

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
SANTIAGO-CHILE



ELONGACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES PARA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MEDIA

IGNACIO BÓRQUEZ LLANOS

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO**

Profesora guía: Dra. Andrea Carvajal

Profesor correferente: Ing. Mg. Pablo Jofré

Junio – 2025



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): ☒ Memoria o trabajo de título; ☐ Tesis de Postgrado;

Título del trabajo: Elongación de ácidos grasos volátiles para obtención de ácidos grasos de cadena media

Nombre del candidato(a): Ignacio A. Bórquez Llanos

Carrera / Grado: Ingeniería Civil Química

Campus: Santiago San Joaquín ; **Departamento:** Ingeniería Química y Ambiental

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Andrea Carvajal Guevara, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL

☒ El trabajo **NO contiene información que amerite confidencialidad** y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

☐ El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (embargo) por:

☐ 6 meses; ☐ 12 meses; ☐ 2 años; ☐ 3 años; ☐ 5 años; ☐ 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: 20-08-2025

; Firma:

Signed by:

Andrea Carvajal Guevara

881A7574C7F7492...

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: 20-08-2025

; Firma:

[Firma manuscrita]

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los rostros con los que me he cruzado, todas las palabras que he intercambiado y todas las experiencias que me han enseñado a vivir en este intrigante y cautivador mundo.

Dedicado a mi papá.

RESUMEN

El constante aumento en la generación de residuos alimenticios representa un desafío ambiental a nivel global, por lo cual es imperativo buscar alternativas para su tratamiento, valorización y reincorporación en diversos modelos de negocios. Se presenta como solución novedosa y de alto potencial económico la producción de ácidos grasos de cadena media, a través de la elongación de ácidos grasos volátiles de cadena corta provenientes de residuos alimenticios. En este contexto, se expone el estudio del proceso de la elongación anaerobia, enfocado principalmente en la producción de ácido caproico, en base a dos tipos de sustratos: una matriz sintética, compuesta por ácido acético y etanol, y una matriz real, obtenida a partir del proceso de lixiviación por fermentación anaerobia de residuos alimenticios.

El proceso de elongación se estudió en reactores anaerobios semicontinuos con condiciones controladas para favorecer las reacciones enzimáticas y adaptación de los microorganismos en la producción de ácido caproico. Para esto, se monitoreó periódicamente el comportamiento de los reactores, mediante diversas técnicas analíticas, estimando consumo, producción y rendimientos a los diversos compuestos implicados en los sistemas sintético y real.

Los resultados demostraron que el proceso de elongación es técnicamente viable en la operación en ambas condiciones. El reactor con alimentación sintética, considerado como referencia teórica por la ausencia de compuestos supresores o inhibidores de las reacciones metabólicas de elongación, mostró patrones de una elongación secuencial y estequiométrica desde ácido acético a butírico para la posterior producción de ácido caproico, con una directa tendencia a la selectividad de cadenas de carbono más largas ante un aumento en la carga orgánica alimentada. Por otra parte, el reactor con alimentación proveniente de la fermentación en reactor lixiviado presentó una respuesta más rápida y eficiente para la producción de ácido caproico, alcanzando una máxima concentración de $16,4 \pm 0,2$ (g/l) y un rendimiento del 87% (g_c/g_c), frente a los máximos obtenidos por su contraparte sintética, siendo $13,2 \pm 0,5$ (g/l) y 70% (g_c/g_c), respectivamente. Esto sugiere una preferencia del inóculo a la utilización de sustratos con mayor disponibilidad y complejidad orgánica para el proceso de elongación.

Ambos reactores estudiados, a pesar de mostrar un aumento progresivo en la productividad del inóculo para la reacción de elongación, no consiguieron alcanzar una estabilización del proceso, sugiriendo la necesidad de utilizar tiempos de residencia mayores que permitan el óptimo desarrollo y adaptación de los microorganismos. Además, en base a las limitaciones observadas en la operación, se proponen como recomendación para la mejora continua del proceso: una caracterización más rigurosa al inóculo inicial, la implementación de metodologías cromatográficas con capacidades de detección de cadenas de carbono más largas y la implementación de un plan para la preparación de la alimentación con menores intervalos de tiempo con la finalidad de evitar el riesgo de contaminaciones o degradación del sustrato.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	9
1.	Residuos orgánicos y digestión anaeróbica.....	9
2.	Ácidos grasos volátiles de cadena corta y media	10
3.	Elongación de cadenas	12
3.1.	Mecanismo RBO	13
3.2.	Factores de elongación	13
3.2.1.	Reacciones competitivas	13
3.2.2.	Temperatura y pH.....	14
3.2.3.	Razón DE:AE	14
3.2.4.	Microorganismos.....	14
3.2.5.	Alimentación	15
3.2.5.1.	Medio mineral	15
3.2.5.2.	Fuente de carbono	15
3.3.	Reactores	16
3.3.1.	Variables operacionales de reactores semicontínuos	17
3.3.1.1.	Razón inóculo sustrato	17
3.3.1.2.	Tiempo de retención hidráulico (TRH).....	17
3.3.1.3.	Velocidad de carga orgánica (OLR).....	17
II.	OBJETIVOS.....	19
1.	Objetivo general	19
2.	Objetivos específicos.....	19
III.	METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS.....	20
1.	Montaje del reactor de lecho lixiviado (LBR)	20
2.	Elongación.....	22
2.1.	Montaje de los reactores de elongación	23
2.1.1.	Pretratamiento térmico del inóculo	26
2.2.	Alimentación y muestreo	26
2.3.	Sustrato.....	26
2.3.1.	Fuente de carbono	27
2.3.2.	Medio mineral	28

3.	Técnicas y análisis.....	29
3.1.	pH.....	29
3.2.	Sólidos suspendidos totales y volátiles	29
3.3.	Carbono orgánico total	30
3.4.	Análisis cromatográficos de los compuestos	30
3.5.	Cálculo de rendimientos.....	31
3.5.1.	Razón estequiométrica EtOH:AGV en la alimentación.....	31
3.5.2.	Rendimiento y Selectividad del reactor sintético	32
3.5.2.1.	Rendimiento de producción	32
3.5.2.2.	Selectividad de los productos.....	32
3.5.3.	Rendimiento del consumo de etanol	32
3.5.4.	Rendimiento de la alimentación.....	33
3.5.5.	Productividad del inóculo.....	33
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
1.	Reactor sintético.....	35
1.1.	Monitoreo de pH	35
1.2.	Sólidos Suspendidos.....	36
1.3.	Alimentación	37
1.4.	Carbono orgánico total	38
1.5.	Producción de ácidos.....	39
1.6.	Rendimiento y selectividad	43
2.	Reactor lixiviado	45
2.1.	Monitoreo de pH	45
2.2.	Sólidos suspendidos	46
2.3.	Alimentación	47
2.4.	Carbono orgánico total	48
2.5.	Producción de ácidos.....	49
3.	Rendimientos.....	53
3.1.	Rendimiento de consumo de etanol	53
3.2.	Rendimiento de la alimentación.....	54
3.3.	Productividad del inóculo.....	56

V. CONCLUSIONES	58
VI. REFERENCIAS	59
ANEXOS.....	63
A. Diagrama del montaje	63
B. Caracterización de residuos alimenticios	64
C. Caracterización del inóculo	64
D. Conversión de unidades de los compuestos	65
E. Preparación de la alimentación para los reactores de elongación	65
F. Elementos traza de medio mineral DSM 52.....	66
G. Modelo cinético de reactores de elongación y cálculo de TRH óptimo.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la digestión anaerobia para materia orgánica compleja (Huertas, 2015). ..	10
Figura 2: Esquema para el tratamiento de residuos orgánicos en la producción de ácidos grasos de cadena media. Traducido de: Wang, Yang, Cai, Zhang, Wu, Ma, Fu, Zhang, et al. (2023).....	12
Figura 3: Diagrama del diseño experimental de la investigación.	20
Figura 4: Reactor de lixiviación montado en el laboratorio.....	21
Figura 5: Sistema experimental de los reactores de elongación.....	24
Figura 6: Montaje de los reactores de elongación. De izquierda a derecha: sintético OLR 1, lixiviado y sintético OLR 2.	25
Figura 7: Monitoreo de pH de reactor sintético.	35
Figura 8: Sólidos suspendidos del reactor sintético.	36
Figura 9: Composición de la alimentación del reactor sintético.	37
Figura 10: Carbono orgánico total medido en el reactor sintético.	39
Figura 11: Composición de la salida del reactor sintético.	40
Figura 12: Comparación de carbono orgánico total medido y equivalente a la salida del reactor sintético.	41
Figura 13: Perfil de concentraciones de compuestos más relevantes en el reactor sintético.	42
Figura 14: Rendimiento (Y) y selectividad (S) de ácido butírico (AB) y ácido caproico (AC) en reactor sintético.	43
Figura 15: Monitoreo de pH de reactor de lixiviado.....	45
Figura 16: Sólidos suspendidos de reactor lixiviado.....	46
Figura 17: Composición de la alimentación del reactor lixiviado.	48
Figura 18: Carbono orgánico total del reactor de lixiviado	49
Figura 19: Composición a la salida del reactor de lixiviado.....	50
Figura 20: Comparación de carbono orgánico total medido y equivalente a la salida del reactor de lixiviado.....	51
Figura 21: Perfil de concentraciones de compuestos más relevantes en el reactor de lixiviado....	52

Figura 22: Consumo de etanol (EtOH) para la producción de ácido caproico (AC). 54

Figura 23: Rendimiento de la alimentación para la producción de ácido caproico. 55

Figura 24: Productividad del inóculo para la producción de ácido caproico. 56

ÍNDICE DE FIGURAS DE ANEXO

Figura A. 1: Montaje de LBR con control de pH (De la Fuente, 2023). 63

Figura A. 2: Modelo ajustado para el reactor sintético. 67

Figura A. 3: Modelo ajustado para el reactor lixiviado.....68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Aplicaciones de los ácidos grasos de cadena media obtenidos por bioprocesos de elongación (Venkateswar Reddy et al., 2020).....11

Tabla 2: Caracterización del líquido lixiviado del LBR luego de 10 días de operación. 22

Tabla 3: Variables controladas en la operación de los reactores de elongación 23

Tabla 4: Componentes para el montaje de los reactores de elongación. (*) Solo para el caso de lixiviado con el fin de suprimir reacciones metanogénicas indeseadas (Yin et al., 2017). 24

Tabla 5: Días de muestreo para la salida y alimentación de los reactores. 26

Tabla 6: Concentraciones de los ácidos y etanol dentro de los recipientes de alimentación. 28

Tabla 7: Medio mineral DSM 52 (*) véase anexo F para detalle de elementos traza. 29

Tabla 8: Recopilación de resultados más relevantes de ambos reactores operados. 53

ÍNDICE DE TABLAS DE ANEXO

Tabla A. 1: Caracterización de residuos alimenticios para fermentación en LBR (De la Fuente, 2023).....64

Tabla A. 2: Caracterización del inóculo antes del pretratamiento térmico. 64

Tabla A. 3: Conversión de unidades de los compuestos. 65

Tabla A. 4: Preparación de la alimentación para cada una de las cargas orgánicas.....65

Tabla A. 5: Elementos traza de medio mineral DSM 52. 66

Tabla A. 6: Parámetros ajustados para los modelos de elongación semicontinua. 69

I. INTRODUCCIÓN

1. Residuos orgánicos y digestión anaeróbica

El precipitado desarrollo tecnológico de los últimos años ha mejorado sustancialmente la calidad de vida de las personas lo que, sumado al progresivo avance de la urbanización, implica en un aumento de los desechos generados. De estos, cerca del 44% provienen de residuos alimenticios, lo cual se traduce a 1300 millones de toneladas de comida perdida o descartada anualmente a nivel global (Zan et al., 2022), proyectándose un aumento significativo en la generación de estos residuos en un 10% cada año (Ma et al., 2021).

En Chile durante el año 2017 se generaron 23 millones de toneladas, de las cuales aproximadamente 7,9 millones corresponden a residuos municipales, y de ellos cerca del 58%, es decir, 4,6 millones de toneladas entran en la categoría de residuos orgánicos. De este monto, menos del 1% es tratado (Ministerio de Medio Ambiente de Chile, 2020). Es por esto que es imperativo impulsar nuevas formas para la disminución y revalorización de los residuos a nivel nacional y global.

Dentro de las alternativas para el tratamiento de residuos orgánicos, se destaca la digestión anaeróbica, la cual es capaz de transformar estos residuos en productos de valor agregado que pueden ser reincorporados en una nueva línea productiva, fomentando la economía circular y disminuyendo las emisiones al medio ambiente (Huertas, 2015).

La digestión anaerobia es una tecnología ampliamente utilizada para el tratamiento de residuos orgánicos, debido a su bajo consumo de energía y costos de operación. En esta digestión se degradan complejos orgánicos como carbohidratos, proteínas y lípidos en compuestos químicos de valor agregado como el etanol, lactato, metano y ácidos grasos volátiles (AGVs) por medio de microorganismos anaerobios (Wang et al., 2020). Este tipo de digestión consta principalmente por cuatro procesos metabólicos: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (*véase figura 1*).

Durante el proceso de hidrólisis, se degrada la materia orgánica en azúcares simples, aminoácidos y ácidos grasos, mediante la acción de enzimas hidrolíticas. Estos productos son convertidos principalmente en alcoholes y AGVs en el proceso de acidogénesis, para transformarse en ácido acético o hidrógeno y dióxido de carbono en el proceso acetogénico. Finalmente, los productos de las etapas acidogénica y acetogénica son utilizados como fuente de carbono por microorganismos metanogénicos para concluir la digestión con biogás como producto, componiéndose principalmente de metano, dióxido de carbono y agua (Tao et al., 2019).

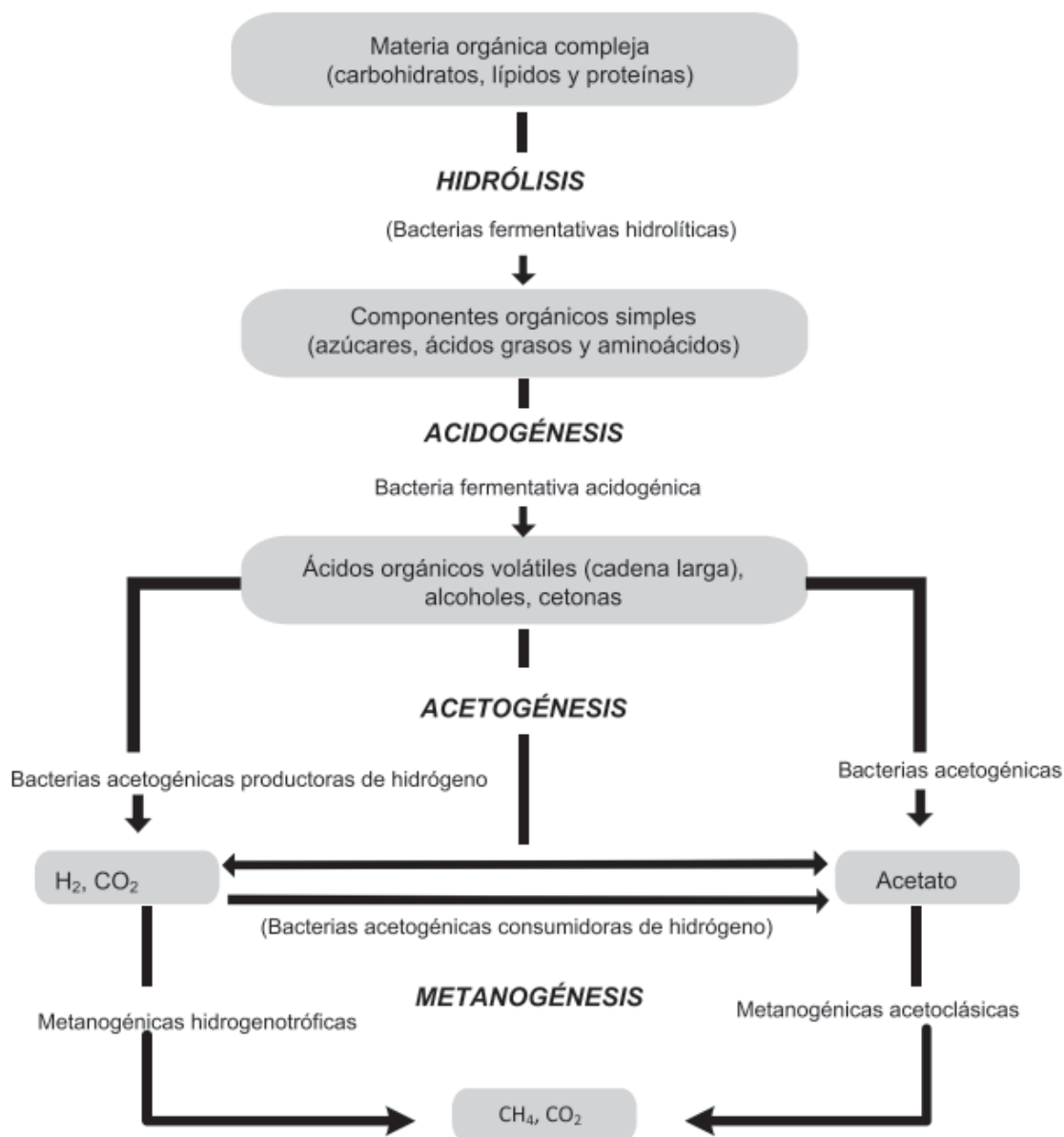


Figura 1: Esquema de la digestión anaerobia para materia orgánica compleja (Huertas, 2015).

2. Ácidos grasos volátiles de cadena corta y media

De los productos obtenidos de la digestión anaerobia, la producción de AGVs frente a la producción de metano ha mostrado un mayor interés dada la versatilidad de estos compuestos en procesos industriales: desde la producción de biocombustibles y bioplásticos, hasta la industria de alimentos (Wu et al., 2018). Estos compuestos están constituidos por cadenas de carbono limitadas entre un rango de 2 y 5 átomos de carbono de los cuales se destacan los ácidos: acético (C2), propiónico (C3), butírico (C4), valérico (C5) y sus respectivos isómeros estructurales.

Estos ácidos grasos volátiles al ser productos intermedios de la digestión anaerobia presentan una alta competencia con el proceso metanogénico, por lo que para su obtención se debe suprimir la producción de metano en el sistema (Agler et al., 2011). Sin embargo, a diferencia del metano, son difíciles de separar y purificar del caldo de fermentación debido a su alta afinidad hidrofílica con el medio, lo cual limita su purificación y posterior utilización (Angenent et al., 2016). Es por esta principal barrera que ha nacido un interés en investigar la producción de ácidos grasos de cadena media (MCFAs, por sus siglas en inglés *medium-chain fatty acids*) por medio de elongación de cadenas dada sus características hidrofóbicas, lo que le confiere facilidad en su extracción (Reddy et al., 2022).

Los MCFAs son ácidos carboxílicos con cadenas que varían en un rango de 6 a 12 átomos de carbono y son altamente valorados por su notable densidad energética y su potencial para sintetizar un amplio rango de compuestos como: aditivos alimenticios, perfumes, colorantes, medicinas, combustibles sintéticos y solventes orgánicos (Zan et al., 2022). En la *tabla 1* se detallan las aplicaciones más relevantes de estos compuestos.

Tabla 1: Aplicaciones de los ácidos grasos de cadena media obtenidos por bioprocesos de elongación (Venkateswar Reddy et al., 2020).

Aplicación	Descripción
Bioenergía	Se utilizan como precursores para la producción de biodiesel y combustibles de aviación. También pueden convertirse en alcoholes de mayor valor energético en procesos adicionales.
Producción de hidrógeno	Mejoran la producción de hidrogeno mediante procesos electro-hidrolíticos en celdas de corriente continua.
Producción de electricidad	Fuente de carbono en celdas de combustible microbianas (MFC) para liberar electrones que son captados por los cátodos de la celda mediante reacciones metabólicas de las colonias de bacterias.
Bioplásticos (mcl-PHAs)	Precursores para producir polihidroxialcanoatos de cadena media, con enfoque de utilización en empaques, medicina, ingeniería de tejidos y liberación de fármacos.
Aplicaciones clínicas	En la salud presentan un amplio uso por sus efectos antimicrobianos, eficacia para tratar trastornos gastrointestinales y neurodegenerativos, además de ser utilizados como solventes para vitaminas y fármacos orales.
Tratamiento de aguas residuales	Su uso como fuente de carbono para los microorganismos relacionados en el tratamiento de aguas residuales, ha demostrado un aumento en la eficiencia de la tasa de desnitrificación y en la eliminación de fósforo.

Los MCFAs más estudiados son los ácidos: caproico (C6), heptanoico (C7) y octanoico (C8), dentro de los cuales destaca su uso y producción en la industria el ácido caproico dada su factibilidad en la producción de combustibles de alto rendimiento (Venkateswar Reddy et al., 2020). Esta tendencia se refleja en el comportamiento del mercado global, donde alcanzó 240.1 millones de dólares para el año 2024 y se proyecta que alcance los 358.8 millones de dólares para el año 2030 (Global Industry Analysts, 2024).

Actualmente, la obtención de MCFAs se hace mediante la extracción de aceites vegetales (como el aceite de palma, coco o castor), pero generalmente estos métodos de extracción no utilizan solventes verdes y el porcentaje de recuperación de aceite es bajo, representando un 5-15% de la materia prima, haciéndolos inviables como métodos sustentables con el medio ambiente para su explotación (Venkateswar Reddy et al., 2020). Es por este motivo, que se ha planteado el mecanismo de elongación de cadenas como vía de valorización de AGVs y proceso alternativo para la producción de MCFAs. En la *figura 2* se esquematiza la inclusión de este proceso en el tratamiento de residuos orgánicos.



Figura 2: Esquema para el tratamiento de residuos orgánicos en la producción de ácidos grasos de cadena media. Traducido de: Wang, Yang, Cai, Zhang, Wu, Ma, Fu, Zhang, et al. (2023).

3. Elongación de cadenas

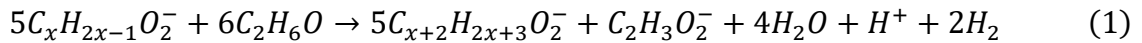
La elongación de cadenas es un tipo de digestión anaerobia, en la cual los AGVs provenientes de la acidogénesis de sustratos orgánicos, junto con compuestos dadores de electrones, producen ácidos grasos de cadenas de carbono más largas, como caproato, heptanoato y octanoato (Huo et

al., 2023). Los compuestos involucrados en el proceso son usados como sustrato por colonias microbianas para reacciones enzimáticas cíclicas conocidas como RBO (por su nombre en inglés: *reverse β – oxidations*) (Battista et al., 2024).

3.1. Mecanismo RBO

La reacción RBO requiere dos tipos de sustancias para su eficiente operación: dadores de electrones (DE) y aceptores de electrones (AE) (Wu et al., 2020). Por un lado, los AE son los AGVs producidos en la fase intermedia de la digestión anaerobia y, por el otro, los DE corresponden a lactato o etanol, los cuales son transferidos a las cadenas de los AE, elongando la longitud de los AGVs de a dos carbonos por cada ciclo (Venkateswar Reddy et al., 2020). En la *ecuación 1* se presenta la reacción RBO cuando se utiliza etanol como DE, en la cual se aprecia que, por cada 5 reacciones de elongación, se produce la oxidación de 1 mol de etanol en 1 mol de acetato (Roghair et al., 2018).

Vía de la reacción RBO:



Por esta vía de elongación, el etanol es particularmente crucial, puesto que se ha demostrado un aumento en el rendimiento de producción de caproato cuando se aumenta la concentración de etanol en el sistema (Huo et al., 2023).

3.2. Factores de elongación

La elongación de cadenas para la eficiente producción de MCFAs puede verse afectada o limitada por diversos factores, entre los más relevantes se encuentran: (1) la inhibición de reacciones competitivas, (2) control de pH y temperatura, (3) la proporción entre aceptores y dadores de electrones, (4) microorganismos utilizados y (5) tipo y origen del sustrato, las cuales se describirán en los puntos siguientes.

3.2.1. Reacciones competitivas

Al igual que en la digestión anaerobia, para producir AGVs eficientemente, es necesario inhibir la metanogénesis acetoclástica, la cual transforma el acetato del sistema en biogás mediante la acción de enzimas metanogénicas, disminuyendo la disponibilidad de este sustrato para ser utilizado en la elongación (Montecchio et al., 2024). Se han estudiado distintos métodos para aumentar el rendimiento del proceso, dentro de los cuales se encuentran los tratamientos térmicos, ácidos y/o alcalinos. Estos logran inhibir la producción de biogás redireccionando el flujo de carbono metabólico a la producción de MCFAs (Ji et al., 2022). Por otro lado, se ha demostrado como una alternativa eficaz en diversos procesos de elongación para la inhibición de las reacciones metanogénicas el uso del compuesto BES (2-Bromoetanosulfonato) cuando se utiliza en concentraciones de 10 g/l (Yin et al., 2017).

