

# Estudio preliminar de enzimas fosfatasa y $\beta$ -glucosidasas como indicadores bioquímicos en la codigestión anaeróbica de residuos de cebolla y estiércoles

## Preliminary study of phosphatases and $\beta$ -glucosidases enzymes as biochemical indicators in the anaerobic co-digestion of onion residues and manures

Presentación: xx/10/2024

**Victoria Monserrat**

GEAQB Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Bahía Blanca  
[victoriamonserrat@frbb.utn.edu.ar](mailto:victoriamonserrat@frbb.utn.edu.ar)

**Milena Uribe Echevarría**

GEAQB Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Bahía Blanca  
[milenae@frbb.utn.edu.ar](mailto:milenae@frbb.utn.edu.ar)

**Ariel Airasca**

GEAQB Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Bahía Blanca  
[aaairasca@frbb.utn.edu.ar](mailto:aaairasca@frbb.utn.edu.ar)

**Patricia Benedetti**

GEAQB Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Bahía Blanca  
[pbenedet@frbb.utn.edu.ar](mailto:pbenedet@frbb.utn.edu.ar)

### Resumen

En este trabajo se presenta el estudio preliminar de la actividad de las enzimas hidrolíticas fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasas en reactores anaeróbicos de codigestión de residuos de cebolla y estiércoles de vaca y gallina, con y sin agregado de inóculo, con la finalidad de determinar su función como indicadores tempranos de las distintas etapas de la codigestión. El inóculo utilizado fue codigerido de estiércol de gallina. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado en 3 biodigestores de 2000 mL a temperatura entre 22 y 24 °C. Se midieron actividades enzimáticas, volumen de gas generado, pH y cromatografía del biogas. La mayor actividad enzimática se obtuvo para los reactores de estiércol de vaca, la que podría considerarse para fijar las condiciones iniciales de operación y control en la fase hidrolítica en los procesos de codigestión. La mayor producción de volumen de biogás fue para los reactores con estiércol de gallina con 69% de generación de metano.

Palabras clave: Enzimas hidrolíticas, Biogás, Codigestión anaeróbica, Biomasa residual

### Abstract

This work is a preliminary study of phosphatases and  $\beta$ -glucosidases hydrolytic enzymes activity in co-digestion of wastes of onion and hen and cow manure with and without addition of inoculum (co-digested hen manure) anaerobic reactors, in order to determine their function as early indicators of co-digestion different stages. The tests were carried out in duplicate on 3 biodigesters of 2000 mL at temperatures between 22 and 24 °C. Enzymatic activities, volume of gas generated, pH and biogas chromatography were measured. The highest enzymatic activity was obtained for cow manure reactors, which could be considered to set the initial operating and control conditions in the hydrolytic phase in the co-digestion processes. The highest volume production of biogas was for reactors with hen manure with 69% methane generation.

Keywords: Hydrolytic enzymes, Biogas, Anaerobic codigestion, Residual biomass.

## Introducción

Un tema preocupante a nivel mundial es la creciente contaminación ambiental vinculada con la generación de residuos y la utilización de hidrocarburos que causan gran parte del calentamiento global por acumulación de CO<sub>2</sub> en la atmósfera y gases que deterioran la salud y los ecosistemas.

La producción de biogás se basa en el uso técnico de las actividades microbianas, con el objetivo de convertir sustratos orgánicos en biohidrógeno y biometano lo más eficientemente posible (Gasch et al., 2013).

Una alternativa para la estabilización de residuos orgánicos es la digestión anaeróbica, a partir de la cual se pueden obtener biogás y biofertilizantes, disminuyendo la carga contaminante de los residuos y obteniendo energía a partir de los mismos, transformando la biomasa en compuestos simples tales como metano e hidrógeno debido a la actividad de microorganismos. Para que la producción de biogás sea un proceso sostenible, los sustratos deben ser producidos a partir de recursos renovables, estar disponibles en suficiente cantidad y/o concentración para que la fermentación ocurra de forma eficiente. Convertir residuos en bioenergía, como la producción de biohidrógeno y biogás utilizando desechos agrícolas ofrece una alternativa adecuada con un enorme potencial y un resultado concebible para disminuir nuestra dependencia de la energía derivada del petróleo. (Mishra et al., 2021).

