

MEDICION DE ACIDOS GRASOS VOLATILES MEDIANTE LA DEGRADACION ANAEROBIA DE UN VERTIDO SALINO

González E., Gabriel., Roeckel vonB., Marlene, Sanhueza M., Verónica, Vargas A., Daniela y Aspé L., Estrella

Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Correo 3, Concepción, Chile. FAX: 56-41-243750, E-mail: easpe@udec.cl

Palabras Claves: AGV, Anaerobiosis, desecho salino.

RESUMEN

La determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) comúnmente se realiza por cromatografía gaseosa. Sin embargo, cuando las muestras se encuentran en medio salino se presentan dificultades debido a la cristalización de la sal, lo que contamina o corroe al cromatógrafo.

Se estudiaron distintos métodos para eliminar el interferente: *headspace*, liofilización y extracción por solvente. El método más adecuado corresponde al de extracción por solvente, utilizando dietil éter como solvente, obteniéndose una desviación media de 14.4, 7.7, 3.6 y 3.2 % para ácido acético (HAc), propiónico (HPr), butírico (HBr) y valérico (HVa), respectivamente. A las muestras se les agregó ácido fosfórico al 5 % y un estándar interno (SI), luego fueron congeladas para favorecer la distribución de AGV al solvente y el análisis se hizo a la fase orgánica, la cual es rica en AGV y libre de sal. Por análisis estadístico se determinó que el método puede medir concentraciones de AGV en un rango de concentraciones de 2 a 1000 mg-L⁻¹. Finalmente, se aplicó el método analítico en un estudio de producción y consumo de AGV, durante la degradación de proteínas en medio anaerobio y salino.

Introducción.

Los ácidos grasos volátiles libres de cadena corta, es decir, ácidos carboxílicos de 2 a 5 carbonos, son productos intermedios de la degradación anaerobia de materia orgánica, y corresponden al producto de la etapa acidogénica y a su vez son sustrato de la etapa acetogénica (1). Además, el 15 % del metano producido durante la fermentación metabólica de macromoléculas orgánicas proviene de los AGV (2). Si los AGV están presentes en altas concentraciones pueden causar estrés microbiano, por lo que la concentración de AGV, es un factor importante en la operación de un reactor anaeróbico. Los AGV se miden

indirectamente a través de análisis de alcalinidad, y han sido señalados como un parámetro de control de reactores (3). La determinación cuantitativa directa de los AGV, más común, es por cromatografía gaseosa con detector de ionización de flama (4) y existen varias aplicaciones de este método en la literatura. (5, 6, 7, 8 y 9). Sin embargo, cuando el vertido a degradar es altamente salino, el método presenta dificultades debido a la cristalización de la sal lo que contamina y corroe componentes vitales del cromatógrafo. Por esta razón, el objetivo de este trabajo es desarrollar una adaptación del método usado en la literatura realizando distintas preparaciones de la muestra de forma de eliminar las sales presentes, y aplicarlo en el estudio de la producción de AGV durante la degradación anaerobia de un sustrato salino y proteico.

Una alternativa para obviar el problema de la sal es pasar los AGV a la fase gaseosa, debido a que el sustrato posee altas concentraciones de sal, se favorece la volatilización de los AGV. Otra alternativa es pasar selectivamente a una fase líquida los AGV, esto puede hacerse por liofilización y posterior extracción con un solvente que solubilice los AGV y no la sal.

Por las razones expuestas, se ensayaron los métodos de *headspace*, para determinar los AGV a partir de una muestra de la fase gaseosa (10), de liofilización y de extracción por solvente (4).

Metodología.

El análisis de los ácidos grasos volátiles se llevó a cabo en un cromatógrafo Hewlett Packard, 5890 Serie II, equipado con detector de ionización de flama y una columna capilar de sílice fundida de 0.53 (mm) de diámetro, 15 (m) de largo y 1.20 (µm) de espesor de película, modelo EC—1000 marca Alltech (Deerfield, Estados Unidos). El gas portador era helio (99.995%, INDURA, Buenos Aires, Argentina).