3.2.2. Temperatura y pH

Una de las formas más efectivas de inhibir la metanogénesis es mediante el control del pH, puesto que su supresión toma lugar en valores de pH mayores a 6 (Montecchio et al., 2024). Lo cual coincide con el eficiente proceso de elongación para colonias de bacterias mixtas, puesto que transcurre entre un rango de pH de 6,5 y 7,0 cuando se utiliza etanol como dador de electrones (Wang, Yang, Cai, Zhang, Wu, Ma, Fu, Zhang, et al., 2023).

Por otro lado, se ha reportado que la temperatura ideal de los microorganismos relacionados con la elongación se encuentra entre los 35 y 38°C, dadas sus características mesofílicas (Wang, Yang, Cai, Zhang, Wu, Ma, Fu, Zhang, et al., 2023). A pesar de esto, se ha reportado que la temperatura óptima de operación para el proceso de elongación en reactores con poblaciones microbianas mixtas es de 30°C (Angenent et al., 2016).

3.2.3. Razón DE:AE

Uno de los factores más influyentes para una óptima elongación de cadenas es la mantención de la razón entre los compuestos DE y AE. Diversos estudios han mostrado que una proporción DE:AE adecuada para el proceso es de 3:1 en un reactor que opera con etanol y acetato como sustratos, respectivamente (Chen et al., 2024). A pesar de que se sugiere un aumento en la proporción de los DE en el sistema para aumentar la eficiencia del proceso, Battista et al. (2024) sugiere no exceder una razón 10:1 para evitar reacciones oxidativas de etanol en el sistema. Por otro lado, en ese mismo estudio y considerando la producción de caproato en el sistema, se establece una razón de consumo teórico de etanol frente a los AGVs de 2:1, definiéndose ésta como razón mínima para llevar a cabo el proceso de elongación de cadenas (Battista et al., 2024).

3.2.4. Microorganismos

El proceso de elongación solo se puede llevar a cabo gracias a la existencia de microorganismos especializados que, mediante acciones enzimáticas, son capaces de transformar los AGVs en MCFAs. De estos, existen dos categorías principales: cultivos puros y mixtos.

Dentro de los microorganismos funcionales más estudiados en el proceso de elongación de cadenas se encuentran familias como: *Clostridium* (*Cl. khuyveri*; *Cl. sporosphaeroides*), *Megasphaera* (*M. elsdenii*), *Bacillus*, *Ruminococcaceae*, and *Caproiciproducens* (*Ca. galactilolivorans*) (Battista et al., 2024). Dentro de ellos, el que más se destaca por la profundidad en su estudio es *Clostridium khuyveri*, el cual fue el primero en encontrarse en la reacción RBO (Bevilacqua et al., 2022). Generalmente, se utilizan cultivos puros de bacterias para el estudio del proceso, sin embargo, el uso de cultivos de fermentación mixtos a menudo muestra mayores niveles de funcionalidad para degradar el sustrato (Ji et al., 2022). En una prueba en un reactor discontinuo, Reddy et al. (2018) logra alcanzar una concentración de 8,1 g/L de caproato utilizando cultivos mixtos con una dominancia microbiana de 50% de *Clostridium* y 14,2% de *Actinobacter*. En otra investigación, utilizando cultivos mixtos de lodo domesticado con principales presencias de los microorganismos *Romboutsia* y *Clostridium*, obtienen un máximo de producción de caproato de 169,76 mgDQO/gSV, lo cual equivale a una utilización del 65,43% de los residuos alimenticios usados como

sustrato (Wang, Fu, et al., 2023). Por otro lado, para cultivos puros de *Cl kluyveri* se obtuvo un rendimiento máximo de 8,42 g/L (Yin et al., 2017), valores similares obtenidos por Choi et al. (2013) en una digestión y posterior elongación de cadenas utilizando sacarosa como sustrato y cultivos puros de *Megasphaera elsdenii*, los cuales alcanzaron una producción máxima de $8,19 \pm 0,03$ g/L.

3.2.5. Alimentación

Los microorganismos para su correcto desempeño metabólico y crecimiento celular, requieren de una fuente de carbono como principal sustrato energético, además de una suplementación adecuada de macronutrientes (como nitrógeno, fósforo, potasio y azufre) y micronutrientes (como hierro, zinc, cobre y magnesio), los cuales son esenciales para el desarrollo biológico y las reacciones enzimáticas del proceso.

3.2.5.1. Medio mineral

La bacteria *Cl kluyveri* además de ser una de las familias bacterianas más estudiadas para procesos con cultivos puros, en investigaciones que utilizan cultivos mixtos, presenta una considerable predominancia microbiana (Angenent et al., 2016). Dado esto, se utilizan variaciones del medio mineral DSM-52, con ligeras modificaciones entre estudios, para suplementar a los microorganismos encargados de la elongación de cadenas que utilizan acetato y etanol como sustrato a pH neutro. Este medio, además de los macro y micronutrientes, contiene compuestos reductores y vitaminas para el correcto desarrollo metabólico de los microorganismos (Yin et al., 2017).

3.2.5.2. Fuente de carbono

La composición de la fuente de carbono en la alimentación del proceso es relevante para la reacción de elongación, puesto que contribuye en la eficiencia del sistema, además de la composición en los productos. Dado el mecanismo de la reacción de elongación, dependiendo del número de carbonos en la estructura de los ácidos grasos volátiles utilizados como sustratos, se producen MCFA pares (ácido caproico u octanoico) si se utiliza ácido acético e impares (ácido heptanoico), con ácido propiónico (Grootscholten et al., 2013). Además de la composición, la alimentación se puede distinguir por su procedencia: sintética y real.

Las fuentes sintéticas se refieren a la adición de compuestos de grado analítico o superior al sistema con el fin de estudiar de forma precisa la eficiencia del proceso, conversión y las rutas metabólicas implicadas en la elongación. Su uso permite disminuir la incertidumbre que pueden ocasionar reacciones alternas y/o posibles inhibiciones con alguno de los compuestos no deseados. Sin embargo, su uso se encuentra limitado a escala de laboratorio dado que no siempre representan condiciones reales de operación. Dependiendo del caso de estudio, se pueden utilizar diversos compuestos en la elongación, dentro de los que destacan: etanol y lactato como dadores de electrones y ácido acético, propiónico o butírico como aceptores de electrones, dependiendo del enfoque de la investigación (Liu et al., 2024). En la producción de MCFA en reactores semicontinuos sintéticos utilizando ácido acético y etanol como sustrato, Battista et al. (2024) logra

un rendimiento máximo de 9 – 12 (%p/p) para el estado estacionario, con una concentración de 14 – 17 (g_{DQO}/l) y 1,50 – 1,55 (g_{DQO}/l) para ácido caproico y octanoico, respectivamente.

Las fuentes reales, por otro lado, provienen de residuos orgánicos complejos, como los residuos alimenticios, los cuales contienen una mezcla de carbohidratos, proteínas y lípidos (Angenent et al., 2016). Estos residuos pueden ser utilizados directamente en procesos de elongación o someterse a pretratamientos, para la obtención de una materia prima rica en compuestos solubles como AGV, etanol y otros compuestos intermedios, que pueden ser aprovechados por los microorganismos durante el proceso de elongación. El uso de fuentes reales es más representativo con la realidad, permitiendo escalar de mejor forma los resultados a la industria (Liu et al., 2024). Battista et al. (2024), en la elongación de residuos orgánicos en reactores semicontínuos obtiene rendimientos de producción de MCFA de $25,17 \pm 1,65$ (%p/p) y $10,45 \pm 0,72$ (%p/p) utilizando concentrados de residuos alimenticios y residuos de suero de leche, respectivamente.

Dada la incipiente investigación en esta área, se estudiará el comportamiento de la elongación de ácidos grasos volátiles provenientes de una matriz sintética y una real, producida en una fase alterna de digestión anaeróbica en un reactor de lixiviación, con el fin de obtener una comprensión más detallada y precisa de los mecanismos y factores que influyen en la elongación, para así poder implementar en el futuro nuevas metodologías que faciliten la optimización y eficiencia del proceso a escala industrial.

3.3. Reactores

En los procesos de elongación de cadenas, la elección del tipo de reactor influye significativamente en la eficiencia y rendimientos del sistema. Las operaciones más comunes para procesos de elongación que utilizan sustratos pretratados (sintéticos o reales) son en reactores discontinuos, semicontínuos y continuos (Battista et al., 2024), cada uno con características particulares que afectan el comportamiento microbiano y acumulación de productos.

Los reactores discontinuos son sistemas cerrados donde se carga la mezcla de sustrato e inóculo, sin realizar alimentaciones ni extracciones hasta completar el ciclo del proceso. Aunque este tipo de reactores son útiles para ensayos a pequeña escala para estudiar el comportamiento y mecanismos de reacción de la elongación, suelen presentar limitaciones por la acumulación de los productos, inhibiendo total o parcialmente la reacción (Angenent et al., 2016).

Por otro lado, los reactores semicontínuos y continuos permiten una operación más estable mediante la renovación parcial del contenido del reactor en intervalos regulares o de forma constante, respectivamente. Estas cualidades permiten evitar la acumulación excesiva de los productos, favoreciendo el equilibrio microbiano y, así, el desempeño del sistema (Battista et al., 2024). Por lo tanto, con vistas para aplicaciones a escala piloto o industrial, el estudio de la operación de elongación en reactores continuos o semicontínuos representan una estrategia más adecuada para la optimización en la producción de ácidos grasos de cadena media, facilitando la integración de este proceso en proyectos reales de valorización de residuos. Dada estas cualidades,

en este estudio se implementará el uso de un reactor semicontinuo para la operación del proceso de elongación.

3.3.1. Variables operacionales de reactores semicontinuos

En los reactores semicontinuos, existen tres variables operacionales clave que influyen directamente en el rendimiento del sistema: la relación inóculo:sustrato, el tiempo de retención hidráulico (TRH) y la tasa de carga orgánica (OLR). Donde, el control y ajuste adecuado de estas variables permite optimizar la producción de ácidos grasos de cadena media, mejorar la eficiencia del sistema y adaptarlo a condiciones operativas reales.

3.3.1.1. Razón inóculo sustrato

En procesos de elongación de AGVs en sistemas semicontinuos, la relación inóculo:sustrato representa un parámetro crítico para asegurar una actividad microbiana eficiente y una producción estable de ácidos grasos de cadena media. En sustratos con material sólido, generalmente sin tratamiento digestivo previo, la razón inóculo:sustrato se mide en sólidos suspendidos volátiles y oscila entre valores de 6:1 (Wang, Fu, et al., 2023) y 2:1 (Liu et al., 2017), respectivamente. Sin embargo, dado el mecanismo específico de la elongación de cadenas, la cantidad de inóculo que se debe añadir para una eficiente reacción es relativo al tipo de microorganismos, su procedencia y la adaptación que presenta para este tipo de procesos (Agler et al., 2011).

3.3.1.2. Tiempo de retención hidráulico (TRH)

Tanto para procesos de digestión anaerobia, como en el proceso de elongación, el tiempo de retención hidráulico (*ec. 2*) se define como la razón entre el volumen del reactor (V_{rx}) y el caudal de alimentación (v_0), en otras palabras, es el tiempo promedio que el líquido procesado se encuentra dentro del reactor.

$$TRH (d) = \frac{V_{rx}}{v_0} \quad (2)$$

Los valores de TRH para procesos de elongación varían entre 4 a 60 días, dependiendo de la alimentación y microorganismos utilizados, sin embargo, se ha descrito que a mayores tiempos se obtienen mejores producciones de ácidos grasos de cadena media (Roghair et al., 2018). Battista et al. (2024) plantea el uso de 25 (d) para un eficiente proceso de elongación. Por otro lado, De la Fuente (2023), en el proceso de acondicionamiento biológico en un reactor continuo, utilizando el mismo inóculo de esta investigación, trabaja con tiempos de 14 (d).

3.3.1.3. Velocidad de carga orgánica (OLR)

La velocidad de carga orgánica (OLR, por sus siglas en inglés) se define como el flujo de sustrato por unidad de volumen del reactor (*ec. 3*). Este parámetro es fundamental para determinar la capacidad del reactor para el tratamiento de la alimentación.

$$OLR \left(\frac{g_c}{L \cdot d} \right) = \frac{C_0 \cdot v_0}{V_{rx}} \frac{1}{TRH} \sum C_{0i} \quad (3)$$

Generalmente, cuando se utiliza una alimentación rica en sólidos suspendidos, la concentración (C_0) se mide en gramos de sólidos suspendidos volátiles (SSV). De la Fuente (2023) utiliza una carga inicial de $2 g_{SSV}/l \cdot d$ para el acondicionamiento acidogénico del inóculo en un reactor continuo, aumentando la concentración gradualmente hasta $4 g_{SSV}/l \cdot d$. Puesto que en una alimentación con fuente de carbonos sintética no se ingresan sólidos al reactor, estos valores se pueden extrapolar con el aporte en gramos de carbono orgánico total (TOC) de cada compuesto (C_{0i} medido en g_c). Sin embargo, es necesario evaluar el comportamiento de los microorganismos y la producción de los ácidos de cadena media ante la fluctuación en la carga orgánica alimentada para ofrecer condiciones representativas y escalables en aplicaciones industriales.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo general

- Evaluar la factibilidad de producir ácidos grasos de cadena media a partir de mezclas de ácidos grasos volátiles de cadena corta producidos por la fermentación de residuos alimenticios.

2. Objetivos específicos

- Estudiar la elongación de ácidos grasos de cadena corta, a partir de una matriz sintética de ácido acético y etanol, en un reactor semicontinuo.
- Estudiar la elongación de ácidos grasos de cadena corta, provenientes de fermentación de residuos alimenticios, en un reactor semicontinuo.

III. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

El estudio del proceso de elongación se realiza mediante una metodología experimental de dos etapas principales (*figura 3*). La primera parte del procedimiento consiste en el montaje y operación de un reactor de lecho lixiviado (LBR) para la fermentación acidogénica de residuos alimenticios bajo condiciones anaerobias controladas. Este sistema permite obtener un lixiviado rico en AGVs de cadena corta, para ser utilizados como materia prima en uno de los reactores de elongación.

La segunda parte del estudio se enfoca en el proceso de elongación de cadenas en dos reactores semicontinuos que comparten configuración y condiciones operativas, pero con diferencias en la composición de su alimentación, en las cargas orgánicas aplicadas y tiempos de operación. Uno de los reactores emplea una matriz sintética compuesta por ácido acético y etanol, mientras que el otro utiliza la matriz real proveniente del lixiviado del LBR. La operación de ambos reactores permite evaluar la influencia del tipo de alimentación y las cargas orgánicas aplicadas en la eficiencia del proceso de elongación y producción de ácidos grasos de cadena media, particularmente de ácido caproico.

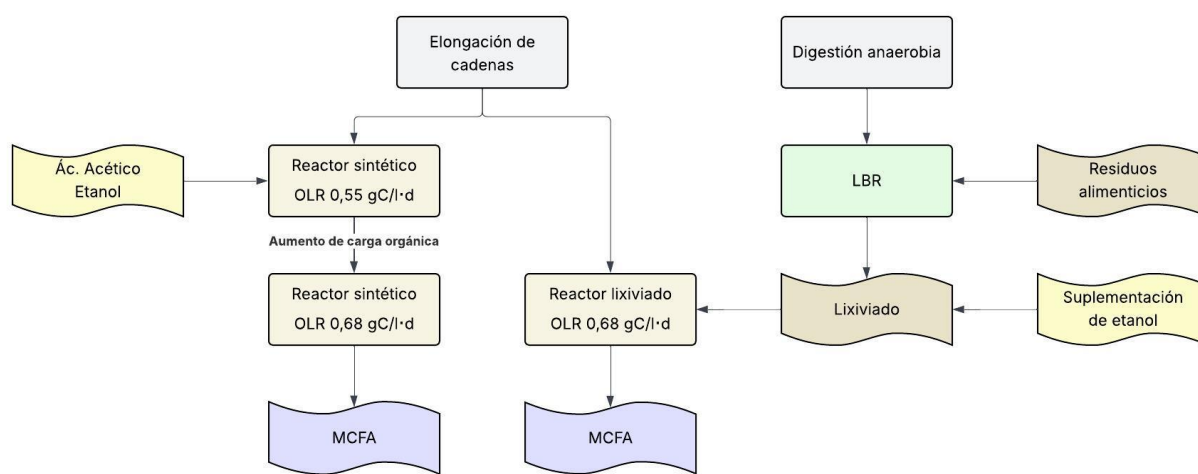


Figura 3: Diagrama del diseño experimental de la investigación.

1. Montaje del reactor de lecho lixiviado (LBR)

El montaje del LBR (*véase anexo A para el diagrama del montaje*), para la obtención del lixiviado rico en AGVs, se basa en la metodología descrita por De la Fuente (2023) para la fermentación acidogénica de residuos alimenticios (*véase anexo B para la caracterización de los residuos alimenticios*), en el cual se utiliza: un inóculo mixto proveniente de la planta de tratamiento Lesaffre con un pretratamiento térmico para suprimir la actividad de los microorganismos metanogénicos, controlador y regulador de pH configurado en 7,0, el uso de una cámara caliente configurada a una temperatura constante de 30°C y purga del sistema con nitrógeno gaseoso para asegurar un ambiente anaeróbico. El proceso de fermentación se opera de forma

discontinua durante un total de 10 días. En la *figura 4* se presenta el LBR montado en el laboratorio durante el proceso de lixiviación.

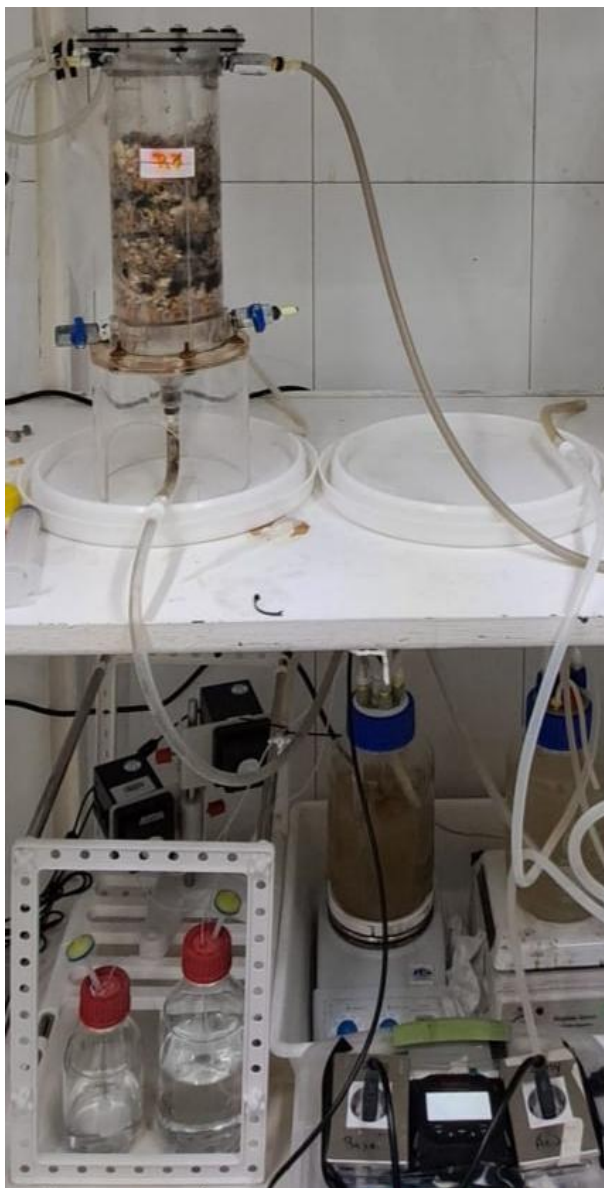


Figura 4: Reactor de lixiviación montado en el laboratorio.

La caracterización del lixiviado terminado el tiempo de fermentación se detalla en la *tabla 2*, la cual es utilizada para el cálculo y preparación posterior de la alimentación del reactor de elongación lixiviado.

Tabla 2: Caracterización del líquido lixiviado del LBR luego de 10 días de operación.

Compuesto	Valor	Unidad
Ácido acético	8241	<i>mg/l</i>
Ácido propiónico	2932	<i>mg/l</i>
Ácido isobutírico	302	<i>mg/l</i>
Ácido butírico	6540	<i>mg/l</i>
Ácido isovalérico	399	<i>mg/l</i>
Ácido valérico	743	<i>mg/l</i>
Ácido isocaproico	367	<i>mg/l</i>
Ácido caproico	1177	<i>mg/l</i>
Ácido heptanoico	2167	<i>mg/l</i>
Etanol	3820	<i>mg/l</i>
TOC	15,18	<i>g_C/l</i>

2. Elongación

La siguiente parte del procedimiento y enfoque de esta memoria de investigación consiste en la operación del proceso de elongación en dos reactores semicontinuos con diferencias en su alimentación: uno trabaja con una matriz sintética compuesta de ácido acético y etanol, mientras que el otro; con una matriz real proveniente del lixiviado del LBR, suplementado con etanol para alcanzar la proporción 3:1 entre etanol y la mezcla de AGVs de cadena corta. Además de la diferencia en la composición de la alimentación (*véase tabla 6 para detalle de composiciones*), ambos rectores operan a distintas cargas orgánicas. Por un lado, el reactor de alimentación sintética opera dos ciclos a una carga orgánica constante OLR 1, para luego ser operado dos ciclos más a una carga OLR 2 (considerando un aumento en la concentración de la alimentación de 25%). Por otro lado, el reactor de lixiviado solo operó por dos ciclos a la segunda carga del reactor sintético. En la *tabla 3* se presentan las diferencias de cargas orgánicas en la alimentación y tiempos para cada uno de los reactores y el detalle de las variables controladas en la operación.

Tabla 3: Variables controladas en la operación de los reactores de elongación

Reactor	Volumen del reactor (L)	Caudal de Entrada y Salida (ml/d)	OLR ($g_c/l \cdot d$)	Tiempo (d)	Operación
Sintético OLR 1	1,0	167	0,55	31	- pH 7,0 - Temperatura 30°C - TRH 14 días - Agitación 150 rpm - Alimentación tres veces por semana (L-Mi-V) - Ambiente anaerobio (purga con nitrógeno)
Sintético OLR 2	0,4	67	0,68	30	
Lixiviado	1,0	167	0,68	28	

En el reactor de alimentación sintética, terminada su operación a la primera carga orgánica, se reduce su volumen de 1 a 0.4 litros para la utilización de los microorganismos acondicionados en una investigación paralela sobre el proceso de elongación. Es importante señalar este evento por la posible fluctuación en los resultados analizados para este día en particular.

Dentro de las variables descritas en la *tabla 3*, se manipuló: el caudal de alimentación y salida, pH y, en caso de ser requerido, purga con nitrógeno para asegurar las condiciones anaerobias del sistemas. La temperatura es controlada por el uso de una cámara caliente y la agitación por medio de un agitador magnético (*véase figura 5*).

2.1. Montaje de los reactores de elongación

El proceso de elongación se lleva a cabo en reactores de vidrio herméticos de 1 litro de volumen útil. El interior del reactor se mantiene homogéneo y temperado por medio de un agitador magnético seteado a 150 rpm y por el uso de una cámara caliente configurada a 30°C constantes, además de contar con un sistema de medición y purga de gases. Adicionalmente, se cuenta con un único conducto por el cual se efectúa la alimentación y muestreo de los reactores, tal como se muestra en la *figura 5*.

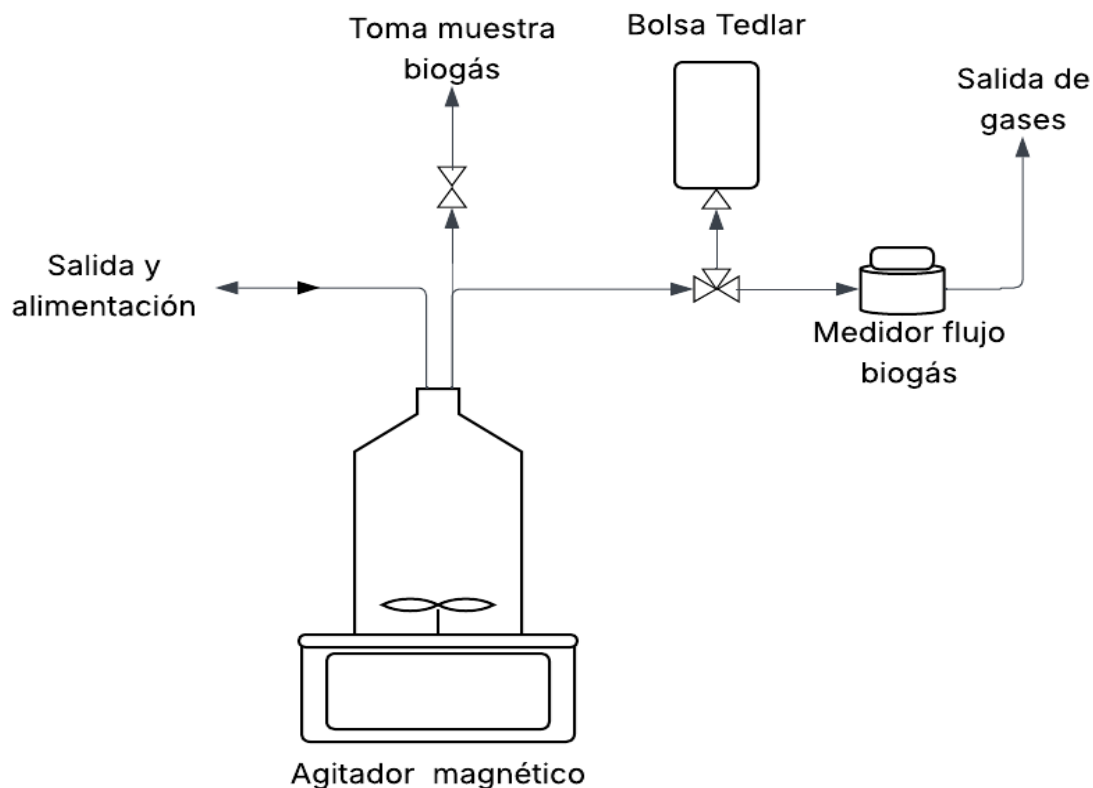


Figura 5: Sistema experimental de los reactores de elongación.