Uno de los procesos fermentativos más eficientes para la producción de hidrógeno es la fermentación oscura, que es llevado a cabo por bacterias estrictamente anaerobias o anaerobias facultativas, las cuales crecen en oscuridad y usan sustratos ricos en carbohidratos (Martínez, 2019).

Para este trabajo se realizó la codigestión anaeróbica de desechos de cebolla con estiércol de gallina y de vaca en los que se determinaron las actividades de enzimas hidrolíticas  $\beta$ -glucosidasas y fosfatasas. Los residuos de cebolla son provenientes del Valle Bonaerense del Río Colorado, principal zona productora en Argentina. La producción de cebolla en su etapa de acondicionamiento genera grandes volúmenes de desecho, que consisten en restos de hojas, tallos, raíces, catáfilas y bulbos de descarte entre otros, compuestos en su mayoría por hemicelulosa y material hidrosoluble. Los estiércoles de gallina y de vaca provienen de establecimientos agrícolas de la región. El estiércol vacuno tiene una concentración elevada de nutrientes y microorganismos, necesarios para el desarrollo del proceso microbiológico, así como capacidad tampón fundamental para evitar procesos de acidificación que inhiben el desarrollo microbiológico anaeróbico. Estos residuos se complementan en su composición para su estabilización y favorecer el proceso de codigestión.

La digestión anaeróbica se divide en cuatro fases: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis/deshidrogenación y metanogénesis, que se caracterizan por diferentes grupos de microorganismos. Durante la primera fase, moléculas orgánicas complejas (polisacáridos, proteínas y lípidos) se descomponen en moléculas orgánicas más simples (azúcares, aminoácidos, y ácidos grasos de cadena larga). Estas reacciones son catalizadas por hidrolasas, que son secretadas por bacterias hidrolíticas en el medio. En la fase acidogénica los microorganismos transforman estas moléculas en productos intermedios (ácidos orgánicos de baja molecularidad, acetato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>). Los procesos de hidrólisis y la acidogénesis habitualmente ocurren en forma conjunta en el metabolismo, por lo que no pueden delimitarse claramente (Gasch et al., 2013).

De las enzimas involucradas en el ciclo del carbono, la  $\beta$ -glucosidasa es una de las más estudiadas, la cual completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa, removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños oligosacáridos. La mineralización de fósforo orgánico es llevada a cabo por fosfatasas o fosfotransferasas que catalizan la hidrólisis de ésteres y de anhídridos de ácido fosfórico. Las mismas son enzimas extracelulares que son liberadas al medio por microorganismos o por ruptura de ellos (Barriga, 2017).

El control y optimización de los procesos de digestión anaeróbica tradicionalmente se ha basado en mediciones de parámetros físicoquímicos. La inclusión de parámetros como la actividad de enzimas hidrolíticas de los microorganismos involucrados en la digestión anaeróbica, permitiría mejorar el ajuste de las condiciones operativas. En la transformación de componentes orgánicos, la hidrólisis es un punto crítico de control, por esta razón la determinación de la actividad de enzimas hidrolíticas puede relacionarse directamente con el proceso desarrollado en las dos primeras etapas (acidogénesis-acetogénesis). En este trabajo se presentan las actividades de  $\beta$ -glucosidasas y fosfatasas como estudio preliminar con la finalidad de determinar su función como indicadores tempranos de las distintas etapas de la codigestión.

## Metodología

### Caracterización de sustratos

Los sustratos utilizados en los ensayos fueron: inóculo (codigerido de gallina más cebolla), cebolla y estiércol de gallina [E1 y E1']; cebolla y estiércol de gallina [E2 y E2']; cebolla y estiércol de vaca [E3 y E3'].

Los valores de porcentajes de materia seca (MS), materia orgánica (MO) y carbono orgánico (CO), pH, Conductividad eléctrica (Ce) y Demanda Química de Oxígeno inicial (DQO inicial) para los ensayos E1 y E1', E2 y E2' y E3 y E3' corresponden a los publicados por Benedetti et al., 2016. La caracterización de las mezclas se muestra en la Tabla 1.

