerados compuestos fácilmente biodegradables (Jiménez-Peñalver et al., 2018). Son uno de los biosurfactantes más viables dando altos rendimientos ($>400\text{g L}^{-1}$) y una conversión de sustrato del 70% y, además, son producidos por una levadura no patogénica. La especie más estudiada y eficiente es *Starmerella bombicola* (Jiménez-Peñalver et al., 2020). Esta levadura necesita para sintetizar el soforolípido dos tipos de fuentes de carbono, una hidrofílica y otra hidrofóbica. Para la producción de SLs por FES se usa glucosa como la fuente de carbono hidrofílica y una fuente con un alto contenido de ácido oleico como la fuente de carbono hidrofóbica (Jiménez-Peñalver et al., 2016). Su producción se puede llevar a cabo por fermentación sumergida (FS) o por fermentación en estado sólido (FES). La FES muestra ventajas sobre la FS ya que se pueden utilizar sustratos sólidos hidrofóbicos, no cuenta con problemas de viscosidad o presencia de espuma y presenta una mejor transferencia de oxígeno y menos requerimientos de agua, aun así, hay menos biorreactores comerciales disponible y las herramientas de seguimiento de la fermentación pueden ser imprecisas (Jiménez-Peñalver et al., 2019).

Los soforolípidos se han utilizado para mejorar la digestión anaerobia en diferentes ocasiones. En el trabajo de Xu et al. (2019) se utilizaron los soforolípidos para aumentar la producción de ácidos grasos de cadena corta en la fermentación anaerobia de lodos activados. A partir de la investigación se observó que los soforolípidos aceleraban la biodegradabilidad de las moléculas orgánicas complejas lo que aumentó el sustrato biodegradable necesario para la producción de ácidos grasos de cadena corta (Figura 2).

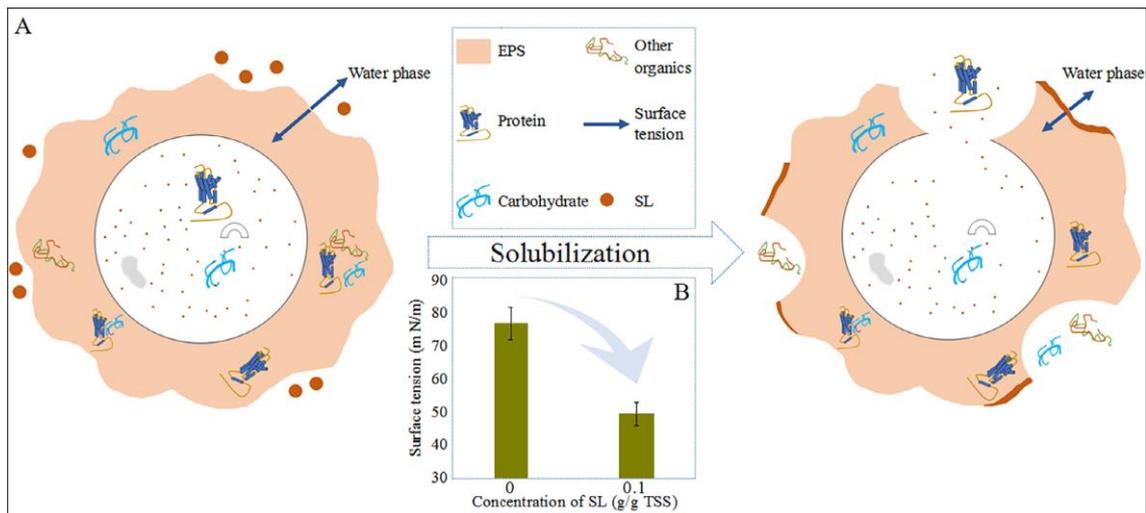


Figura 2: Diagrama esquemático de la interacción entre materia orgánica hidrofóbica, moléculas de agua y SL y las variaciones de tensión superficial: Fuente: (Xu et al., 2019)

En el trabajo de Xu et al. (2021) se propuso un pretratamiento con ramnolípidos, un biosurfactante de tipo glicolípido, para la promoción de producción de metano en una digestión anaerobia de dos fases del residuo de lodos activados. La adición de este biosurfactante mejoró la hidrólisis y la acidogénesis en la primera fase proveyendo de más sustrato para la metanogénesis y aumentando la producción de metano en la segunda fase.

1.3. Residuos orgánicos utilizados para la síntesis de SLs por FES

La producción de biosurfactantes, y en este caso, de SLs, se lleva a cabo a partir del proceso de FES donde se requiere, como se ha comentado anteriormente, una molécula de tipo glucosa como la fuente de carbono hidrofílica y una fuente con un alto contenido de ácido oleico como fuente de carbono hidrofóbica. Los residuos expuestos a continuación son materiales residuales de posible valorización por esta vía.

1.3.1. Residuo de winterización de aceite de girasol

En la extracción del aceite de girasol algunos compuestos son eliminados para mejorar la calidad y estabilidad de los aceites comestibles. Uno de estos compuestos son las ceras. Se eliminan dado que tienden a cristalizar a temperatura ambiente causando turbidez en aceites refinados. Una de las técnicas para su separación es el proceso de winterización que consiste en una cristalización y separación por filtros. Para empezar, el aceite se enfría mediante agitación mecánica para provocar la cristalización de las ceras y después se separan los cristales del aceite por filtración (Schneiter et al., 1997). El residuo que queda en el filtro se considera un residuo industrial y se llama residuo de winterización de aceite de girasol o “torta”, WOC por sus siglas en inglés, *winterization oil cake*. Este residuo proveniente del filtrado contiene un 50-60% de contenido en grasa además de ceras (Chalapud et al., 2017).

A partir de este producto, se puede recuperar el aceite y las ceras para posteriores aplicaciones en diversas industrias de las fracciones por separado (Chalapud et al., 2017) aunque también se ha utilizado en la producción de soforolípidos (Jiménez-Peñalver et al., 2016) o en la producción de biogás (Torrijos et al., 2012).

En España la producción de aceite de girasol es minoritaria a la del aceite de oliva, 63.964 toneladas frente a 961.955 toneladas anuales, respectivamente (INE, 2020). Aun así, su producción es considerable, al igual que los residuos que se producen en su extracción. En 2019, la producción de tortas y otros residuos sólidos del proceso de producción del aceite de girasol fue de 67.685 toneladas (INE, 2019) siendo éste un producto interesante en cuanto a la valorización de su fracción orgánica.

1.3.2. Melaza de remolacha azucarera

La remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) es comúnmente utilizada para la obtención de azúcar. La extracción de azúcar se lleva a cabo mediante una serie de procesos en los que, para empezar, se extrae el azúcar con agua caliente formando un producto líquido

(jugo) que después es purificado con cal para eliminar las sustancias no azucaradas. A continuación, se somete al jugo purificado a una evaporación para espesarlo y, por último, a una cristalización del azúcar. Para ser considerado azúcar comercial, los cristales se hacen pasar por un centrifuga y finalmente son secados. El azúcar que no ha sido cristalizado se mantiene en forma de miel y a ésta se la denomina melaza. Este subproducto se utiliza para la producción de alcohol etílico, ácido cítrico o como medio de cultivo en fermentaciones (Campbell, 2002) y solo en 2019, las toneladas de melaza de remolacha producidas en España ascendieron a 106.207 (INE, 2020).

1.3.3. Paja de trigo

La paja de trigo es un subproducto agrícola que se obtiene de diferentes partes de la planta de trigo como el tallo o las hojas. La paja se utiliza normalmente como alimento o cama para animales, aun así, su alto contenido en fibras celulósicas la convierte en sustrato de gran interés para el cultivo microbiano en aplicaciones como procesos de fermentación, piensos, industria de la medicina o para el aumento de la fertilidad del suelo. En la industria de la fermentación se puede utilizar como sustrato para la producción de enzimas hidrolíticas, medicamento, biocombustibles u otros compuestos (Khan & Mubeen, 2012).

A partir de estos tres residuos se puede llevar a cabo la producción de soforolípidos. Esto ha sido probado en reactores de 0,5 L por Jiménez-Peñalver et al. (2016) y más adelante, a volúmenes mayores, de 22L y 100L, por Rodríguez et al. (2021).

Son diferentes los usos que se le pueden dar a los soforolípidos, aunque un uso posible de ellos es la mejora del proceso de digestión anaerobia.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es analizar el efecto de los soforolípidos en el proceso de digestión anaerobia de grasas.

Para alcanzar este objetivo se establecen los siguientes objetivos parciales:

- Determinar el potencial de producción de biogás y su concentración de metano utilizando grasa como sustrato.
- Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de soforolípidos en el desarrollo del proceso de digestión anaerobia de grasas.
- Contrastar el potencial de producción de biogás y su concentración de metano entre una grasa pura y una grasa residual.
- Comprobar el potencial de producción de metano del WOC en el proceso de digestión anaerobia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El capítulo se divide en 3 secciones: una se dedica a la producción de soforolípidos que posteriormente se utilizarán en los ensayos de producción de biogás, la siguiente dedicada a las pruebas de producción de biogás y una última que recoge los métodos analíticos comunes.