Una vez configurado el sistema, se procede a la preparación del contenido de los reactores. Como se menciona en el punto anterior, tanto la elongación sintética como la de lixiviado disponen de iguales condiciones de montaje, considerando un volumen total de 1 litro y una alimentación sintética de acetato de sodio y etanol como fuentes de carbono. En la *tabla 4* se detalla la preparación para el montaje de los reactores.

Tabla 4: Componentes para el montaje de los reactores de elongación. (*) Solo para el caso de lixiviado con el fin de suprimir reacciones metanogénicas indeseadas (Yin et al., 2017).

Detalle	Reactor sintético	Reactor lixiviado
Volumen de reactor	1 L	1 L
Etanol absoluto	7,0 ml	7,0 ml
Acetato de sodio	3,27 g	3,27 g
Medio mineral	350 ml	350 ml
Inóculo pretratado	10 g _{SSV}	12,5 g _{SSV}
BES*	—	10 g

La diferencia entre la cantidad de inóculo añadido inicialmente es proporcional a la carga orgánica de la alimentación a tratar en la operación de cada reactor, la cual es un 25% mayor para el caso lixiviado respecto al sintético.

Luego de verter y ajustar el pH a 7.0, se sellaron los reactores herméticamente, además todas las líneas de gases fueron purgadas con nitrógeno con el fin de asegurar el ambiente anaerobio.

El montaje final de los reactores se muestra en la *figura 6*, donde el reactor de la imagen de la izquierda corresponde al alimentado sintéticamente a la primera carga orgánica. En la segunda imagen, de izquierda a derecha se observan los reactores lixiviado y sintético, luego del aumento de la carga orgánica. De este último, es posible notar la disminución de volumen declarada anteriormente.



Figura 6: Montaje de los reactores de elongación. De izquierda a derecha: sintético OLR 1, lixiviado y sintético OLR 2.

2.1.1. Pretratamiento térmico del inóculo

El inóculo fresco, siguiendo la metodología descrita por De la Fuente (2023), se trata térmicamente a 75°C por 15 min en un baño termostático. Este pretratamiento se realiza con la finalidad de inhibir a los microorganismos metanogénicos (Ma et al., 2021).

Al igual que en el montaje del LBR y manteniendo las relaciones de sustrato:inóculo descritas por De la Fuente (2023), se añaden 50,05 y 68,81 gramos del inóculo pretratado para alcanzar una concentración de 10 g_{SSV}/l y 12,5 g_{SSV}/l en los reactores sintético y lixiviado, respectivamente. (véase anexo C, para caracterización del inóculo).

2.2. Alimentación y muestreo

La alimentación de los reactores se realiza, primero cerrando todas las válvulas de gas para evitar la entrada de oxígeno al sistema. Luego, con la ayuda de una jeringa de 50 ml y una probeta, se extrae el volumen necesario para mantener el tiempo de retención hidráulico de 14 días (véase tabla 3). Por otro lado, se debe medir el mismo volumen extraído del alimento, respectivo para cada uno de los reactores, y ser inyectado por el mismo conducto, evitando el ingreso de aire externo en cada uno de los pasos descritos. Este proceso de alimentación y, consecuente muestreo, se repite tres veces por semana: lunes, miércoles y viernes. Los distintos tipos de análisis que se realizan se efectúan los mismos días de muestreo, a excepción de los SST/SSV. A su vez, la alimentación también es analizada, pero con una menor frecuencia (tabla 5).

Tabla 5: Días de muestreo para la salida y alimentación de los reactores.

	Salida de reactor			Alimentación		
Análisis	Lunes	Miércoles	Viernes	Lunes	Miércoles	Viernes
pH	X	X	X			
SST/SSV	X		X			
TOC/TN	X	X	X	X		X
AGV	X	X	X	X		X
AGCM	X	X	X	X		X
Etanol	X	X	X	X		X

Una vez alimentado los reactores y analizado sus respectivos pH, se procede a tomar una pequeña porción de estos, procurando mantener la hermeticidad del sistema, para ajustar manualmente el pH con soluciones 2 N de NaOH y 1 N de HCl. Finalmente, se reintegra la porción extraída una vez alcanzado un valor de $7,0 \pm 0,1$. En el caso de que se identifique una entrada de aire al sistema, se purga con nitrógeno mediante la bolsa Tedlar.

2.3. Sustrato

El sustrato con el cual se alimentan ambos reactores consiste de la fuente de carbono (véase tabla 6), respectiva para cada uno de los reactores (sintético y lixiviado), con la adición de macro y

micronutrientes, provisionada por el *Medio mineral DSM-52* (véase tabla 7). Esta preparación, con el fin de abastecer continuamente el proceso de elongación y asegurar la menor desviación en la carga orgánica, se prepara con una periodicidad de 14 días. Una vez preparado, se ajusta el pH a $7,0 \pm 0,1$.

2.3.1. Fuente de carbono

Las fuentes de carbono para el caso sintético consisten en etanol y ácido acético, los cuales deben cumplir con la carga orgánica descrita en la *tabla 3*, además de la razón 3:1 mol:mol entre Etanol y AGV, respectivamente. La masa de etanol (m_{EtOH}) y de ácido acético (m_{AA}) que se deben añadir a la alimentación, considerando un volumen de 1 litro de preparación (V_{Al}), se debe relacionar con el tiempo de retención hidráulica (TRH) junto con la carga orgánica respectiva a cada reactor (OLR) de acuerdo a lo descrito en la *ecuación 5*. La relación se hace respecto a gramos de carbono, por lo que es necesario introducir el factor de conversión K_i para cada uno de los compuestos i (véase *ec. 4*). Por otro lado, se considera la relación estequiométrica que deben tener ambos compuestos para fomentar la elongación (*ec. 6*). Es importante recalcar que el ácido acético se añade como acetato de sodio sólido y el etanol en líquido, utilizando su densidad (véase *anexo D*), como etanol absoluto, ambos de grado analítico. A continuación, se presentan las ecuaciones mencionadas:

$$K_i \left(\frac{g_c}{g_i} \right) = R_i \left(\frac{mol_c}{mol_i} \right) \cdot \frac{PM_c \left(\frac{g_c}{mol_c} \right)}{PM_i \left(\frac{g_i}{mol_i} \right)} \quad (4)$$

Donde R_i corresponde a la cantidad molar de átomos de carbono que presenta en su estructura cada compuesto i , asimismo, el término PM_i corresponde a su respectivo peso molecular de cada uno de los compuestos (véase *anexo D* para los valores utilizados para cada uno de los compuestos).

$$OLR \left(\frac{g_c}{l \cdot d} \right) \cdot HRT(d) \cdot V_{Al}(l) = m_{EtOH} \cdot K_{EtOH} \left(\frac{g_c}{g} \right) + m_{AA}(g) \cdot K_{AA} \left(\frac{g_c}{g} \right) \quad (5)$$

$$3 \frac{m_{AA}(g)}{PM_{AA} \left(\frac{g}{mol} \right)} = \frac{m_{EtOH}(g)}{PM_{EtOH} \left(\frac{g}{mol} \right)} \quad (6)$$

Homológamente, se realizan los mismos dos planteamientos para el caso del reactor de elongación de lixiviado (*ec. 7 y 8*), con el fin de establecer la correcta proporción a añadir de lixiviado (V_{Lix}) y etanol a suplementar (m_{Et}). Sin embargo, a diferencia del reactor sintético, en ambas relaciones se utilizan la concentración de los AGV y etanol caracterizados del LBR ($C_{i,Lix}$) para la preparación de la alimentación. Al igual que en el caso anterior, el etanol suplementado se añade como etanol absoluto de grado analítico.

$$OLR \left(\frac{g_c}{l \cdot d} \right) \cdot HRT(d) \cdot V_{Al}(l) = m_{EtOH} \cdot K_{EtOH} \left(\frac{g_c}{g} \right) + \sum_i^{AGV, EtOH} C_{i,Lix} \left(\frac{g}{l} \right) \cdot V_{Lix}(l) \cdot K_i \left(\frac{g_c}{g} \right) \quad (7)$$

$$3 \sum_i^{AGV} \frac{C_{i,Lix} \left(\frac{g}{l} \right)}{PM_i \left(\frac{g}{mol} \right)} \cdot V_{Lix}(l) = \frac{m_{Et}(g) + C_{Et,Lix} \left(\frac{g}{l} \right) \cdot V_{Lix}(l)}{PM_{Et} \left(\frac{g}{mol} \right)} \quad (8)$$

Tomando en consideración lo descrito anteriormente, se resuelve el sistema de ecuaciones para cada una de las alimentaciones de los reactores (*véase anexo E para el resultado de la preparación*). Se presentan en la *tabla 6* las concentraciones calculadas de los ácidos y etanol dentro de los recipientes de alimentación luego de la adición de los componentes.

Tabla 6: Concentraciones de los ácidos y etanol dentro de los recipientes de alimentación.

Compuesto (<i>mg/l</i>)	Sintético <i>OLR 1</i>	Sintético <i>OLR 2</i>	Lixiviado <i>OLR 2</i>
Ácido acético	4781	5976	2761
Ácido propiónico	-	-	982
Ácido isobutírico	-	-	101
Ácido butírico	-	-	2191
Ácido isovalérico	-	-	134
Ácido valérico	-	-	249
Ácido isocaproico	-	-	123
Ácido caproico	-	-	394
Ácido heptanoico	-	-	726
Etanol	11002	13753	12302

2.3.2. Medio mineral

Además de la fuente de carbono, se necesita un medio mineral que provea de los nutrientes esenciales para el correcto desarrollo de los microorganismos. Se decide trabajar con el medio mineral DSM 52, que a pesar de ser específico para la bacteria *Clostridium kluyveri*, presenta un amplio uso en similares procesos de elongación, con adaptaciones particulares para cada caso que se estudia (Angenent et al., 2016).

La formulación del medio presenta ligeras variaciones al recomendado por *The Leibniz Institute DSMZ* (*véase tabla 7*), dentro de las cuales se encuentran: la exclusión de las fuentes de carbono, por ser añadidas particularmente a cada una de las alimentaciones; modificación en algunos de los reactivos por versiones más o menos hidratadas que se encontraban en el laboratorio y, finalmente, la supresión total de las vitaminas con fin de generar un ambiente empobrecido, más similar a lo que sería en procesos reales.

Tabla 7: Medio mineral DSM 52 (*) véase anexo F para detalle de elementos traza.

Compuesto	Dosificación
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,41 g
KH_2PO_4	0,23 g
NH_4Cl	0,25 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Elementos traza*	1 ml
Extracto de levadura	1 g
Na_2CO_3	1 g
$L - Cysteine HCl \cdot H_2O$	0,25 g
$Na_2S \cdot H_2O$	0,10 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7,0 (Ajustado con NaOH y HCl)

Por otro lado, la adición de este medio, con fin de ser concordante a los requerimientos de los microorganismos, se hace relativo a la proporción de etanol. Considerando una razón de 50.16 mililitros del medio mineral por cada mililitro de etanol que se añada, tanto al montaje como a la preparación de las alimentaciones.

3. Técnicas y análisis

Las técnicas analíticas mencionadas en la *tabla 5*, se describen detalladamente en cada uno de los siguientes apartados, así como los respectivos cálculos inherentes de la técnica utilizada, según se requiera. Posteriormente, se presentan ecuaciones para el cálculo de rendimientos y productividad para una mayor comprensión de los resultados.

3.1. pH

La medición y ajuste de pH para los reactores elongación se realizaron en un pH-metro marca OHAUL modelo Starter2100 utilizando un sensor de pH marca Hanna modelo HI1230b, además de una placa de agitación magnética.

3.2. Sólidos suspendidos totales y volátiles

Puesto que los sólidos suspendidos presentes en los reactores de elongación provienen esencialmente del inóculo, se analizan los sólidos totales y volátiles en las muestras extraídas para estimar el comportamiento de los microorganismos dentro de los reactores. Los análisis se realizaron bajo el modelo estándar para aguas residuales de la “*American Publics Health Association*” (APHA, 1998).

Para los sólidos suspendidos totales, primero se masa un crisol (M_C) y filtro de fibra de vidrio (M_F) para; con la ayuda de este último, un matraz Kitasato y una bomba de vacío, separar la fase sólida de la líquida del volumen de muestra extraído de los reactores (V_M). Este volumen de muestra varía

a lo largo de la experimentación entre 2 y 15 ml, intentando lograr siempre una saturación total del filtro. Las muestras filtradas, en conjunto con sus crisoles, son secadas en una estufa marca Raypa modelo DO-90 a 105°C por 24 horas. La concentración de los sólidos suspendidos totales (SS_T) se determina mediante la siguiente ecuación:

$$SS_T \left(\frac{g}{l} \right) = \frac{M_S(g) - M_C(g) - M_F(g)}{V_M(l)} \quad (9)$$

Posterior a la medición de la muestra seca proveniente de la estufa (M_S), esta se calcina en una mufla marca Thermolyne model Type F6000 Furnace por 12 horas, para así calcular los sólidos suspendidos volátiles (SS_V) con este valor de masa incinerada (M_I) y el mismo volumen de muestra del punto anterior (V_M) de acuerdo a la expresión:

$$SS_V \left(\frac{g}{l} \right) = \frac{M_S(g) - M_I(g)}{V_M(l)} \quad (10)$$

Es importante recalcar que el muestreo se realiza en duplicado, donde el resultado que se presenta es el promedio, con su respectiva desviación, de ambas mediciones. Por otro lado, las mediciones se efectúan una vez atemperadas las muestras, secas o calcinadas, en recipientes desecadores.

3.3. Carbono orgánico total

Se considera relevante para el estudio la medición de la cantidad de carbono orgánico total (TOC) dentro de las muestras, los cuales son analizados en el equipo Analytikjena modelo TOC multi N/C 3100, además del nitrógeno total (TN), carbono inorgánico (IC) y carbono total (TC). Las muestras, antes de ser ingresadas al equipo, deben ser filtradas por un filtro de poros de 0.45 μm para preparar, en un matraz de aforo, una dilución de 1:20 tanta para la alimentación como salida de los reactores. Finalmente, la solución es depositada en tubos TOC para ser ingresadas al equipo.

Como ambos reactores poseen un comportamiento semi continuo, la remoción de TOC para un particular día de muestreo i se calcula considerando esa respectiva salida ($TOC_{Salida,i}$) con la alimentación del muestreo anterior ($TOC_{Alimento,i-1}$), tal como se muestra en la ecuación 11.

$$Remoción_{TOC,i} = \frac{TOC_{Alimento,i-1} - TOC_{Salida,i}}{TOC_{Alimento,i-1}} \quad (11)$$

3.4. Análisis cromatográficos de los compuestos

Se realizan dos tipos de análisis cromatográficos para la cuantificación de los compuestos involucrados en la elongación. Por un lado, se utiliza el equipo de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC, por sus siglas en inglés) de marca Agilent Technologies modelo 1260 Infinity. Este equipo se utiliza para la cuantificación de ácido propiónico (AP), butírico (AB) y etanol (EtOH) al utilizar un detector ultravioleta de 37 a 210 nm según el método de De Sá et al. (2011), además de detectar otros de los ácidos grasos volátiles, fructosa y glucosa.

Por otro lado, se utiliza un equipo de cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) que emplea una mezcla de gases inertes para el arrastre y volatilización de la muestra, la cual es llevada a una columna de separación con un detector de llama ionizado (Liu et al., 2017). El análisis en este equipo permite la cuantificación de los ácidos acético (AA), isobutírico (AIB), isovalérico (AIV), valérico (AV), isocaproico (AIC), caproico (AC) y heptanoico (AH).

Las muestras deben ser preparadas antes de ingresarlas a los equipos para su correcto análisis. Primero, se pasa por un filtro de $0.22 \mu m$ de poro para luego ser diluidas en un matraz de aforo a razón 1:10. Finalmente, son almacenadas en viales de $1 ml$, junto a una microgota de ácido ortofosfórico para su correcta conservación.

Utilizando los resultados cromatográficos de las composiciones para cada sistema, es posible calcular el aporte equivalente en base a carbono orgánico (TOC_{eq}) para, junto con la medición respectiva de TOC (TOC_M), estimar el porcentaje de diferencias o error en las muestras (δTOC), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\delta TOC = \frac{TOC_M - TOC_{eq}}{TOC_M} \quad (12)$$

Se asumen valores positivos de este error como compuestos no identificados por los métodos cromatográficos y valores negativos de éste como sobreestimación de alguno de los compuestos presentes. Es importante recalcar que el cálculo de este error no se puede atribuir particularmente a ninguno de los equipos involucrados, sin embargo, si presenta relevancia al momento de estimar las desviaciones en el cálculo posterior de rendimientos para cada uno de los reactores.

3.5. Cálculo de rendimientos

Los resultados de las técnicas analíticas presentadas permiten dilucidar el comportamiento de los reactores a través de sus respectivos días de operación. Sin embargo, para un correcto y robusto análisis es necesario establecer parámetros de rendimientos y productividad que permitan la comparación entre ambos sistemas utilizados, además de contrastar los resultados con investigaciones relacionadas.

3.5.1. Razón estequiométrica EtOH:AGV en la alimentación

El primer factor importante por evaluar es la correcta razón estequiométrica entre etanol y ácidos grasos volátiles en la alimentación de los reactores. Esta razón se debe mantener en valores cercanos a 3: 1 (mol/mol) para EtOH:AGV, respectivamente (Yin et al., 2017), la cual se calcula mediante las concentraciones obtenidas por los métodos cromatográficos de la alimentación, de acuerdo a la ecuación 13.

$$EtOH:AGV|_{Al} \left(\frac{mol}{mol} \right) = \frac{C_{EtOH}/PM_{EtOH}}{\sum C_i/PM_i} ; i \in \{AA, AP, AIB, AB, AIV, AV\} \quad (13)$$

Es importante recalcar que, para el caso sintético, el ácido acético es el único AGV presente en la alimentación, por lo que la suma de los ácidos grasos volátiles corresponde solo a la caracterización de este compuesto.

3.5.2. Rendimiento y Selectividad del reactor sintético

Puesto que la alimentación del reactor sintético se basa en etanol y ácido acético como sustrato para la reacción de elongación, sin compuestos que puedan alterar el proceso como en el caso del reactor lixiviado, se calculan rendimientos molares de producción y selectividad de los dos productos cuantificados por los métodos cromatográficos: ácido butírico y ácido caproico, para estimar el comportamiento y mecanismo de la elongación en este sistema sin interferentes.

3.5.2.1. Rendimiento de producción

El etanol añadido al reactor, dada la razón estequiométrica en la alimentación, se encuentra en exceso respecto a la otra fuente de carbono: ácido acético (Yin et al., 2017), por lo que se considera este último como reactivo limitante para el cálculo de los rendimientos de producción. En la *ecuación 14* se presenta el cálculo para los rendimientos de ácido butírico ($Y_{AB/AA}$) y caproico ($Y_{AC/AA}$), los cuales son la razón molar entre el compuesto producido y el ácido acético consumido para cada día particular.

$$Y_{i/AA} \left(\frac{mol}{mol} \right) = \frac{\Delta C_i / PM_i}{-\Delta C_{AA} / PM_{AA}}; i \in \{AB, AC\} \quad (14)$$

La diferencia de concentración de cada compuesto (ΔC_i) corresponde a la concentración a la salida del reactor para un día particular, menos la concentración de ese compuesto en la alimentación del día previo.

3.5.2.2. Selectividad de los productos

El cálculo de los rendimientos de producción para el ácido butírico ($Y_{AB/AA}$) y caproico ($Y_{AC/AA}$) permiten establecer el indicador de selectividad entre ambos compuestos ($S_{AC/AB}$), de acuerdo a la *ecuación 15*, la cual describe la preferencia del sistema para la formación de alguno de estos compuestos a lo largo de la experimentación.

$$S_{AC/AB} \left(\frac{mol}{mol} \right) = \frac{Y_{AC/AA}}{Y_{AB/AA}} \quad (15)$$

Valores superiores a 1 (mol/mol) suponen una disposición a la formación de ácido caproico en el reactor, en caso contrario, al ácido butírico.

3.5.3. Rendimiento del consumo de etanol

Otro factor relevante por evaluar es la proporción estequiométrica entre consumo de etanol y producción de ácido caproico, la cual debiese rondar valores teóricos de 2:1 entre EtOH:AC, respectivamente (Battista et al., 2024). Este cálculo (*ec. 16*), contrario a los rendimientos de

producción del inciso anterior, se estima por la razón entre el consumo de etanol y la producción de ácido caproico en el sistema.

$$Y_{EtOH/AC} \left(\frac{mol}{mol} \right) = \frac{-\Delta C_{EtOH}/PM_{EtOH}}{\Delta C_{AC}/PM_{AC}} \quad (16)$$

El cálculo de este factor se realiza a ambos reactores y permite establecer relaciones teóricas en la elongación para ambos sistemas.

3.5.4. Rendimiento de la alimentación

Es relevante evaluar el rendimiento de la alimentación para la producción de ácido caproico ($Y_{AC/TOC_{Al}}$), la cual es la razón entre el flujo de producción de ácido caproico y el flujo de alimentación, ambos medidos en carbono orgánico equivalente (*ec. 17*). El flujo de producto se calcula como la producción de ácido caproico (ΔC_{AC}), junto a su respectiva conversión de unidades (K_{AC}), multiplicado por el caudal de salida (v), según corresponda para cada sistema (*véase tabla 3*). Por otro lado, el flujo de alimentación se estima con la cantidad medida de carbono orgánico total alimentada (TOC_{Al}) el día anterior al que se quiere evaluar, multiplicado por el caudal de alimentación (v_0).

$$Y_{AC/TOC_{Al}} \left(\frac{g_C}{g_C} \right) = \frac{\Delta C_{AC} \cdot K_{AC} \cdot v}{TOC_{Al} \cdot v_0} = \frac{\Delta C_{AC} \cdot K_{AC}}{TOC_{Al}} \quad (17)$$

3.5.5. Productividad del inóculo

Se establece la *ec. 18* para describir la productividad del inóculo (P_{AC/SS_V}) en la producción de ácido caproico, la cual relaciona el flujo de producción de ácido caproico por los gramos de microorganismos, medido en sólidos suspendidos volátiles (SS_V), dentro del reactor.

$$P_{AC/SS_V} \left(\frac{g}{g \cdot d} \right) = \frac{\Delta C_{AC} \cdot v}{SS_V \cdot V_{rx}} = \frac{\Delta C_{AC}}{SS_V \cdot TRH} \quad (18)$$

Dado que la alimentación para ambos reactores se encuentra filtrada y que los sólidos suspendidos medidos corresponden esencialmente al inóculo añadido al comienzo de la operación, se estima la proporcionalidad de los sólidos suspendidos volátiles como los microorganismos involucrados en el sistema, con el fin de cuantificar la adaptación y eficiencia de estos en el proceso de elongación de esta investigación.

Por otro lado, se incluye el error asociado a este cálculo ($\delta P_{AC/SS_V}$) en la *ec. 19*, referente a la propagación de errores de la medición de los sólidos suspendidos (δSS_V):

$$\delta P_{AC/SS_V} = P_{AC/SS_V} \cdot \frac{\delta SS_V}{SS_V} \quad (19)$$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan y analizan los principales resultados obtenidos durante la operación de los reactores semicontinuos en el proceso de elongación de ácidos grasos volátiles de cadena corta para la producción de ácidos grasos de cadena media, con énfasis en el ácido caproico como producto principal.

Se presentan los resultados, en primer lugar, para la operación del reactor sintético considerando ambos periodos de operación (OLR 1 y 2), en la cual se evalúan sus respectivos estados estacionarios y máximos valores alcanzados para, posteriormente, analizar los rendimientos de producción específicos de cada compuesto involucrado en la elongación, así como la selectividad de éstos en el sistema.

En el segundo apartado se presentan y analizan los resultados del reactor lixiviado, considerando el impacto de usar una matriz de alimentación real para la reacción de elongación para, finalmente discutir el rendimiento y productividad de ambos reactores para la producción de ácido caproico, permitiendo así identificar las ventajas, limitaciones y posibles mejoras de cada tipo de alimentación y carga orgánica aplicada.