Ensayo	pH	Ce(mS/cm)	% MS	% MO	% CO	DQO inicial mg O <sub>2</sub> /L
E1 y E1'	7.28	6.50	1.51	57.85	33.56	7340
E2 y E2'	6.82	4.10	1.07	62.59	36.31	5670
E3 y E3'	5.25	2.22	0.76	70.29	40.77	5420

Tabla 1. Caracterización de las mezclas iniciales de los ensayos

## Ensayos en reactores anaeróbicos

Se diseñó el ensayo inicial para evaluar la producción de biogás, en una primera etapa se tomaron muestras para hacer las determinaciones de enzimas hidrolíticas, además de pH, DQO y volumen de gas generado, continuando en una segunda etapa con las determinaciones fisicoquímicas y cromatográficas. Se hicieron 3 ensayos por duplicado, se usaron reactores de 2000 ml de capacidad y temperatura controlada que varió entre 22 y 24° C. El ensayo 1 [E1 y E1'] se preparó con 300 mL de inóculo (codigerido de gallina más cebolla), 120 g de cebolla fresca, 120 g de estiércol de gallina y se llevó a volumen de 2000 mL con agua destilada. El ensayo 2 [E2 y E2'] se preparó con 120 g de cebolla fresca, 120 g de estiércol de gallina y se llevó a volumen de 2000 mL con agua destilada. El ensayo 3 [E3 y E3'] se preparó con 120 g de cebolla fresca, 120 g de estiércol de vaca y se llevó a volumen de 2000 mL con agua destilada.

El muestreo para enzimas se realizó a los 20 días de iniciados los ensayos. Para la determinación de pH y DQO se tomaron muestras cada 72 horas y se midió el volumen de gas generado.

## Análisis físico químico de la biomasa residual

Para las determinaciones fisicoquímicas de pH, MS, MO, CE, CO y DQO se utilizaron los Métodos Normalizados 2540 B, 2540 C, 2540 D, 2540 E, 2540 G y 5220 D del Standard Methods.

## Determinación de actividad enzimática

Las determinaciones de actividad enzimática se realizaron por triplicado en un extracto acuoso al 5% m/V. La dilución se realizó con agua destilada, siguiendo la metodología descrita por Cunha Queda, 2006. Para cada una de las enzimas investigadas se utilizaron sus respectivos sustratos, p-nitrofenol para la actividad de fosfatasas y p-nitroβ-D-glucopiranosido para β-glucosidasa. Los resultados fueron referidos en unidades de μmoles de producto formado por gramo de materia seca por hora. Todas las lecturas de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro HACH 2100.

## Determinación cromatográfica

El biogás obtenido fue analizado en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, modelo Clarus 500 CG, controlable por software Totalchrom, con columna empacada HaysepN 80/100 - 6'x 1/8" SS, gas carrier Nitrógeno 19.0 PSI, flujo 25,0 ml/m, detector TCD 130°C, horno 65°C y columna 100°C.

## Resultados y discusión

Los valores de las actividades de β-glucosidasas obtenidos fueron mayores en el caso de los ensayos con estiércol de vaca que en los de estiércol de gallina. A su vez, los resultados de estiércol de gallina con inóculo fueron mayores que los de estiércol solo. En el caso de las actividades de fosfatasas, los mayores valores se obtuvieron para los ensayos con estiércol de vaca. Dicha actividad se relaciona con los compuestos orgánicos de fosfato y fosfatos libres, disponibles en la materia orgánica que son transformados por la acción microbiana. La mayor actividad de las enzimas estudiadas en los ensayos con estiércol de vaca podría deberse a la cantidad de nutrientes, a la composición microbiológica del estiércol y a una mejor disponibilidad de los compuestos solubles, dado que, presentan 0,76 % de materia seca y 70,29 % de materia orgánica. La presencia de altos contenidos de compuestos orgánicos degradables (disponibles en el sustrato) en el estiércol de vaca

estimulan la síntesis de las enzimas a nivel celular, como también, a medida que disminuye el sustrato, lo hace la actividad enzimática (Benítez, 1999).

Los resultados de las actividades enzimáticas se presentan en la Tabla 2.

