

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 828**

51 Int. Cl.:

C12P 5/02 (2006.01)

B09B 3/00 (2006.01)

C02F 11/04 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2013 PCT/DK2013/050443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14198274**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013 E 13814425 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 3008193**

54 Título: **Métodos de procesamiento de residuos sólidos municipales (RSM) usando hidrólisis y fermentación microbiana y lodo resultante de los mismos**

30 Prioridad:

12.06.2013 WO PCT/DK2013/050193
12.06.2013 WO PCT/DK2013/050194

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2018

73 Titular/es:

RENESCIENCE A/S (100.0%)
Kraftværksvej 53
7000 Fredericia, DK

72 Inventor/es:

RØNSCH, GEORG ØRNSKOV;
JENSEN, JACOB WAGNER y
ANTONSEN, SEBASTIAN BUCH

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 683 828 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de procesamiento de residuos sólidos municipales (RSM) usando hidrólisis y fermentación microbiana y lodo resultante de los mismos

Campo:

La invención se refiere, en general, a métodos de procesamiento de residuos sólidos, y en particular a métodos que se basan en la fermentación microbiana.

Los residuos sólidos municipales (RSM), que en particular incluyen los residuos del hogar o residuos domésticos, los residuos de restaurantes y de instalaciones de procesamiento de alimentos, y los residuos de edificios de oficinas tienen un gran componente de material orgánico que se puede transformar adicionalmente en energía, combustibles y productos útiles. En la actualidad, solo se recicla una pequeña parte de los RSM, arrojando la gran mayoría a los vertederos.

Ha surgido un interés considerable en el desarrollo de métodos eficaces y respetuosos con el medio ambiente de tratamiento de residuos sólidos, para maximizar la recuperación de su inherente potencial energético y, también, recuperar materiales reciclables. Un reto significativo en el procesamiento de "residuos a energía" es la naturaleza heterogénea de los RSM. Los residuos sólidos típicamente comprenden un componente considerable de material orgánico degradable entremezclado con plásticos, vidrio, metales y otros materiales no degradables. Los residuos no clasificados se pueden usar directamente en la incineración, tal como se hace ampliamente en países tales como Dinamarca y Suiza, que se basan en los sistemas de calefacción urbana. Véase Strehlik 2009. Sin embargo, los métodos de incineración se asocian con consecuencias ambientales negativas y no logran un reciclaje eficaz de las materias primas. El uso limpio y eficaz de los componentes degradables de los RSM junto con el reciclado típicamente requiere de algún método de clasificación para separar el material degradable del no degradable.

El componente degradable de los RSM se puede usar en el procesamiento de "residuo a energía" usando tanto métodos termoquímicos como métodos biológicos. Los RSM se pueden someter a pirólisis o a otros modos de gasificación termoquímica. Los residuos orgánicos descompuestos térmicamente a temperaturas extremadamente altas, producen componentes volátiles tales como alquitrán y metano, así como un resto sólido o "coque" que pueden quemar con consecuencias menos tóxicas que las que se asocian con la incineración directa. Como alternativa, los residuos orgánicos se pueden convertir térmicamente a "gas de síntesis", que comprende monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno, que se pueden convertir adicionalmente a combustibles sintéticos. Véase, por ejemplo, Malkow 2004 para revisión.

Los métodos biológicos para la conversión de componentes degradables de los RSM incluyen la fermentación para producir productos finales útiles específicos, tales como etanol. Véase, por ejemplo, el documento WO2009/150455; el documento WO2009/095693; el documento WO2007/036795; Ballesteros et al. 2010; Li et al 2007.

Como alternativa, la conversión biológica se puede lograr mediante digestión anaeróbica para producir biometano o "biogás". Véase, por ejemplo, Hartmann y Ahring 2006 para revisión. El componente orgánico previamente clasificado de los RSM se puede convertir a biometano, véase, por ejemplo, el documento US2004/0191755, o tras un proceso de "despulpado" comparativamente sencillo que implica la molienda en presencia de agua añadida, véase, por ejemplo, el documento US2008/0020456.

Sin embargo, la clasificación previa de los RSM para obtener el componente orgánico suele ser costosa, ineficaz o poco práctica. La clasificación en origen requiere una gran infraestructura y de costes operacionales, así como la participación activa y el apoyo de la comunidad de la que se recolectan los residuos - una actividad que ha resultado ser difícil de lograr en las sociedades urbanas modernas. La clasificación mecánica típicamente es altamente costosa y además se asocia con grandes pérdidas de material orgánico, del orden de al menos el 30 %, y a menudo mucho más. Véase, por ejemplo, Connsonni 2005.

Algunos de estos problemas con los sistemas de clasificación se han evitado con éxito mediante el uso de licuefacción de componentes orgánicos degradables en residuos no clasificados. El material licuefactado se puede separar fácilmente de los materiales no degradables. Una vez licuefactado en un lodo bombeable, el componente orgánico se puede usar fácilmente en procesos de conversión termoquímica o biológica. La licuefacción de los componentes degradables se ha documentado ampliamente usando procesos en "autoclave" a alta presión y alta temperatura, véanse, por ejemplo, los documentos US2013/0029394; US2012/006089; US20110008865; WO2009/150455; WO2009/108761; WO2008/081028; US2005/0166812; US2004/0041301; US 5427650; US 5190226.

Una estrategia radicalmente diferente a la licuefacción de componentes orgánicos degradables es la que se puede lograr usando procesos biológicos, específicamente mediante hidrólisis enzimática, véase Jensen et al. 2010; Jensen et al. 2011; Tonini y Astrup 2012; y los documentos WO2007/036795; WO2010/032557.

La hidrólisis enzimática ofrece ventajas únicas sobre los métodos de "autoclave" para la licuefacción de componentes orgánicos degradables. Usando la licuefacción enzimática, se puede llevar a cabo el procesamiento de los RSM de manera continua, usando un equipo comparativamente barato y haciendo reacciones no presurizadas a temperaturas comparativamente más bajas. Por el contrario, los procesos de "autoclave" se deben llevar a cabo a modo de lotes y generalmente implican costes económicos mucho mayores.

Una necesidad percibida de "esterilización" con el fin de reducir los posibles riesgos para la salud que plantean los microorganismos patógenos transmitidos por los RSM ha sido un tema predominante en el apoyo del predominio de los métodos de licuefacción en "autoclave". Véase, por ejemplo, el documento WO2009/150455; y los documentos WO2000/072987; Li et al. 2012; Ballesteros et al. 2010; Li et al. 2007. Asimismo, anteriormente se creía que la licuefacción enzimática requería un pretratamiento térmico a una temperatura comparativamente alta de al menos 90-95 ° C. Esta alta temperatura se consideró esencial, en parte para efectuar una "esterilización" de los RSM no clasificados, de manera que los componentes orgánicos degradables se puedan ablandar y los productos de papel se puedan "despulpas". Véase Jensen et al. 2010; Jensen et al. 2011; Tonini y Astrup 2012.

Los presentes inventores han descubierto que la licuefacción enzimática de los RSM no clasificados usando preparaciones de celulasa aislada se puede lograr sin un pretratamiento a altas temperaturas. De hecho, al contrario de lo esperado, el pretratamiento a altas temperaturas no solo es innecesario, sino que puede ser activamente perjudicial, ya que esto destruye a los microorganismos del ambiente que están prosperando en los residuos.

Promover la fermentación microbiana al mismo tiempo que la hidrólisis de celulasa en condiciones termófilas típicamente entre 40 y 55 ° C mejora la "captura biodegradable", bien usando microorganismos "del ambiente" o bien usando organismos "inoculados" de manera selectiva. Es decir, la fermentación microbiana termófila concurrente aumenta de forma segura el rendimiento del "lodo biodegradable" que se recupera. En estas condiciones, los microorganismos patógenos que se encuentran típicamente en los RSU no prosperan. Véase, por ejemplo, Hartmann y Ahring 2006; Déportes et al. 1998; Carrington et al. 1998; Bendixen et al. 1994; Kubler et al. 1994; Six y De Baerre et al. 1992. En estas condiciones, los patógenos típicos transmitidos por los RSM son desplazados fácilmente por las bacterias ubicuas del ácido láctico y otros organismos seguros.

Además de mejorar la "captura de biodegradable" de la hidrólisis enzimática usando preparaciones de celulasa aislada, la fermentación microbiana concurrente usando cualquier combinación de bacterias del ácido láctico o microorganismos productores de acetato, etanol, formiato, butirato, lactato, pentanoato o hexanoato, "preacondiciona" el lodo biodegradable para hacerlo más eficaz como un sustrato para la producción de biometano.

La fermentación microbiana produce un lodo biodegradable que tiene generalmente un elevado porcentaje de sólidos disueltos en comparación con los sólidos suspendidos, en relación con el lodo biodegradable producido mediante licuefacción enzimática usando solo preparaciones de celulasa aislada. Los polisacáridos de cadena más largas generalmente se degradan más a fondo debido al "preacondicionamiento" microbiano. La fermentación microbiana concurrente y la hidrólisis enzimática usando preparaciones de celulasa aislada degrada biopolímeros en sustratos fácilmente utilizables y, además, logra la conversión metabólica de los sustratos primarios a ácidos carboxílicos de cadena corta y/o etanol. Los biodegradables resultantes que comprende un alto porcentaje de metabolitos microbianos proporcionan un sustrato de biometano que evita de manera eficaz la etapa de "hidrólisis" limitante de velocidad, véase, por ejemplo, Delgenes et al. 2000; Angelidaki et al. 2006; Cysneiros et al. 2011, y que ofrece ventajas adicionales para la producción de metano, particularmente usando sistemas de digestión anaeróbica de "filtro fijo" muy rápidos.