1. Reactor sintético

1.1. Monitoreo de pH

De acuerdo a la metodología, se realiza el monitoreo y ajuste de pH periódicamente al reactor sintético (véase figura 7). Dada la reacción de oxidación del etanol en acetato, inherente al proceso de elongación por el mecanismo RBO, se observa una tendencia de acidificación del pH (Roghair et al., 2018). Esta tendencia se observa con mayor intensidad los primeros días de operación, alcanzando un pH mínimo de 5,8 para el día 7, para revertirse desde el día 14 al 19, mostrando un máximo de 7,4. A pesar de este aumento, el pH tiende a estabilizarse al término de su segundo tiempo de residencia. Al aumentar la carga orgánica en el día 33, el reactor tiende nuevamente a la acidificación, para disminuir esta tendencia al final de su operación. Considerando el tiempo total de operación, el reactor se mantuvo en un valor de pH medio de $6,8 \pm 0,4$, rango en el cual se propicia la elongación de los ácidos (Wang, Yang, Cai, Zhang, Wu, Ma, Fu, & Zhang, 2023).

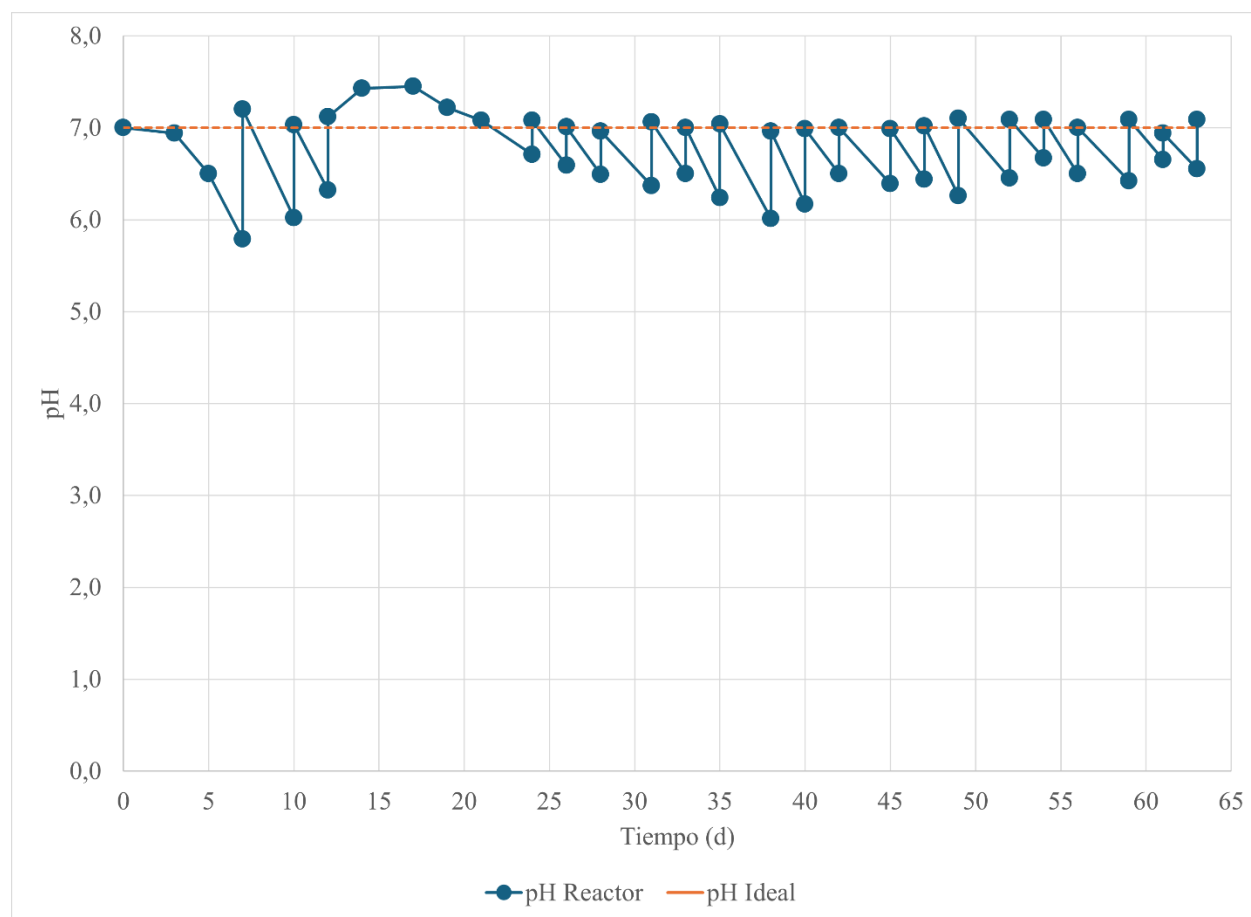


Figura 7: Monitoreo de pH de reactor sintético.

1.2. Sólidos Suspendedos

En la *figura 8* se presenta el comportamiento de los sólidos suspendidos a lo largo de todo el periodo experimental del reactor sintético. En este, es posible notar un decrecimiento importante en los primeros 20 días, alcanzando un valor relativamente constante cercano al término de su segundo tiempo de residencia de $2,4 \pm 0,3 \text{ g/l}$ y $2,2 \pm 0,3 \text{ g/l}$, para los sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV), respectivamente. Además, se observa que ambas curvas convergen a valores similares, lo cual supone la correspondencia entre microorganismo y sólidos suspendidos volátiles. Por lo que, el decrecimiento sustancial de estos sólidos se puede traducir en una adaptación forzosa de los microorganismos al proceso de elongación.

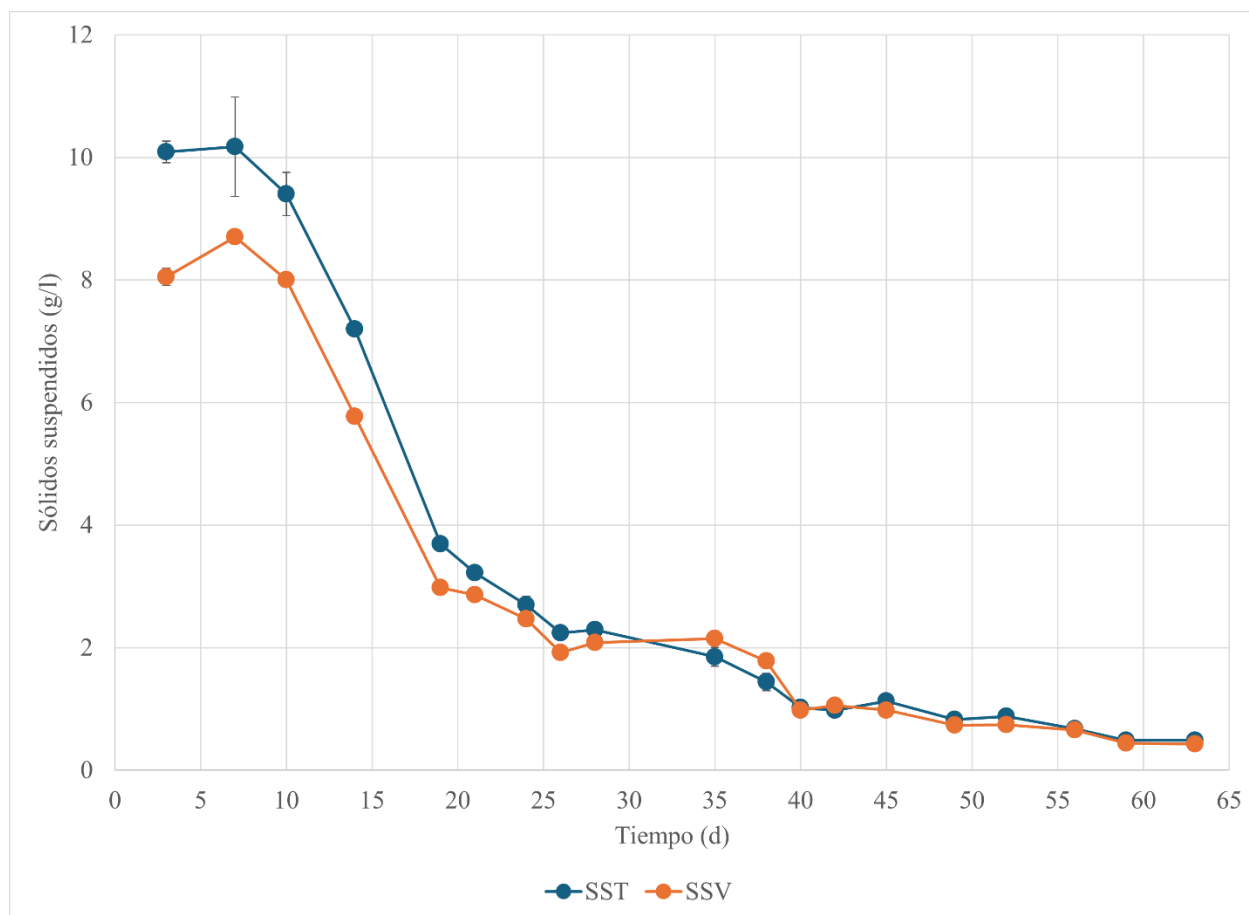


Figura 8: Sólidos suspendidos del reactor sintético.

Por otro lado, luego de la disminución del volumen del reactor y aumento en la OLR en el día 33, se observa un aumento de los sólidos suspendidos volátiles en los primeros días de operación a esta nueva condición, no así de los sólidos suspendidos totales. Esto sugiere la incurrancia de errores en el cambio de reactor y/o en las mediciones de los sólidos. La convergencia de los sólidos totales y volátiles se alcanza en el día 40 con ligeras fluctuaciones, para mantenerse en un decrecimiento constante hasta el fin de la operación en valores medio de $0,8 \pm 0,1 \text{ g/l}$ y $0,71 \pm 0,05 \text{ g/l}$ para los sólidos totales y volátiles, respectivamente.

El decrecimiento constante de los sólidos en el reactor sin lograr una total estabilización, sugiere efectuar un aumento del tiempo de retención hidráulico para otorgar el tiempo suficiente para la regeneración de las colonias bacterianas implicadas en el proceso. Además, de acuerdo al estudio de elongación de cadenas en reactores de agitación continua realizado por Roghair et al. (2018) concluye que a mayores TRH se obtienen mayores producciones de ácido caproico.

1.3. Alimentación

En la *figura 9* se presenta la composición y el aporte equivalente de carbono orgánico total del monitoreo de la alimentación para el reactor sintético. Considerando el primer periodo operativo del proceso entre los días 3 al 28, la alimentación ronda valores de $8500 \pm 775 \text{ mg/l}$ para etanol y $4333 \pm 691 \text{ mg/l}$ para ácido acético, correspondiendo a una razón estequiométrica EtOH:AGV de $2.7 \pm 0.5 \text{ (mol/mol)}$, dentro del rango ideal establecido para la elongación 3:1 (Yin et al., 2017). Ambos compuestos representan un aporte medio de carbono total equivalente de $6,2 \pm 0,6 \text{ gC/l}$.

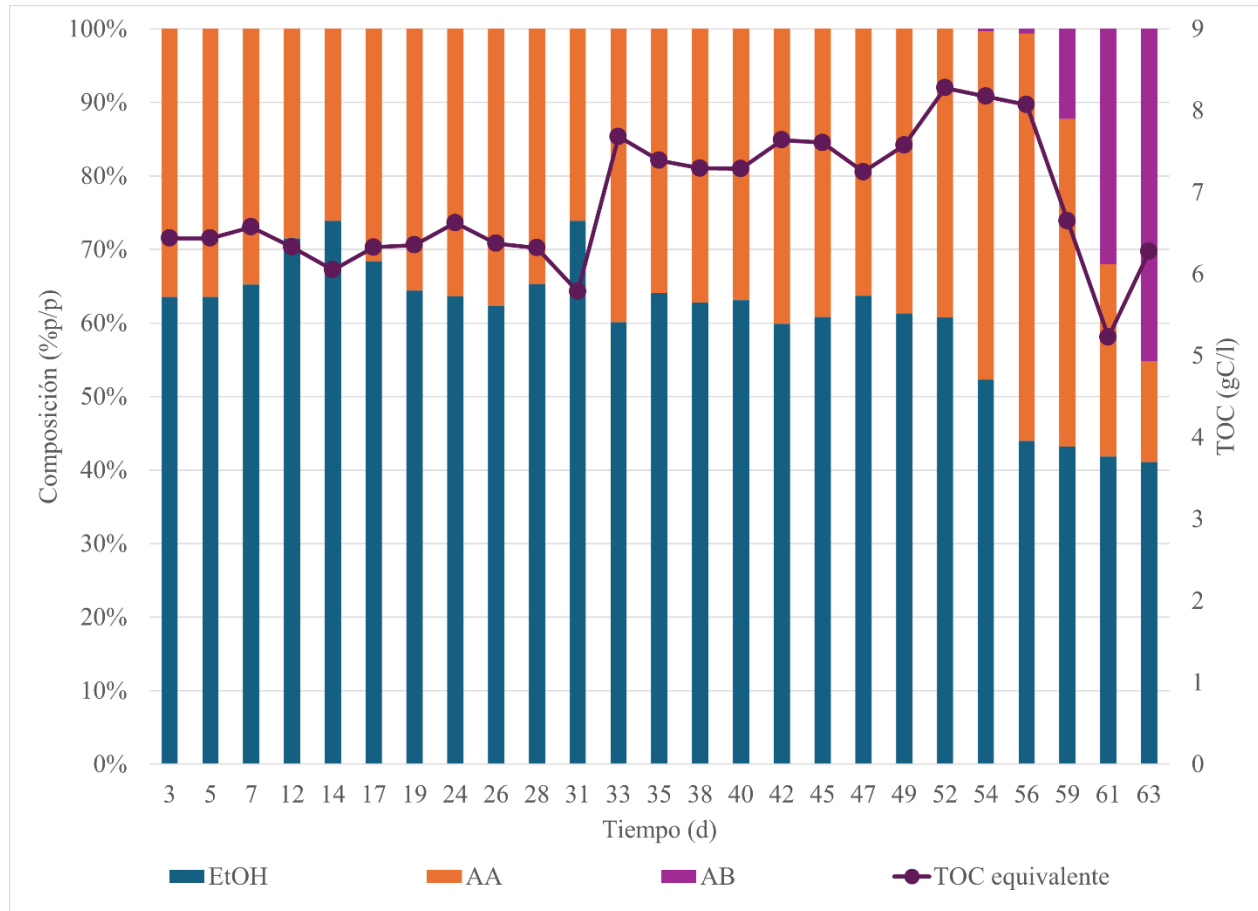


Figura 9: Composición de la alimentación del reactor sintético.

Posteriormente, como resultado del aumento de la carga orgánica en el día 33, se incrementa la concentración de los compuestos a $9831 \pm 309 \text{ mg/l}$ y $6076 \pm 487 \text{ mg/l}$ para etanol y ácido acético, respectivamente, alcanzando una alimentación media de $7,6 \pm 0,3 \text{ gC/l}$ de carbono

equivalente para el periodo entre los días 33 y 52. Para este rango de días, la razón molar alimentada entre etanol y AGV toma valores de $2,3 \pm 0,5$ (mol/mol) que, a pesar de la disminución, se encuentra dentro de los parámetros mínimos de elongación (Battista et al., 2024).

La media de la composición antes descrita se considera hasta el día 54, dado que es posible notar un ligero aumento en el TOC, que luego decrece rápidamente por el consumo del etanol y ácido acético para la formación de ácido butírico. Este último, para el día 63, alcanza valores de 5506 mg/l , lo cual sugiere una contaminación en el recipiente de alimentación, además de presentar una razón EtOH:AGV de $1,2 \pm 0,2$ (mol/mol). Este hallazgo resulta relevante en el posterior análisis del desempeño del reactor por la variación microbiana y metabólica que se podría haber generado en el sistema.

1.4. Carbono orgánico total

La medición del carbono orgánico total a la salida y alimentación del reactor, así como su respectiva remoción, se detalla en la *figura 10*. Para el primer periodo de operación se puede observar como a la salida del reactor la concentración de carbono orgánico aumenta en el primer tiempo de residencia, para mantenerse estable por lo que queda de operación. Este valor se mantiene para los días 21 al 31 en $7,7 \pm 0,2\text{ g}_C/l$ con un porcentaje de remoción de la alimentación del $12 \pm 3\%$.

Por otro lado, luego del aumento de la carga orgánica en el día 33, se observa el consecuente aumento del carbono orgánico a la salida del reactor, el cual tendería a estabilizarse una vez cumplido su tiempo de residencia. Sin embargo y de acuerdo a lo planteado en el inciso anterior, se observa una drástica caída del carbono orgánico en la salida del reactor por la insuficiente carga orgánica, y posiblemente contaminación, de la alimentación. Por lo que, considerando los días previos a este evento, entre los días 45 y 49, se estima un valor de carbono orgánico a la salida del reactor de $10,7 \pm 0,2\text{ g}_C/l$ con una remoción, ligeramente mayor que con la carga anterior, de $15 \pm 2\%$.

Finalmente, para los últimos días de operación, se observa una tendencia de estabilización en la salida del reactor con un promedio de $10,9 \pm 0,1\text{ g}_C/l$ y una remoción de carbono orgánico de tan solo $3,7 \pm 0,4\%$. Estos valores, solo sirven a modo cualitativo para dilucidar la disminución en el desempeño del reactor y reafirmar la posible contaminación del sistema.

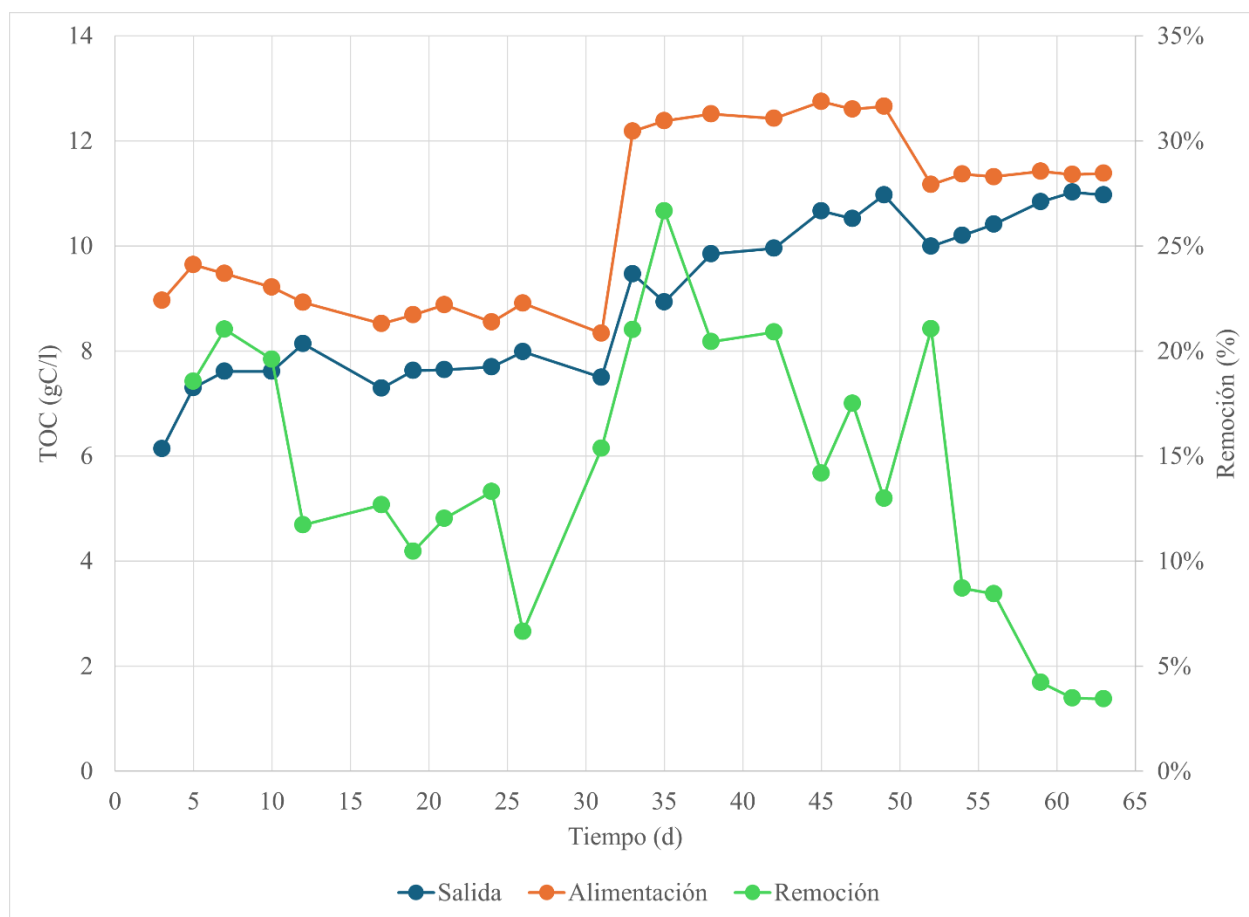


Figura 10: Carbono orgánico total medido en el reactor sintético.

1.5. Producción de ácidos

En el siguiente apartado se evalúa el comportamiento de los compuestos presentes en el proceso de elongación del reactor sintético, así como su comparación entre el carbono orgánico medido y el equivalente, para el posterior análisis del perfil de concentraciones de los compuestos más relevantes en la elongación.

En la *figura 11* se presenta la composición en %p/p de los compuestos medidos por cromatografía, además del comportamiento en carbono orgánico total equivalente a la salida del reactor. De lo primero, en los días 3 y 5 se nota la predominancia de ácido acético y etanol en el reactor, con ligeros porcentajes de otros ácidos provenientes posiblemente de la solubilización del inóculo, dada la inexistencia de estos compuestos en la alimentación. A partir del día 7, se observa una aparición notoria de ácido butírico cercana a un 50%, la cual decae en el día 17, para mantenerse relativamente constante por la formación de ácido caproico. Posterior al aumento de la carga orgánica del día 33, se observa una disminución del ácido butírico y, consecuente, aumento del porcentaje de ácido caproico en el reactor, el cual alcanza valores cercanos al 80% del total. Finalmente, desde el día 52 comienza un declive en el porcentaje de ácido caproico, así como una

disminución del carbono orgánico total equivalente por la posible contaminación de la alimentación.

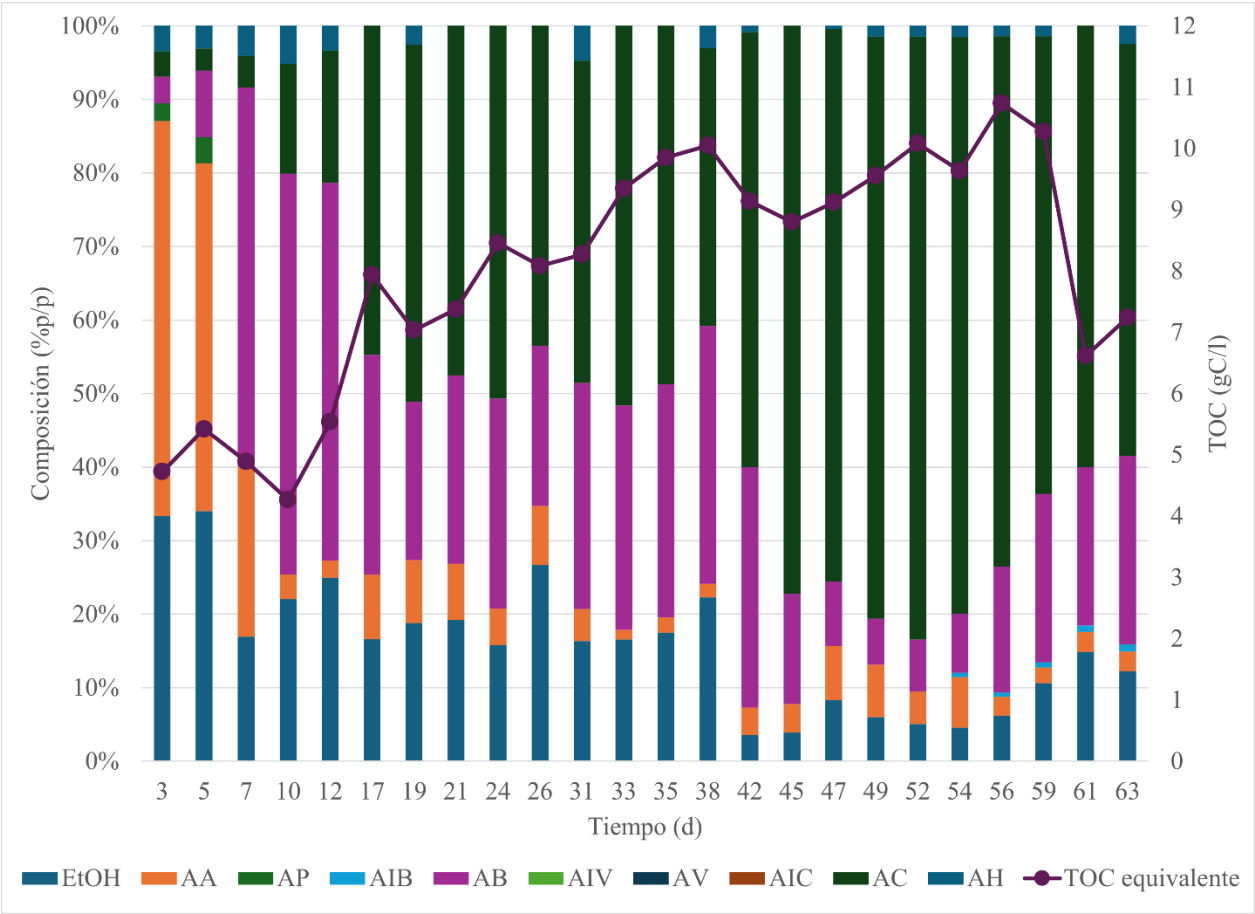


Figura 11: Composición de la salida del reactor sintético.