	$\beta$ -glucosidasas	Fosfatasas
E1	0,095	0,808
E1'	0,125	0,673
E2	0,084	0,884
E2'	0,080	1,038
E3	0,477	1,135
E3'	0,279	1,353

Tabla 2. Resultados de las actividades enzimáticas en  $\mu\text{mol p-Nitrophenol g}^{-1} \text{h}^{-1}$

La producción de biogás (Figura 1), fue de 2400, 2450, 250 y 390 mL producidos en cada uno de los reactores con estiércol de gallina: E1, E1', E2 y E2' respectivamente, a los 22 días de operación, lo que equivale a 42 mL de biogás/gSV, para E1 y E1' y a 4 y 6 mL de biogás/gSV para E2 y E2'. Para los reactores que contienen estiércol de vaca, el volumen producido fue de 140 y 100 mL para E3 y E3' que corresponden a 6,2 y 2,4 mL de biogás/gSV. Los valores más altos de obtención de biogás en los reactores E1 y E1' podrían estar en relación directa con el uso de un 15% de agregado de inóculo sobre el total del reactor. El valor de 42 mL de biogás/gSV está en concordancia con el 41.7 obtenido a partir de codigestión de vaca y gallinácea en 27 días de operación por Briseño Arciniega, 2017.

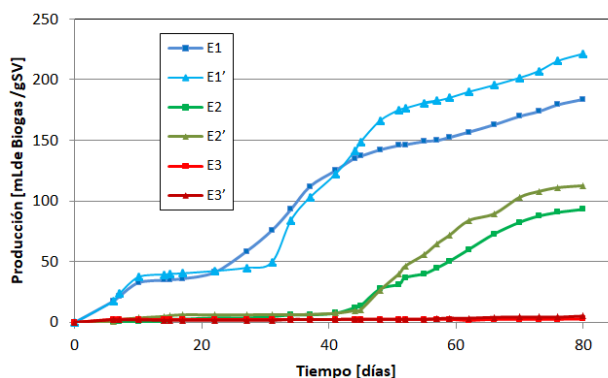


Figura. 1. Producción de biogás.

El pH disminuyó alcanzando valores a los 20 días de 6,26 y 6,24 para los reactores E1 y E1' y de 5,98 y 5,92 para E2 y E2', aumentando posteriormente para llegar a valores cercanos a la neutralidad a los 80 días. Esta variación se debe a la alcalinidad disponible en el estiércol de gallina. En el caso de los ensayos E3 y E3' se partió de un pH inicial más ácido, 5,10 y 5,25, a los 20 días los valores fueron de 5,21 y se observa que a los 80 días disminuyó a 4,99 (Figura 2). Los ensayos con estiércol de gallina estabilizan su valor de pH alrededor de los 80 días, no siendo así para los que contienen estiércol de vaca (pH 4,99). Por esta razón, la generación de biogás en ellos es mucho menor que en los ensayos con estiércol de gallina.

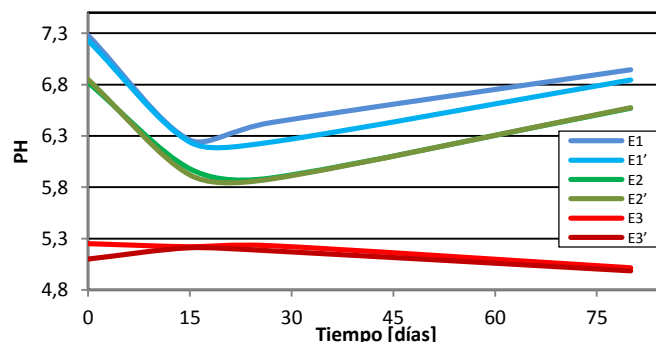


Figura. 2. Variación del pH.

Los ensayos se mantuvieron en condiciones operativas hasta los 80 días, obteniéndose un 40 a 50% más de producción de biogás en los de cebolla con estiércol de gallina que con estiércol de vaca. La composición del biogás de acuerdo con la determinación cromatográfica, (Figura 3), indica la presencia de aproximadamente 69% de metano y 30% de dióxido de carbono, siendo similar para los 3 ensayos, este valor se encuentra en el mismo orden de magnitud que los hallados por Magaña et al, 2006, que a los 21 días obtuvieron 62,71 % de metano utilizando estiércol de cabras.

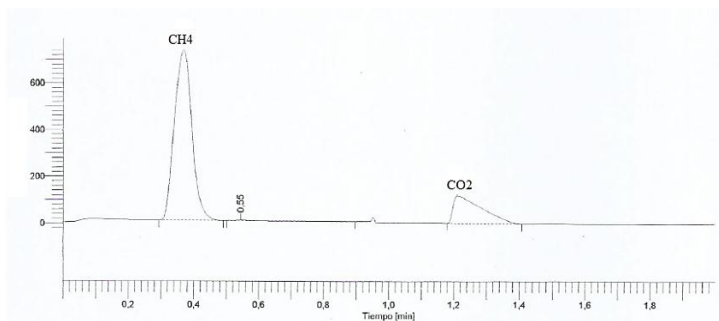


Figura. 3. Composición del biogás a los 80 días.