3.1. Producción de soforolípidos

Los soforolípidos fueron producidos en reactores de 22L de capacidad a partir de la fermentación en estado sólido de un peso total de 3kg de sustrato que incluye una mezcla de 0,619 kg paja, 1,012 de WOC y 0,253 kg melaza (Rodríguez et al., 2021). El WOC proviene de la empresa Lípidos Santiga, S.A (Barcelona, España), la melaza de AB Azucarera Iberia S.L.U. (Madrid, España) y la paja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Además, se añade el inóculo de *Starmerella Bombicola*. *Starmerella bombicola* ATCC 22214 proviene de la “American Type Culture Collection” (Manassas, Estados Unidos). Para su reactivación, la cepa es sembrada en placas de agar que contienen: 5 g/l de peptona, 3 g/l de extracto de malta, 3g/l de extracto de levadura y 20 g/l de agar durante 48h a 30°C. Posteriormente el inóculo que ha crecido se añade a matraces Erlenmeyer de un litro con 200 ml de un medio de cultivo que contiene: 10 g/l de glucosa, 5g/l de peptona, 3g/l de extracto de malta y 3g/l de extracto de levadura. Estos matraces son incubados en un agitador durante 48h a 30°C y 180 rpm.

Dado que se quiere producir un biosurfactante, un compuesto anfipático, se necesita un extremo hidrofílico, que en este caso es la melaza y un extremo hidrofóbico, que en este caso es el WOC. La paja sirve como soporte de la mezcla a la que da estructura permitiendo una correcta distribución del aire en el reactor.

Una vez se preparada la mezcla, se esteriliza en autoclave dos veces durante 1,5h a 121°C. Al día siguiente se le inocula el microorganismo y por último se introduce en el reactor donde se lleva a cabo el proceso de FES. El FES tuvo una duración de 4 días.

El reactor que se utilizó tiene una capacidad de 22 l. Es un reactor cilíndrico de acero inoxidable (70 cm de altura x 30 cm de diámetro) y funciona de forma discontinua, con aporte de aire de 1200 ml min⁻¹ y con seguimiento del consumo de oxígeno para el cálculo del consumo específico de oxígeno, OUR. Este índice muestra la tasa de respiración del sustrato y se calcula a partir de la ecuación 1.

$$\text{OUR} = \frac{(\text{O}_2 \text{ inicial} - \text{O}_2 \text{ consumido}) \times F \times 31,98 \times 60}{22,4 \times \text{MS}} \quad (1)$$

El OUR es expresa como mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹; (O₂ inicial - O₂ consumido) es la diferencia entre el contenido de oxígeno del flujo de aire a la entrada y a la salida del reactor a un tiempo en concreto; F es el flujo de aire volumétrico medido en condiciones normales (1 atm y 273K) en ml min⁻¹; 31,98 es el peso molecular del oxígeno en g mol⁻¹; 60 es el factor de conversión minutos/horas; 22,4 es el volumen ocupado por un mol de gas ideal bajo condiciones normales en L y MS es la materia seca de la muestra introducida al reactor en g.

Antes de introducir todo del sustrato en el reactor se separó una fracción para realizar su caracterización mediante el análisis de diferentes parámetros como los sólidos totales, sólidos volátiles, pH y para la extracción de soforolípidos iniciales. En la Tabla 2 se resumen los valores de estos parámetros

Tabla 2: Resultados de ST, SV y pH del sustrato inicial.

| Parámetros | Sustrato inicial |
|--------------------------|------------------|
| Sólidos totales (%) | 50,46 ± 0,79 |
| Sólidos volátiles (%sms) | 82,39 ± 2,99 |
| pH | 5,47 |

3.2. Producción de biogás

Para cuantificar el potencial de producción de biogás de un residuo y la composición de este biogás se han utilizado los ensayos conocidos como BMP, de biodegradabilidad metanogénica o de potencial bioquímico de producción biogás. En estos ensayos se introduce un peso conocido de inóculo y muestra a analizar en un recipiente cerrado y con un espacio libre de cabeza constante. A partir de aquí, se va midiendo la presión en el recipiente a distintos tiempos y se extrae muestra para determinar la composición del biogás (Angelidaki et al., 2009). En este caso, los ensayos se llevaron a cabo en botellas de 250 ml y se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37°C. Además, se añaden pruebas con solo inóculo o “blanco” para poder cuantificar también la actividad del inóculo y de inóculo con celulosa para la comparación de resultados. (Ponsá et al., 2011).

El RIS (ratio inóculo sustrato) es un parámetro clave en los ensayos BMP. Es recomendado que la proporción de sólidos volátiles aportada por el inóculo sea mayor que la del sustrato para minimizar acidificación o inhibición. Los RSI basados en los sólidos volátiles se recomiendan que estén entre 2 y 4 (Holliger et al., 2016). En este caso se utilizó un RSI de 2:1.

El inóculo a utilizar debe ser fresco y venir de un reactor anaerobio (Angelidaki et al., 2009). En este caso el inóculo utilizado es de la Estación Depuradora de Aguas Residuales Urbanas Riu Sec, en Sabadell. Además, el inóculo debe ser desgasificado para disminuir el material orgánico biodegradable presente. Este acondicionamiento ha de llevarse a cabo a la misma temperatura que la temperatura del proceso originario y este proceso debería durar hasta que no se produzca metano, o sea, de 2 a 5 días de incubación (Angelidaki et al., 2009). El inóculo se dejó por tanto durante 4 días a una temperatura de 37°C. En la Tabla 3 se recogen las características del inóculo utilizado.

Tabla 3: Resultados de ST, SV, pH y DA del inóculo a utilizar.

| Parámetros | Inóculo |
|--------------------------------|---------|
| Sólidos totales (g de ST/ml) | 0,0286 |
| Sólidos volátiles (g de SV/ml) | 0,0190 |
| pH | 7,96 |

3.2.1. Ensayos BMP con grasa pura: Experimento 1

En el Experimento 1 se llevan a cabo los ensayos de BMP con una grasa pura. En este caso se utilizó aceite de oliva puro (AO). Se prepararon 22 recipientes de 250 ml de capacidad total dejando 150ml de espacio de cabeza en cada una de las botellas, introduciendo por tanto 100 ml totales de mezcla. Se eligió una relación inóculo-sustrato de 2:1 y de ahí se obtuvieron los pesos de celulosa y grasa a añadir (Tabla 4). El volumen de aceite se calculó utilizando una densidad de 0,916 (FAO, 1981).

Tabla 4: Peso del inóculo y la celulosa y volumen de la grasa a introducir en las diferentes pruebas BM

| Inóculo (g) | Sustrato | | |
|-------------|--------------|-----------|------------|
| | Celulosa (g) | Grasa (g) | Grasa (ml) |
| 1,52 | 0,76 | 0,76 | 1,2 |

En cada una de las botellas se introdujo lo indicado en la Tabla 5 según cada una de las muestras a analizar. Todas las pruebas se realizaron por triplicado (los casos de inóculo e inóculo más celulosa) o cuadruplicado (para los casos con AO, con o sin SL). De esta forma los resultados pueden ser expresados como una media con desviación estándar.

Tabla 5: Valores de los pesos a introducir en las botellas del Experimento 1

| Muestra | Réplicas | Inóculo (ml) | Celulosa (g) | Aceite (ml) | SLs (g) | Agua (ml) |
|---------|----------|--------------|--------------|-------------|---------|-----------|
|---------|----------|--------------|--------------|-------------|---------|-----------|

| | | | | | | |
|-----------------------|---|----|------|-----|------|------|
| Inóculo | 3 | 80 | | | | 20 |
| Inóculo + celulosa | 3 | 80 | 0,76 | | | 20 |
| Inóculo + grasa | 4 | 80 | | 1,2 | | 18,8 |
| Inóculo + grasa + SLs | 4 | 80 | | 1,2 | 0,14 | 18,8 |
| | 4 | 80 | | 1,2 | 0,28 | 18,8 |
| | 4 | 80 | | 1,2 | 0,55 | 18,8 |

3.2.2. Ensayos BMP con grasa residual: Experimento 2

En el Experimento 2 se siguió el mismo proceso que en el Experimento 1, pero se cambió la grasa pura por una grasa residual, el residuo de winterización de la producción de aceite (WOC). La relación inóculo sustrato se mantuvo en 2:1 en sólidos volátiles. En la Tabla 6 se muestran los resultados de sólidos totales y sólidos volátiles del WOC.

Tabla 6: Resultados de ST y SV del WOC.

| Parámetros | WOC |
|--------------------------|-------------|
| Sólidos totales (%) | 84,4 ± 0,50 |
| Sólidos volátiles (%sms) | 44,0 ± 0,64 |

A partir de los resultados de sólidos volátiles del WOC (Tabla 6) se obtuvo el peso del WOC necesario para los ensayos BMP (Tabla 7).