Adicionalmente, para evaluar la correlación entre los resultados, se detalla el comportamiento del carbono orgánico total medido (figura 10) y equivalente (figura 11) en la figura 12, además del porcentaje de error del carbono orgánico total entre ambas curvas.

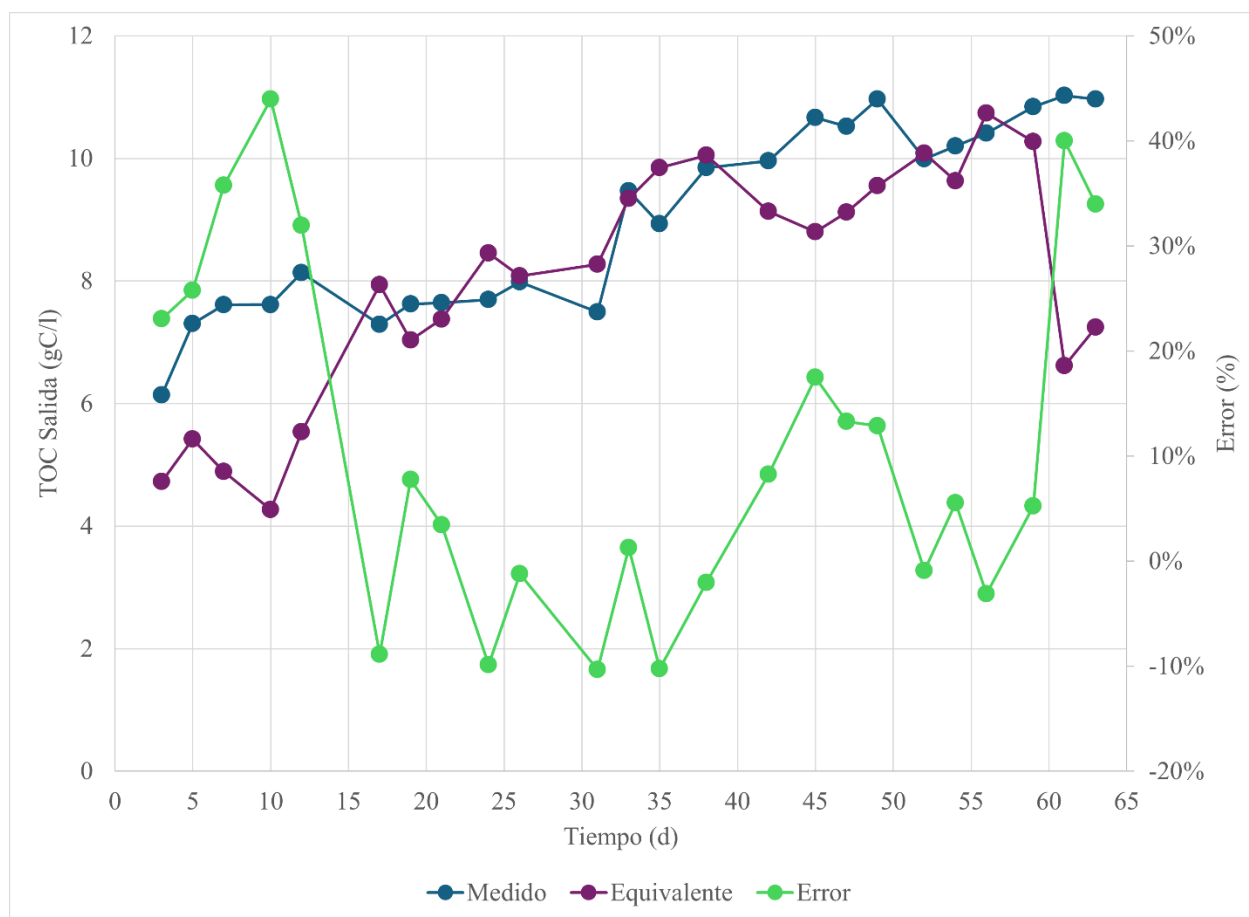


Figura 12: Comparación de carbono orgánico total medido y equivalente a la salida del reactor sintético.

Los primeros días de operación presentan una notable diferencia entre el carbono medido y equivalente, alcanzando su máximo el día 10 con un 44%, lo cual puede ser indicio de la solubilización del inóculo anteriormente mencionada. Este máximo porcentaje de compuestos no reconocidos disminuye drásticamente para el día 17, donde se mantiene relativamente constante hasta el día 38, con una posible sobreestimación de alguno de los compuestos por un porcentaje de error medio entre ambas curvas de $-3 \pm 7\%$. Este comportamiento se revierte desde el día 42 hasta el 59 con un $7 \pm 7\%$, alcanzando su máximo el día 61 con 40%, lo cual puede sugerir una formación de otros compuestos no reconocibles por la metodología cromatográfica utilizada dada la contaminación de la alimentación en el sistema.

Del análisis anterior y considerando la predominancia de etanol y los ácidos acético, butírico y caproico de la *figura 11*, se presenta el perfil de concentraciones de estos compuestos en la *figura 13*, tanto para la salida como la alimentación, para la posterior estimación de rendimientos y desempeño del reactor. Es importante destacar que, para los cálculos posteriores, no se considera relevante en este proceso la cuantificación del ácido heptanoico, dada la intermitencia en su aparición a lo largo de la operación del reactor, así como los demás ácidos: propiónico (AP), isobutírico (AIB), isovalérico (AIV), valérico (AV) e isocaproico (AIC).

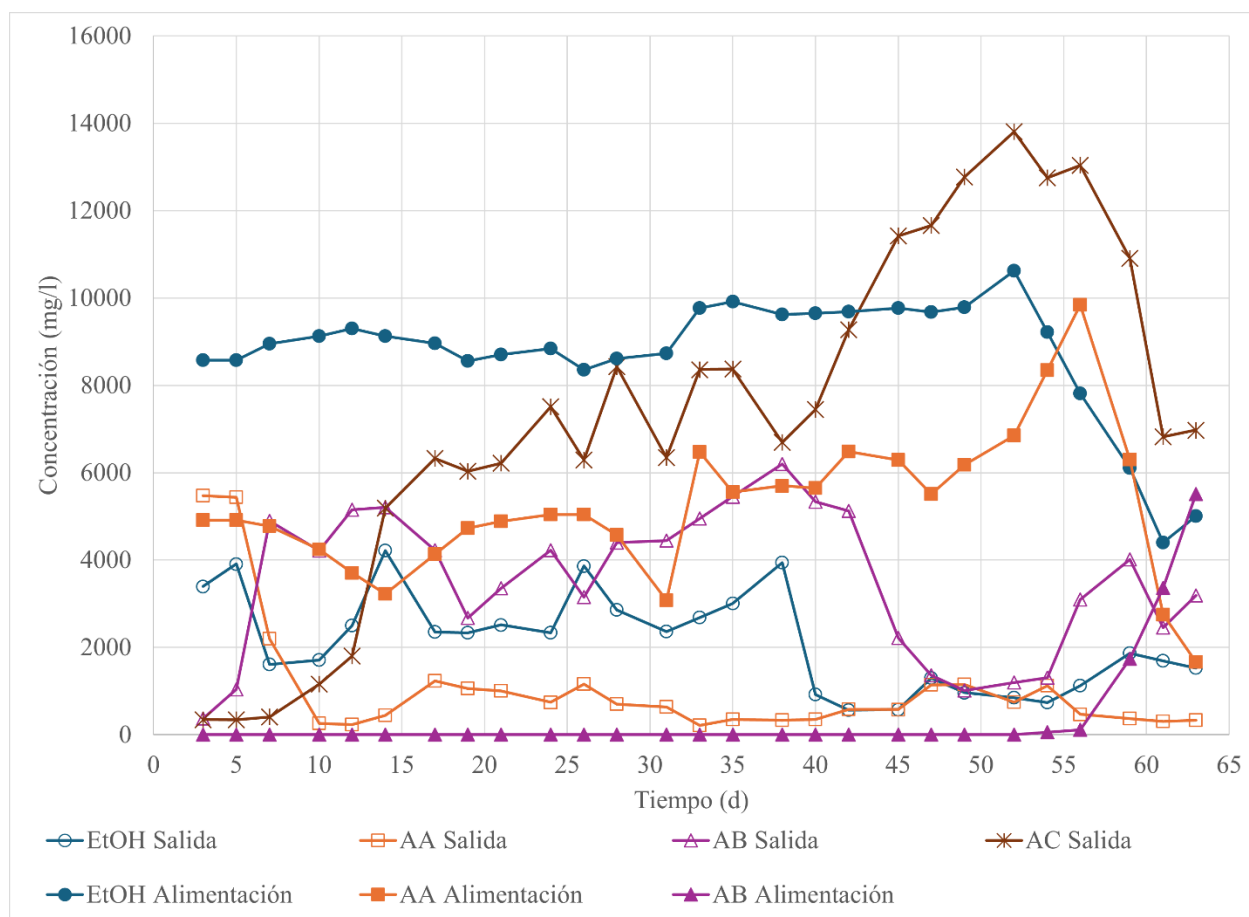


Figura 13: Perfil de concentraciones de compuestos más relevantes en el reactor sintético.

Para el primer periodo de operación del reactor, se observa el consumo de ácido acético y etanol para la formación de ácido butírico, la cual alcanza su máxima concentración entre los días 12 y 14 con $5179 \pm 41 \text{ mg/l}$, para luego comenzar a decaer por la aparición de ácido caproico en el sistema. La concentración de ácido butírico y caproico se mantienen en valores promedio de $4054 \pm 610 \text{ mg/l}$ y $7142 \pm 1025 \text{ mg/l}$, respectivamente para los días 24 al 31, con fluctuaciones inherentes a la operación semicontinua del sistema. Por otro lado, el etanol en ese mismo rango de días presenta una clara disminución respecto a la alimentación, alcanzando valores medios de $2854 \pm 713 \text{ mg/l}$, al igual que el ácido acético con valores de $809 \pm 238 \text{ mg/l}$.

Luego del aumento de la carga orgánica del día 33, se nota un inmediato aumento de la producción de ácido butírico alcanzando su máximo el día 38 con 6196 mg/l para, al igual que en el primero periodo, decaer drásticamente por la aparición de ácido caproico. Considerando la estabilidad del sistema antes de la contaminación de la alimentación entre los días 49 y 56, el consumo de ácido acético se mantiene relativamente constante a su valor en el primer periodo con $871 \pm 328 \text{ mg/l}$, no así los valores medios de ácido butírico y etanol, los cuales disminuyen considerablemente con valores de $1650 \pm 972 \text{ mg/l}$ y $918 \pm 162 \text{ mg/l}$, respectivamente. Por otro lado, para este periodo se observa la máxima producción de ácido caproico en el sistema con $13091 \pm 496 \text{ mg/l}$.

1.6. Rendimiento y selectividad

En la *figura 14* se presentan los rendimientos para la producción de ácido butírico y caproico respecto al consumo de ácido acético, además de la selectividad del proceso. Transcurrido el primer TRH, es posible observar una disposición del sistema a la formación de ácido butírico, la cual alcanza un rendimiento de $1,0 \pm 0,3$ (*mol/mol*), lo cual sugiere una elongación casi estequiométrica del ácido acético. A su vez, se presencia un abrupto crecimiento del rendimiento del ácido caproico, alcanzado su máximo al comienzo del segundo TRH. Tanto el rendimiento de ácido butírico como caproico, se mantienen constantes hasta el término de operación a esta primera carga orgánica, mostrando un estado estacionario con valores medios de $0,6 \pm 0,1$ y $0,9 \pm 0,1$ (*mol/mol*), respectivamente. y con una selectividad para la formación de ácido caproico frente a butírico de $1,4 \pm 0,1$ (*mol/mol*). Esto último implica una estabilidad del sistema para la formación y consumo de ácido butírico, con una ligera preferencia a la producción de ácido caproico.

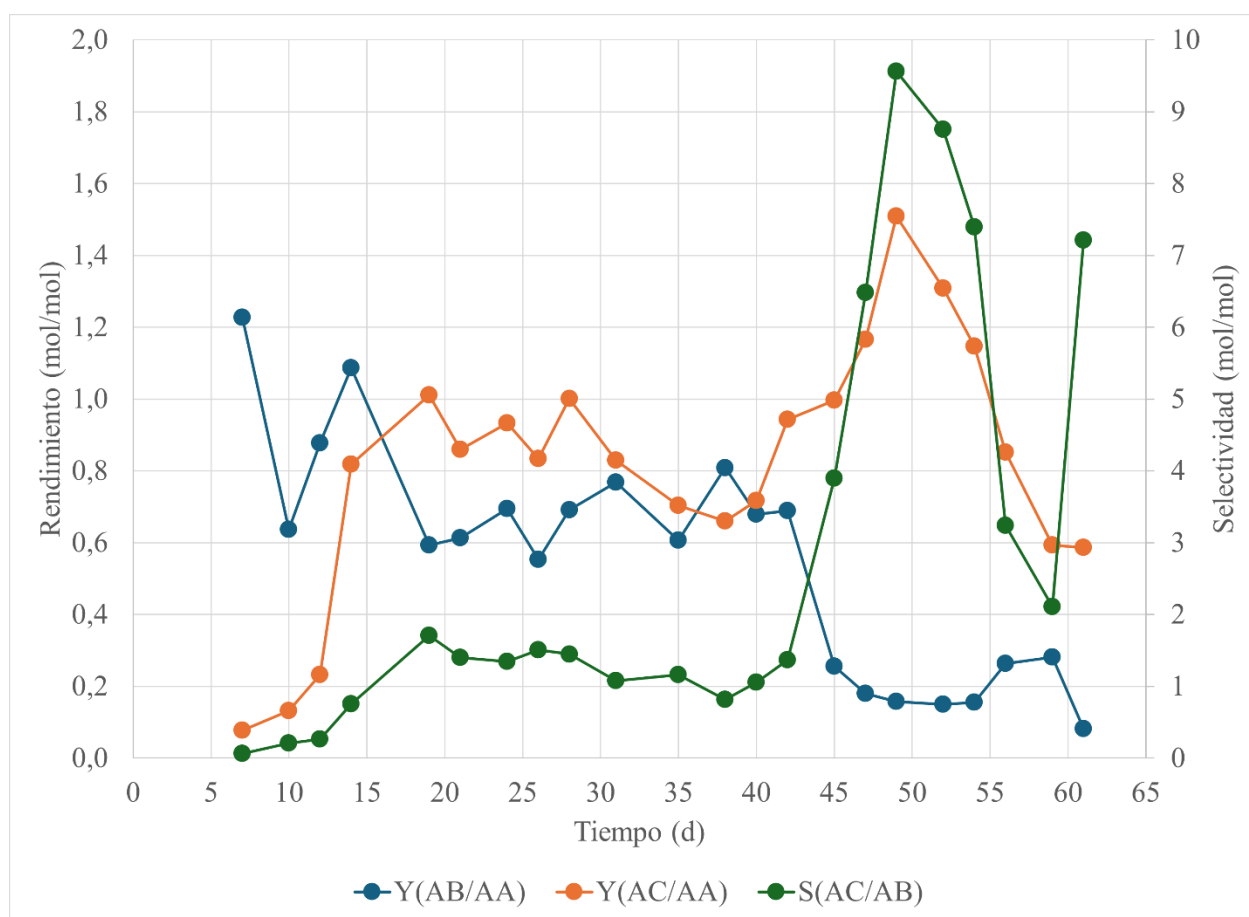


Figura 14: Rendimiento (Y) y selectividad (S) de ácido butírico (AB) y ácido caproico (AC) en reactor sintético.

Posterior al aumento de la carga orgánica del día 33, se nota una disminución en la selectividad, la cual aumenta precipitadamente hasta alcanzar su valor máximo el día 49 con $9,6$ (*mol/mol*) y

rendimientos de 1,5 y 0,2 (*mol/mol*) para ácido caproico y butírico, respectivamente. Este cambio repentino, sugiere una inclinación a la elongación del ácido butírico acumulado en el sistema, sin embargo, decae inesperadamente por la contaminación de la alimentación descrita en los puntos anteriores. Considerando la estabilidad del sistema para el segundo periodo de operación, planteada en inciso anterior entre los días 49 y 56, se obtienen valores de rendimiento para ácido caproico y butírico de $1,2 \pm 0,3$ y $0,2 \pm 0,1$ (*mol/mol*) con una selectividad de $7,2 \pm 2,8$ (*mol/mol*).

2. Reactor lixiviado

2.1. Monitoreo de pH

Al igual que para el caso sintético, se monitoriza y ajusta el pH del reactor durante toda su operación (véase figura 15), denotando la misma tendencia a la acidificación del sistema. Análogamente, los primeros días de operación se presentan los menores pH, alcanzando su mínimo el día 5 con 5,9. Posterior a esto, el pH oscila con una menor desviación hasta terminar su periodo de operación con un promedio de $6,8 \pm 0,2$. Considerando la totalidad de la operación, se presenta un pH medio de $6,7 \pm 0,3$ similar a lo presentado por el reactor sintético, propiciándose la reacción de elongación (Wang, Yang, Cai, Zhang, Wu, Ma, Fu, & Zhang, 2023).

Se evidencia una correlación entre ambos reactores por la mayor tendencia a la acidificación en los primeros días, para una convergencia al pH establecido al termino de cada una de sus operaciones. Lo cual sugiere una similitud en el mecanismo de reacción del proceso.

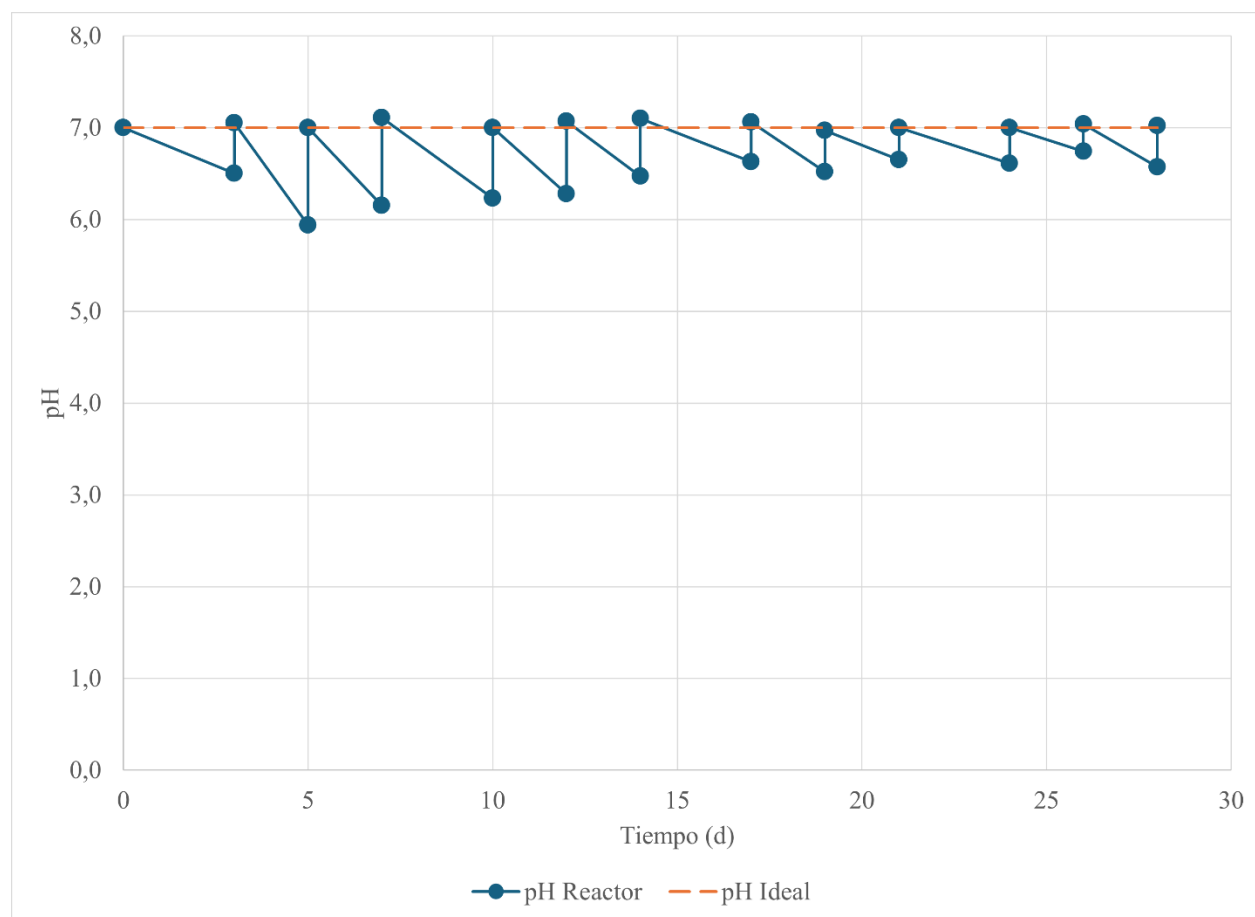


Figura 15: Monitoreo de pH de reactor de lixiviado.

2.2. Sólidos suspendidos

En la *figura 16* se presenta el comportamiento de los sólidos suspendidos para el reactor lixiviado, en el cual es posible notar su decrecimiento constante a lo largo del tiempo de operación del reactor y la convergencia de ambas curvas (SST y SSV) a valores similares. A diferencia del caso sintético, no se logra visualizar un estado estacionario de los sólidos suspendidos, sin embargo, entre los días 21 al 28, se percibe una tendencia a la estabilización en el rango de $3,5 \pm 0,6 \text{ g/l}$ y $2,9 \pm 0,6 \text{ g/l}$ para los sólidos suspendidos totales y volátiles, respectivamente. La principal diferencia frente a su contraparte sintética es la adición de mayor cantidad de inóculo en el montaje (25% más) y el menor tiempo de operación. Se esperaría que, igualando uno o ambos de estos factores, la cantidad de sólidos converja a valores similares para ambos reactores, mostrando leves diferencias dado el tipo de alimentación y afinidad de los microorganismos a esta.

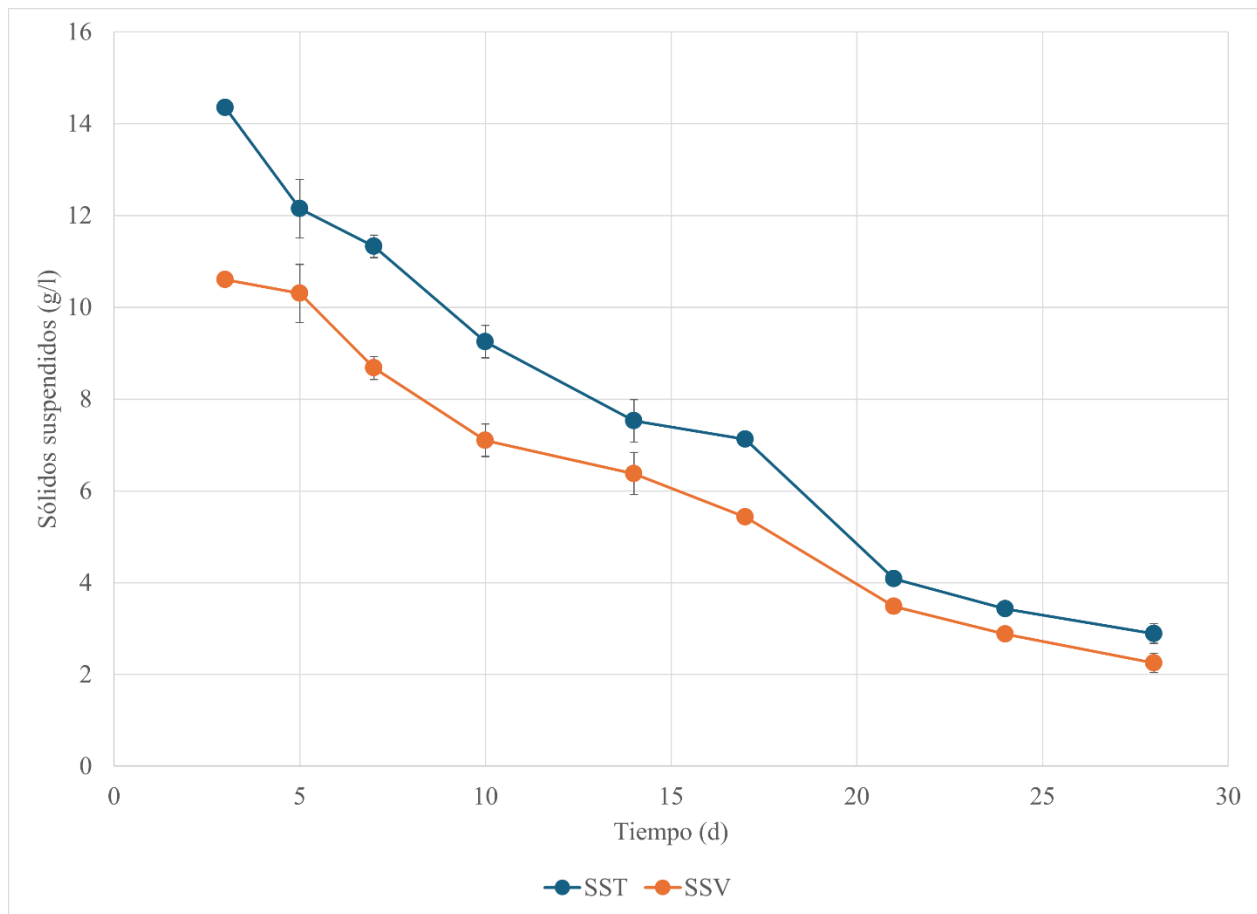


Figura 16: Sólidos suspendidos de reactor lixiviado.