El documento WO2011/100272 desvela un método para el procesamiento de residuos sólidos municipales, en donde la celulasa de origen microbiano, que se puede proporcionar mediante los microorganismos que proporcionan la fermentación, se usa con el fin de producir residuos fermentados que se separan en un lodo de componentes biodegradables y sólidos residuales.

Sorprendentemente, la licuefacción suficiente de componentes degradables de RSM no clasificados antes de la separación del material no degradable se puede lograr en un tiempo de procesamiento relativamente corto, típicamente de 36 horas o menos, solo mediante fermentación microbiana, sin ningún requerimiento de preparaciones de celulasa aislada. Puede lograrse un sustrato de biometano "rápido" mejorado que comprende un alto grado de sólidos disueltos y metabolitos bacterianos, incluso cuando la separación inicial de material no degradable se consigue por fermentación microbiana sola, por el simple procedimiento de fermentación continua del lodo biodegradable recuperado después de la separación inicial de sólidos no degradables.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1. Ilustración esquemática de las principales características de la planta de demostración.

Figura 2. Suma de la concentración de lactato, acetato y etanol en el lodo biogénico obtenido con y sin actividad celulasa complementaria proporcionada por preparaciones de enzimas aisladas.

Figura 3. Captura de biodegradables en kg de ST/ kg de basura. (A). En lodo biogénico tras tamices de 3 mm. (B) Captura total incluyendo material retenido por los tamices.

Figura 4. Degradación comparativa de los sustratos celulósicos y de los RSM modelo mediante el inóculo microbiano y CTEC3.

Figura 5. Degradación comparativa de la parte celulósica de los RSM modelo mediante inóculo microbiano y CTEC3.

Figura 6. Conversión de materia seca en hidrólisis enzimática con CTEC3 y fermentación microbiana concurrentes.

Figura 7. Metabolitos bacterianos recuperados en sobrenadante tras la hidrólisis enzimática con CTEC3 y la fermentación microbiana concurrentes.

Figura 8. Representación gráfica del reactor de ensayo REnescience.

Figura 9. Captura de biodegradables en lodo biogénico durante diferentes períodos de tiempo expresada como kg de SV por kg de RSM procesados.

Figura 10. Metabolitos microbianos en lodo biogénico y recuento bacteriano aeróbico en diferentes puntos temporales.

Figura 11. Distribución de especies bacterianas identificadas en el lodo biogénico del ejemplo 7.

Figura 12. Distribución de las 13 bacterias predominantes en el lodo biogénico del ejemplo 9.

Figura 13. Ascenso y descenso en la producción de biometano usando lodo biogénico del ejemplo 9.

Figura 14. Caracterización del ascenso y del descenso en la producción de biometano del biolíquido "alto en lactato" del ejemplo 6.

Figura 15. Caracterización del ascenso y del descenso en la producción de biometano del biolíquido "bajo en lactato" del ejemplo 6.

Figura 16. Caracterización del ascenso en la producción de biometano del biolíquido de paja de trigo hidrolizada.

Descripción detallada de las realizaciones.

La invención proporciona un método de procesamiento de residuos sólidos municipales (RSM) que comprende las etapas de

- proporcionar un flujo de RSM no clasificados hacia un reactor de fermentación microbiana en el que los RSM se fermentan con agitación a un contenido sin agua de entre el 10 y el 50 % en peso y a una temperatura de entre 35 y 75 °C durante un período de entre 1 y 72 horas en condiciones suficientes como para mantener una concentración de bacterias del ácido láctico vivas de al menos $1,0 \times 10^{10}$ UFC/l, en donde se proporciona actividad celulasa de origen microbiano de al menos 30 UPF/l mediante un consorcio microbiano que proporciona fermentación microbiana y
- eliminar un flujo de RSM no clasificados fermentados del reactor y someterlo a una etapa de separación mediante la cual, los sólidos no degradables se eliminan para proporcionar un lodo de componentes biodegradables.

Las cepas de bacterias del ácido láctico (BAL) de origen natural presentes en los residuos han demostrado previamente que proporcionan una conversión eficaz, a lactato, de un modelo de residuos de cocina que comprende frutas, hortalizas, cereales, carne, pescado y similares. Véase Sakai et al. 2000; Sakai et al. 2004; Akao et al. 2007a; Akao et al. 2007b. No se requirió ningún procedimiento particular de inoculación para producir una fermentación de lactato eficaz de los residuos - éstos simplemente se molieron en un volumen igual de agua, después se calentaron a temperaturas de entre 37 y 55 °C. Típicamente, emergió una comunidad de cepas de origen natural, con una u otra especie que emerge como la claramente dominante. Véase Sakai et al. 2004. Sin embargo, con el fin de facilitar el procesamiento a gran escala, es ventajoso mantener los tiempos de fermentación tan cortos como sea posible durante la etapa inicial antes de la eliminación de los sólidos no degradables. Generalmente, se debería lograr cierta degradación enzimática de origen microbiano antes de la separación de los residuos no degradables. Idealmente, el componente biodegradable de los RSM se licuefacta antes de la separación, lo que significa que se ha dado una suficiente degradación como para que el lodo de sólidos disueltos y no disueltos sea bombeable.

Cuando las fermentaciones se han llevado a cabo usando sustratos que incluyen un gran porcentaje de materiales celulósicos y lignocelulósicos, típicamente se han usado preparaciones de enzima celulasa aislada para promover la hidrólisis de celulasa de manera simultánea con la fermentación usando bacterias del ácido láctico. Véase, por ejemplo, Abe y Takagi 1990; Parajo et al. 1997; Chen y Lee 1997; Schmidt y Padukone 1997. Sin embargo, se ha demostrado que muchas especies de BAL que incluyen casi todas las especies de *Lactobacillus* ensayadas y muchas especies de *Pediococcus* presentan actividad celulasa extracelular. Véase, por ejemplo, Yang et al. 2001; Matthews et al. 2004; Matthews et al. 2006; Gao et al. 2008. Por lo tanto, es posible realizar métodos de la invención usando una fermentación microbiana que comprende principalmente o incluso únicamente BAL y, sin embargo, lograr niveles eficaces de actividad celulasa.

Cualquier residuo sólido municipal no clasificado adecuado se puede usar para realizar los métodos de la invención. Tal como entenderá el experto en la materia, la expresión "residuos sólidos municipales" (RSM) se refiere a partes de residuos que típicamente están disponibles en una ciudad, pero que no necesitan provenir de ningún municipio *per se*. Los RSM pueden ser cualquier combinación de residuo de celulosa, vegetal, animal, plástico, metal o de vidrio, incluyendo, pero sin limitación, uno cualquiera o más de lo siguiente: Basura recogida en sistemas normales de recolección municipal, procesados opcionalmente en algún dispositivo central de clasificación, trituración o despulpado tal como Dewaster® o reCulture®; residuos sólidos clasificados a partir de los hogares, incluyendo tanto partes orgánicas como partes ricas en papel; partes de residuos que provienen de la industria tales como la industria de la restauración, la industria del procesamiento de alimentos, la industria en general; partes de residuos de la industria del papel; partes de residuos de las instalaciones de reciclaje; partes de residuos de la industria alimenticia o de piensos; partes de residuos de la industria médica; partes de residuos que provienen de la agricultura o de sectores relacionados con el cultivo; partes de residuos del procesamiento de productos ricos en azúcar o en almidón; productos agrícolas contaminados o estropeados de otro modo tales como cereales, patatas y remolachas que no se pueden utilizar con fines alimenticios para el hombre o para los animales; restos de jardinería.

Los RSM típicamente son, por naturaleza, heterogéneos. Las estadísticas referentes a la composición de materiales de residuos no se conocen tan ampliamente como para proporcionar una base firme para comparaciones entre países. Las normas y los procedimientos operativos para el muestreo y la caracterización correctos siguen sin estar normalizados. De hecho, sólo se han documentado unos pocos métodos de muestreo normalizados. Véase, por ejemplo, Riber et al., 2007. Al menos en el caso de los residuos sólidos, la composición presenta variación geográfica y estacional. Véase, por ejemplo, Dahlen et al., 2007; Hansen et al., 2007b; Muhle et al., 2010; Riber et al., 2009. También se ha documentado la variación geográfica en la composición de los residuos domésticos, incluso en pequeñas distancias de 200 - 300 km entre municipios. Véase Hansen et al., 2007b. Como regla general, el peso seco de los residuos urbanos modernos de Europa Occidental típicamente comprende el orden del 25 % en peso de "residuos de hortalizas y de alimentos". En China, por el contrario, las proporciones relativas de "residuos alimenticios" típicamente aumentan en un factor de al menos dos en relación con los RSM de Europa Occidental.

Véase, por ejemplo, Zhang et al. 2010. Los RSM de la invención se procesan como residuos "no clasificados". El término "no clasificado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un proceso en el que los RSM no se dividen sustancialmente en partes separadas, de manera que el material biogénico no se separa sustancialmente del plástico y/o de otros materiales no biogénicos. Tal como se usa en el presente documento, el término "biogénico" se refiere a materiales que son biodegradables y comprende materiales que provienen de organismos vivos. Los residuos pueden estar "no clasificados" tal como se usa en el presente documento a pesar de la eliminación de objetos grandes o de objetos de metal, o a pesar de alguna separación de plástico y/o de otros materiales no biogénicos. Los términos "residuos no clasificados" (o "RSM no clasificados") tal como se usa en el presente documento se refiere a residuos que comprenden una mezcla de material biogénico y no biogénico en la que el 15 % en peso o más del peso seco es material no biogénico.

Normalmente, los RSM sin clasificar comprenden residuos biogénicos, que incluyen residuos alimenticios y de cocina, materiales que contienen papel y/o cartón, residuos alimenticios y similares; materiales reciclables, incluyendo vidrio, botellas, latas, metales y determinados plásticos; otros materiales incinerables, que aunque no sean prácticamente reciclables *per se* pueden tener valor calorífico en forma de combustibles que provienen de residuos; así como materiales inertes, incluyendo cerámica, rocas y diversas formas de sedimentos.