Tabla 7: Peso del inóculo, celulosa y WOC a introducir

| Inóculo (g) | Sustrato | |
|-------------|--------------|---------|
| | Celulosa (g) | WOC (g) |
| 1,52 | 0,76 | 1,73 |

A continuación, en cada una de las botellas se introdujo lo indicado para cada una de las muestras (Tabla 8).

Tabla 8: Valores de los pesos a introducir en las botellas del experimento 2

| Muestra | Réplicas | Inóculo (ml) | Celulosa (g) | WOC (g) | SLs (g) |
|---------------------|----------|--------------|--------------|---------|---------|
| Inóculo | 3 | 80 | | | |
| Inóculo + celulosa | 3 | 80 | 0,76 | | |
| Inóculo + WOC | 4 | 80 | | 1,73 | |
| Inóculo + WOC + SLs | 4 | 80 | | 1,73 | 0,14 |
| | 4 | 80 | | 1,73 | 0,28 |
| | 4 | 80 | | 1,73 | 0,55 |

3.3. Métodos analíticos utilizados

3.3.1. Producción de soforolípidos

- pH

Para la medición del pH se realiza una medición del extracto de la matriz sólida. Para la obtención del extracto, se pesan 5g de muestra y se le añade 25 ml de agua destilada. Se agita a 200 rpm durante 30 minutos en una incubadora a temperatura ambiente.

- Humedad, sólidos totales, sólidos volátiles

Para el cálculo de estos parámetros se utiliza el método de desecación. A continuación, se detallan los pasos:

- Pesar en una balanza de precisión, de tres decimales, tres cápsulas metálicas o cerámicas (crisol) y apuntar el peso de cada una. Este peso se denominará P_{crisol} .
- Añadir a cada cápsula 20 g de muestra. El peso del crisol más la muestra se denominará P_{inicial} .
- Introducir las cápsulas en una estufa a 105 °C durante 24h. A continuación, volver a pesar y el valor obtenido se denominará P_{final} .
- Se calcula el porcentaje de humedad mediante la ecuación 2 y los sólidos totales mediante la ecuación 3.

$$\%H = \frac{P_{inicial} - P_{final}}{P_{inicial} - P_{crisol}} \times 100 \quad (2)$$

$$\%ST = 100 - \%H \quad (3)$$

Para los sólidos volátiles:

- Pesar de nuevo, en la balanza de precisión, tres cápsulas y apuntar el peso de cada una. Este peso se denominará Pcrisol.
- Pesar 2 g de muestra desecada en cada crisol. El peso del crisol más la muestra se llama Pinicial.
- Introducir las cápsulas en la mulfa a 550°C durante 2 horas. Finalizado el proceso, dejar secar y enfriar en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. A continuación, volver a pesar y el valor obtenido se denominará Pcenizas.
- A partir de la ecuación 4 se calculan los sólidos volátiles

$$\%SV = \frac{P_{inicial} - P_{cenizas}}{P_{inicial} - P_{crisol}} \times 100 \quad (4)$$

- Extracción de soforolípidos

Esa extracción se realiza sobre el material obtenido al final del proceso de fermentación en estado sólido o sobre muestras intermedias si se desea monitorizar la evolución del proceso de FES. Se sigue el procedimiento que se detalla a continuación:

- I. Triturar muestra húmeda. Pesar muestra húmeda en una relación 1:10 con el acetato de etilo. En este caso se elige 20 g.
- II. Poner muestra pesada en un matraz y añadir 200 ml de acetato de etilo. Tapar con Parafilm y poner en la incubadora a 25°C a 200rpm durante 1 hora. Pasada la hora, filtrar para separar el líquido del matraz y añadir otros 200 ml. Poner de nuevo en la incubadora durante 1 hora.

- III. Una vez pasada la hora, mezclar las dos fracciones líquidas en un mismo matraz, agitar y añadir una cucharada de sulfato de sodio. Agitar de nuevo unos 10 segundos.
- IV. Filtrar la muestra con un papel filtrante Wallmann 1.
- V. Colocar muestra en el rotaevaporador a 40°C con una agitación de 20rpm.
- VI. Una vez se ha evaporado el acetato de etilo, retirar del rotaevaporador y poner 40 ml de n-hexano. Cuando el sofrolípido se ha fijado desechar el líquido. Dejar que se evapore el n-hexano restante.

3.3.2. Producción de biogás

- Caracterización del biogás

Para la caracterización del biogás se utiliza un cromatógrafo de gases, modelo CG 5890 Emp. Éste utiliza helio como gas portador a una presión de 4 bares. Para el método utilizado en la medición de dióxido de carbono y metano se necesita un volumen de muestra de 100 µl de biogás extraído con una jeringa Vici. El análisis tiene una duración de 3 minutos y requiere de una temperatura de horno de 70°C, sin rampa de temperatura.

- Volumen de metano

Para calcular el volumen de metano producido se utiliza la ecuación 5.

$$\frac{(P \times \%CH_4) \times V_{ca}}{P_{atm}} \quad (5)$$

P : Presión de la botella, medida en bares

V_{ca}: Volumen de espacio vacío de la botella, expresado en ml.

%CH₄: Porcentaje de metano en el total del biogás

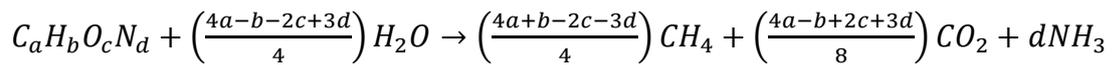
P_{atm}: Presión atmosférica, medida en bares

- Volumen de biogás

Para calcular el biogás producido se suman los valores de los volúmenes de CH₄ y CO₂, medidos utilizando el método anterior.

- Potencial máximo de producción de metano

Para el cálculo del volumen teórico de metano a producir se utiliza la Formula de Bushwell (1952):



- Modelización de la producción de metano (Modelo Gompertz)

El modelo Gompertz se utiliza para simular la generación de biogás y metano. La ecuación por cual se crea la curva del modelo es la siguiente:

$$B = \beta \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m \cdot e}{\beta} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (6)$$

Donde B representa la producción acumulativa de metano simulado (ml CH₄ g⁻¹ SV); β hace referencia a la producción máxima acumulada de metano simulado (ml g⁻¹ SV); μ_m, representa la tasa máxima de producción de metano (ml CH₄ g⁻¹ SV d⁻¹); e equivale a 2,718; λ se refiere a la fase de latencia (día) y t es el tiempo de digestión (día)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de soforolípidos por fermentación en estado sólido

El proceso de producción de SLs se llevó a cabo por FES en un periodo de duración de 4 días. En la Tabla 9 se pueden observar los valores al inicio y final de la fermentación ST, SV y pH.

Tabla 9: Valores de los ST, SV, pH, la concentración de SL y pH de SL al principio y al final

| Parámetros | Sustrato inicial (Día 1) | Sustrato final (Día 4) |
|-------------------------|--------------------------|------------------------|
| Sólidos totales (%) | 50,46 ± 0,79 | 48,87 ± 0,13 |
| Sólidos volátiles (%) | 82,39 ± 2,99 | 83,34 ± 0,73 |
| pH | 5,47 | 4,18 |
| g SL g ⁻¹ MS | 1,1 × 10 ⁻⁶ | 0,077 ± 0,006 |
| pH SL | | 2,56 |

Como se observa en la Tabla 9, para un período de 4 días, se alcanzó un valor medio de concentración de SL de 0,077 g SL g⁻¹ MS. Este valor es más bajo comparado con los resultados obtenidos por Rodríguez et al. (2021) que muestran una producción de 0,026 g SL g⁻¹ MS d⁻¹. En el actual trabajo, al tratarse de un proceso de 4 días de duración, se debería haber alcanzado aproximadamente, unos 0,104 g SL g⁻¹ MS.

En la Figura 3 se presenta la evolución del contenido de oxígeno en el aire a la salida del reactor (en naranja) y del OUR (en azul). Se observa una alta OUR (Rodríguez et al., 2021) y un descenso en el nivel de O₂ que demuestra una alta actividad microbiana.

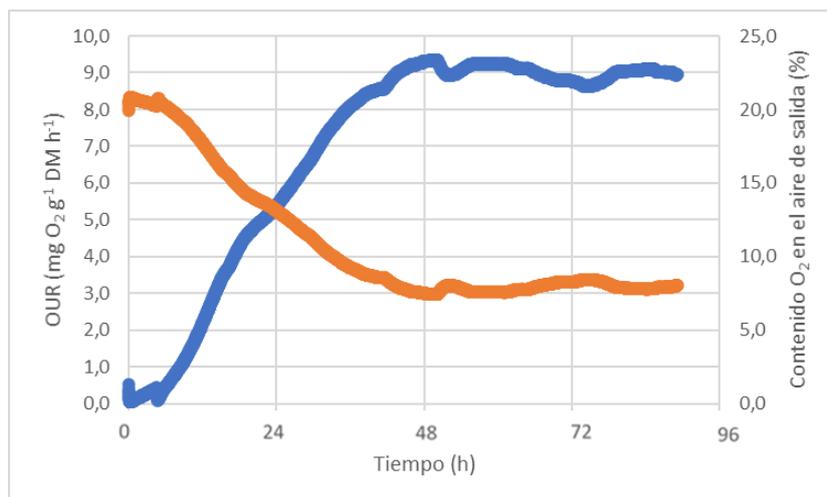


Figura 3: Perfil respirométrico de la FES de la mezcla de paja, WOC y melaza

4.2. Evolución de la producción de biogás y metano en la digestión anaerobia de grasa pura (Experimento 1)

En el Experimento 1 se llevaron a cabo ensayos BMP de celulosa, AO y AO con diferentes cantidades de SL (0,14, 0,28 y 0,55g). Las 3 dosis de SL fueron elegidas a partir de las utilizados por Zhou et al. (2015). A partir de los resultados, se podrá establecer qué efecto tiene la concentración de SL en la producción de metano en la digestión de grasa. Para empezar, se comentarán las diferencias en el contenido de metano y después se discutirá la producción de metano de las muestras del Experimento 1.