La incapacidad de lograr una estabilidad de los sólidos en el reactor, al igual que en el caso sintético, sugieren aplicar un aumento en el tiempo de retención hidráulica, que según investigaciones similares se han estimado en 25 días o más (Battista et al., 2024).

2.3. Alimentación

En la *figura 17* se presenta la composición y el aporte equivalente de carbono orgánico total del monitoreo de la alimentación para el reactor lixiviado. Durante la alimentación del primer tiempo de residencia del reactor, se nota una predominancia del etanol, ácido acético y ácido butírico, con valores medios de $8646 \pm 613 \text{ mg/l}$, $3507 \pm 620 \text{ mg/l}$ y $2756 \pm 336 \text{ mg/l}$, respectivamente, además de un aporte de $508 \pm 116 \text{ mg/l}$ de ácido caproico. La razón estequiométrica EtOH:AGV para este periodo oscila en $2,0 \pm 0,5 \text{ (mol/mol)}$, correspondiendo a la razón teórica para la reacción de elongación (Battista et al., 2024). Por otro lado, la concentración, en carbono total equivalente, alimenta al reactor en este periodo con $8,5 \pm 0,7 \text{ g}_C/\text{l}$. Sin embargo, desde el día 17 se nota una baja en la carga orgánica, seguido de una alteración en la composición de la alimentación. El aumento de la formación, y posterior decaimiento, del ácido butírico para la aparición de ácido caproico indica la existencia de la reacción de elongación dentro del recipiente de alimentación sugiriendo, al igual que la alimentación del reactor sintético, una posible contaminación. La alimentación para el final de la operación del reactor alcanza valores de 2195 mg/l , 1219 mg/l , 2424 mg/l y 3184 mg/l para los ácidos caproico, butírico y acético; y etanol, respectivamente, con una alimentación media de $4,65 \text{ g}_C/\text{l}$ de carbono orgánico total equivalente, donde para la última semana se alcanza una razón EtOH:AGV de $1,0 \pm 0,3 \text{ (mol/mol)}$, en la cual se vería desfavorecida la reacción de elongación dentro del reactor (Battista et al., 2024). Este hallazgo, homólogo a su contraparte sintética, resulta relevante en el posterior análisis del desempeño del reactor por la variación microbiana y metabólica que se podría haber generado en el sistema.

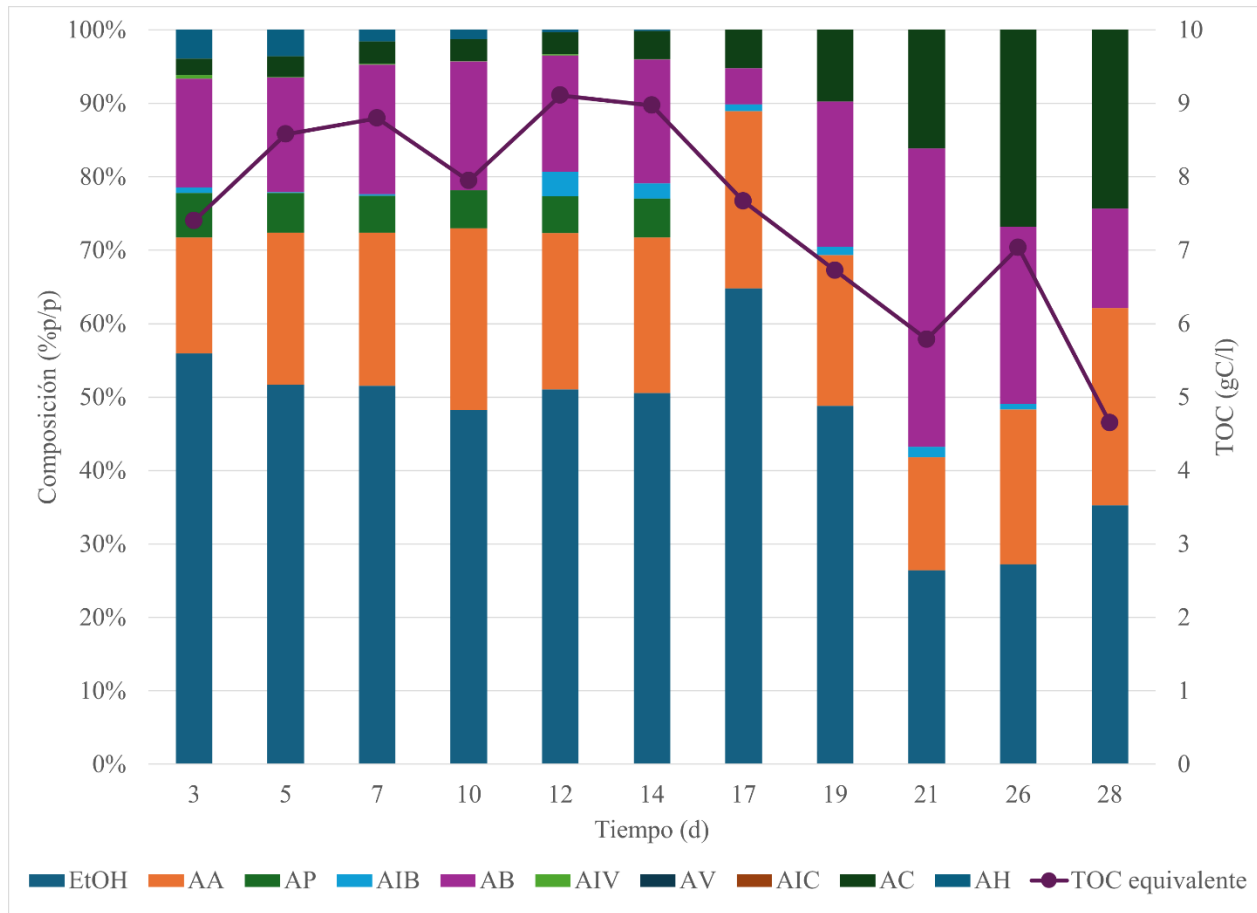


Figura 17: Composición de la alimentación del reactor lixiviado.

2.4. Carbono orgánico total

La medición del carbono orgánico total a la salida y alimentación del reactor lixiviado, así como su respectiva remoción, se detalla en la *figura 18*. De esta, se observa como la concentración de carbono orgánico total a la salida del reactor aumenta paulatinamente en su primer tiempo de residencia, alcanzando una concentración de $10,7 \pm 0,8 \text{ g}_C/\text{l}$ con una remoción de alimentación de $24 \pm 7\%$ entre los días 14 y 17. Posterior a estos días y de acuerdo a lo descrito en el inciso anterior, se presenta la contaminación de la alimentación, disminuyendo drásticamente la remoción de carbono orgánico en el sistema. Al final de la operación del reactor, entre los días 24 y 28, se obtiene una salida promedio de $10,3 \pm 0,2 \text{ g}_C/\text{l}$ con una remoción del $1 \pm 4\%$. El sistema, por falta en la alimentación, se muestra estable durante el último tiempo de residencia en los valores ya presentados.

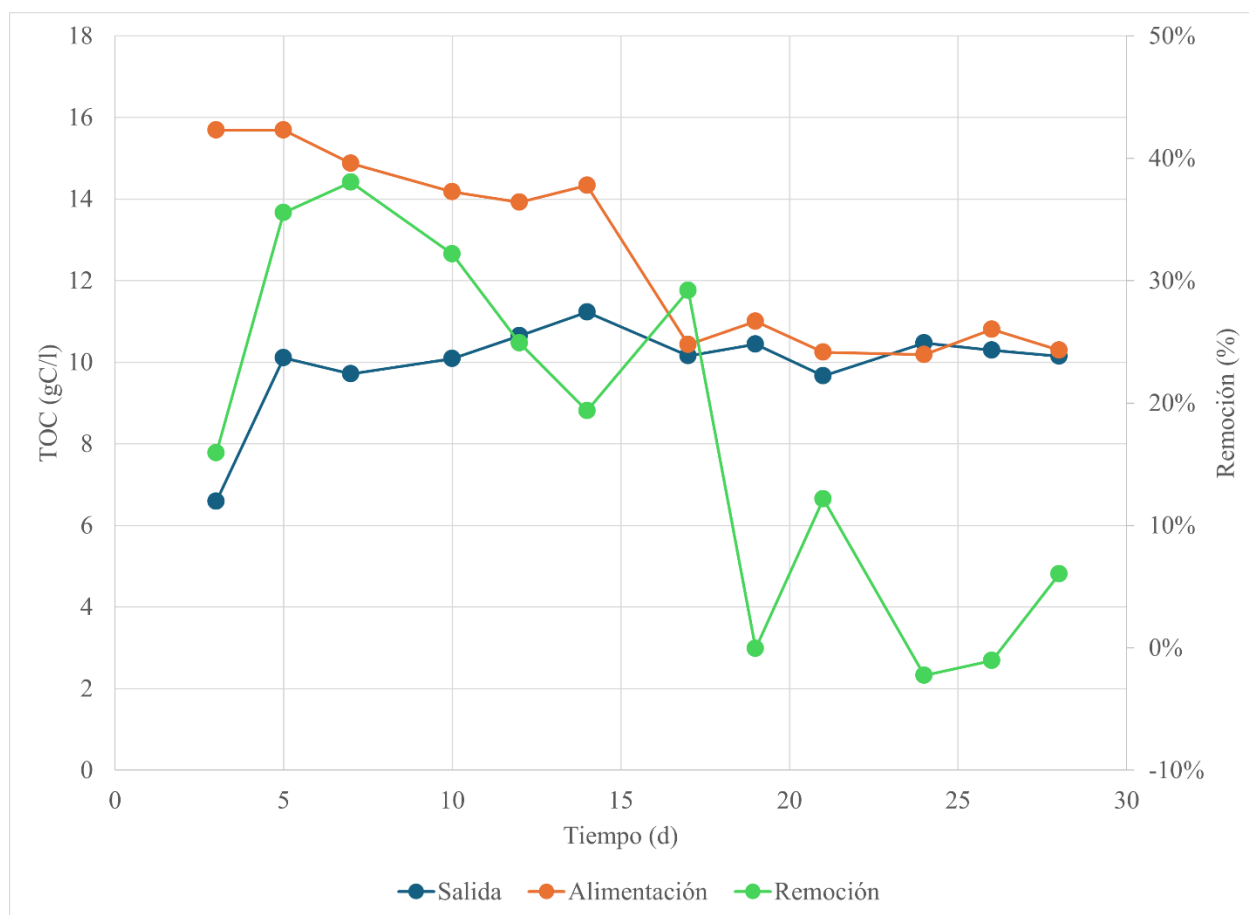


Figura 18: Carbono orgánico total del reactor de lixiviado

2.5. Producción de ácidos

En el siguiente apartado se evalúa el comportamiento de los compuestos más relevantes del proceso de elongación del reactor lixiviado, así como su comparación entre el carbono orgánico medido y equivalente, para el posterior análisis del perfil de concentraciones de los compuestos más relevantes en la elongación.

En la *figura 19* se presenta la composición en %*p/p* de los compuestos medidos por cromatografía, además del comportamiento, en carbono orgánico total equivalente a la salida del reactor lixiviado. Se observa la predominancia del ácido acético en la salida del reactor para el tercer día, seguido por el ácido butírico y etanol. Sin embargo, al quinto día la proporción es liderada por el ácido butírico con un porcentaje cercano al 70%, para comenzar a decaer por la formación de ácido caproico en el sistema. El consumo de ácido butírico y, consecuente, formación de ácido caproico se mantiene en aumento hasta el día 19, en el cual se alcanza una predominancia del 80% del total, de este último. Posterior a estos días, se mantienen relativamente estables las composiciones, sin embargo, se observa un decaimiento en la carga orgánica a la salida del reactor por la deficiente, y posible contaminada, alimentación.

Al igual que en el reactor sintético, es importante destacar que, para los cálculos posteriores, no se considera relevante en este proceso la cuantificación del ácido heptanoico, dada la intermitencia en su aparición a lo largo de la operación del reactor, así como los demás ácidos: propiónico (AP), isobutírico (AIB), isovalérico (AIV), valérico (AV) e isocaproico (AIC).

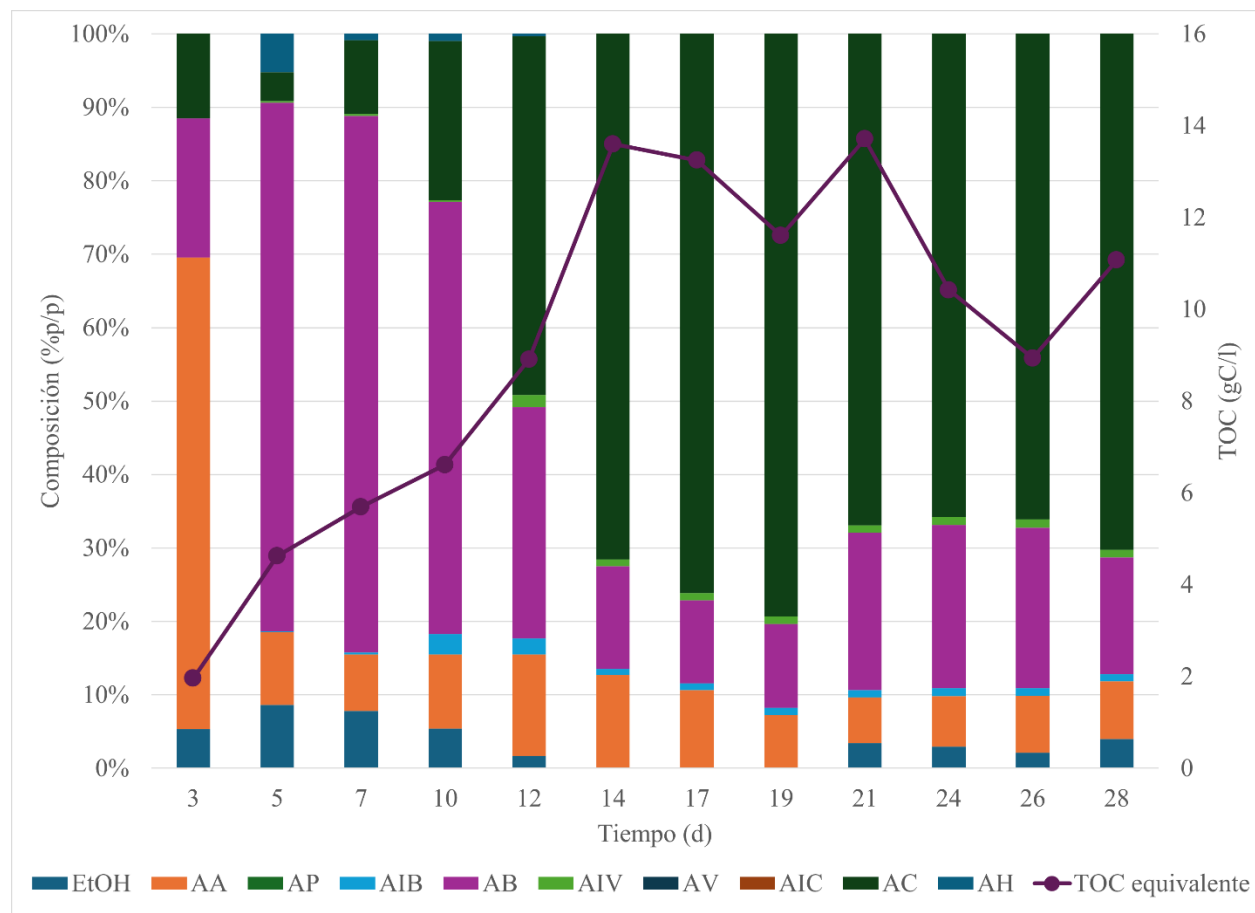


Figura 19: Composición a la salida del reactor de lixiviado.

De estas consideraciones y con el propósito de evaluar la correlación entre los resultados, se detalla el comportamiento del carbono orgánico total medido (*figura 18*) y equivalente (*figura 19*) en la *figura 20*, además del porcentaje de error del carbono orgánico total entre ambas curvas. De ésta, se observa una tendencia de ambas curvas a aumentar en los primeros días de operación, sin embargo, en este rango días es donde se presenta el mayor porcentaje de carbono no reconocido, alcanzando su máximo de 70% al tercer día. Al igual que en el caso sintético, esto puede ser un indicio de la solubilización del inóculo. El porcentaje de carbono no reconocido decae rápidamente a lo largo de los días, para revertirse al día 14 y mantenerse en un valor de $-26 \pm 7\%$ hasta el día 17, sugiriendo una sobreestimación de alguno de los compuestos medidos. Finalmente, entre los días 24 y 28, se observa la mayor proximidad entre ambas curvas, con valores de error en la estimación del carbono del $2 \pm 11\%$.

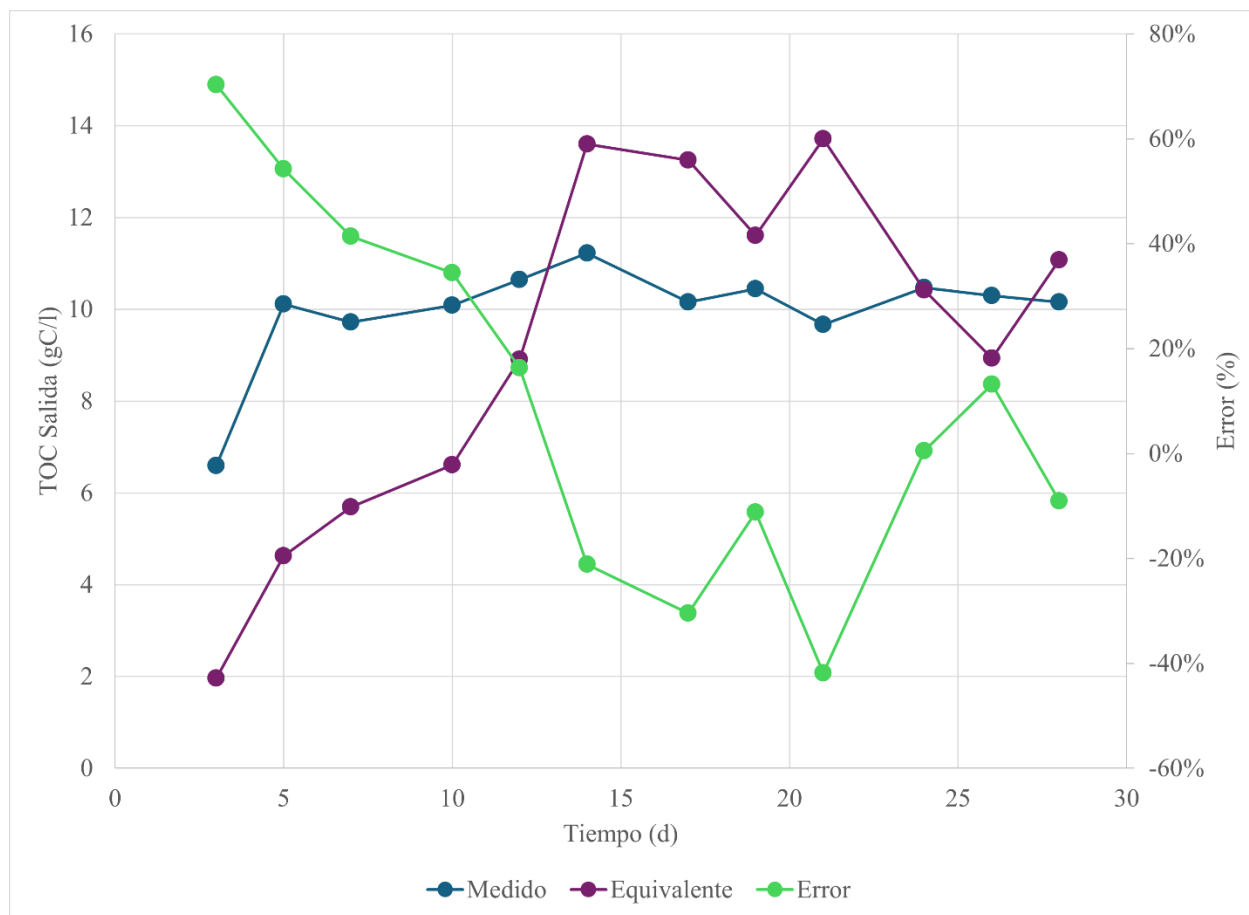


Figura 20: Comparación de carbono orgánico total medido y equivalente a la salida del reactor de lixiviado.

Del análisis anterior y considerando la predominancia de etanol y los ácidos acético, butírico y caproico de la *figura 19*, se presenta el perfil de concentraciones de estos compuestos en la *figura 21*, tanto para la salida como la alimentación, para la posterior estimación de rendimientos y desempeño del reactor.

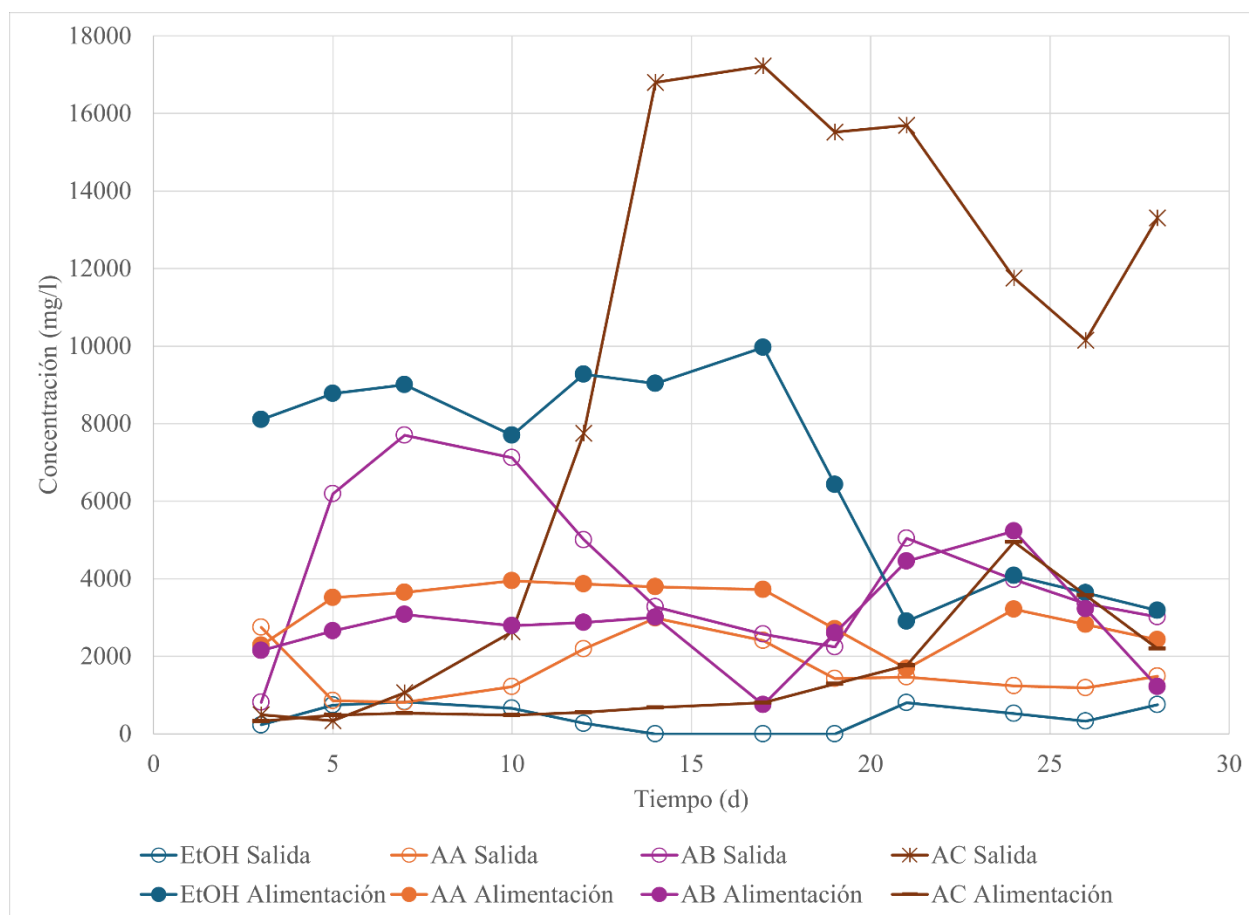


Figura 21: Perfil de concentraciones de compuestos más relevantes en el reactor de lixiviado.