Puesta en marcha del cromatógrafo.

Inicialmente se usó el gas portador y su flujo en la columna, de acuerdo a lo descrito en la literatura (6). El flujo de hidrógeno, aire y gas auxiliar se ajustaron de

acuerdo a las condiciones descritas en el Manual de Operación del Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard Serie II (11). Se ensayó el método con estándares de ácidos grasos volátiles y un estándar interno en mezclas de concentración de 10 a 1000 (mg/L) de cada uno. Se estudió el efecto de la variación de la temperatura sobre el tiempo de retención y resolución de los ácidos grasos volátiles, en condiciones isotérmicas en el rango de 80 (°C) a 170 (°C) y mediante rampas de temperatura, en que la temperatura inicial estaba en el rango de 80 a 100 (°C), para luego de 2 (min) subir a 140 (°C) a 5 (°C min⁻¹).

Preparación de muestra salina.

Se ensayaron las siguientes técnicas: espacio de cabeza o *headspace*, liofilización y extracción con solvente de los AGV y SI.

El procedimiento de *headspace* se llevó a cabo añadiendo 0.5 (mL) H₂SO₄ a la muestra de 5 (mL), se analizó la fase gaseosa de acuerdo a lo propuesto en la literatura (10).

Para la liofilización y extracción con solvente se tomó 1 (mL) de muestra. La liofilización se hizo en el equipo Labconco Freezone 6; a temperatura de -40 (°C) y a presión de 0.003 (mbar), por 24 horas. Los AGV se extrajeron selectivamente con metanol, luego, se centrifugó y se sacó 1 (μL) para ser analizado.

La extracción con solvente se realizó ensayando con los siguientes solventes dicloro metano, n—heptano, diétil éter y diisopropil éter. La extracción se realizó a 1 (mL) de muestra, luego se congeló a -18 (°C) y se analizó la fase orgánica (solvente más AGV) por cromatografía gaseosa de acuerdo al método desarrollado en este trabajo.

Reproducibilidad y límite de detección.

Una vez obtenidas las mejores condiciones para medir ácidos grasos volátiles, se realizó un estudio de reproducibilidad, linealidad y límite de detección. Para ello se prepararon muestras de mezclas de ácidos a 0, 10, 25, 50, 75, 100, 200 y 300 (mg/L) cada uno y en cada caso con 24 (mg/L) de NaCl.

Se midió 0.95 (mL) de HAc; 1.01 (mL) HPr; 1.05 (mL) HBU y 1.09 (mL) HVa. Se llevó a un volumen final de 100 (mL) (enrasado con sustrato) obteniendo 10.000 (mg/L) de AGV en la solución. De esta solución, se hicieron las diluciones (0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 (mg/L)) necesarias para obtener una curva de calibración por triplicado en distintos tiempos (semanas). El análisis se hizo de acuerdo a lo descrito previamente.

El estudio de la reproducibilidad del tiempo de retención se realizó con 8 muestras de 100 (mg/L) de cada AGV. La precisión del método se

obtuvo para una concentración de 100 (mg/L) de cada AGV, se prepararon 10 muestras y se determinó el error asociado a esa concentración.

Mediciones de AGV.

Se tomó un volumen suficiente de muestra, de manera que al ser filtrada se obtenga 0.5 (mL). Posteriormente se añadió 50 (μL) de ácido 2-etil-butírico de concentración 500 (mg/L), luego se añaden 100 (μL) de ácido fosfórico y finalmente, 0.5 (mL) de di—isopropil éter. La solución obtenida se mezcló y se congeló por un periodo superior a 48 (h). Se obtuvieron dos fases; una sólida formada por la matriz acuosa y salina, y otra fase; la orgánica que contiene los ácidos grasos volátiles. La fase orgánica se vertió en otro recipiente y se analizó directamente en el cromatógrafo, con las siguientes condiciones de operación: Temperatura del horno: 140 (°C), temperatura del inyector; 250 (°C), temperatura del detector; 270 (°C), presión de entrada en la columna; 1.5 (psi), flujo volumétrico del gas portador (Helio) : 5 (mL/min) y Razón de dilución: 50. Después de 6.5 (min), de finalizado la medición de los AGV, se procedió a aumentar la temperatura del horno a una velocidad de 60 (°C/min) hasta 170 (°C), de manera de eliminar las impurezas que estuviesen presentes.