En la Tabla 10 y en la Figura 4 se muestra la producción de biogás y metano al final de un proceso de digestión anaerobia de 40 días. Normalmente los ensayos de BMP de lodos o FORM tienen una duración de 21 días, pero al tratar grasas, sustratos más complejos y con una degradación más lenta, se requieren mayores tiempos.

El porcentaje de metano en el biogás producido en las pruebas con en el AO es del 62%, un porcentaje menor al que se esperaría de un compuesto graso que suelen obtener porcentajes de hasta 70% (Rasit et al., 2015). La muestra de AO y SL con un peso de 0,14g muestra un porcentaje mayor al del AO mientras que las muestras de SL con 0,28 y 0,55 g tienen porcentajes menores por lo que se puede decir que el porcentaje de metano en el biogás disminuye a medida que aumenta el peso de SL.

Tabla 10: Producción final de biogás y metano, con el inóculo restado, de las 5 muestras del Experimento 1

| | Celulosa | AO | SL (0,14) | SL (0,28) | SL (0,55) |
|--|----------|-------|-----------|-----------|-----------|
| Biogás (ml g ⁻¹ SV) | 230,1 | 407,3 | 2064,4 | 1161,7 | 896,9 |
| Metano (ml CH ₄ g ⁻¹ SV) | 128,0 | 250,5 | 1328,0 | 668,3 | 341,3 |
| % CH ₄ | 56% | 62% | 64% | 58% | 38% |

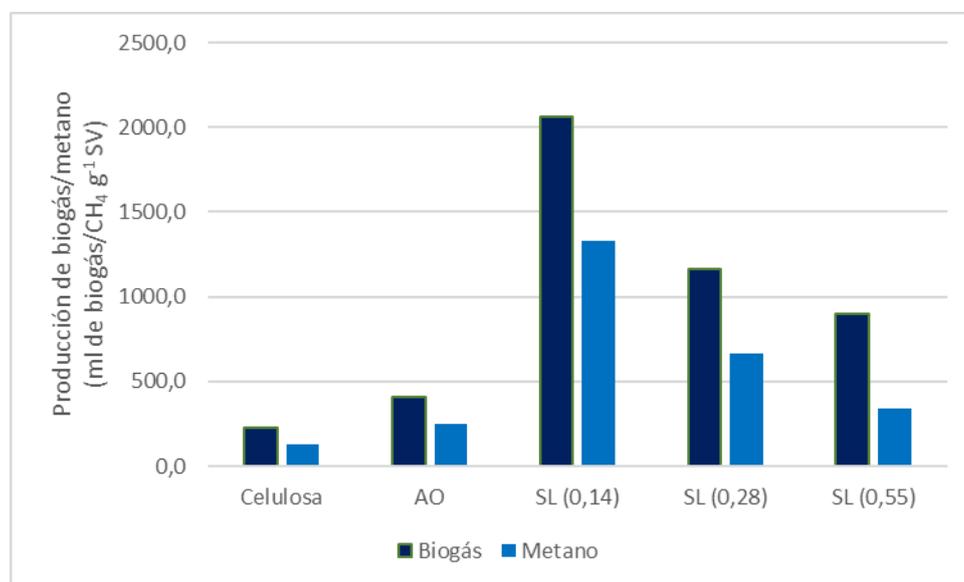


Figura 4: Producción de biogás y su contenido en metano, con el inóculo restado, de las 5 muestras del Experimento 1

En la Figura 5 se observa el volumen acumulado de metano producido en las pruebas que contenían celulosa y en las que contenían AO. El valor se da referido a los sólidos volátiles que inicialmente tenía la muestra y con el volumen acumulado del metano producido por el inóculo restado en un periodo de 40 días. Al restar la producción de metano del inóculo se puede saber el potencial real de producción de metano de los sustratos. En la Figura 5 se puede observar que el potencial de producción de metano es mayor en el AO que en la celulosa, el AO consigue una producción de metano final de 250 ml CH₄ g⁻¹ SV mientras que la celulosa consigue un valor de 128 ml CH₄ g⁻¹ SV. No se han encontrado resultados de producción de metano únicamente de AO, pero sí de aceite de colza y su producción alcanza los 800-900 ml CH₄ g⁻¹ SV a los 50 días (Hansen et al., 2004). Además, según el cálculo teórico de la producción de metano de AO calculada mediante la ecuación de Buswell, éste debería producir 1000 ml CH₄ g⁻¹ SV por lo que se esperaba un resultado mucho mayor.

La celulosa, en este caso, se utiliza como control, para así comprobar la calidad del inóculo y su actividad. En el Experimento 1 los resultados finales de producción de metano de la celulosa fueron de 128 ml CH₄ g⁻¹ SV. Según los resultados de Hansen et al. (2004), la celulosa alcanzó los 379 ml CH₄ g⁻¹ SV a los 50 días y según el cálculo teórico serían 371 ml CH₄ g⁻¹ SV por lo que está muy por debajo de lo esperado. Los bajos valores para la celulosa y el AO podrían deberse a una baja actividad del inóculo introducido.

Por otro lado, la evolución en la producción de biogás que siguen estos dos sustratos es parecida a la presentada por Ponsá et al. (2011). En ambos casos, a los 11 días, se muestra un incremento acentuado en la producción de metano del aceite vegetal mientras que la de la celulosa empieza a descender hasta estabilizarse.

Otro aspecto que destacar es el error del ensayo, principalmente para de AO. La Figura 5 muestra una desviación de 157,7 ml CH₄ g⁻¹ SV en el resultado final de producción de metano, o sea, un error de 63%. En el cuadruplicado llevado a cabo se consigue un máximo de producción de metano de 432,6 ml CH₄ g⁻¹ SV, valor que se acerca a lo esperado por el AO pero que sigue siendo menor al esperado. Según Hansen et al. (2004), en la degradación de grasas puede ocurrir inhibición de la metanogénesis por la acumulación de productos intermedios y esta inhibición puede resultar en una producción de metano muy variable entre los triplicados.

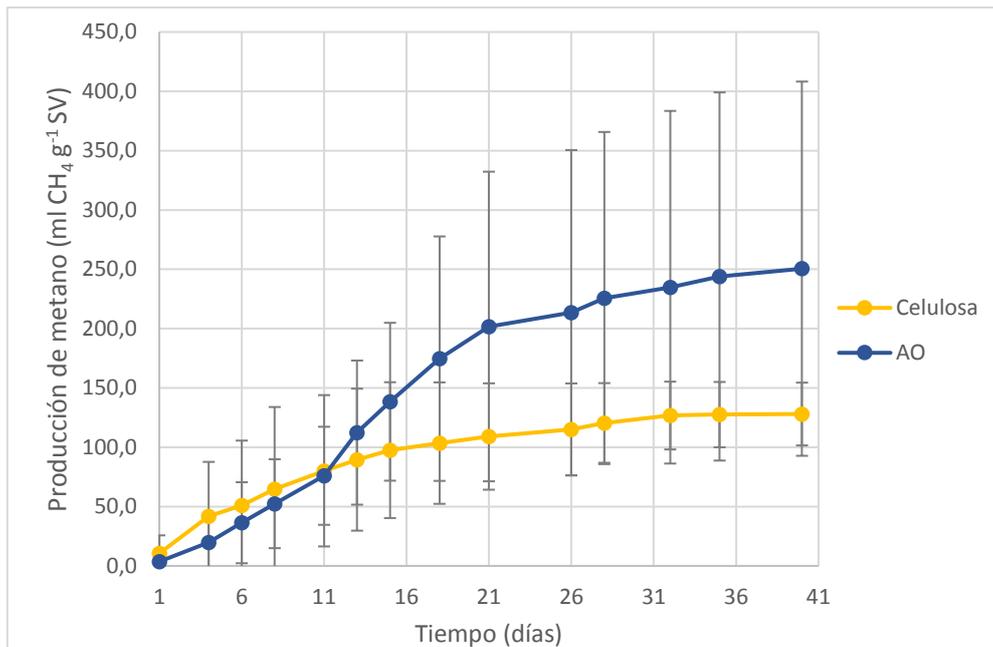


Figura 5: Volumen acumulado de metano de la celulosa y el AO, por gramo de sólidos volátiles, con el inóculo restado, en el Experimento 1