Los RSM se pueden procesar como residuos "clasificados". El término "clasificado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un proceso en el que los RSM se dividen sustancialmente en partes separadas, de manera que el material biogénico se separa sustancialmente del plástico y/o de otros materiales no biogénicos. Los términos "residuos clasificados" (o "RSM clasificados") tal como se usan en el presente documento se refieren a residuos en los que menos del 15 % en peso del peso seco es material no biogénico.

Los RSM pueden ser residuos orgánicos separados en origen que comprenden predominantemente residuos de fruta, hortalizas y/o animales. Se puede aplicar una variedad de diferentes sistemas de clasificación a los RSM no clasificados en algunas realizaciones, incluyendo la clasificación en origen, en donde los hogares disponen los diferentes materiales residuales por separado. Los sistemas de clasificación en origen actualmente están en vigor en algunos municipios de Austria, Alemania, Luxemburgo, Suecia, Bélgica, Países Bajos, España y Dinamarca. Como alternativa, se pueden usar sistemas de clasificación industrial. Los medios de clasificación y separación mecánica

- pueden incluir cualquiera de los métodos conocidos en la materia que incluyen pero no se limitan a los sistemas descritos en los documentos US2012/0305688; y los documentos WO2004/101183; y los documentos WO2004/101098; y los documentos WO2001/052993; y los documentos WO2000/0024531; y los documentos WO1997/020643; y los documentos WO1995/0003139; CA2563845; US5465847. Los residuos se pueden clasificar ligeramente y aun así producir una fracción de residuos que está "no clasificada" tal como se definió anteriormente. En los métodos de la invención se usan RSM en los que más del 15 % en peso del peso seco es material no biogénico, o más del 18 %, o más del 20 %, o más del 21 %, o más del 22 % o más del 23 %, o más del 24 % o más del 25 %.
- Un método de la invención puede comprender una etapa de clasificación de sólidos no biodegradables, en donde dicha clasificación se realiza en 36 horas desde el comienzo de la hidrólisis enzimática.
- En los métodos realizados de la invención, se ajusta el contenido de agua de los RSM para que los RSM comprendan un contenido que sin agua de entre el 10 y el 50 % en peso, o en algunas realizaciones, entre el 12 y el 40 %, o entre el 13 y el 35 %, o entre el 14 y el 30 %, o entre el 15 y el 25 %. Se considera que el contenido en agua está "ajustado", tal como se usa en el presente documento, en donde los RSM comprenden el contenido sin agua apropiado, tanto si se ha añadido agua directamente como si no. Los RSM típicamente comprenden un contenido en agua considerable. Todos los otros sólidos que comprenden los RSM se denominan "contenido sin agua" tal como se usa en el presente documento. El nivel de contenido en agua usado en los métodos realizados de la invención se refiere a varias variables interrelacionadas. Los métodos de la invención típicamente producen un lodo biogénico. Tal como se entenderá fácilmente, el lodo es biogénico cuando comprende material biogénico de manera predominante, pero también puede incluir contaminantes no biogénicos. Un lodo es "líquido", tal como se usa en el presente documento, en la medida en que es bombeable, a pesar del contenido sustancial de los sólidos no disueltos.
- Tal como entenderá fácilmente el experto en la materia, la capacidad de convertir componentes sólidos en un lodo líquido aumenta con un aumento en el contenido en agua. El despulpado eficaz de papel y cartón, que comprende una parte sustancial de los RSM en algunos países, normalmente mejora cuando aumenta el contenido en agua. El contenido en agua proporciona un medio en el que la preparación microbiana se puede propagar y que disuelve metabolitos. Además, como es bien sabido en la materia, las actividades enzimáticas pueden presentar una actividad reducida cuando se lleva a cabo la hidrólisis en condiciones con bajo contenido en agua. Por ejemplo, las celulasas típicamente presentan una actividad reducida en mezclas de hidrólisis que tienen un contenido sin agua mayor de aproximadamente el 10 % en peso. En el caso de celulasas, que degradan papel y cartón, se ha documentado de manera eficaz una relación inversamente lineal entre la concentración del sustrato y el rendimiento de la reacción enzimática por gramo de sustrato. Véase Kristensen et al. 2009. Normalmente, se debería de añadir algún contenido de agua al residuo con el fin de lograr un contenido sin agua apropiado. Por ejemplo, considérese una parte de los residuos domésticos daneses no clasificados. La Tabla 1, que describe la composición característica de los RSM no clasificados documentados por Riber et al. (2009), "Chemical composition of material fractions in Danish household waste," Waste Management 29:1251. Riber et al. caracterizaron las partes de los componentes de residuos domésticos obtenidas de 2220 hogares en Dinamarca en un solo día en 2001. Un experto en la materia entenderá fácilmente que esta composición documentada es simplemente un ejemplo representativo, útil en la explicación de los métodos de la invención. En el ejemplo mostrado en la Tabla 1, sin ninguna adición de contenido de agua, se esperaría que la parte biogénica y biodegradable que comprende residuos de hortalizas, de papel y de animales tuviera aproximadamente el 47 % del contenido sin agua en promedio.
$$[(\% \text{ absoluto sin agua})/(\% \text{ de peso húmedo}) = (7,15 + 18,76 + 4,23)/(31,08 + 23,18 + 9,88) = 47 \% \text{ de contenido sin agua}]$$
 La adición de un volumen de agua que se corresponde con un equivalente en peso de la parte de residuos que se está procesando reduciría el contenido sin agua del propio residuo al 29,1 % (58,2 %/2) mientras se reduce el contenido sin agua del componente degradable a aproximadamente el 23,5 % (47 %/2). La adición de un volumen de agua que se corresponde con dos equivalentes en peso de la parte de residuos que se está procesando reduciría el contenido sin agua del propio residuo al 19,4 % (58,2 %/3) mientras se reduce el contenido sin agua del componente degradable a aproximadamente el 15,7 % (47 %/3).

Tabla 1 Resumen de distribución de masas de las partes de los residuos de Dinamarca 2001

- (a) Parte pura.
- (b) Suma de: periódicos, revistas, panfletos, libros, papeles de oficina limpios/sucios, envases de papel y de cartón, cartón, cartón con plástico, cartón con papel de aluminio, cartón sucio y papel de cocina.
- (c) Suma de: plástico blando, botellas de plástico, otros plásticos duros y plásticos no reciclables.
- (d) Suma de: Suelo, rocas, etc., cenizas, cerámicas, arena para gatos y otras no combustibles.
- (e) Suma de: envases de aluminio, papel de aluminio, papel de tipo metálico, envases de metal y otros metales.
- (f) Suma de: vidrio transparente, verde, marrón y otros vidrios.
- (g) Suma de: Las 13 partes restantes de material.

Parte del residuo	Parte de la cantidad global de residuos globales (% de peso húmedo)	Parte de residuos globales expresada como la contribución absoluta al contenido sin agua del 58,2 %
Residuos de hortalizas (a)	31,08	7,15
Residuos de papel(b)	23,18	18,76
Residuos de animales (a)	9,88	4,23
Residuos de plástico (c)	9,17	8,43
Pañales (a)	6,59	3,59
No combustibles (d)	4,05	3,45
Metal (e)	3,26	2,9
Vidrio (f)	2,91	2,71
Otros (g)	9,88	6,98
TOTAL	100,00 %	58,20 %

Un experto en la materia será fácilmente capaz de determinar una cantidad apropiada contenido en agua, si lo hay, para añadir a los residuos en el ajuste del contenido en agua. Normalmente, en la práctica, a pesar de alguna variabilidad en la composición de los RSM que se están procesando, es conveniente añadir una proporción de masa de agua relativamente constante (que incluye solución acuosa), en algunas realizaciones entre 0,8 y 1,8 kg de agua por kg de RSM, o entre 0,5 y 2,5 kg de agua por kg de RSM. Como resultado, el contenido sin agua real de los RSM durante el procesamiento puede variar dentro del intervalo apropiado.

Se puede usar una variedad de reactores de fermentación microbiana diferentes. Se puede usar un reactor similar al descrito en el documento WO2011/032557, que presenta una cámara que rota sobre un eje sustancialmente horizontal, equipado con accesorios sobre su superficie interna que forman una matriz espiralada, que mueve los RSM de manera continua desde el extremo de entrada hasta el extremo de salida. En función del grado al que se ajusta el reactor, y en función del tamaño del reactor, se puede controlar el "tiempo de residencia" promedio de los RSM dentro del reactor. El reactor puede estar equipado con elementos calentadores, de manera que se pueda mantener una temperatura apropiada. Mientras que se introducen de manera continua los RSM en el reactor y se eliminan parcialmente de manera continua los RSM degradados del reactor, se obtiene un determinado tiempo de residencia promedio. Se pueden usar grandes depósitos, posiblemente contruidos con hormigón u otros materiales de construcción simples, que están equipados con medios para la agitación, tales como un eje dispuesto horizontalmente que tiene paletas que levantan y mezclan los RSM entrantes. El reactor puede estar equipado con medios para la aireación pasiva, por lo que se proporciona la exposición al aire y la agitación facilita la exposición al aire. Como alternativa, se puede configurar el reactor para mantener de manera eficaz las condiciones anaeróbicas limitando la exposición al aire. La agitación se puede lograr por medio de una variedad de medios diferentes. La agitación es ventajosa porque promueve no solo la fermentación microbiana *per se*, sino también la hidrólisis catalizada por enzimas secretadas por o proporcionadas de otra forma por los microorganismos vivos. De hecho, en este contexto, la fermentación microbiana es, efectivamente, la hidrólisis y la fermentación. La agitación se proporciona mediante un tipo de mezclado de caída libre, tal como un depósito giratorio o un eje dispuesto horizontalmente que proporciona la elevación y la mezcla de RSM en el medio de fermentación microbiana. Se puede proporcionar agitación por medios más simples, tales como barrenas.