Estudio de degradación de proteínas.

La formación de AGV durante la degradación de un vertido proteínico y salino se realizó en reactores discontinuos de 65 (mL) de volumen útil, en los cuales se agregó 5 (mL) de lodo anaeróbico proveniente de un reactor de laboratorio que funciona a 37 (°C) por 1,5 años, y 45 (mL) de vertido sintético, el cual ha sido usado para simular vertido salino y ha sido descrito en la literatura (12). Los reactores consistieron en viales de vidrio sellados herméticamente con un tapón de borosilicato, los cuales fueron gasificados con nitrógeno, para mantener el ambiente anaeróbico. El ensayo se realizó a 37 ± 1 (°C) que corresponde a la temperatura óptima para el desarrollo de las bacterias mesofílicas. Para cada punto experimental, se realizó una muestra, un duplicado y dos blancos, usando un reactor diferente para cada punto muestreado; un blanco sólo contenía medio de cultivo, y el otro contenía medio de cultivo sin proteínas, e inóculo.

Resultados y Discusión.

Condiciones de operación.

Las condiciones de operación obtenidas para los equipos de laboratorio y materiales disponibles, se presentan en la tabla 1. El método se ajustó con leves modificaciones a las condiciones de trabajo del laboratorio. En general, los valores obtenidos para los parámetros de operación se asemejan a los descritos

en el método de análisis de ácidos grasos volátiles descrito en la literatura (6). La única diferencia es la temperatura de la columna, que es a condiciones isotérmicas (temperatura de 140 (°C)), permitiendo leer concentraciones de ácidos grasos del orden de 2 a 1000 (mg/L).

Tabla 1
Condiciones de operación
del cromatógrafo HP 5890 Series II.

Parámetro	Valores
Gas portador, helio	5 (mL/min)
Aire	300 (mL/min)
Hidrógeno	30 (mL/min)
Gas auxiliar, helio	25 (mL/min)
Temperatura	140 (°C).
Programa T	Isotérmico

Curva de Calibración para muestras no salinas.

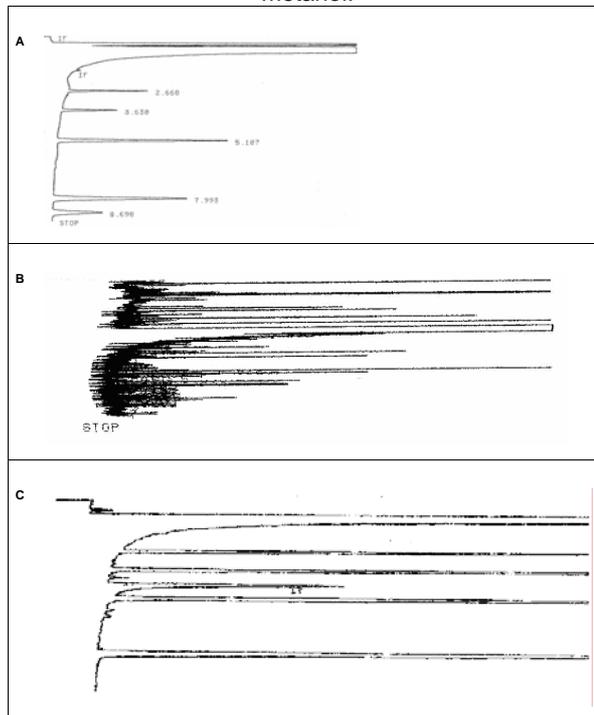
Se realizaron calibraciones con estándares no salinos, en las condiciones de operación del cromatógrafo, determinadas previamente. Las curvas resultaron lineales y repetibles en un rango de 25 (mg/L) hasta 1.000 (mg/L). Uno de los cromatogramas usados en estas calibraciones se muestra en la figura 1-A. En este cromatograma se observa que el primer pico corresponde al solvente agua, el segundo corresponde al ácido acético, luego al ácido propiónico, butírico, valérico y el último pico corresponde al estándar interno. La calidad del cromatograma permite concluir que este método es adecuado para la determinación de ácidos grasos volátiles, en matriz no salina.