En la Figura 6 se observa el potencial de producción de metano del AO y del AO con diferentes cantidades de SL. La adición de SL muestra mejoras en el potencial de producción del metano, aunque éste disminuye a medida que aumenta la cantidad del SL añadido. Por tanto, el mejor resultado se obtiene añadiendo a 80 ml de inóculo, 0,76g de AO y 0,14g de SL, con una producción de metano de 1328 ml CH₄ g⁻¹ SV, cinco veces mayor a la obtenida con solo AO. Un menor potencial de producción de metano para las pruebas donde se añadieron 0,28 y 0,55 g de SL puede deberse a una inhibición de la metanogénesis de los SLs que además se confirma con los bajos porcentajes de metano del biogás, de 58% y 38%, respectivamente (Tabla 10). Aun así, el volumen acumulado de metano es siempre mayor para las pruebas con SL que para el caso de solo AO. Según Xu et al. (2019) la adición de SLs puede afectar a la degradación. Con una presencia de 0,1 g de SL/g ST la tasa específica de degradación del acetato, disminuyó y reprimió la actividad de los metanógenos en un 53,1%. Esta inhibición en la actividad de los metanógenos se puede deber a una reducción del pH causada por la adición de los SLs. Los microorganismos metanógenos son sensibles al pH y su pH óptimo es alrededor de 7 (Mao et al., 2015). En el caso de Xu et al. (2019) en el reactor en el que introdujo SLs el pH se redujo de 6,8 a 6. Como se muestra en la Tabla 9, el pH de los SLs es de 2,56 por lo que podría haber afectado al pH del proceso, aunque no se tienen datos del pH de las muestras finales. Así pues, la adición de una cierta cantidad de SL al AO parece favorable para el aumento del potencial de producción de metano.

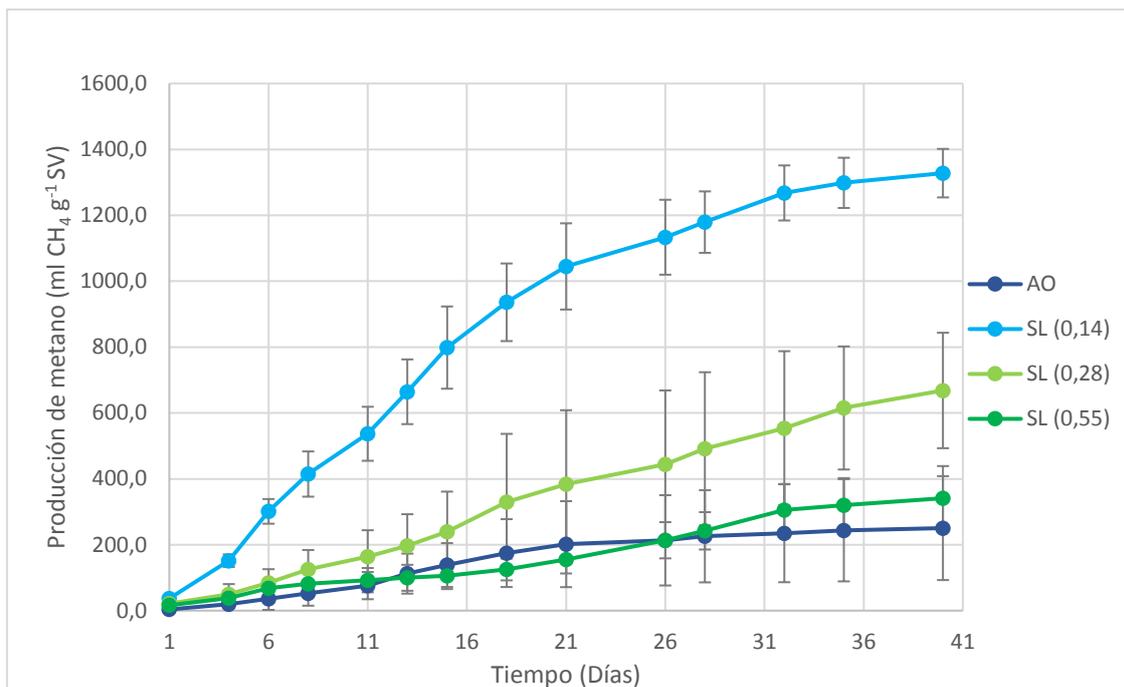


Figura 6: Volumen acumulado de metano del AO y AO con diferentes pesos de SL, por gramo de sólidos volátiles, con el inóculo restado, en el Experimento 1

4.3. Evolución de la producción de biogás y metano en la digestión anaerobia de grasa residual (Experimento 2)

En el Experimento 2 se repitió el mismo procedimiento que en el Experimento 1 pero en vez de probar los diferentes pesos de SL (0,14, 0,28, 0,55g) en AO, se hizo con WOC, un residuo graso. A partir de este experimento se puede observar si los SLs también pueden aumentar el potencial de producción de metano, en un producto residual como es el WOC, ayudando a la posible valorización de este material por digestión anaerobia. Esta vez el periodo de medición fue de 22 días en vez de 40 días por falta de tiempo, por lo que los resultados pueden ser insuficientes para obtener un resultado claro sobre el efecto de los SLs en el proceso de digestión anaerobia.

En la Tabla 11 y en la Figura 7 se muestra la producción de biogás y su concentración de metano a los 22 días. Los resultados que se obtienen son bastante distintos a los del Experimento 1 y esto se puede deber a que la producción de metano al parar el experimento estaba en el pleno crecimiento. El WOC y SL (0,14g) muestran resultados muy por encima de los esperados para el biogás lo cual es ventajoso para su valorización

energética. Además, se observa que tanto en el Experimento 1 como en este el contenido de metano disminuye a medida que se aumenta el peso de SL.

Tabla 11: Producción final de biogás y metano, con el inóculo restado, de las 5 muestras del Experimento 2

| | Celulosa | WOC | SL (0,14) | SL (0,28) | SL (0,55) |
|--|----------|-------|-----------|-----------|-----------|
| Biogás (ml g ⁻¹ SV) | 314,3 | 519,9 | 571,6 | 397,9 | 172,7 |
| Metano (ml CH ₄ g ⁻¹ SV) | 133,3 | 471,9 | 482,6 | 272,3 | 39,9 |
| % CH ₄ | 42% | 91% | 84% | 68% | 23% |

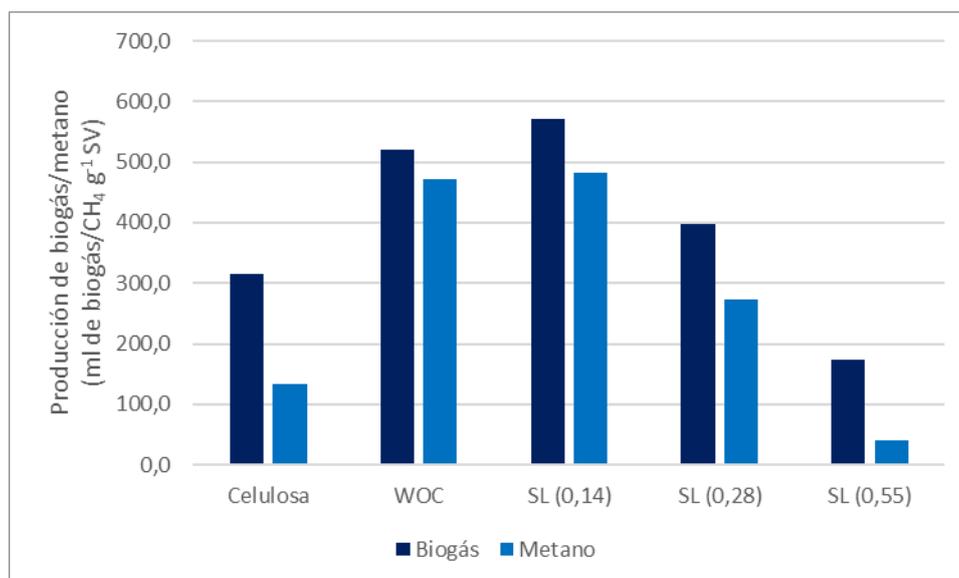


Figura 6: Producción de biogás y su concentración de metano, con el inóculo restado, de las 5 muestras del Experimento 2

Los ensayos con celulosa además de servir como control pueden ayudar a comparar dos experimentos. En este caso, según la Figura 8, la producción de metano de la celulosa era a los 22 días, de 133,3 ml CH₄ g⁻¹ SV mientras que en el Experimento 1, a los 21 días, era de 109,05 ml CH₄ g⁻¹ SV. Como ya se ha comentado, según Hansen et al. (2004), la celulosa alcanza 379 ml CH₄ g⁻¹ SV por lo que los resultados para el Experimento 2 siguen siendo bajos. Para el WOC los resultados presentan una tendencia parecida a los del AO. A los 22 días se alcanzó un valor de 471,9 ml CH₄ g⁻¹ SV, claramente superior que el producido por el AO (250,5 ml CH₄ g⁻¹ SV) pero también con un error considerable, de un 57,5%, que puede deberse, como se ha explicado con anterioridad, a la acumulación de compuestos intermedios y que causan la inhibición de la metanogénesis, en algunos casos. Torrijos et al. (2012) utilizó WOC como cosustrato de

la digestión anaerobia de una mezcla de hierba, estiércol de vaca y restos de frutas y verdura. La digestión anaerobia de estos residuos alcanzó una producción de metano de $690 \text{ ml CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$ en 60 días mientras que el control sin WOC solo alcanzó $410 \text{ ml CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$ por lo que se supone que, en el caso actual, la producción de metano debería seguir aumentando y alcanzar valores mayores. Además, la tendencia de la gráfica muestra un aumento continuado. A partir de la curva que se obtenga del modelo de Gompertz se podrá comentar su producción máxima de metano simulado.