## Conclusiones

Los ensayos efectuados con cebolla en codigestión con estiércol de gallina produjeron mayor volumen de biogás, que con estiércol de vaca. Siendo los que más producen los que contienen inóculo.

Dado que se observó una mayor actividad enzimática en los ensayos con estiércol de vaca, podrían considerarse las mismas para fijar las condiciones iniciales de operación y control en la fase hidrolítica.

De acuerdo con los resultados obtenidos y continuando en esta línea de investigación, se diseñarán nuevos ensayos con el objetivo de evaluar las distintas etapas de la codigestión anaeróbica, la primera de producción de hidrógeno y la segunda de producción de metano a partir de biomasa residual proveniente de otros residuos. Para la producción de biohidrógeno se realizarán ensayos en un rango de temperaturas termofílicas y en oscuridad para favorecer la fermentación oscura. Con el digestato obtenido en la primera etapa y estiércol de gallina se llevará a cabo la co-digestión para la obtención de metano, dado que con este se obtuvo mayor producción. Se propone evaluar actividades de enzimas hidrolíticas y oxidorreductasas.

## Referencias

- Barriga Azocar, Felipe Andrés (2017) Influencia de un pre-tratamiento secuencial sobre la producción de metano y actividad microbiana durante la digestión anaeróbica de lodos sanitarios [Tesis de grado, Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas] <https://www.eula.cl/tesis-felipe-barriga2017>
- Bedoya, A.; Castrillón, J. C.; Ramírez, J. E.; Vásquez, J. E.; Arias Zabala, M.; (2008) Producción Biológica de Hidrógeno: Una Aproximación Al Estado Del Arte. Dyna, 154 (137-157). ISSN 0012-7353
- Benedetti, P. Airasca, A. Uribe Echevarria, M. Monserrat, V. Campaña, H. (2016) Obtención de biogás a partir de codigestión residuos agroindustriales. II Congreso Argentino de Energías Sustentables (pp. 300-305) Ed. EduTECNe.
- Benitez, E. Nogales, R. Elvira, C. Masciandaro, G. Ceccanti, B. (1999). Enzyme Activities as Indicators of the Stabilization of Sewage Sludges Composting with *Eisenia foetida*. Bioresource Technology 67 297-303
- Briseño Arciniega, Laura (2017). Producción de biogás a través de la codigestión de residuos sólidos y semisólidos: hacia una planta centralizada de biogás para la generación de energía. [Tesis. CIDETEC, Santiago de Querétaro, México]. <https://cidetec.repositorioinstitucional.mx>
- Cunha - Queda C. (2006) Métodos para a determinação de actividades enzimáticas em solos.
- Gasch et al. (2013) Enzymatic monitoring and control of a two-phase batch digester leaching system with integrated anaerobic filter. Energy, Sustainability and Society 3:10.
- Magaña R., J. Luis; Torres R., Ernestina; Martínez G., Martín T.; Sandoval Juárez, Carmen; Hernández Cantero, Rosalía. (2006) Producción de Biogás a Nivel Laboratorio Utilizando Estiércol de Cabras. Acta Universitaria, vol. 16, núm. 2, pp. 27-3. <https://www.redalyc.org/pdf/416/41616204.pdf>

Martínez, E. Judith; Blanco, D; Gómez, X. (2019). Chapter 7 Two-Stage Process to Enhance Bio-hydrogen Production en H. Treichel and G. Fongaro (eds.), Improving Biogas Production, Vol. 9, pp. 149–179). © Springer Nature Switzerland AG 2019 doi: 10.1007/978-3-030-10516-7\_7

Mishra, Apurva; Kumar, Manish; Bolan, Nanthi S; Kapley, Atya; Kumar, Rakesh; Singh, Lal. Multidimensional approaches of biogas production and up-gradation: Opportunities and challenges. Bioresource Technology 338 (2021) 125514

SMWW (1999).Standard Methods for the examination of Water and Wastewater.20th edition. American Public Health Association. American Water Works Association. Water Environment Federation.