Separación de ácidos grasos volátiles mediante head space.

En la figura 1-B se presentan el cromatograma de la fase gaseosa resultante al usar la técnica de head space, en las condiciones indicadas en la metodología. Se puede apreciar que este cromatograma presenta mucho ruido, probablemente por la presencia de otros gases, y los resultados obtenidos no son confiables. Por lo tanto, esta técnica fue desechada.

Figure 1

- (A) Cromatograma de un estándar de AGV, usando agua como solvente
- (B) Cromatograma de un estándar de AGV, en una matriz con proteínas, sales, amonio y otros interferentes, usando la técnica de headspace (solvente: agua)
- (C) Cromatograma de un estándar de AGV de 750 (mg/L) de cada ácido, liofilizado y luego, extraído con metanol.



Separación de ácidos grasos volátiles por liofilización y extracción por solvente.

El resultado de la liofilización y extracción con metanol se muestra en la figura 1-C. Se observó que al extraer con metanol, se logró disolver los ácidos grasos volátiles y no disolver las sales presente. Sin embargo, este procedimiento no presentó resultados repetibles, debido a que el metanol interactuaba con la columna, y como eluye en primer lugar, produce una cola que enmascara a los ácidos grasos en bajas concentraciones, en especial el ácido acético. En la figura 1-C se observa claramente como la cola del metanol, se sobrepone con la el ácido acético, el cual eluye en segundo lugar.

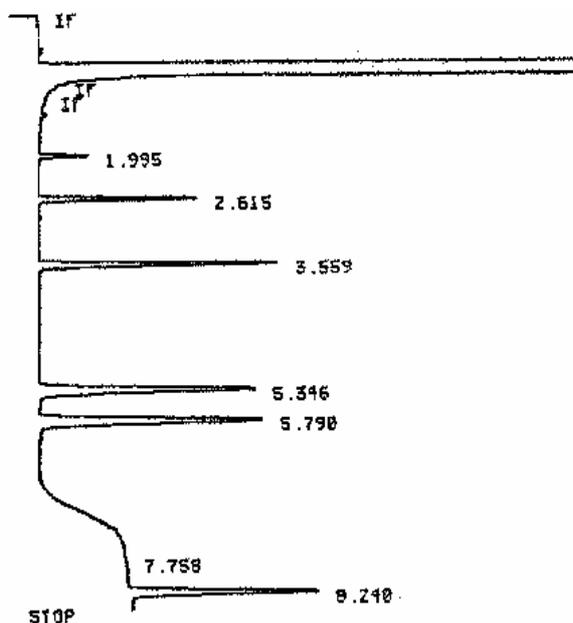
Separación de ácidos grasos volátiles por extracción con solvente

Se estudió la extracción de los AGV con solventes orgánicos no miscibles con el agua. De los solventes estudiados el que dio mejores resultados fue el diisopropil éter, ya que permitía leer concentraciones bajas de ácidos grasos volátiles, era reproducible y tenía bajo error. Un cromatograma típico obtenido con

este solvente se muestra en la figura 2, donde, se puede ver que el solvente (primer pico), no interactúa con la columna, debido a que no produce una cola que interfiere con los picos de los ácidos grasos volátiles. Además, se obtienen distintos ácidos se obtienen con una buena resolución y en un tiempo adecuado.

Figure 2

Cromatograma para un estándar de AGV de 1000 (mg/L) de cada ácido, extraído con di-isopropil éter (con modificación de tiempo de retención).