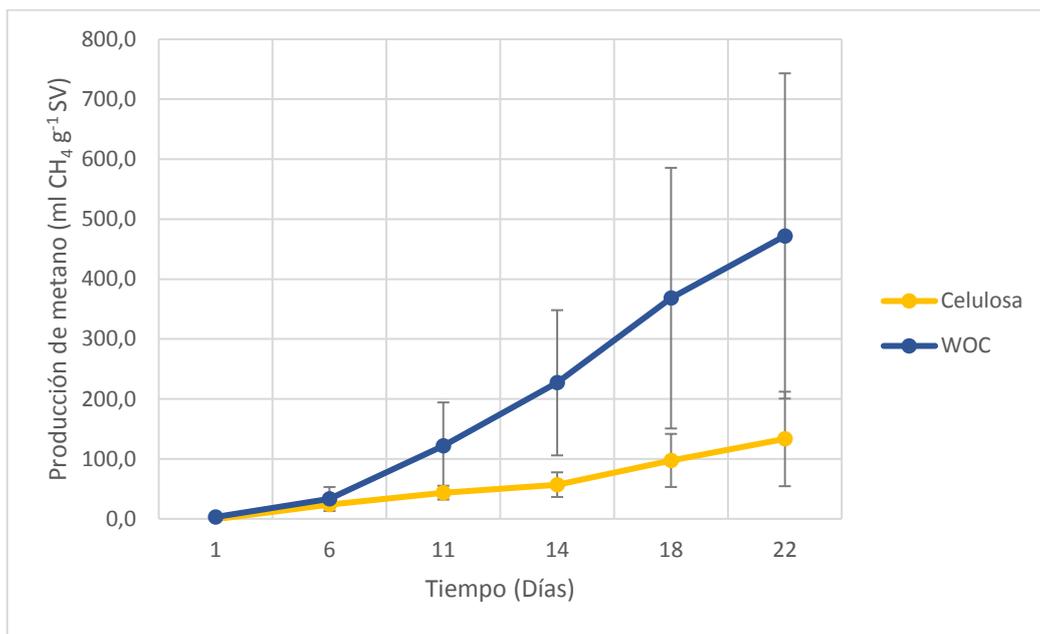


Figura 7: Volumen acumulado de metano de la celulosa y el WOC, entre los sólidos volátiles, con el inóculo restado, en el Experimento 2

En cuanto, a la influencia de la presencia de SL en la digestión anaerobia del WOC, la Figura 9 muestra resultados distintos a los del Experimento 1. En esta ocasión las muestras con SL obtuvieron una producción menor de metano que la que únicamente tenía la grasa. Solo es a los 22 días cuando las muestras con 0,14 g de SL obtienen un valor mayor de producción de metano y su trayectoria muestra un aumento continuado. A partir del modelo de Gompertz se podrán analizar mejor los resultados que se esperarían de haber continuado el experimento. En cuanto a las muestras de 0,28 g de SL obtiene resultados menores, pero también tiene un aumento pronunciado a partir de los 14-18 días de proceso mientras las de 0,55 g obtiene resultados muy bajos durante todo el experimento y si en algún momento aumentase sería más adelante. En el

Experimento 1 se observó un incremento a partir del día 16. En este Experimento se puede observar de nuevo la inhibición en la metanogénesis ya que, aunque se hayan conseguido altos porcentajes de contenido de metano (Tabla 11), son menores a los obtenidos por la prueba del WOC solo. Además, tienen una fase de latencia mayor.

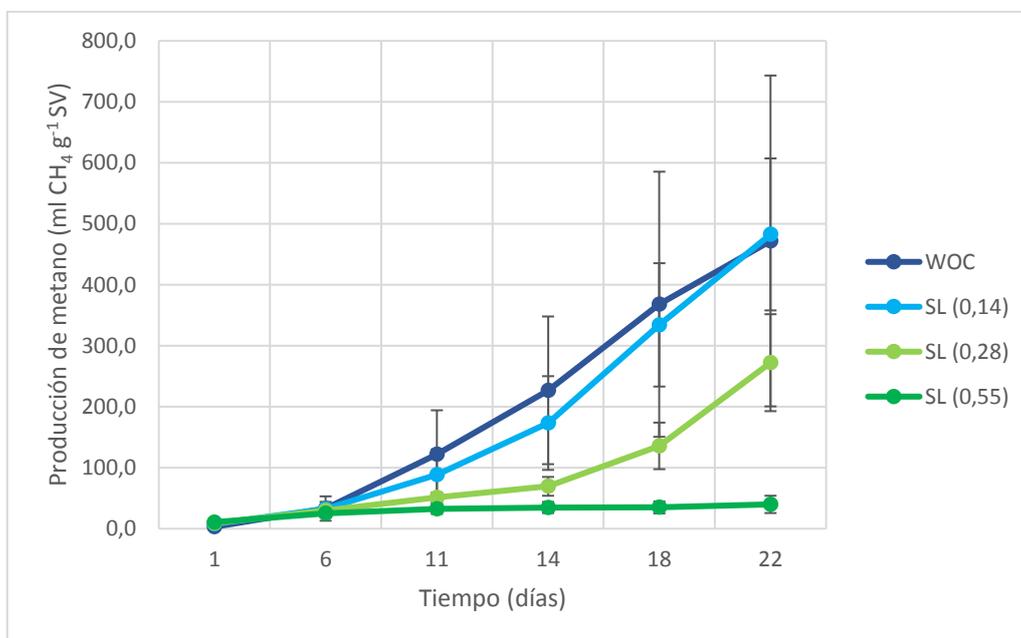


Figura 8: Volumen acumulado de metano del WOC y del WOC con diferentes pesos de SL, entre los sólidos volátiles, con el inóculo restado, en el Experimento 2

4.4. Modelización de los resultados de los ensayos BMP

La producción de metano fue evaluada utilizando el modelo de Gompertz, un modelo utilizado frecuentemente para analizar los datos obtenidos en este tipo de ensayos (Rasit et al., 2015). Este modelo nos muestra la tendencia en la producción de metano y calcula parámetros como la producción máxima acumulada de metano simulada, la máxima tasa de producción y la fase de latencia. En la Tabla 12 se muestran los valores de estos parámetros para el Experimento 1 y en la Figura 10 la tendencia según el modelo de las 5 pruebas (celulosa, AO, SL(0,14), SL(0,28) y SL (0,55)). B_0 hace referencia a la producción máxima acumulada de metano simulado ($\text{ml g}^{-1} \text{SV}$); μ_m , representa la tasa máxima de producción de metano ($\text{ml CH}_4 \text{g}^{-1} \text{SV d}^{-1}$) y λ se refiere a la fase de latencia (día).

El ajuste de los datos según el modelo Gompertz fue adecuado ya que se obtuvo un R^2 de 0,97 a 0,99 para los 5 ensayos. En cambio, el error de predicción fue alto para los sustratos analizados. En el Experimento 1 el error alcanzó en el peor de los casos el 98,89% y en el mejor el 0,38%. El error fue calculado a partir de la diferencia entre el resultado experimental y el simulado por el modelo de Gompertz.

Según la Tabla 12, los ensayos de celulosa, AO y SL (0,14) ya habían alcanzado prácticamente su producción máxima en el tiempo observado mientras que para los de SL(0,28) y SL (0,55) aún tenían potencial de producción de metano, hasta 816,3 ml $\text{CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV}$ y 672,5 ml $\text{CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV}$, respectivamente. Además, se puede observar que el tiempo de latencia aumenta según la cantidad de SL añadida al ensayo, que podría también explicar la mayor inhibición observada según el peso de SL. En el caso de solo AO el tiempo de latencia es mayor que para casi todos los casos en los que se añade SL, por lo que el beneficio de añadir SL se traduce tanto en mayor producción como en menos latencia. Se puede observar también una mayor tasa máxima de producción de metano a medida ligada a una menor fase de latencia y a la cantidad de SL añadido.