Se puede usar una variedad de diferentes medios para lograr y mantener una concentración de bacterias del ácido láctico de al menos $1,0 \times 10^{10}$ UFC (unidades formadoras de colonias)/l durante el transcurso de la fermentación. Tal como se usa en el presente documento, la concentración de bacterias del ácido láctico se mantiene a una concentración durante la etapa de fermentación anterior a la separación de los sólidos no degradables, hasta el punto en que la concentración de células bacterianas vivas en la fermentación es, en promedio, al menos $1,0 \times 10^{10}$ UFC/l durante el transcurso de la fermentación. Un promedio de al menos $1,0 \times 10^{10}$ UFC/l durante la fermentación se demuestra típicamente mediante una serie de mediciones en muestras tomadas antes y después o durante la fermentación. La medición de UFC/l se determina mediante una medición expresada como UFC por gramos de sólidos totales presente en una muestra representativa de la mezcla, y después expresada como una medición por litro mediante una medición del porcentaje en peso del contenido en sólidos totales de la mezcla. El porcentaje de sólidos totales de una muestra representativa de 5 ml se determina mediante el secado a temperatura ambiente con el fin de proporcionar una base para los cálculos. Las UFC se determinan usando PCR cuantitativa (qPCR). Se suspenden alícuotas de 5 ml de material muestreado suspendido en glicerol al 50 % en peso en 5 ml de H₂O filtrada estéril. Se filtra una alícuota a través de un filtro y se extrae el ADN de la masa celular filtrada. El número de copias de genes de ARNr 16S en el ADN extraído se cuantifica mediante análisis de qPCR con cebadores universales de genes de ARNr 16S. El número de células bacterianas se calcula basándose en esto datos, asumiendo un promedio de 3,0 números de copias de genes de ARNr 16S por célula viva y se expresa en términos de contenido en sólidos totales de la muestra analizada. Los recuentos de arqueas no se incluyen en el recuento de UFC/l. El porcentaje de recuentos de células vivas medidas que se corresponde con las bacterias del ácido láctico se determina en base a una estimación proporcionada por el análisis de ADNr 16S, como es bien sabido en la materia. Una muestra líquida

de mezcla de fermentación se congela en glicerol al 20 % en peso y se almacena a -20 °C con el fin de realizar el análisis de ADNr 16S para identificar los microorganismos. Este análisis es bien conocido en la materia y se usa ampliamente para la identificación y el análisis filogenético de procariotas basado en el componente 16S de la subunidad ribosómica pequeña. El análisis comprende la extracción de ADN genómico, la preparación de la biblioteca de amplicones usando el par de cebadores de cebadores universales que abarca las regiones hipervariables V1 a V3 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG / 534R: ATTACCGCGGCTGCTGG; 507 pb de longitud), el etiquetado de PCR con adaptadores GS FLX y la secuenciación para obtener 104.000-160.000 números de lecturas por muestra analizada. Las secuencias resultantes se pueden consultar en un BlastN frente a la base de datos de ADNr del Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009). La base de datos contiene secuencias de buena calidad con al menos 1200 pb de longitud y una asociación taxonómica del NCBI. La versión actual (RDP versión 10, actualizada el 19 de septiembre de 2012) contiene secuencias de 9.162 bacterias y de 375 arqueas. Los resultados de BLAST se pueden filtrar para eliminar los accesos cortos y de baja calidad (identidad de secuencia ≥ 90 %, cobertura de alineación ≥ 90 %). El porcentaje numérico de bacterias detectadas mediante este análisis que son bacterias del ácido láctico, incluyendo, pero sin limitación, especies de *Lactobacillus*, se aplica después a las UFC/l totales medidas como una medida parcial de UFC/l de BAL. Por ejemplo, cuando se determinan recuentos de bacterias vivas totales de $2,0 \times 10^{12}$ UFC/l en muestras representativas de una mezcla de fermentación, y cuando el análisis de ARN 16S de muestras representativas de la mezcla de fermentación indica que el 50 % de los microorganismos detectados son especies de *Lactobacillus*, la concentración de bacterias del ácido láctico se establece en el momento de la medición en al menos $1,0 \times 10^{12}$ UFC/l.

En general, es bastante simple lograr concentraciones de bacterias del ácido láctico de al menos $1,0 \times 10^{10}$ UFC/l. Si las condiciones de aireación son aeróbicas o anaeróbicas, las BAL generalmente comprenderán una proporción importante de la población microbiana que evoluciona cuando los RSM simplemente se incuban a temperaturas de entre 37 y 50 °C. Véase, por ejemplo, Akao et al. 2007a; Akao et al. 2007b; Sakai et al. 2000; Sakai et al. 2004. Por consiguiente, las condiciones de fermentación microbiana pueden ser bien aeróbicas o anaeróbicas. Los recuentos de bacterias BAL vivas del orden de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/l se pueden obtener de manera habitual en aproximadamente 12 horas de fermentación del ácido láctico en modelo de residuos de cocina, sin actividad enzimática añadida. Véase Sakai et al. 2000 y Sakai et al. 2004. Los tiempos de duplicación de la generación de bacterias del ácido láctico identificadas en los ejemplos presentados posteriormente son, según los informes, del orden de 4 a 5 horas. Véase Liong y Shaw 2005.

En algunas realizaciones, el flujo entrante de RSM simplemente se inocula con un inóculo de microorganismos que se dan de forma natural en los residuos, y se "generan" en residuos locales o en componentes de residuos locales como una fuente de alimento en condiciones de fermentación de temperatura en el intervalo de 37 a 55 °C, o 40 a 55 °C, o 45 a 50 °C y a un pH en el intervalo de 4,2 y 6,0.

Dado que las BAL generan metabolitos ácidos, su crecimiento continuo típicamente implica un requisito de ajuste del pH para mantener las condiciones de crecimiento apropiadas. Normalmente, las BAL prefieren condiciones de pH en el intervalo de 4,2 a 6,0. El ajuste del pH durante la fermentación microbiana se puede proporcionar con medios microbianos, por ejemplo, al incluir en la mezcla de fermentación microbiana levaduras o bacterias u otros microorganismos que convierten los productos ácidos en no ácidos, tal como en los métodos descritos por Nakaski et al. 1996 y Nakasaki et al. 2013.

En general, es ventajoso lograr la clasificación biológica en el marco de tiempo más corto posible, es decir, para mantener la duración de la fermentación microbiana antes de la separación de sólidos no degradables tan breve como sea posible. Esto se puede lograr con una velocidad particular proporcionando una inoculación inicial del flujo de entrada de los RSM no clasificados. En algunos casos, el inóculo puede ser simplemente aguas de procesamiento recirculadas, que se pueden calentar ventajosamente a temperaturas de entre 37 y 55 °C. En algunos casos, el propio inóculo imparte concentraciones de BAL vivas de al menos $1,0 \times 10^{10}$ UFC/l al flujo entrante de RSM. En algunos casos, las células liofilizadas se pueden añadir directamente como inóculo. En algunos casos los componentes biodegradables de RSM de una localización dada se pueden usar como sustrato tras el cual crece un inóculo de bacterias del ácido láctico en un fermentador y se introducen en el flujo entrante de RSM no clasificados. En algunos casos, el flujo entrante de RSM se puede someter a esterilización por calor con el fin de que se pueda inocular una cepa específica de bacterias del ácido láctico que tenga propiedades ventajosas especializadas.

En los métodos de la invención, se mantiene una concentración de BAL vivas a niveles de al menos $1,0 \times 10^{10}$ UFC/l o de al menos $2,0 \times 10^{10}$ UFC/l o de al menos $3,0 \times 10^{10}$ UFC/l en el reactor de fermentación microbiana durante la operación continua. Un flujo entrante de RSM se introduce de manera continua, y un flujo de RSM fermentados se elimina de manera continua antes de la separación de los sólidos no degradables, durante un período de al menos 20 horas, o al menos 50 horas, o al menos 70 horas. En algunos casos, la fermentación microbiana se puede llevar a cabo de manera simultánea con la hidrólisis enzimática usando preparaciones de enzimas aisladas. En estas realizaciones, los niveles de BAL vivas durante la fermentación microbiana antes de la separación de sólidos no degradables pueden ser mucho más bajos, del orden de $5,0 \times 10^7$ UFC/l, o entre $5,0 \times 10^7$ UFC/l y $1,0 \times 10^{10}$ UFC/l.