Curva de Calibración para muestras salinas

Las curvas obtenidas se presentan en la figura 3. Las curvas poseen una gran correlación lineal obteniéndose la correlación más baja para el ácido acético con 0.985 y la más alta para el ácido butírico y valérico con 0.999. Además, se hicieron análisis de reproducibilidad, límite de detección, linealidad y sensibilidad, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 2.

Figure 3

Curva de calibración de AGV usando el método con estándar interno (ácido 2-etil-butírico).

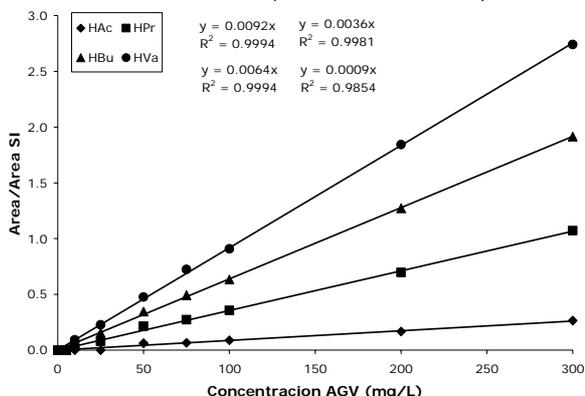


Tabla 2

Calibración del método de análisis de ácidos grasos volátiles en una matriz salina.

Ácido	HAc	HPr.	HBU	Hva
Tiempo de retención (min)	2.05 ± 0.4%	2.69 ± 0.3%	3.66 ± 0.2%	5.49 ± 0.2%
Rango lineal (mg/L)	5-1000	2-1000	2-1000	2-1000
Lím. de detección (mg/L)	0.2	0.4	0.2	0.2
Lím. de cuantificación (mg/L)	5	2	2	2
Error relativo %	14.4	7.7	3.6	3.2

Estudio de la formación de AGV durante la degradación anaerobia de proteínas en medio salino

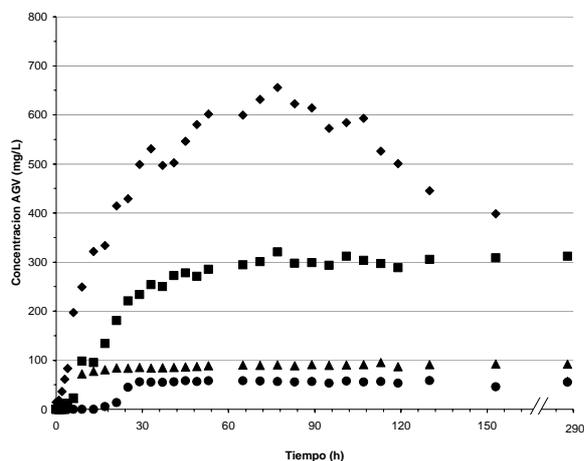
La figura 4 muestra la formación de AGV durante la degradación de proteínas con concentración inicial de 1680 (mg/L de proteínas). Éstos corresponden a ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico. La formación de estos ácidos presenta la misma tendencia reportada en la literatura (13). Es posible observar que el ácido acético tiene una velocidad de formación mayor a los demás ácidos analizados, y es el único que alrededor de las 80 horas alcanza un valor máximo de 650 (mg/L), y comienza a degradarse, bajando su concentración hasta 50 (mg/L) a las 290 horas. Además, se observa que alrededor de las 15, 30 y 50 horas, se estabiliza la concentración de los ácidos butírico, valérico y propiónico, respectivamente, alcanzando cada uno de éstos concentraciones de 100, 50, 300 (mg/L) aproximadamente. Dado que los AGV son compuestos intermedios, es esperable una

degradación de éstos, sin embargo, esto no se observa en este experimento.