Tabla 12: Parámetros de la ecuación de Gompertz para el Experimento 1

| | Celulosa | AO | SL (0,14) | SL (0,28) | SL (0,55) |
|---|----------|-------|-----------|-----------|-----------|
| B_0 (ml $\text{CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV}$) | 126,7 | 252,5 | 1350 | 816,3 | 672,5 |
| μ_m (ml $\text{CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV d}^{-1}$) | 6,52 | 12,74 | 59,66 | 20,96 | 10,18 |
| λ (día) | -1,626 | 4,091 | 1,599 | 3,383 | 4,489 |
| R^2 | 0,98 | 0,99 | 0,98 | 0,98 | 0,97 |

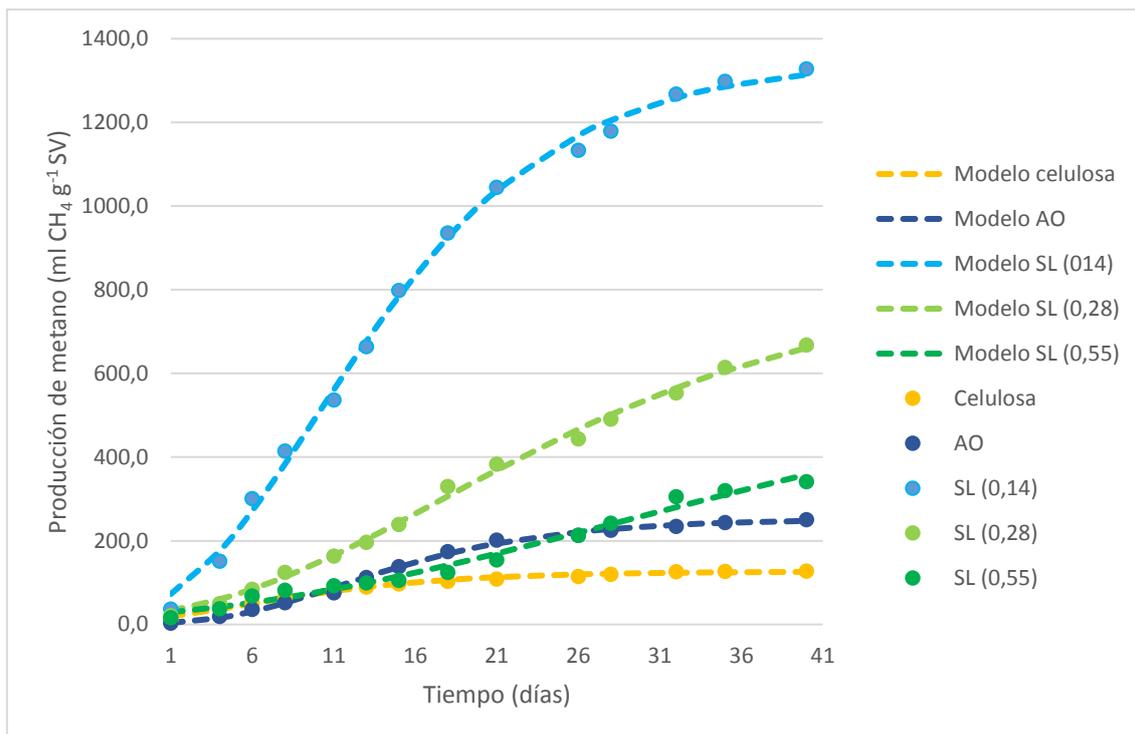


Figura 9: Modelización del Experimento 1 con la ecuación de Gompertz

Los resultados del ajuste al modelo de Gompertz para los datos del Experimento 2 se pueden observar en la Tabla 13. La duración del ensayo no se pudo alargar más de 22 días, por lo tanto, hay resultados que no se ajustan demasiado bien a las curvas simuladas, y hubiese sido necesario disponer de más tiempo para su completo análisis. Sobre todo, en el ensayo de SL (0,28 g) que estaba en pleno crecimiento y SL (0,55 g) que aún no había arrancado se obtienen valores muy dispares a los del resto de ensayos. Como en el caso del Experimento 1, el ajuste de datos fue satisfactorio, alcanzando valores de R^2 de 0,97 a 0,99. En cambio, como era de esperar, el error de predicción fue alto con valores de 0,22 a 1167,15%.

Según la Tabla 13, la producción de metano para la celulosa alcanzaría los 469,9 ml $\text{CH}_4 \text{g}^{-1} \text{SV}$ mientras que en el Experimento 1 solo alcanzaría los 126,7 ml $\text{CH}_4 \text{g}^{-1} \text{SV}$. Los valores del Experimento 2 se asemejan más a los valores alcanzados por Hansen et al. (2004) y Gunaseelan (2004) con valores de producción de metano de 379 y 419 ml $\text{CH}_4 \text{g}^{-1} \text{SV}$, respectivamente. Aun así, se podría interpretar que los datos obtenidos por el

modelo están sobreestimados en el caso del Experimento 2, por la falta de datos a tiempo mayores. Además, en el Experimento 2, la producción de metano de la celulosa empieza a aumentar a los aproximadamente a los 11 días y como se muestra en la Tabla 13 su fase de latencia es de 9 días mientras que en el Experimento 1 es a partir de los 11 días cuando se empieza a estabilizar.

Por otro lado, se obtiene mediante el modelo un valor final de volumen de metano acumulado para el WOC de 684,2 ml CH₄ g⁻¹ SV, valor parecido al obtenido por Torrijos et al. (2012) de 690 ml CH₄ g⁻¹ SV. Aun así, este dato no es exclusivo del WOC. Además, otro dato a destacar es el valor de producción máxima de metano para el SL (0,14). El valor estimado según el modelo es de 1111,0 ml CH₄ g⁻¹ SV por lo que se obtiene un efecto parecido al del Experimento 1, un aumento de la producción de metano en el WOC al introducir SL en cantidades relativamente bajas. Se obtiene también en este Experimento una mayor tasa máxima de producción de metano para el SL (0,14 g) comparado con el AO, 40,48 contra 34,75 ml CH₄ g⁻¹ SV d⁻¹, aunque una mayor fase de latencia, 9,98 contra 7,47 días. Para las otras dosis de SL es difícil conocer el efecto en la producción de metano.

Tabla 13: Parámetros de la ecuación de Gompertz para el Experimento 2

| | Celulosa | WOC | SL (0,14) | SL (0,28) | SL (0,55) |
|---|----------|-------|-----------|-----------|-----------|
| B ₀ (ml CH g ⁻¹ SV) | 469,9 | 684,2 | 1.111,0 | 466.400,0 | 38,5 |
| μ _m (ml CH ₄ g ⁻¹ SV d ⁻¹) | 10,28 | 34,75 | 40,48 | 3.305,00 | 2,86 |
| λ (día) | 9,04 | 7,47 | 9,98 | 74,50 | -2,88 |
| R ² | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,98 | 0,97 |

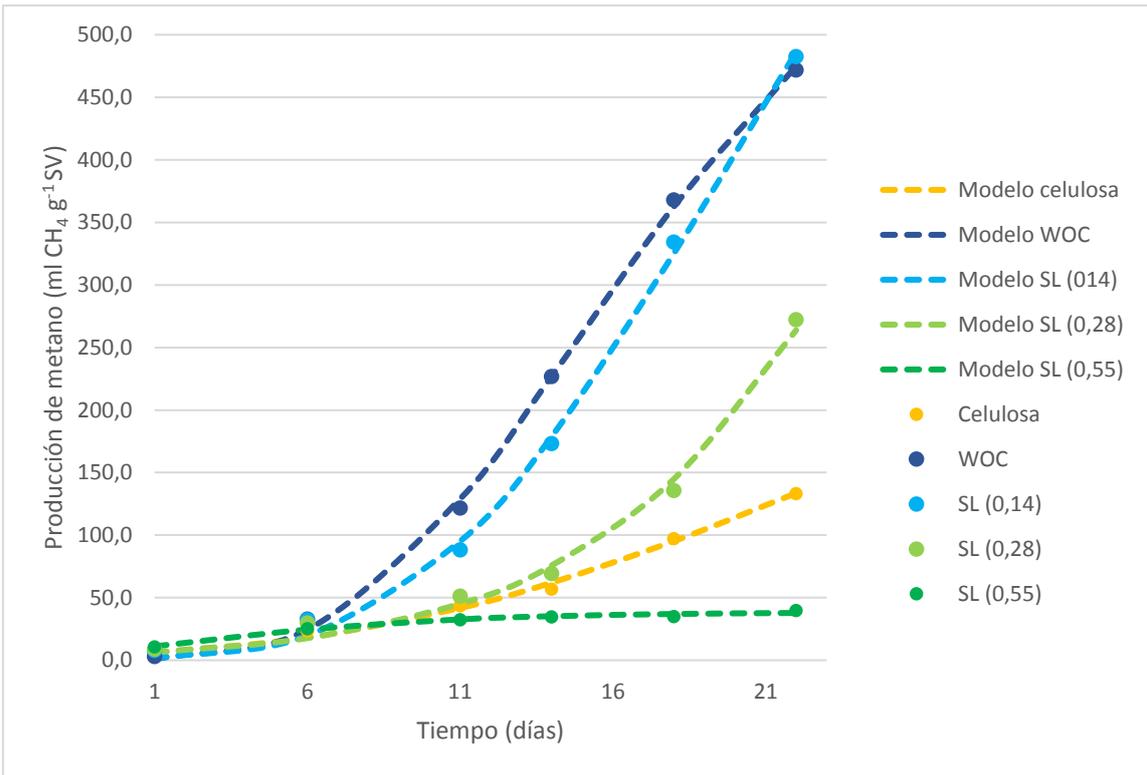


Figura 10: Modelización del Experimento 2 utilizando la ecuación de Gompertz

5. CONCLUSIONES

De los resultados conseguidos en los ensayos BMP se pueden observar una serie de conclusiones.