En los métodos de la invención, se proporciona actividad celulasa de origen microbiano de al menos 30 UPF/l mediante el consorcio microbiano que proporciona fermentación microbiana. Tal como se usa en el presente documento, el término actividad celulasa de origen microbiano se refiere a una actividad que no se proporciona directamente por una preparación de enzima aislada que se ha añadido a una mezcla de fermentación, sino a una actividad proporcionada por organismos vivos. En algunos casos, los organismos vivos pueden proporcionar actividad celulasa mediante la secreción en masa de enzimas celulíticas. En otros casos, los organismos vivos pueden proporcionar actividad de celulasa en contacto relativamente local con sustratos celulósicos. La actividad celulasa de origen microbiano se determina tal como sigue: Se incuba una muestra de microbios vivos con adición de un sustrato de celulosa limpio y puro, bien un pañuelo de papel o papel de filtro, durante un período de 24 horas en condiciones de temperatura, pH y aireación para los cuales se desea la medición de la actividad. La masa sólida transferida desde el sustrato celulósico añadido a la fase líquida, corregida por transferencia de "fondo" de masa sólida a la fase líquida por la propia muestra que contiene microbios, y corregida por la transferencia de "fondo" de la masa sólida del sustrato celulósico añadido a la fase líquida con agua sola en las condiciones de reacción ensayadas proporciona una medida de la actividad de celulasa de origen microbiano. Esta medida después se compara con la actividad lograda en condiciones equivalentes mediante una preparación de enzimas celulíticas aisladas que tienen actividad celulasa conocida en Unidades de Papel de Filtro (UPF), tal como se determina mediante el método de Ghose, T.K. (1987), Measurement of cellulase activities. Pure & Appl. Chem., 59(2): pág. 257-268. El [(fondo de la muestra y transferencia de porcentaje de fondo de agua de la masa sólida del sustrato celulósico a la fase líquida lograda por la muestra que contiene microbios) dividido entre (la transferencia de porcentaje de fondo de agua de la masa sólida del sustrato celulósico a la fase líquida lograda mediante la preparación de enzima aislada)] calcula el tiempo de la actividad de FPU conocida de la preparación enzimática aislada, y proporciona una medida de actividad de celulasa de origen microbiano. Esta medición de la actividad después se divide entre el volumen de reacción en el que se hace la medición para proporcionar una medición expresada como UPF/l. Un experto en la materia entenderá fácilmente que la muestra que contiene microbios se puede haber diluido antes de la medida y que una estimación final de UPF/l en el origen de la muestra puede implicar una corrección para la dilución. En casos en los que algún componente de actividad de UPF proporcionado por una preparación de enzima aislada se combina con la actividad celulasa de origen microbiano, la actividad celulasa de origen microbiano se corrige simplemente mediante una resta lineal de la actividad proporcionada por las enzimas aisladas en aislamiento del ámbito microbiano. Un cálculo de ejemplo se da como sigue: Una muestra de inóculo microbiano de 20 ml se incuba durante 24 horas en presencia de 1 gramo de sustrato celulósico añadido.

Después de corregir la liberación de sólidos de fondo por la propia muestra de inóculo, se observa que un total neto del 12 % de la masa celulósica se transfiere desde el sustrato celulósico a la fase líquida. Una muestra de tampón de 20 ml a la que se añade 1 g de sustrato celulósico añadido y una preparación de celulasa aislada previamente medida para tener actividad de UPF conocida en una cantidad correspondiente a 5,7 UPF/g de celulosa se incuba durante 24 horas en condiciones equivalentes. Se observa que un total neto del 62 % de la masa celulósica se transfiere desde el sustrato celulósico a la fase líquida. Una muestra de agua de 20 ml a la que se le añade 1 g de sustrato celulósico añadido se incuba durante 24 horas en condiciones equivalentes. Se observa que un total neto del 3% de la masa celulósica se transfiere desde el sustrato celulósico a la fase líquida. Se añade una pequeña cantidad de preparación de enzima aislada que tiene actividad de FPU conocida al fermentador del que se extrajo el inóculo microbiano en una cantidad que, expresada en términos de volumen total de los contenidos del fermentador, se puede expresar como 8 UPF/l. La actividad celulasa medida de origen celular está dada por: [(12 % de transferencia corregida con fondo propio - 3 % de transferencia de fondo de agua) / (62 % de transferencia - 3 % de transferencia de agua)] * (5,7 UPF/0,020 l) = 43,5 UPF/l microbianas iniciales - 8 UPF/l de contribución de enzimas aisladas = 35,47 UPF/l de actividad celulasa de origen microbiano. La actividad celulasa de origen microbiano se puede proporcionar por organismos especializados secretores de celulasa, que se han incluido en un inóculo aplicado al flujo entrante de RSM. En algunos casos, la actividad celulasa de origen microbiano puede alcanzar niveles de al menos 50 UPF/l o al menos 75 UPF/l o al menos 100 UPF/l o al menos 300 UPF/l o al menos 500 UPF/l o al menos 700 UPF/l o al menos 1000 UPF/l. Puede ser ventajoso añadir preparaciones de enzimas aisladas a la mezcla de fermentación microbiana, incluyendo preparaciones de amilasa u otras preparaciones de enzimas.

La duración de la fermentación microbiana previa a la separación de los sólidos no degradables se determina mediante el tiempo de residencia promedio en el reactor de fermentación microbiana. En los métodos de la invención, los RSM no clasificados se fermentan durante un período de entre 1 y 72 horas. El tiempo de residencia promedio del flujo de RSM en la fermentación microbiana previa a la separación de los materiales degradables está entre 1 y 18 horas, o entre 1 y 24 horas, o entre 1 y 36 horas o entre 36 horas y 48 horas, o entre 48 horas y 60 horas, o entre 60 horas y 72 horas, o entre 1 y 27 horas. La invención proporciona un lodo biodegradable obtenido mediante cualquiera de los métodos reivindicados durante el procesamiento de RSM no clasificados. Se elimina un flujo de RSM fermentados del reactor de fermentación microbiana, normalmente de forma continua. Esa es una corriente de RSM no clasificados que se introduce de manera continua en el reactor y una corriente de RSM parcialmente hidrolizados y fermentados se retira de manera continua del reactor. Sin embargo, se puede introducir un flujo de RSM de forma pulsátil, con una inyección de RSM, seguida de una pausa, seguida de una posterior inyección de RSM. De manera similar, el flujo de RSM fermentados y parcialmente hidrolizados se puede eliminar del reactor de forma pulsátil, con una eyección de RSM, seguida de una pausa, seguida de una posterior eyección de RSM y así sucesivamente.

Tras la eliminación del reactor de fermentación microbiana, los RSM fermentados y parcialmente hidrolizados se someten a una etapa de separación, mediante la cual, se eliminan los sólidos no degradables para proporcionar un lodo de componentes biodegradables. Esta etapa de separación, y el posterior procesamiento, se puede lograr en una variedad de formas diferentes.

En algunos casos, la etapa de separación se logra en dos etapas. En primer lugar, un separador balístico elimina dos flujos de materiales no degradables, produciendo una parte "bidimensional" (2D) que comprende bolsas de plástico y otros materiales generalmente sin forma, una parte "tridimensional" (3D) que comprende botellas y envases que tienen una forma y un volumen definidos de un lodo líquido biogénico de componentes biodegradables. En una segunda etapa, la parte en 2D se somete adicionalmente a un prensado con una prensa de tornillo o un dispositivo similar para aumentar adicionalmente el rendimiento del lodo biogénico.

En algunos casos, la parte en 2D se somete adicionalmente a lavado, con el fin de recuperar adicionalmente el material biodegradable. Las aguas de lavado obtenidas en esta etapa se pueden mantener entonces a la temperatura de fermentación y usarlas para humedecer y también inocular los RSM entrantes sin clasificar.

En algunos casos, se puede usar el esquema de procesamiento descrito en la Figura 1. La Figura 1 muestra una ilustración esquemática de las características de la planta de demostración REnescience Versión 1. Los RSM se someten a un proceso de clasificación biológica que produce cuatro productos - un lodo biogénico adecuado para la producción de biometano u otros procesos, inertes (vidrio y arena) para el reciclado, y tanto una parte "bidimensional" (2D) como una parte "tridimensional" (3D) de materiales inorgánicos adecuados para la producción de CSR, así como para el reciclado de metales, plástico y madera. Los RSM de zonas urbanas se recolectan tal cual en bolsas de plástico. Los RSM se transportan hasta la Refinería de residuos REnescience, donde se almacenan en un silo hasta el procesamiento. En función de las características de los RSM, se puede instalar una etapa de clasificación enfrente del sistema REnescience para extraer las partículas de gran tamaño (por encima de 500 mm). Un flujo de RSM sin clasificar se calienta y su contenido sin agua se ajusta mediante la adición de solución acuosa calentada. En algunos casos, se puede añadir la actividad celulasa proporcionada por las preparaciones de enzima aislada para facilitar la rápida degradación del componente biodegradable de los RSM. En algunos casos se añaden preparaciones enzimáticas a los RSM calentados a un contenido sin agua apropiado. En algunos casos se añaden preparaciones de enzimas aisladas y se proporciona la hidrólisis y la fermentación microbiana mediante el mantenimiento de bacterias del ácido láctico durante el transcurso de la fermentación a niveles de células bacterianas vivas de al menos $1,0 \times 10^{10}$ UFC/l. Los RSM, con o sin enzimas añadidas, se pueden incubar en un reactor de fermentación microbiana similar al descrito en el documento WO2011/032557. Mientras que se introducen de manera continua los RSM en el reactor y se eliminan parcialmente de manera continua los RSM degradados del reactor, se obtiene un determinado tiempo de residencia promedio. Los RSM parcialmente degradados eliminados del reactor se pueden someter a dos etapas distintas de separación. En primer lugar, se puede usar un separador balístico, usado a menudo en la clasificación, que, por ejemplo, tiene tamices de entre 20-50 mm para producir un flujo de lodo biogénico, así como una parte en 3D no degradable y una parte en 2D no degradable.

En algunos casos, tal como se muestra en la Figura 1, la parte en 2D no degradable se puede someter adicionalmente a deshidratación usando una prensa de tornillo, con recuperación del lodo biogénico adicional que, a su vez, se mezcla con el lodo obtenido de la etapa de separador balístico.

En algunos casos, tal como se muestra en la Figura 1, el lodo biogénico obtenido se puede someter a una separación "fina" adicional usando una serie de tamices con vibración, por ejemplo, un tamiz de curso de 6-10 mm, por ejemplo, de 8 mm, seguido de uno o más tamices más finos de 2-6 mm, por ejemplo, de 3 mm. Estos tamices más gruesos típicamente separan principalmente los contaminantes no degradables. Los tamices más finos, por ejemplo, los tamices de 3 mm, típicamente separan las fibras más grandes, que comprenden una cantidad considerable de material biodegradable. Tras pasar a través de los tamices más finos, en algunos casos, el lodo biogénico obtenido, que típicamente es bombeable (es decir, líquido) se puede almacenar en un depósito mayor.