De la *figura 21*, en la primera semana de operación, se observa un consumo considerable de ácido acético y etanol para la formación de ácido butírico, logrando su máxima concentración el día 7 con 7697 mg/l . Luego de esto, comienza el aumento del ácido caproico hasta alcanzar su punto de mayor producción entre los días 14 y 17 con un promedio de producción de $16395 \pm 214 \text{ mg/l}$. A su vez, en estos días se presencia la menor concentración de ácido butírico con $2920 \pm 501 \text{ mg/l}$. Posteriormente, se distingue la baja en las concentraciones de la alimentación por la posible contaminación, además del decaimiento progresivo de la concentración de ácido caproico en la salida, el cual promedia valores de $1173 \pm 1581 \text{ mg/l}$ entre los días 24 y 28.

Es relevante notar, al igual que para el caso sintético, el desfase en la producción de ácido caproico respecto al ácido butírico, lo cual sugiere una elongación secuencial hacia la producción de cadenas de carbono cada vez más largas (Yin et al., 2017). Sin embargo, se destaca la diferencia en los tiempos de aparición de las máximas concentraciones de ácido caproico entre ambos reactores: días 24 y 14, para reactor sintético y lixiviado, respectivamente. Lo cual implica la rápida utilización del ácido butírico ya presente en el reactor lixiviado para su elongación. No obstante, no es posible determinar si la máxima producción de ácido caproico obtenida en este sistema representa el valor esperable, dada la contaminación de la alimentación.

3. Rendimientos

En la *tabla 8* se presenta un resumen de los resultados más relevantes para la investigación, considerando el estado pseudo-estacionario logrado para cada una de las operaciones establecidas. De ésta, es posible observar la tendencia positiva entre la carga orgánica alimentada y la producción de ácido caproico, además de notarse un incremento en el porcentaje de remoción de TOC, denotando que una mayor disponibilidad de sustrato favorecería tanto a la reacción de elongación como al desarrollo de los microorganismos involucrados.

Tabla 8: Recopilación de resultados más relevantes de ambos reactores operados.

Reactor	Rango de días	Remoción (% TOC)	SSV (g/l)	Producción AC (mg/l)
Sintético OLR 1	24 – 28	$12 \pm 3\%$	$2,16 \pm 0,28$	7408 ± 1072
Sintético OLR 2	52 – 56	$15 \pm 2\%$	$0,70 \pm 0,04$	13198 ± 548
Lixiviado	14 - 17	$24 \pm 7\%$	$5,90 \pm 0,67$	16395 ± 214

Por otro lado, el reactor de lixiviado, a pesar de haber operado durante un periodo más corto, demuestra un mejor desempeño respecto a su contraparte sintética, tanto en la remoción de TOC como en la producción de ácido caproico. Sin embargo, dada la mayor proporción de inóculo utilizada al comienzo de su operación, es necesario cuantificar estas diferencias con el cálculo de rendimientos y productividades en los siguientes apartados.

3.1. Rendimiento de consumo de etanol

Se plantea evaluar el comportamiento entre el consumo de etanol y la formación de ácido caproico para ambos sistemas mediante la *figura 22*. Battista et al. (2024) plantea una razón teórica entre el consumo de etanol y formación de ácido caproico de 2:1, respectivamente. Esta razón es alcanzada para la primera operación del reactor sintético con un valor medio de $1,9 \pm 0,3$ (mol/mol), la cual disminuye ligeramente hacia el segundo periodo de operación con valores de $1,7 \pm 0,2$ (mol/mol). Esta proximidad entre el valor teórico y el logrado sintéticamente, denota la eficiente y secuencial elongación del ácido acético en butírico para la producción de ácido caproico.

Por otro lado, en el reactor lixiviado se observa la tendencia a la estabilización de este parámetro en un valor medio de $1,4 \pm 0,3$ (mol/mol), lo cual implicaría un uso más eficiente del etanol en el sistema para la producción de ácido caproico. Esto sugiere que, dada la existencia de ácido butírico en la alimentación del reactor, el consumo de etanol se dirige hacia la elongación de este compuesto sobre su producción por la elongación del ácido acético.

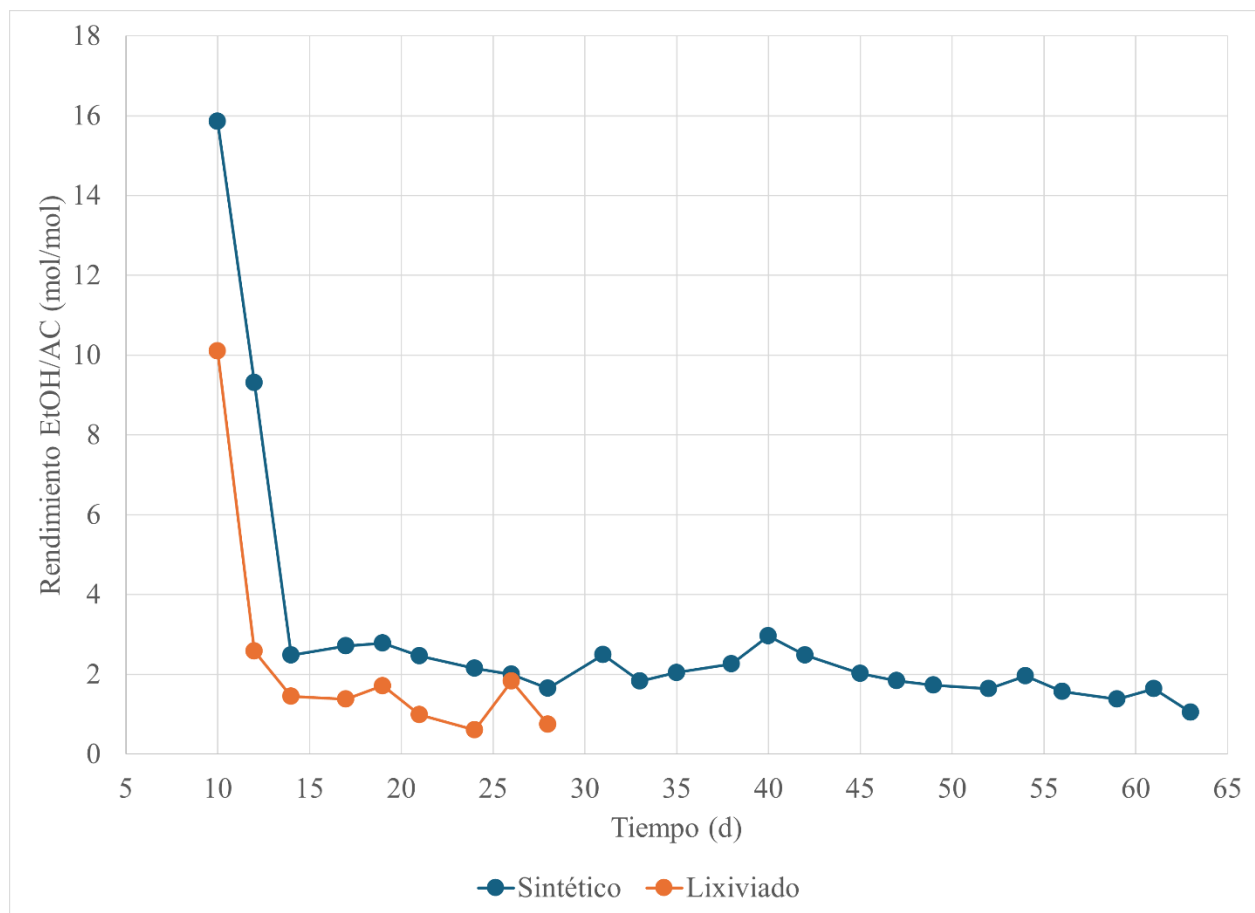


Figura 22: Consumo de etanol (EtOH) para la producción de ácido caproico (AC).

3.2. Rendimiento de la alimentación

En la *figura 23* se describe el rendimiento de la alimentación, medida en gramos de carbono orgánico total, para la producción de ácido caproico. En ésta, se observa un comportamiento similar hasta el décimo día en ambos reactores. Sin embargo, el reactor lixiviado, coincidiendo con la temprana aparición de ácido caproico en el sistema, aumenta precipitadamente hasta alcanzar su valor de rendimiento máximo del 87% para el día 19, el cual decae hacia el fin de su operación. Esto último coincide con la ineficiente e inconstante alimentación, por la posible contaminación presentada en los puntos anteriores, por lo que no es posible determinar si el valor obtenido corresponde al máximo posible del reactor. A pesar de esto, comparando los resultados obtenidos por Roghair et al. (2018) y Battista et al. (2024) en la producción de ácidos grasos de cadena media utilizando residuos alimenticios en reactores semicontinuos, con rendimientos de $58,7 \pm 2,9 \%$ (*mol/mol*) $25,17 \pm 1,65 \%$ (*p/p*), respectivamente, es posible evidenciar una notable eficiencia del proceso. La principal diferencia frente a estos y otros estudios similares encontrados en la literatura, es la utilización de una materia prima previamente tratada (en el reactor de

lixiviación) rica en ácidos grasos volátiles y etanol. Por lo cual se destaca el uso de este tipo de metodologías para un eficiente proceso de elongación.

Por otro lado, el reactor sintético presenta un desfase de 2 días, respecto al lixiviado, para mostrar el crecimiento precipitado del rendimiento. El valor alcanzado, a pesar de ser menor al del reactor lixiviado ($52 \pm 7\%$), se presenta más estable hasta el término de operación a la primera carga orgánica. Contrastando con el rendimiento de 40% (p/p) presentado por Battista et al. (2024) en el proceso de elongación sintética en un reactor discontinuo, se corrobora la efectividad de producir ácido caproico mediante la utilización de reactores continuos o semicontinuos.

Luego del aumento de carga en el reactor, se nota un decaimiento en el rendimiento, por el aumento en la formación de ácido butírico, para ser remontado con valores máximos de $70 \pm 2\%$, los cuales decaen inesperadamente por la contaminación de la alimentación. Este último rendimiento se encuentra dentro del orden de magnitud de lo obtenido por Liu et al. (2017), con 68,9% (mol/mol), en la elongación sintética de ácido acético en un reactor semicontinuo. Lo cual sugiere una correcta operación del proceso.

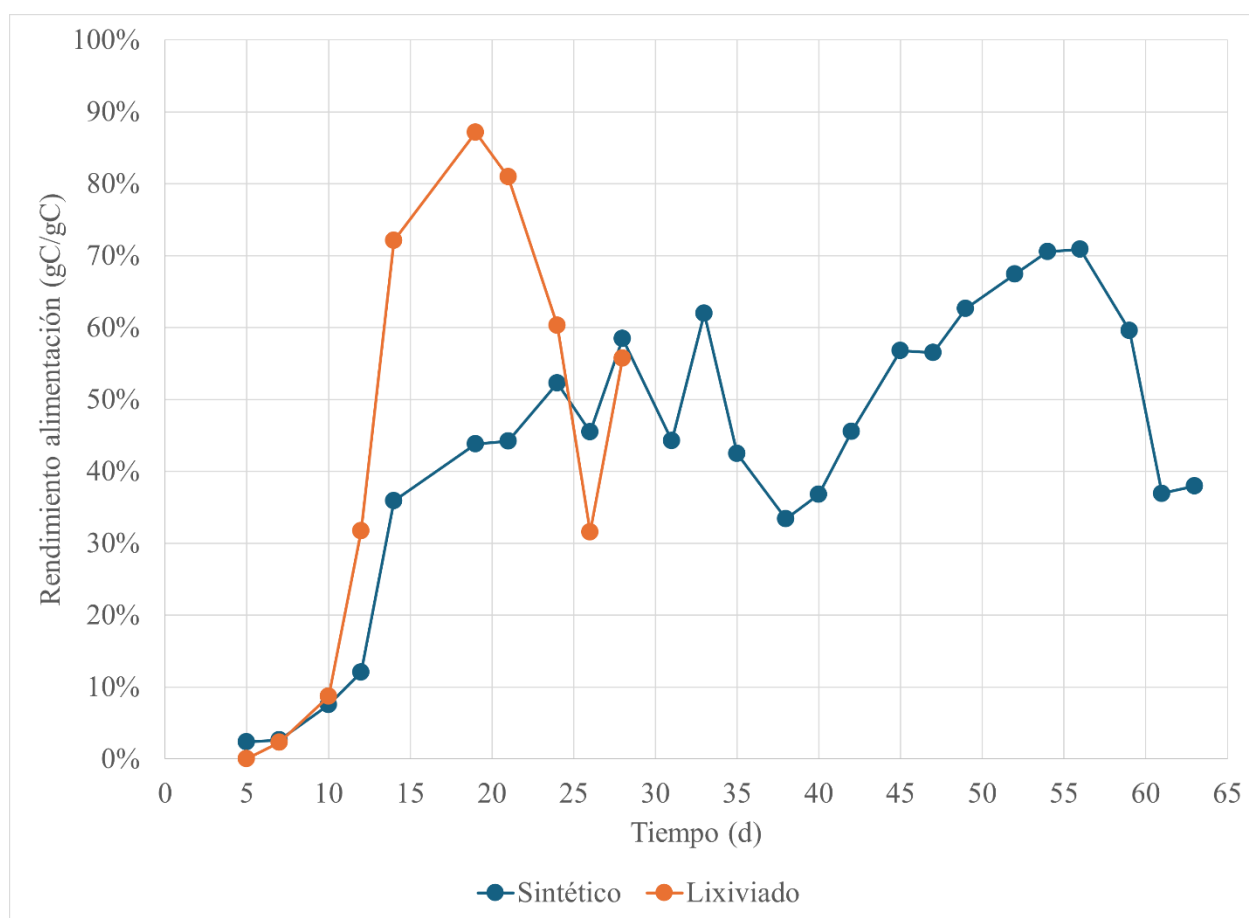


Figura 23: Rendimiento de la alimentación para la producción de ácido caproico.

A pesar de que ambos sistemas se vieron desfavorecidos por problemas en la alimentación hacia el final de cada ensayo, los valores obtenidos son comparables con los reportados en la literatura, respaldando la viabilidad del proceso en condiciones semicontinuas y presentando, además, indicios de mejoras en los rendimientos para la producción real de ácido caproico mediante la utilización de residuos alimenticios pretratados en reactores de lixiviación.

3.3. Productividad del inóculo

Como último parámetro a evaluar, se presenta la productividad del inóculo para la producción de ácido caproico de ambos reactores en la *figura 24*. Para el primer periodo de operación, el reactor lixiviado denota un mejor desempeño en la productividad, la cual alcanza su máximo el día 21 con $0,30 \pm 0,01 \text{ g}/(\text{g} \cdot \text{d})$. El decaimiento que se nota posterior a este día confirma la contaminación del sistema y, consecuentemente, una alteración en la diversidad microbiana del reactor.

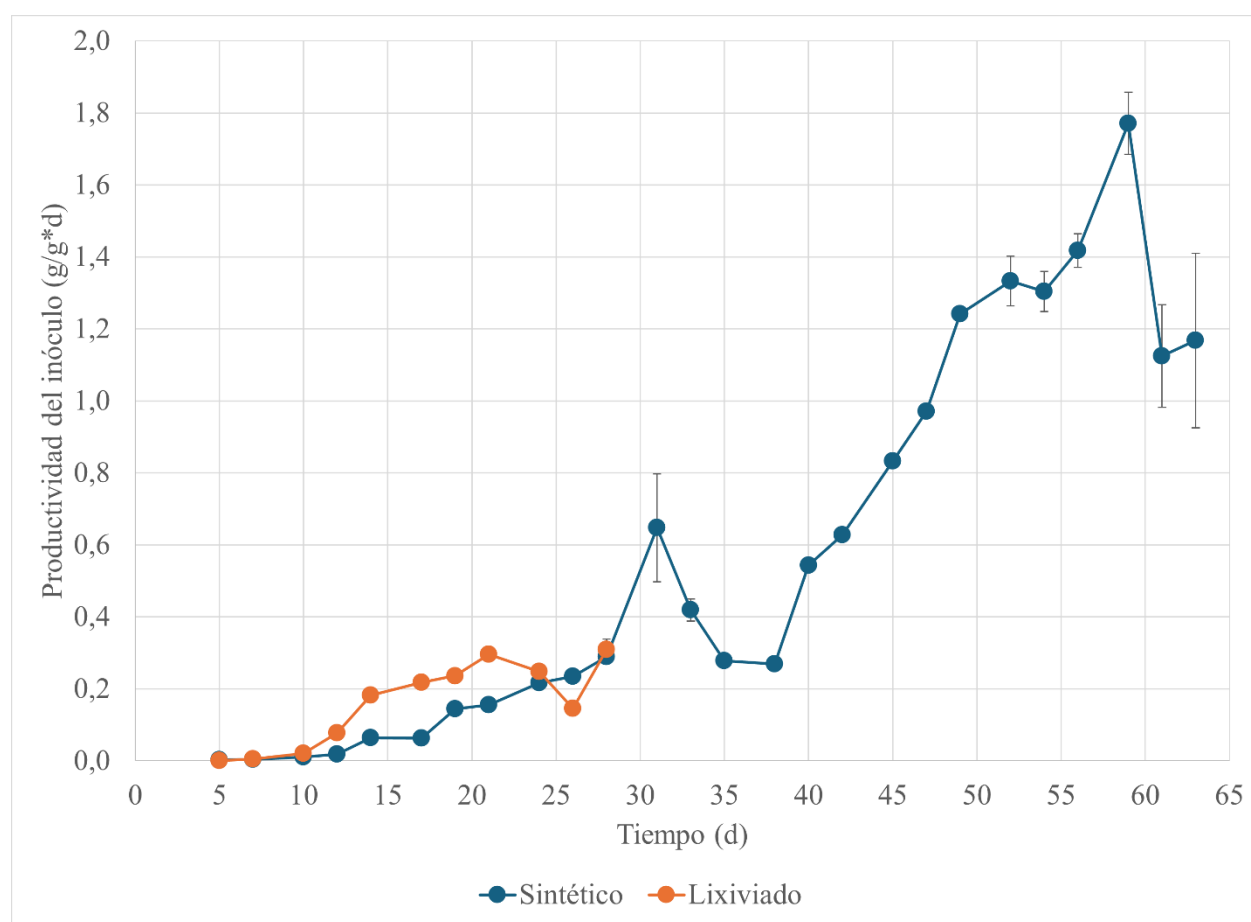


Figura 24: Productividad del inóculo para la producción de ácido caproico.

Por otro lado, el reactor sintético muestra un crecimiento constante durante el primer periodo de operación, alcanzando un valor de $0,29 \pm 0,01 \text{ g}/(\text{g} \cdot \text{d})$ para el día 28. En el día que se aumenta la carga orgánica y disminuye el volumen del reactor (día 31), es posible notar un aumento considerable en la productividad, sin embargo, este valor representa una anomalía en la estimación de la productividad, dado los errores asociados a la pérdida de biomasa por el cambio de reactor.

Posterior a esto, se nota una disminución en la productividad en el sistema, posiblemente por el estrés ocasionado a los microorganismos, sin embargo, la situación es revertida, para aumentar considerablemente hasta el día 59. Se considera como máxima productividad alcanzada $1,35 \pm 0,06 \text{ g}/(\text{g} \cdot \text{d})$ entre los días 52 y 56, dada la contaminación del sistema. De hecho, el valor reportado al día 59 se considera anómalo por el posible ingreso de biomasa externa al sistema.

Ambos reactores demuestran una predisposición al aumento en la productividad, lo cual corrobora la viabilidad del proceso para la producción de ácido caproico por este medio y la adaptación continua de los microorganismos involucrados en la reacción de elongación. Por otro lado, el aumento constante de la productividad, sin alcanzar un estado estacionario para ninguno de los dos sistemas, corrobora la idea de aumentar el tiempo de residencia de operación, para incentivar la regeneración óptima de las colonias microbianas involucradas en el proceso (Battista et al., 2024).

Mediante el planteamiento de modelos para el ajuste del comportamiento del sustrato y de los microorganismos (*véase Anexo G*), se proponen tiempos de retención hidráulicas óptimas para futuras investigaciones de elongación en operación semicontinua para los reactores sintético y lixiviado de 39 (d) y 47 (d), respectivamente.

V. CONCLUSIONES

La elongación de ácidos grasos volátiles de cadena corta para la formación de ácidos grasos de cadena media, con particular enfoque en la producción de ácido caproico, se presenta como una alternativa técnicamente viable para la valorización de residuos orgánicos de origen alimenticio. A través de este estudio, se comprueba que el uso de reactores semicontinuos, tanto para alimentación sintética como real, permite operar de forma estable y con rendimientos de producción iguales o superiores a los mostrados en la literatura.

Considerando el reactor con alimentación sintética compuesta de ácido acético, etanol y nutrientes esenciales, el cual representa una referencia teórica del proceso de elongación, se obtienen razones de consumo de ácido acético para la producción de ácido caproico de $0,9 \pm 0,1$ (*mol/mol*) y $1,2 \pm 0,3$ (*mol/mol*), con selectividades frente a la producción de ácido butírico de $1,4 \pm 0,1$ (*mol/mol*) y $7,2 \pm 2,8$ (*mol/mol*), para las cargas orgánicas 1 y 2, respectivamente. De esto, se infiere una elongación secuencial y estequiométrica del ácido acético a butírico, para la posterior producción de ácido caproico en el primer periodo de operación. Para el segundo periodo, luego del aumento de la carga orgánica, se demuestra una tendencia al consumo del ácido butírico presente en el sistema para favorecer la reacción de elongación a la producción de cadenas de carbono más largas.

El reactor alimentado con una matriz real proveniente de un reactor de lixiviación anaerobio tratando residuos alimentarios, demuestra mayores niveles de producción de ácido caproico que su contraparte sintética, con concentraciones máximas obtenidas de 16395 ± 214 *mg/l* y 13198 ± 548 *mg/l*, respectivamente, además de aumentar el rendimiento de caproico alcanzando razones de 87% (g_C/g_C) frente al 70% (g_C/g_C) máximo obtenido por el reactor sintético. Además, en el reactor alimentado con matriz real se distingue la aparición de compuestos de cadena media en un menor tiempo de operación, sugiriendo la preferencia del inóculo a la utilización de sustratos con mayor disponibilidad y complejidad orgánica para el proceso de elongación.

La reacción de elongación en ambos reactores se muestra con una tendencia favorable en la producción de ácidos grasos de cadena media, así como la adaptación biológica de los microorganismos implicados en el proceso. Se obtienen valores máximos de productividad del inóculo para la producción de ácido caproico de $1,35 \pm 0,06$ ($g/(g \cdot d)$) y $0,30 \pm 0,01$ ($g/(g \cdot d)$) para los reactores sintético y lixiviado, respectivamente. A pesar del aumento progresivo en la productividad, no se observa una tendencia a la estabilización del proceso, lo cual sugiere efectuar un aumento en el tiempo de retención hidráulico para la correcta y óptima adaptación de los microorganismos. Mediante el ajuste de modelos para el comportamiento de los microorganismos y sustrato, se propone trabajar en futuras investigaciones de elongación semicontinua entre tiempos de retención hidráulica de 39 (d) y 47 (d), para los reactores sintético y lixiviado, respectivamente.