Para empezar, los biosurfactantes y en concreto los SLs, se recomiendan como una alternativa a los surfactantes para el proceso de digestión anaerobia. Se ha comprobado que el uso de SLs aumenta la producción de metano y que en dosis bajas se consiguen mejores rendimientos. Los ensayos con una dosis de 0,14 g de SL son los que consiguen mejores producciones de metano, 1328 ml CH₄ g⁻¹ SV en el Experimento 1 y 482,6 ml CH₄ g⁻¹ SV en el Experimento 2. Esto se considera ventajoso ya que al necesitar menos SL el coste de su uso es menor.

Por otro lado, se ha comprobado que el WOC es un residuo adecuado para su uso en digestión anaerobia por su alto contenido en grasa y su alto potencial de producción de metano. Teóricamente, la grasa pura, o sea, el AO, debería haber alcanzado un valor mayor que el WOC. En general los materiales con un alto contenido de grasa consiguen altos rendimiento de producción de metano, pero tienen tiempos de latencia mayores y puede haber inhibición de la metanogénesis por la acumulación de productos intermedios.

Para futuros ensayos con grasas se recomienda periodos más largos en los ensayos BMP, mínimo de 40 días. Además, se prueba el pH como un factor importante en el proceso y, por lo tanto, se recomienda realizar su seguimiento para comprobar el efecto del pH de los SLs en el proceso.

Por último, es importante destacar que este trabajo se ha llevado a cabo en el Grupo de Investigación de Compostaje de la Universidad Autónoma de Barcelona y estos resultados servirán para continuar la línea de investigación dedicada al uso de soforolípidos en digestión anaerobia.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abad, V., Avila, R., Vicent, T., & Font, X. (2019). Promoting circular economy in the surroundings of an organic fraction of municipal solid waste anaerobic digestion treatment plant: Biogas production impact and economic factors. *Bioresource Technology*, 283, 10-17.

Alves, M. M., Pereira, M. A., Sousa, D. Z., Cavaleiro, A. J., Picavet, M., Smidt, H., & Stams, A. J. M. (2009). Waste lipids to energy: How to optimize methane production from long-chain fatty acids (Lcfa): Waste lipids to energy. *Microbial Biotechnology*, 2(5), 538-550.

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., & van Lier, J. B. (2009). Defining the biomethane potential (Bmp) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, 59(5), 927-934.

Campbell, L. G. (2002). Sugar beet quality improvement. *Journal of Crop Production*, 5(1-2), 395-413

Campos, E., & Flotats, X. (2004). *Procesos biológicos: La digestión anaerobia y el compostaje*.

Chalapud, M. C., Bäumlér, E. R., & Carelli, A. A. (2017). Characterization of waxes and residual oil recovered from sunflower oil winterization waste: Sunflower waxes and oil recovered from winterization wastes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(2), 1500608.

FAO. (1981). *CODEX STAM 33-1981, Norma para los aceites de oliva y aceite de orujo de olivas*.

Gunaseelan, V. N. (2004). Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 389-399.

Hansen, T. L., Schmidt, J. E., Angelidaki, I., Marca, E., Jansen, J. la C., Mosbæk, H., & Christensen, T. H. (2004). Method for determination of methane potentials of solid organic waste. *Waste Management*, 24(4), 393-400.

Hassan, A. N., & Nelson, B. K. (2012). Invited review: Anaerobic fermentation of dairy food wastewater. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6188-6203.

Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., de Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.-C., de Laclos, H. F., Ghasimi, D. S. M., Hack, G., Hartel, M., ... Wierinck, I. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, 74(11), 2515-2522.

INE, (Instituto Nacional de Estadística). (2019). Encuesta Industrial Anual de Productos.

INE, (Instituto Nacional de Estadística). (2020). Encuesta Industrial Anual de Productos.

Jiménez-Peñalver, P., Castillejos, M., Koh, A., Gross, R., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2018). Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. *Journal of Cleaner Production*, 172, 2735-2747.

Jiménez-Peñalver, P., Gea, T., Sánchez, A., & Font, X. (2016). Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing. *Biochemical Engineering Journal*, 115, 93-100.

Jiménez-Peñalver, P., Koh, A., Gross, R., Gea, T., & Font, X. (2020). Biosurfactants from waste: Structures and interfacial properties of sophorolipids produced from a residual oil cake. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(2), 481-486.

Jiménez-Peñalver, P., Rodríguez, A., Daverey, A., Font, X., & Gea, T. (2019). Use of wastes for sophorolipids production as a transition to circular economy: State of the art and perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18(3), 413-435.

Khan, T., & Mubeen, U. (2012). Wheat Straw: A Pragmatic Overview. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 6, 673-675.

Knepper, T. P., Barceló, D., & Voogt, P. de (Eds.). (2003). Analysis and fate of surfactants in the aquatic environment (1st ed). Elsevier.

Lora Grando, R., de Souza Antune, A. M., da Fonseca, F. V., Sánchez, A., Barrena, R., & Font, X. (2017). Technology overview of biogas production in anaerobic digestion plants: A European evaluation of research and development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.079>

Lyberatos, G., & Skiadas, I. V. (1999). Modelling of anaerobic digestion—A review. *Global Nest Journal*, 1(2), 63-76.

Maeng, Y., Kim, K. T., Zhou, X., Jin, L., Kim, K. S., Kim, Y. H., Lee, S., Park, J. H., Chen, X., Kong, M., Cai, L., & Li, X. (2018). A novel microbial technique for producing high-quality sophorolipids from horse oil suitable for cosmetic applications. *Microbial Biotechnology*, 11(5), 917-929.

Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 540-555.

Mata-Alvarez, J. (Ed.). (2003). Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. IWA.

Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 509-515.

Parra, R. A. (2015). Digestión anaeróbica: Mecanismos biotecnológicos en el tratamiento de aguas residuales y su aplicación en la industria alimentaria. *Producción + Limpia*, 10(2), 142-159.

Ponsá, S., Gea, T., & Sánchez, A. (2011). Anaerobic co-digestion of the organic fraction of municipal solid waste with several pure organic co-substrates. *Biosystems Engineering*, 108(4), 352-360.

Rasit, N., Idris, A., Harun, R., & Wan Ab Karim Ghani, W. A. (2015). Effects of lipid inhibition on biogas production of anaerobic digestion from oily effluents and sludges: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 351-358.

Rodríguez, A., Gea, T., & Font, X. (2021). Sophorolipids production from oil cake by solid-state fermentation. Inventory for economic and environmental assessment. *Frontiers in Chemical Engineering*, 3, 632752.

Schneiter, A. A. (Ed.). (1997). *Sunflower technology and production*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr35>

Silvestre, G., Rodríguez-Abalde, A., Fernández, B., Flotats, X., & Bonmatí, A. (2011). Biomass adaptation over anaerobic co-digestion of sewage sludge and trapped grease waste. *Bioresource Technology*, 102(13), 6830-6836.

Sousa, D. Z., Smidt, H., Alves, M. M., & Stams, A. J. M. (2009). Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids: Ecophysiology of syntrophic LCFA degradation. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(3), 257-272.

Torrijos, M., Soubie, P., Badey, L., Bosque, F., & Steyer, J. P. (2012). Effect of the addition of fatty by-products from the refining of vegetable oil on methane production in co-digestion. *Water Science and Technology*, 66(10), 2237-2242.

Van Renterghem, L., Roelants, S. L. K. W., Baccile, N., Uyttersprot, K., Taelman, M. C., Everaert, B., Mincke, S., Ledegen, S., Debrouwer, S., Scholtens, K., Stevens, C., & Soetaert, W. (2018). From lab to market: An integrated bioprocess design approach for new-to-nature biosurfactants produced by *Starmerella bombicola*. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(5), 1195-1206.

Xu, Q., Liu, X., Wang, D., Liu, Y., Wang, Q., Ni, B.-J., Li, X., Yang, Q., & Li, H. (2019). Enhanced short-chain fatty acids production from waste activated sludge by sophorolipid: Performance, mechanism, and implication. *Bioresource Technology*, 284, 456-465.

Xu, Q., Luo, T.-Y., Wu, R.-L., Wei, W., Sun, J., Dai, X., & Ni, B.-J. (2021). Rhamnolipid pretreatment enhances methane production from two-phase anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Research*, 194, 116909.

Zhou, A., Luo, H., Varrone, C., Wang, Y., Liu, W., Wang, A., & Yue, X. (2015). Enhanced anaerobic digestibility of waste activated sludge by plant-derived biosurfactant. *Process Biochemistry*, 50(9), 1413-1421.