En algunos casos, los materiales biodegradables retenidos por uno o más sistemas de tamices se pueden reintroducir al lodo biogénico almacenado y someterlos a la posterior fermentación, para lograr una degradación más completa del material, a una temperatura de entre 35 y 75 grados durante un período de entre 1 y 72 horas.

Un método de la invención puede comprender una etapa de someter el lodo de componentes biodegradables a la posterior fermentación tras la separación de los sólidos no degradables.

En algunos casos, tal como se muestra en la Figura 1, la parte en 2D de sólidos no degradables deshidratados se pueden someter a un tren de lavado a contracorriente tanto para limpiar la fracción en 2D como para recuperar material biodegradable adicional que de lo contrario se perdería. Por ejemplo, en algunos casos, los flujos de agua pueden ser tal como se muestran en la Figura 1. Se puede aplicar agua fresca para lavar material no degradable en 3D recuperado del separador balístico en un tambor simple. Este agua de lavado puede usarse como agua "limpia" que se introduce en la segunda de dos unidades de lavado idénticas para proporcionar un lavado en contracorriente: el nuevo agua "limpia" encuentra la basura "más limpia" mientras se aplica consecutivamente más agua sucia a basura entrante "más sucia". En algunos casos, el tren de lavado funciona tal como sigue: la parte en 2D sucia entra

en un tambor en la primera unidad de lavado, en donde los residuos se mezclan con el agua de lavado a contracorriente y se mezclan mecánicamente.

Adicionalmente, el agua de lavado sucia se puede someter a una filtración por tamices que tiene tamices de 0,04 a 0,08 mm, para eliminar fibras, que típicamente comprenden principalmente material biodegradable. La arena y el material pesado también se pueden eliminar mediante sedimentación y mediante un transportador de tornillo en el fondo de cada unidad de lavado. La parte eliminada normalmente es fundamentalmente arena/vidrio/plástico duro/ y otros materiales inorgánicos. Tras el primer lavado, el residuo se puede mover mediante una barrena de tornillo u otro medio a una segunda unidad de lavado, que puede ser idéntica a la primera. El agua de lavado de la primera unidad de lavado en tales casos típicamente tiene entre el 1 - 4 % en peso de ST (sólidos totales) mientras que el agua de lavado de la segunda unidad de lavado típicamente tiene el 0,5-3,0 % en peso.

Las aguas de lavado, que comprenden algo de material biodegradable recuperado de los RSM así como microorganismos asociados, en algunos casos se puede almacenar en un depósito "de reserva". La solución acuosa de este depósito "de reserva" después se puede usar para ajustar el contenido sin agua del RSM entrante. En algunos casos, la solución del depósito "de reserva" se puede calentar aplicando vapor, después mezclando la solución calentada con RSM entrantes para calentarlos de manera simultánea hasta una temperatura apropiada y también ajustar el contenido sin agua. En algunos casos, la solución del depósito "de reserva" se calienta en el depósito de reserva a una temperatura en el intervalo de 35 a 55 °C. El simple hecho de calentar las aguas de lavado que se almacenan en el depósito de reserva es suficiente como para inducir la fermentación y promover el crecimiento bacteriano, enriqueciendo la capacidad de la solución para funcionar como un "inóculo" para los RSM entrantes, para facilitar la fermentación microbiana. En algunos casos, las aguas de lavado calentadas que se almacenan en el depósito "de reserva" se pueden agitar, se les puede ajustar el pH y se pueden "introducir" con material biodegradable retenido por uno o más sistemas de tamices o con el lodo biogénico obtenido o ambos, para promover adicionalmente la fermentación bacteriana y para mejorar adicionalmente la "potencia" de la solución como un inóculo para el RSM entrante.

La separación de sólidos no degradables y el esquema para promover la fermentación microbiana se puede lograr mediante una variedad de medios. En algunos casos, el flujo entrante de RSM se puede introducir en el reactor de fermentación microbiana, después, tras un período de fermentación microbiana, se puede someter directamente a prensado con una prensa de tornillo, con separación de lodo biogénico, seguida por la adición de agua dulce, seguida por un segundo tratamiento con la prensa de tornillo, produciendo un lodo biogénico diluido recuperado del segundo tratamiento de prensa de tornillo que se puede usar para ajustar el contenido sin agua y proporciona una inoculación al flujo entrante de RSM. O en algunos casos se puede aplicar un esquema similar, directamente, y algo o todo el lodo biogénico se usa para ajustar el contenido sin agua del flujo entrante de RSM.

En algunos casos, el flujo entrante de RSM se puede introducir en el reactor de fermentación microbiana, después, tras un período de fermentación microbiana, se puede someter a una etapa de separación tal como un separador biobalístico o un separador de tambor o un tamiz con vibración, con recuperación de algo de lodo biogénico, seguida por un prensado con una prensa de tornillo para recuperar lodo biogénico adicional, parte del cual se puede usar directamente para ajustar el contenido sin agua del flujo entrante de RSM.

En algunos casos, la fermentación microbiana se realiza de manera simultánea con hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática se puede lograr usando una variedad de medios diferentes. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "preparación de enzimas aisladas" se refiere a una preparación que comprende actividades de enzimas que se han extraído, secretado u obtenido de otro modo a partir de un origen biológico y, de manera opcional, se han purificado parcialmente o extensivamente.

Se puede usar de manera ventajosa una variedad de actividades de enzimas diferentes para realizar los métodos de la invención. Considerando, por ejemplo, la composición de RSM mostrada en la Tabla 1, será fácilmente evidente que, al menos en Dinamarca, los residuos que contienen papel comprenden el mayor componente individual, en peso seco, del material biogénico. Por consiguiente, como será fácilmente evidente para el experto en la materia, para los residuos domésticos, la actividad de degradación de celulosa será particularmente ventajosa. En residuos que contienen papel, la celulosa se ha procesado anteriormente y se ha separado de su posición natural como un componente de biomasa lignocelulósica, entremezclado con lignina y hemicelulosa. Por consiguiente, los residuos que contienen papel se pueden degradar de manera ventajosa usando una preparación de celulosa comparativamente "simple".

"Actividad celulasa" se refiere a la hidrólisis enzimática de enlaces 1,4-B-D en celulosa. En preparaciones de enzima celulasa obtenidas de fuentes bacterianas, fúngicas o de otras fuentes, la actividad celulasa típicamente comprende una mezcla de diferentes actividades de enzimas, que incluyen endoglucanasas y exoglucanasas (también denominadas celobiohidrolasas), que respectivamente catalizan la endohidrólisis y la exohidrólisis de los enlaces 1,4-B-D-glucosídicos, junto con las B-glucosidasas, que hidrolizan los productos de oligosacáridos de la hidrólisis de exoglucanasa a monosacáridos. La hidrólisis completa de celulosa insoluble típicamente requiere una acción sinérgica entre las diferentes actividades.

En la práctica, puede ser ventajoso usar simplemente una preparación de celulasa aislada disponible comercialmente optimizada para la conversión de biomasa lignocelulósica, dado que están fácilmente disponibles a costes comparativamente bajos. La expresión "optimizado para la conversión de biomasa lignocelulósica" se refiere a un proceso de desarrollo de productos en el que las mezclas de enzimas se han seleccionado y modificado con el fin específico de mejorar los rendimientos de la hidrólisis y/o reducir el consumo de enzimas en hidrólisis de biomasa lignocelulósica pretratada a azúcares fermentables.

Sin embargo, Las mezclas comerciales de celulasa optimizadas para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica típicamente contienen altos niveles de actividades de enzimas adicionales y especializadas. Por ejemplo, los presentes inventores determinaron las actividades enzimáticas presentes en las preparaciones de celulasa comercialmente disponibles y optimizadas para la conversión de biomasa lignocelulósica y proporcionada por NOVOZYMES™ con las marcas CELLIC CTEC2™ y CELLIC CTEC3™ así como preparaciones similares proporcionadas por GENENCOR™ con la marca ACCELLERASE 1500™ y descubrieron que cada una de estas preparaciones contenía actividad endoxilanasas por encima de 200 U/g, actividad xilosidasa a niveles por encima de 85 U/g, actividad B-L-arabinofuranosidasa a niveles por encima de 9 U/g, actividad amiloglucosidasa a niveles por encima de 15 U/g, y actividad α -amilasa a niveles por encima de 2 U/g.

También se pueden usar preparaciones de celulasa aislada más simples para realizar los métodos de la invención. Las preparaciones de celulasa adecuadas se pueden obtener mediante métodos bien conocidos en la materia a partir de una variedad de microorganismos, que incluyen bacterias aerobias y anaerobias, hongos de la podredumbre blanca, hongos de la podredumbre blanda y hongos anaerobios. Como se describe en la ref. 13, R. Singhanía et al., "Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases," Enzyme and Microbial Technology (2010) 46:541-549, que se incorpora en el presente documento expresamente a modo de referencia en su totalidad, los organismos que producen celulasas típicamente producen una mezcla de diferentes enzimas en proporciones apropiadas para que sean adecuadas para la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos. Los orígenes preferidos de preparaciones de celulasa útil para la conversión de biomasa lignocelulósica incluyen hongos tales como las especies de *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Aspergillus* y *Phanerochaete*.

Además de la actividad celulasa, algunas actividades de enzimas que pueden resultar ventajosas en la realización de los métodos de la invención incluyen enzimas que actúan en residuos alimenticios, tales como proteasas, glucoamilasas, endoamilasas, proteasas, pectina esterasas, pectina liasas y lipasas, y enzimas que actúan sobre residuos de jardinería, tales como xilanasas y xilosidasas. En algunos casos, puede ser ventajoso incluir actividades de otras enzimas tales como laminarasas, queratinasas o lacasas.