VI. REFERENCIAS

- Adolfo Parra Huertas, R. (2015). *Anaerobic digestion: biotechnological mechanisms in waste water treatments and their application in food industry Digestão anaeróbica: mecanismos biotecnológicos no tratamento de águas residuais e sua aplicação na indústria alimentícia* (Vol. 10, Issue 2).
- Agler, M. T., Wrenn, B. A., Zinder, S. H., & Angenent, L. T. (2011). Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: The carboxylate platform. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 29, Issue 2, pp. 70–78). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.11.006>
- Angenent, L. T., Richter, H., Buckel, W., Spirito, C. M., Steinbusch, K. J. J., Plugge, C. M., Strik, D. P. B. T. B., Grootscholten, T. I. M., Buisman, C. J. N., & Hamelers, H. V. M. (2016). Chain Elongation with Reactor Microbiomes: Open-Culture Biotechnology to Produce Biochemicals. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 50, Issue 6, pp. 2796–2810). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04847>
- Battista, F., Zeni, A., Andreolli, M., Salvetti, E., Rizzioli, F., Lampis, S., & Bolzonella, D. (2024). Treatment of food processing wastes for the production of medium chain fatty acids via chain elongation. *Environmental Technology and Innovation*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103453>
- Bevilacqua, R., Regueira, A., Mauricio-Iglesias, M., Lema, J. M., & Carballa, M. (2022). Chain elongation may occur in protein mixed-culture fermentation without supplementing electron donor compounds. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106943>
- Chen, Z., Shi, Z., Zhang, Y., Shi, Y., Sun, M., Cui, Y., Zhang, S., & Luo, G. (2024). Metagenomic analysis towards understanding the effects of ammonia on chain elongation process for medium chain fatty acids production. *Bioresource Technology*, 395. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130413>
- Choi, K., Jeon, B. S., Kim, B. C., Oh, M. K., Um, Y., & Sang, B. I. (2013). In situ biphasic extractive fermentation for hexanoic acid production from sucrose by *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(5), 1094–1107. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0310-3>
- De la Fuente, J. (2023). *UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL SANTIAGO-CHILE INGENIERO CIVIL QUÍMICO*.
- De Sá, L. R. V., De Oliveira, M. A. L., Cammarota, M. C., Matos, A., & Ferreira-Leitão, V. S. (2011). Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(23), 15177–15186. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2011.08.056>

- Global Industry Analysts, I. (2024). *Caproic Acid - Global Strategic Business Report*. <https://www.researchandmarkets.com/reports/5302114/caproic-acid-global-strategic-business-report#product--tags>
- Grootscholten, T. I. M., Steinbusch, K. J. J., Hamelers, H. V. M., & Buisman, C. J. N. (2013). High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation. *Bioresource Technology*, 136, 715–718. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.02.085>
- Huo, W., Ye, R., Shao, Y., Wang, H., & Lu, W. (2023). Insight into the mechanism of CO₂ to initiate and regulate ethanol-driven chain elongation by microbial community and metabolic analysis. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110537>
- Ji, X., Zhu, K., Zhang, Y., Ullah, F., Li, A., & Zhang, L. (2022). Mixed culture chain elongation for consumption of acetate and ethanol in anaerobic fermentation: The impact of salt type, dosage and acclimation. *Waste Management*, 152, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.08.005>
- Liu, Y., Chen, L., Duan, Y., Li, R., Yang, Z., Liu, S., & Li, G. (2024). Recent progress and prospects for chain elongation of transforming biomass waste into medium-chain fatty acids. In *Chemosphere* (Vol. 355). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141823>
- Liu, Y., He, P., Shao, L., Zhang, H., & Lü, F. (2017). Significant enhancement by biochar of caproate production via chain elongation. *Water Research*, 119, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.050>
- Liu, Y., Lü, F., Shao, L., & He, P. (2016). Alcohol-to-acid ratio and substrate concentration affect product structure in chain elongation reactions initiated by unacclimatized inoculum. *Bioresource Technology*, 218, 1140–1150. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.07.067>
- Ma, H., Lin, Y., Jin, Y., Gao, M., Li, H., Wang, Q., Ge, S., Cai, L., Huang, Z., Van Le, Q., & Xia, C. (2021). Effect of ultrasonic pretreatment on chain elongation of saccharified residue from food waste by anaerobic fermentation. *Environmental Pollution*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115936>
- Ministerio de Medio Ambiente de Chile. (2020). *ESTRATEGIA NACIONAL DE RESIDUOS ORGÁNICOS CHILE 2040*.
- Montecchio, D., Gazzola, G., Gallipoli, A., Gianico, A., & Braguglia, C. M. (2024). Medium chain Fatty acids production from Food Waste via homolactic fermentation and lactate/ethanol elongation: Electron balance and thermodynamic assessment. *Waste Management*, 177, 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2024.01.049>

- Reddy, M. V., Hayashi, S., Choi, D., Cho, H., & Chang, Y. C. (2018). Short chain and medium chain fatty acids production using food waste under non-augmented and bio-augmented conditions. *Journal of Cleaner Production*, 176, 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.166>
- Reddy, M. V., Nandan Reddy, V. U., & Chang, Y. C. (2022). Integration of anaerobic digestion and chain elongation technologies for biogas and carboxylic acids production from cheese whey. *Journal of Cleaner Production*, 364. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132670>
- Roghair, M., Liu, Y., Strik, D. P. B. T. B., Weusthuis, R. A., Bruins, M. E., & Buisman, C. J. N. (2018). Development of an effective chain elongation process from acidified food waste and ethanol into n-Caproate. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00050>
- Tao, X., Zhang, P., Zhang, G., Nabi, M., Wang, S., Ye, J., Bao, S., Zhang, Q., & Chen, N. (2019). Carbide slag pretreatment enhances volatile fatty acid production in anaerobic fermentation of four grass biomasses. *Energy Conversion and Management*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112009>
- Venkateswar Reddy, M., Kumar, G., Mohanakrishna, G., Shobana, S., & Al-Raoush, R. I. (2020). Review on the production of medium and small chain fatty acids through waste valorization and CO₂ fixation. *Bioresource Technology*, 309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123400>
- Wang, Q., Fu, H., Zhang, G., Wu, Y., Ma, W., Fu, C., Cai, Y., Zhong, L., Zhao, Y., Wang, X., & Zhang, P. (2023). Efficient chain elongation synthesis of n-caproate from shunting fermentation of food waste. *Bioresource Technology*, 370. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128569>
- Wang, Q., Yang, N., Cai, Y., Zhang, G., Wu, Y., Ma, W., Fu, C., & Zhang, P. (2023). Advanced treatment and valorization of food waste through staged fermentation and chain elongation. *Bioresource Technology*, 384. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129286>
- Wang, Q., Yang, N., Cai, Y., Zhang, R., Wu, Y., Ma, W., Fu, C., Zhang, P., & Zhang, G. (2023). Advances in understanding entire process of medium chain carboxylic acid production from organic wastes via chain elongation. *Chemosphere*, 339. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139723>
- Wang, Q., Zhang, P., Bao, S., Liang, J., Wu, Y., Chen, N., Wang, S., & Cai, Y. (2020). Chain elongation performances with anaerobic fermentation liquid from sewage sludge with high total solid as electron acceptor. *Bioresource Technology*, 306. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123188>

- Wu, Q., Feng, X., Guo, W., Bao, X., & Ren, N. (2020). Long-term medium chain carboxylic acids production from liquor-making wastewater: Parameters optimization and toxicity mitigation. *Chemical Engineering Journal*, 388. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124218>
- Wu, Q., Guo, W., Bao, X., Meng, X., Yin, R., Du, J., Zheng, H., Feng, X., Luo, H., & Ren, N. (2018). Upgrading liquor-making wastewater into medium chain fatty acid: Insights into co-electron donors, key microflora, and energy harvest. *Water Research*, 145, 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.046>
- Yin, Y., Zhang, Y., Karakashev, D. B., Wang, J., & Angelidaki, I. (2017). Biological caproate production by *Clostridium kluyveri* from ethanol and acetate as carbon sources. *Bioresource Technology*, 241, 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.184>
- Zan, F., Iqbal, A., Lu, X., Wu, X., & Chen, G. (2022). “Food waste-wastewater-energy/resource” nexus: Integrating food waste management with wastewater treatment towards urban sustainability. *Water Research*, 211. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118089>

ANEXOS

A. Diagrama del montaje

En la *figura A. 1*, se observa el montaje del reactor de lixiviación con control de pH planteado por De la Fuente (2023) y utilizado en la metodología de esta investigación para obtener el lixiviado rico en AGV.

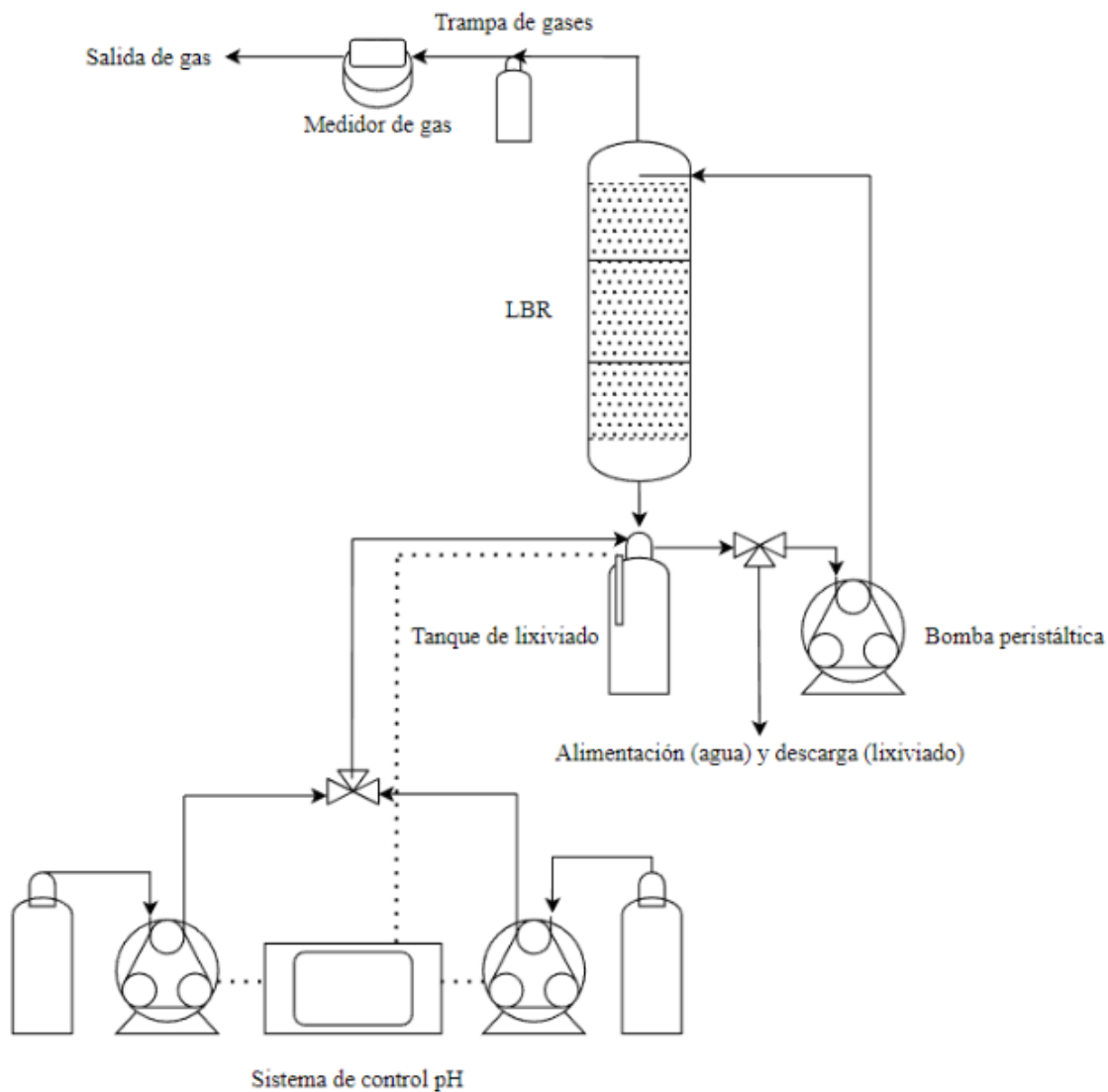


Figura A. 1: Montaje de LBR con control de pH (De la Fuente, 2023).

B. Caracterización de residuos alimenticios

En la *tabla A. 1*, se presenta la caracterización de los residuos alimenticios utilizados en el reactor de lixiviación para la obtención de la materia prima para el proceso de elongación.

Tabla A. 1: Caracterización de residuos alimenticios para fermentación en LBR (De la Fuente, 2023).

Componente	Porcentaje (%p/p)	Observación
Carne	9,4	10% grasa
Repollo	3,8	Crudo
Zanahoria	2,6	Cocido, cáscara aparte
Cáscara de zanahoria	1,1	
Espinaca	3,8	Crudo
Tomate	3,8	Crudo con cáscara
Brócoli	3,8	Cocido
Papas	15,3	Cocido, cáscara aparte
Cáscaras de papas	3,6	
Naranja	2,8	Crudo con cáscara
Limón	2,8	Crudo con cáscara
Manzana	5,7	Crudo con cáscara
Banana	4,5	Crudo, cáscara aparte
Cáscara de banana	3,1	
Arroz	14,1	Cocido
Fideos	14,1	Cocido
Pan	5,7	Crudo
Total	100	

C. Caracterización del inóculo

En la *tabla A. 2* se presenta la caracterización del inóculo utilizado en el LBR y en los reactores de elongación antes del pretratamiento térmico:

Tabla A. 2: Caracterización del inóculo antes del pretratamiento térmico.

	Sólidos suspendidos Totales	Densidad
Valor	181,7 g/kg	1,0 g/ml
Desviación Estándar	22%	—

D. Conversión de unidades de los compuestos

La *tabla A. 3* siguiente contiene los pesos moleculares y la cantidad molar de carbonos que tiene cada uno de los compuestos involucrados en la investigación.

Tabla A. 3: Conversión de unidades de los compuestos.

Compuesto	PM (g/mol)	R (mol _C /mol)
Ácido acético	60,05	2
Ácido propiónico	74,08	3
Ácido isobutírico	88,11	4
Ácido butírico	88,11	4
Ácido isovalérico	102,13	5
Ácido valérico	102,13	5
Ácido isocaproico	116,60	6
Ácido caproico	116,60	6
Ácido heptanoico	130,10	7
Etanol	46,07	2
Carbono	12,01	1

Por otro lado, la densidad del etanol que se utiliza en el montaje de los reactores y preparación de las alimentaciones es de 0,789 g/ml (*Referencia: Merck*).

E. Preparación de la alimentación para los reactores de elongación

Luego de la resolución del sistema de ecuaciones de la carga orgánica y la proporción molar para la preparación de las alimentaciones para cada uno de los sistemas, se presenta en la *tabla A. 4* la cantidad de acetado de sodio, volumen de lixiviado y de etanol, según corresponda, que se deben añadir a cada medio de alimentación para satisfacer con el suplemento de carbono necesario. Además, se incluye la cantidad de medio mineral de acuerdo a la razón descrita en la metodología.

Tabla A. 4: Preparación de la alimentación para cada una de las cargas orgánicas.

Parámetro	Sintético OLR 1	Sintético OLR 2	Lixiviado
Volumen de preparación	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Acetado de sodio	6,53 g	8,16 g	—
Volumen de lixiviado	—	—	335 ml
Volumen de etanol	13,94 ml	17,43 ml	14,00 ml
Medio mineral	699 ml	874 ml	651 ml

F. Elementos traza de medio mineral DSM 52

En la *tabla A. 5* se presenta la preparación de los elementos traza para el medio mineral DSM 52 utilizado en la alimentación del proceso de elongación.

Tabla A. 5: Elementos traza de medio mineral DSM 52.

Compuesto	Valor
<i>HCl</i> (25%)	10 ml
<i>FeCl₂ · 4H₂O</i>	1,5 g
<i>ZnCl₂</i>	70 mg
<i>MnCl₂ · 4H₂O</i>	100 mg
<i>H₃BO₃</i>	6 mg
<i>CoCl₂ · 4H₂O</i>	190 mg
<i>CuCl₂ · 2H₂O</i>	2 mg
<i>NiCl₂ · 6H₂O</i>	24 mg
Agua destilada	990 ml

G. Modelo cinético de reactores de elongación y cálculo de TRH óptimo

En este apartado se plantea una única modelación para ambos sistemas de elongación (reactores sintético y lixiviado) con la finalidad de encontrar valores de TRH óptimos, que pueden ser utilizados en futuras investigaciones de elongación.

Se utiliza la ecuación de Monod para crecimiento bacteriano específico $\mu(S)$ dependiente de la concentración del sustrato S (ec. 20). Donde μ_{max} (d^{-1}) corresponde a la velocidad específica máxima de crecimiento, S ($\frac{gC}{l}$) a la concentración de sustrato y K_S ($\frac{gC}{l}$) a la constante de saturación.

$$\mu(S) = \frac{\mu_{max} \cdot S}{S + K_S} \quad (20)$$

Por otro lado, al reactor de elongación de operación semicontinua se realiza un balance de materia a la concentración de microorganismos X ($\frac{g_{SSV}}{l}$) (ec. 21) y a la concentración del sustrato S ($\frac{gC}{l}$) (ec. 22).

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{1}{TRH}X + \mu X \quad (21)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{TRH}(S_0 - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad (22)$$

La simplificación y resolución del modelo se realiza mediante el método numérico de Euler. Las ecuaciones para el balance de materia de microorganismos y sustrato luego de la aplicación del

método se describen en las *ecuaciones 23 y 24*, en las cuales se utiliza el subíndice n para la discretización del modelo.

$$X_{n+1} = \left(\mu_n - \frac{1}{TRH} \right) X_n \cdot \Delta t + X_n \quad (23)$$

$$S_{n+1} = \left[\left(S_{0,n-1} - S_n \right) \cdot \frac{1}{TRH} - \frac{\mu_n X_n}{Y_{X/S}} \right] \cdot \Delta t + S_n \quad (24)$$

La concentración inicial de microorganismos X_0 corresponde a los planteados por la metodología en la *tabla 4*, al igual que el tiempo de retención hidráulico TRH en la *tabla 3*. Por otro lado, cada concentración de sustrato alimentado $S_{0,n}$ corresponde a la concentración de carbono orgánica real alimentada y medida.

El juste del modelo se realiza mediante la minimización de cuadrados entre las curvas de concentración de microorganismos y sustrato, variando los parámetros μ_{max} , K_s y el rendimiento de la biomasa por sustrato $Y_{X/S}$ $\left(\frac{g_{SSV}}{g_c} \right)$. El modelo ajustado para el reactor sintético y lixiviado se presentan en las *figuras A. 2 y A. 3*, respectivamente.

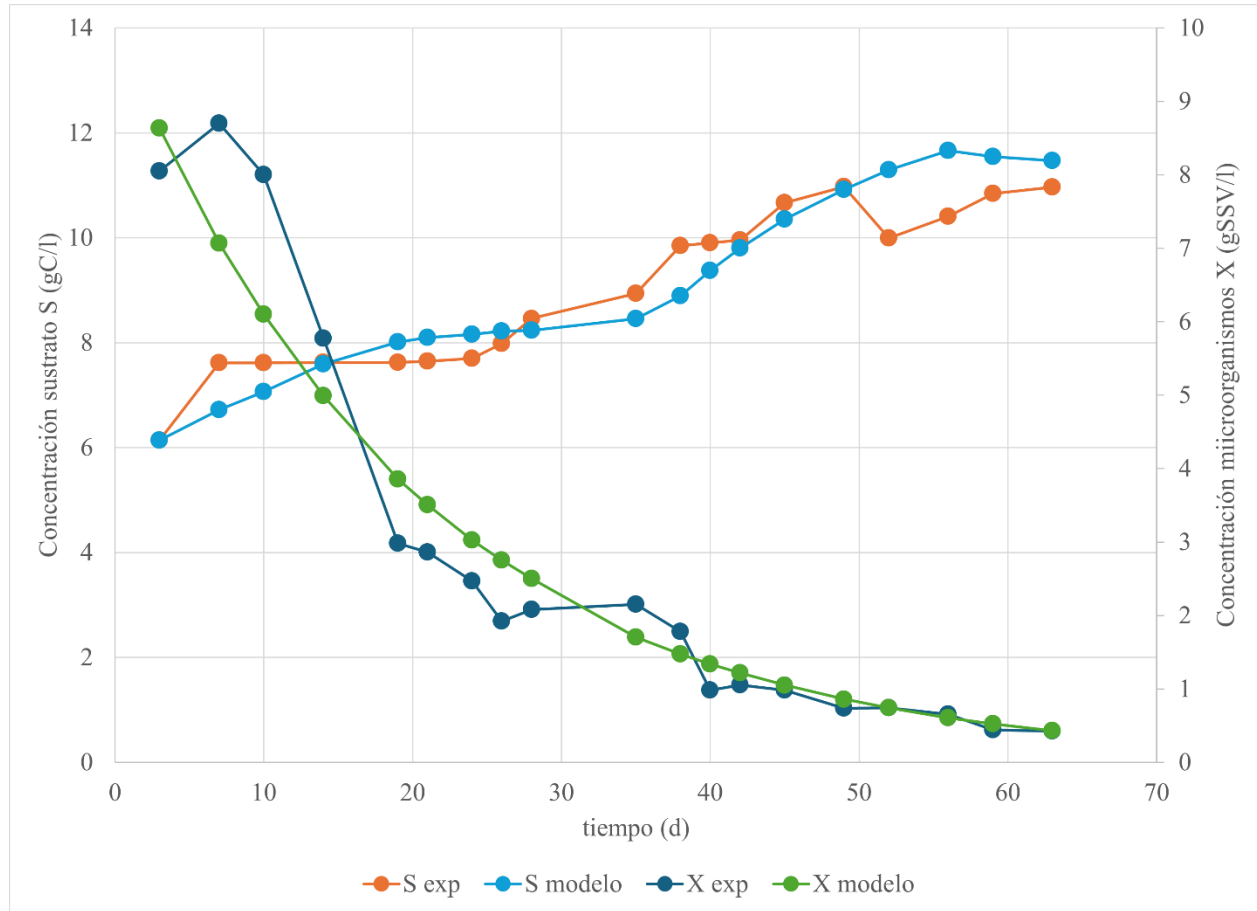


Figura A. 2: Modelo ajustado para el reactor sintético.

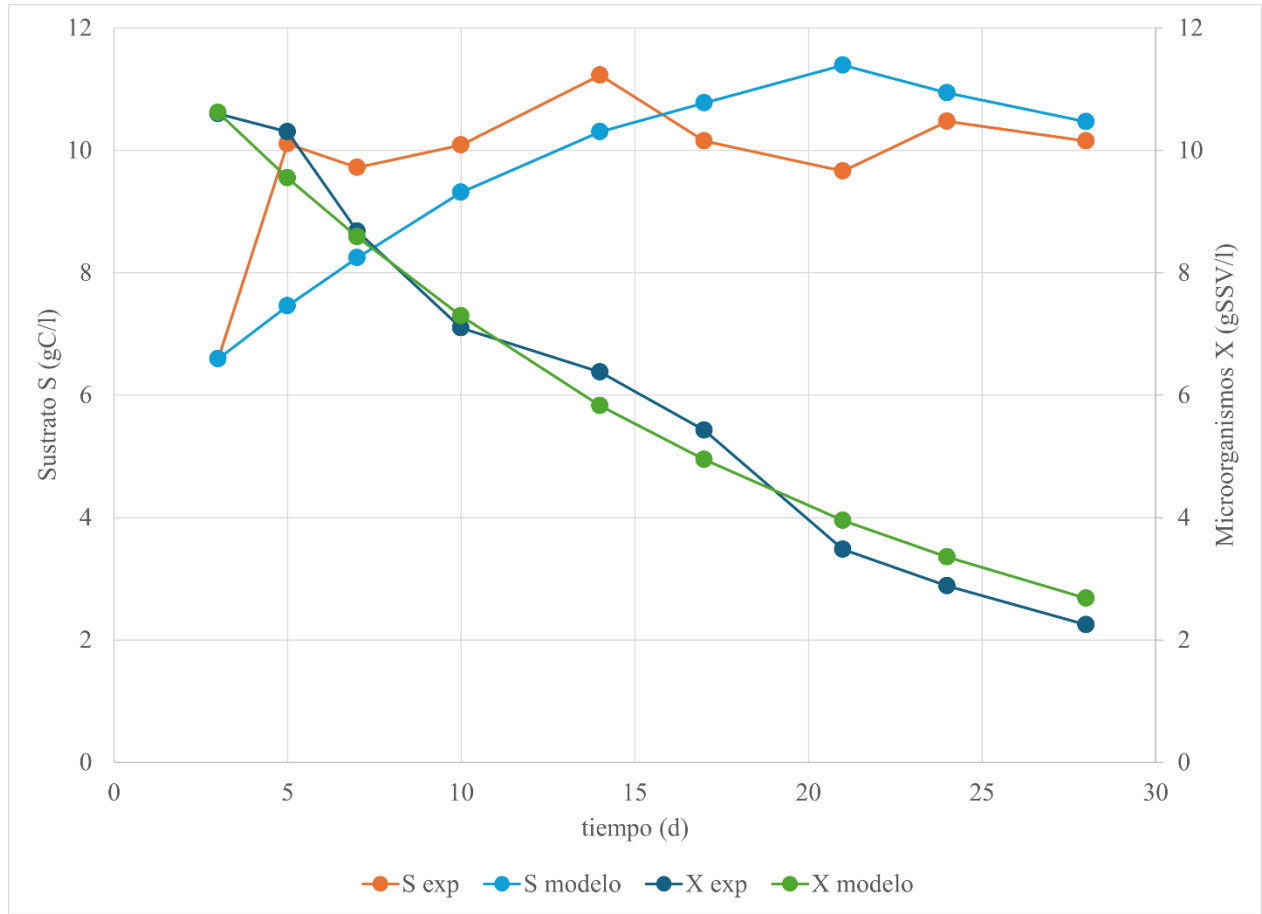


Figura A. 3: Modelo ajustado para el reactor lixiviado.

Considerando el ajuste de los parámetros para los modelos propuestos, se estable analíticamente el equilibrio estacionario de la operación de los reactores mediante la *ec. 25* para la estimación del tiempo de retención hidráulico óptimo TRH_{op} para cada uno de los sistemas.

$$TRH_{op} = \frac{1}{\mu} \quad (25)$$

En la *tabla A. 6* se presenta el ajuste de los parámetros de los modelos, junto al tiempo de retención hidráulico óptimo propuesto para futuras investigaciones en operaciones de elongación continuas o semicontinuas. De los valores presentados, es importante recalcar que los modelos no consideran las posibles limitaciones o inhibiciones por sustrato y/o productos en el sistema.

Tabla A. 6: Parámetros ajustados para los modelos de elongación semicontinua.

	Reactor Sintético	Reactor Lixiviado
$\mu_{max} \text{ (d}^{-1}\text{)}$	0,026	0,021
$K_s \left(\frac{g_c}{l}\right)$	0	0
$Y_{X/S} \left(\frac{g_{SSV}}{g_c}\right)$	4,0	1,03
$TRH_{op} \text{ (d)}$	38,5	47,3