Se observa que después de 24 horas, existe una formación simultánea de ácidos propiónico, butírico y acético. Esto sugeriría que este último proviene en mayor grado de la transformación de los aminoácidos y en menor grado de la acetogénesis. Después de las 140 horas, el ácido acético es consumido completamente sin que exista degradación de los AGV, lo que indicaría que la acetogénesis se encontraría parcialmente inhibida, de acuerdo a lo reportado en la literatura (13), esto puede deberse a efectos de pH o a la presencia de amonio.

Figure 4

Formación de AGV durante la degradación anaeróbica de proteínas en medio salino (concentración inicial de 1680 mg/L de proteínas) a 37°C. (◆: Acido acético, ■ : Acido propiónico, ▲: Acido butírico ●: Acido valérico)



Conclusiones.

El método adaptado y desarrollado en este informe, permite determinar las cinéticas de degradación de ácidos grasos volátiles en un rango de concentraciones de 2 a 1000 (mg/L). Este rango permite determinar las distintas constantes de saturación y de afinidad del modelo de degradación.

Agradecimientos.

Los autores (E.A.L., M.R.vonB. y G.G.E) agradecen al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología de Chile (FONDECYT) por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto FONDECYT 1020457.

Bibliografía.

- Batstone, D.J.; Keller, J.; Angelidaki, I.; Kalyuzhnyi, S.V.; Pavlostathis, S.G.; Rozzi, A.; Sanders, W.T.M.; Siegrist, H. and V.A. Vavilin, "Anaerobic Digestion Model No 1". IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes. Scientific and Technical Report N° 13. IWA Publishing. United Kingdom. (2002).
- Speece, R. E. "Anaerobic Biotechnology for Industrial Waste Water", Archae Press, Tennessee, Estados Unidos, (1996).
- Lema, Juan y Ramón Mendez. "Diseño y operación de digestores anaerobios basados en conceptos cinéticos", 4to Seminario de Depuración de Aguas Residuales. Ed. F. Fdz. Polanco, P. A. García y S. Hernando, Secretariado de Publicaciones, Universidad de Valladolid, Valladolid, pp 21-39 (1988).
- Ewaschuk, J. , Zello, G. , Naylor, J. and Dion R. Brocks "Metabolic acidosis: separation methods and biological relevance of organic acids and lactic acid enantiomers", / J . Chromatogr .B 781 (2002) pp: 39–56
- García-Ochoa, F., V. E. Santos, L. Naval, E. Guardiola and B. López, "Kinetics model for anaerobic digestion of livestock manure" Enzyme and microbial technology, 25, 55-60(1999)
- Bernard, O., Hadj-Sadok, Z., and Dochain, D. "Dynamical model development and parameter identification for an anaerobic wastewater treatment process". Biotechnol. And Bioeng., 75(4): 424-438 (2001).
- Becerra, M., Long, G., Majone, M., Rolle, E. and A. Scarinci, "Modeling of pretreatment and acidogenic fermentation of the organica fraction of municipal solid wastes". Wat Sci Tech 27(2): 193-200 (1993).
- Yu, H.Q. and Fang, H.H.P., "Acidogenesis of gelatin-rich wastewater in an upflow reactor: influence of pH and temperature". Wat. Res. 37: 55-66 (2003)
- Wu, C., Huang, J., Yan, J., Jih, C. "Consecutive reaction kinetics involving distributed fraction of methanogens in fluidized-bed reactors", Biotechnol. And Bioeng., 57(3): 367-379
- Kolb, B. "Headspace sampling with capillary columns", J . Chromatogr . A 842 (1999) pp: 163–205
- Gas Chromatograph Operation Manual for Hewlett Packard Series II, Hewlett-Packard Company, 1st edition, United States of America, June (1989).
- González, G., Urrutia, H., Roeckel, M. and Aspé. "Protein hydrolysis under anaerobic, saline conditions in presence of acetic acid". J Chem Technol Biotechnol 80:151–157 (2005).
- Angelidaki, I., Ellegaard, L. y B. Ahring. "A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas", Biotechnology and Bioengineering, Vol. 63, N° 3, pp. 363-372 (1999).