En algunos casos, un microorganismo seleccionado que presenta actividad celulasa extracelular se puede inocular directamente en la hidrólisis enzimática concurrente y en la fermentación microbiana, incluyendo pero sin limitación, uno o más de los siguientes organismos termófilos celulíticos, que se pueden inocular, solos o en combinación con otros organismos *Paenibacillus barcinonensis*, véase Asha et al 2012, *Clostridium thermocellum*, véase Blume et al 2013 y Lv and Yu 2013, especies seleccionadas de *Streptomyces*, *Microbispora*, y *Paenibacillus*, véase Eida et al 2012, *Clostridium straminisolvans*, véase Kato et al 2004, especies de *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, véase Maki et al 2012, *Clostridium clariflavum*, véase Sasaki et al 2012, nuevas especies de *Clostridiales* relacionados filogenéticamente y fisiológicamente con *Clostridium thermocellum* y *Clostridium straminisolvans*, véase Shiratori et al 2006, *Clostridium clariflavum* sp. nov. y *Clostridium caenicola*, véase Shiratori et al 2009, *Geobacillus thermoleovorans*, véase Tai et al 2004, *Clostridium stercorarium*, véase Zverlov et al 2010, o uno cualquiera o más de los hongos termófilos *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophilum*, *Clostridium straminisolvans* y *Thermonospora curvata*, Kumar et al. 2008 para revisión. En algunos casos, se pueden inocular organismos que presentan otras actividades enzimáticas extracelulares para contribuir a la hidrólisis enzimática concurrente y a la fermentación microbiana, por ejemplo, hongos proteolíticos y queratinolíticos, véase Kowalska et al. 2010, o bacterias del ácido láctico que presentan actividad lipasa extracelular, véase Meyers et al. 1996.

La hidrólisis enzimática se puede llevar a cabo mediante métodos bien conocidos en la materia, usando una o más preparaciones de enzimas aisladas que comprenden una o más de una variedad de preparaciones de enzimas que incluyen cualquiera de las mencionadas anteriormente o, como alternativa, inoculado los RSM del proceso con uno o más organismos seleccionados capaces de efectuar la hidrólisis enzimática deseada. En algunos casos, la hidrólisis enzimática se puede llevar a cabo usando una cantidad eficaz de una o más preparaciones de enzimas aisladas que comprenden actividades celulasa, B-glucosidasa, amilasa y xilanasas. Una cantidad es una "cantidad eficaz" en la que de manera colectiva, la preparación de enzimas usada logra la solubilización de al menos el 40 % del peso seco de material biogénico degradable presente en RSM en un tiempo de reacción de hidrólisis de 18 horas en las condiciones usadas. En algunos casos, se usa una o más preparaciones de enzimas aislados en la que, de manera colectiva, las proporciones relativas de las diversas actividades enzimáticas es tal como sigue: Se usa una mezcla de actividades de enzimas de manera que 1 UPF de actividad celulasa se asocia con una actividad endoglucanasa de al menos 31 U de CMC y de manera que 1 UPF de actividad celulasa se asocia con al menos una actividad beta glucosidasa de 7 U de pNPG. Un experto en la materia entenderá fácilmente que U de CMC se refiere a unidades de carboximetilcelulosa. Una U de CMC de actividad libera 1 μ mol de azúcares reductores (expresados como equivalentes de glucosa) en un minuto en condiciones de ensayo específicas de 50 °C y pH 4,8. Un experto en la

materia entenderá fácilmente que U de pNPG se refiere a unidades de pNPG. Una U de pNPG de actividad libera 1 umol de nitrofenol por minuto de para-nitrofenil-B-D-glucopiranosido a 50 °C y pH 4,8. Además, un experto en la materia entenderá fácilmente que UPF de "unidades de papel de filtro" proporciona una medida de actividad celular. Tal como se usa en el presente documento, UPF se refiere a unidades de papel de filtro tal como se determina por el método de Adney, B. y Baker, J., Laboratory Analytical Procedure #006, "Measurement of cellulase activity", 12 de agosto de 1996, the USA National Renewable Energy Laboratory (NREL), que se incorpora expresamente a modo de referencia en su totalidad.

En algunos casos, puede ser ventajoso ajustar la temperatura de los RSM antes del comienzo de la hidrólisis enzimática. Como es bien sabido en la materia, las celulasas y otras enzimas típicamente presentan un intervalo de temperaturas óptimo. Mientras que se conocen ciertamente ejemplos de enzimas aisladas de organismos termófilos extremos que tienen temperaturas óptimas del orden de 60 o incluso 70 grados C, los intervalos de temperaturas óptimas de las enzimas típicamente están dentro del intervalo de 35 a 55 grados. En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo en el intervalo de temperaturas de 30 a 35 grados C, o de 35 a 40 grados C, o de 40 a 45 grados C, o de 45 a 50 grados C, o de 50 a 55 grados C, o de 55 a 60 grados C, o de 60 a 65 grados C, o de 65 a 70 grados C, o de 70 a 75 grados C. En algunas realizaciones, es ventajoso llevar a cabo la hidrólisis enzimática y una fermentación microbiana concurrente a una temperatura de al menos 45 grados C, porque esto es ventajoso para disuadir el crecimiento de los patógenos transmitidos por los RSM. En algunos métodos de la invención, la fermentación microbiana se lleva a cabo en el intervalo de temperaturas de 45-50 grados C. Véase, por ejemplo, Hartmann y Ahring 2006; Déportes et al. 1998; Carrington et al. 1998; Bendixen et al. 1994; Kubler et al. 1994; Six y De Baerre et al. 1992. La hidrólisis enzimática usando actividad celulasa típicamente sacarificará material celulósico. Por consiguiente, durante la hidrólisis enzimática, los residuos sólidos tanto se sacarifican como se licuefactan, es decir, se convierten a partir de una forma sólida, en un lodo líquido.

Previamente, los métodos de procesamiento de RSM usando hidrólisis enzimática para lograr la licuefacción de los componentes biogénicos han previsto una necesidad por calentar los RSM hasta una temperatura considerablemente superior a la requerida para la hidrólisis enzimática, específicamente para lograr la "esterilización" del residuo, seguida por una etapa de enfriamiento necesaria, para reducir de nuevo la temperatura del residuo calentado hasta una temperatura apropiada para la hidrólisis enzimática. Es suficiente que los RSM simplemente se lleven a una temperatura apropiada para la hidrólisis enzimática. Puede ser ventajoso simplemente ajustar los RSM a un contenido sin agua apropiado usando un calentador de agua, administrada de tal manera que lleve los RSM hasta una temperatura apropiada para la hidrólisis enzimática. En algunos casos se calientan los RSM, bien añadiendo contenido de agua caliente, o vapor, o mediante otros medios de calentamiento, en un depósito reactor. En algunos casos, el RSM se calienta en un depósito reactor hasta una temperatura mayor de 30 °C pero menor de 85 °C, o a una temperatura de 84 °C o menos, o a una temperatura de 80 °C o menos, o a una temperatura de 75 °C o menos, o a una temperatura de 70 °C o menos, o a una temperatura de 65 °C o menos, o a una temperatura de 60 °C o menos, o a una temperatura de 59 °C o menos, o a una temperatura de 58 °C o menos, o a una temperatura de 57 °C o menos, o a una temperatura de 56 °C o menos, o a una temperatura de 55 °C o menos, o a una temperatura de 54 °C o menos, o a una temperatura de 53 °C o menos, o a una temperatura de 52 °C o menos, o a una temperatura de 51 °C o menos, o a una temperatura de 50 °C o menos, o a una temperatura de 49 °C o menos, o a una temperatura de 48 °C o menos, o a una temperatura de 47 °C o menos, o a una temperatura de 46 °C o menos, o a una temperatura de 45 °C o menos. En algunos casos, los RSM se calientan hasta una temperatura de no más de 10 °C por encima de la temperatura más alta a la que se lleva a cabo la hidrólisis enzimática.

Tal como se usa en el presente documento, los RSM se "calientan a una temperatura" cuando la temperatura promedio de los RSM aumenta en un reactor a la temperatura. Tal como se usa en el presente documento, la temperatura a la que se calientan los RSM es la temperatura promedio más alta de los RSM alcanzada dentro del reactor.

En algunas realizaciones, la temperatura promedio más alta puede no mantenerse durante todo el período. El reactor de calentamiento puede comprender diferentes zonas, de manera que el calentamiento tiene lugar en etapas a diferentes temperaturas. En algunas realizaciones, el calentamiento se puede lograr usando el mismo reactor en el que se lleva a cabo la hidrólisis enzimática. El objetivo del calentamiento es simplemente obtener la mayoría de los residuos celulósicos y una fracción sustancial de los residuos de la planta en una condición óptima para la hidrólisis enzimática. Para estar en una condición óptima para la hidrólisis enzimática, los residuos idealmente deberían tener una temperatura y un contenido en agua apropiados para las actividades de las enzimas usadas para la hidrólisis enzimática. Puede ser ventajoso agitar durante el calentamiento para lograr un residuo calentado de manera uniforme. En algunos casos, la agitación puede comprender el mezclado de caída libre, tal como el mezclado en un reactor que tiene una cámara que rota junto con un eje sustancialmente horizontal o en un mezclador que tiene un eje giratorio que levanta los RSM o en un mezclador que tiene ejes horizontales o paletas que levantan los RSM. En algunos casos, la agitación puede comprender zarandear, sacudir o el transporte a través de un transportador a tornillo. En algunos casos, la agitación continúa hasta que los RSM se han calentado hasta la temperatura deseada.

En algunos casos, la agitación se lleva a cabo durante entre 1 y 5 minutos, o entre 5 y 10 minutos, o entre 10 y 15 minutos, o entre 15 y 20 minutos, o entre 20 y 25 minutos, o entre 25 y 30 minutos, o entre 30 y 35 minutos, o entre

35 y 40 minutos, o entre 40 y 45 minutos, o entre 45 y 50 minutos, o entre 50 y 55 minutos, o entre 55 y 60 minutos, o entre 60 y 120 minutos.

La hidrólisis enzimática se inicia a ese punto, al cual se añaden preparaciones de enzimas aisladas. Como alternativa, en el caso en el que no se agreguen preparaciones de enzimas, pero se usen en su lugar microorganismos que presentan actividades de enzimas extracelulares deseadas, la hidrólisis enzimática se inicia a ese punto en el que se añade el microorganismo deseado.

En algunos casos, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo de manera concurrente con la fermentación microbiana. La fermentación microbiana concurrente se puede lograr usando una variedad de métodos diferentes. En algunas realizaciones, se permite que los microorganismos presentes de forma natural en los RSM prosperen en las condiciones de la reacción, cuando los RSM procesados no se han calentado previamente hasta una temperatura que es suficiente como para efectuar una "esterilización". Típicamente, los microorganismos presentes en los RSM incluirán organismos que están adaptados al ambiente local. El efecto beneficioso general de la fermentación microbiana concurrente es comparativamente fuerte, lo que significa que una variedad muy amplia de organismos puede, de manera individual o colectiva, contribuir a la captura orgánica a través de la hidrólisis enzimática de los RSM. Sin desear quedar sujeto a ninguna teoría, los presentes inventores consideran que los microbios de cofermentación tienen de manera individual algún efecto directo sobre la degradación de residuos alimenticios que no se hidrolizan necesariamente por enzimas celulasas. Al mismo tiempo, los monómeros de carbohidratos y los oligómeros liberados por la hidrólisis de celulasa, en particular, se consumen fácilmente prácticamente por cualquier especie microbiana. Esto da una sinergia beneficiosa con las enzimas celulasas, posiblemente a través de la liberación de la inhibición de las actividades de las enzimas, y también posiblemente por otras razones que no son inmediatamente evidentes. Los productos finales del metabolismo microbiano en cualquier caso son típicamente apropiados para sustratos de biometano. El enriquecimiento de los RSM hidrolizados enzimáticamente en metabolitos microbianos es, por lo tanto, ya, en sí mismo, una mejora en calidad del sustrato de biometano resultante. Las bacterias del ácido láctico en particular son ubicuas en la naturaleza y la producción de ácido láctico típicamente se observa cuando los RSM se hidrolizan de forma enzimática a un contenido sin agua de entre el 10 y el 45 % en el intervalo de temperaturas del 45-50 %. A mayores temperaturas, posiblemente pueden predominar otras especies de microorganismos de origen natural y otros metabolitos microbianos pueden llegar a ser más prevalentes que el ácido láctico.

En algunos casos, la fermentación microbiana se puede realizar mediante una inoculación directa usando una o más especies microbianas. Un experto en la materia entenderá fácilmente que una o más especies bacterianas usadas para la inoculación para proporcionar una hidrólisis enzimática y una fermentación simultánea de los RSM se pueden seleccionar de manera ventajosa cuando las especies bacterianas son capaces de prosperar a una temperatura del o cerca del óptimo para las actividades enzimáticas usadas.

La inoculación de la mezcla de hidrólisis para inducir la fermentación microbiana se puede realizar mediante una variedad de medios diferentes.

En algunos casos, puede ser ventajoso inocular los RSM bien antes, después o de manera concurrente con la adición de actividades enzimáticas o con la adición de microorganismos que presentan actividad celulasa extracelular. En algunos casos, puede ser ventajoso inocular usando una o más especies de BAL que incluyen pero sin limitación, una cualquiera o más de las siguientes, o variantes de las mismas modificadas genéticamente:

Lactobacillus plantarum, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jugurti*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus piscicola*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus pseudopiantarum*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus uamanashiensis*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus sharpeae*, *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus alactosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus homohiochii*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus ponti*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus hilgardi*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus vaccinostrictus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus leichmanni*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus salicinus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus amyolyticus*, *Lactobacillus similis*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus sobrius*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus dextranicum*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus hordniae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc oenos*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc pseudoesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus cervisiae*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus halophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus intermedius*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Oenococcus oeni*, *Bifidobacterium breve* y *Propionibacterium freudenreichii*, o con algunas especies de BAL descubiertas posteriormente o con otras especies de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, o *Carnobacterium* que presentan una capacidad útil para los

procesos metabólicos que producen ácido láctico.

Un experto en la materia entenderá fácilmente que una preparación bacteriana usada para la inoculación puede comprender una comunidad de organismos diferentes. En algunos casos, se pueden usar las bacterias de origen natural que existen en cualquier región geográfica dada y que se adaptan para prosperar en los RSM de esa región. Como es bien sabido en la materia, las BAL son ubicuas y normalmente comprenderán un componente principal de cualquier comunidad bacteriana de origen natural en los RSM.

En algunos métodos de la invención, la actividad celulasa se añade mediante inoculación con un microorganismo seleccionado que presenta actividad celulasa extracelular.

En algunos métodos de la invención, los RSM se pueden inocular con bacterias de origen natural, mediante reciclado continuado de aguas de lavado o soluciones del proceso usadas para recuperar material orgánico residual de sólidos no degradables y/o en donde la inoculación del flujo entrante de RSM se proporciona antes o de manera concurrente con la adición de actividades enzimáticas. Como las aguas de lavado o las soluciones del proceso se reciclan, adquieren de forma gradual mayores niveles de microbios. En algunos casos, la fermentación microbiana tiene un efecto reductor del pH, especialmente cuando los metabolitos comprenden ácidos carboxílicos/ ácidos grasos de cadena corta tales como formiato, acetato, butirato, propionato o lactato. Por consiguiente, en algunos casos puede ser ventajoso controlar y ajustar el pH de la mezcla de hidrólisis enzimática concurrente y fermentación microbiana. Cuando se usan las aguas de lavado o las soluciones del proceso para aumentar el contenido de agua de los RSM entrantes antes de la hidrólisis enzimática, la inoculación se hace de manera ventajosa antes de la adición de actividades de enzimas, bien como preparaciones de enzimas aisladas o como microorganismos que presentan actividad celulasa extracelular. En algunos casos, las bacterias de origen natural adaptadas para prosperar en RSM de una región particular se pueden cultivar en RSM o en el componente orgánico licuefactado obtenido mediante hidrólisis enzimática de RSM. En algunas realizaciones, las bacterias de origen natural cultivadas se pueden añadir después como un inóculo, bien de forma separada o como complemento a la inoculación usando aguas de lavado o soluciones del proceso recicladas. En algunos casos, las preparaciones bacterianas se pueden añadir antes o de manera concurrente con la adición de preparaciones de enzimas aisladas, o después de algún período inicial de prehidrólisis.

En algunos casos se pueden cultivar cepas específicas para la inoculación, incluyendo cepas que se han modificado especialmente o "entrenado" para prosperar en condiciones de reacción de hidrólisis enzimática y/o para potenciar o reducir procesos metabólicos particulares. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso inocular los RSM usando cepas bacterianas que se han identificado como capaces de sobrevivir en ftalatos como la única fuente de carbono.

Tales cepas incluyen pero no se limitan a una cualquiera o más de las siguientes, o variantes de las mismas modificadas genéticamente: *Chryseomicrobium intechense* MW10T, *Lysinibacillus fusiformis* NBRC 157175, *Tropicibacter phthalicus*, *Gordonia* JDC-2, *Arthrobacter* JDC-32, *Bacillus subtilis* 3C3, *Comamonas testosteronii*, *Comamonas* sp E6, *Delftia tsuruhatensis*, *Rhodococcus jostii*, *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Arthrobacter keyseri*, *Bacillus* sb 007, *Arthrobacter* sp. PNPX-4-2, *Gordonia namibiensis*, *Rhodococcus phenolicus*, *Pseudomonas* sp. PGB2, *Pseudomonas* sp. Q3, *Pseudomonas* sp. 1131, *Pseudomonas* sp. CAT1-8, *Pseudomonas* sp. Nitroreducens, *Arthrobacter* sp AD38, *Gordonia* sp CNJ863, *Gordonia rubripertinctus*, *Arthrobacter oxydans*, *Acinetobacter genomosp.*, y *Acinetobacter calcoaceticus*. Véase, por ejemplo, Fukuhura et al. 2012; Iwaki et al. 2012A; Iwaki et al. 2012B; Latorre et al. 2012; Liang et al. 2010; Liang et al. 2008; Navacharoen et al. 2011; Park et al. 2009; Wu et al. 2010; Wu et al. 2011. Los ftalatos, que se usan como plastificantes en muchas preparaciones comerciales de cloruro de polivinilo, son lixiviables y, desde la experiencia de los presentes inventores, a menudo están presentes en componentes orgánicos, licuefactados a niveles que son indeseables. En algunos casos se pueden usar ventajosamente las cepas que se han modificado genéticamente mediante los métodos bien conocidos en la materia, para potenciar procesos metabólicos y/o reducir otros procesos metabólicos que incluyen, pero sin limitación, los procesos que consumen glucosa, xilosa o arabinosa.

En algunos casos puede ser ventajoso inocular los RSM usando cepas bacterianas que se han identificado como capaces de degradar lignina. Tales cepas incluyen pero no se limitan a una cualquiera o más de las siguientes, o variantes de las mismas modificadas genéticamente: *Comamonas* sp B-9, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter* sp FJ581023, *Pandorea norimbergensis*, *Amycolatopsis* sp ATCC 39116, *Streptomyces viridosporous*, *Rhodococcus jostii* y *Sphingobium* sp. SYK-6. Véase, por ejemplo, Bandounas et al. 2011; Bugg et al. 2011; Chandra et al. 2011; Chen et al. 2012; Davis et al. 2012. Desde la experiencia de los presentes inventores, los RSM típicamente comprenden un contenido en lignina considerable, que típicamente se recupera como residuo no digerido tras la DA.

En algunos casos, puede ser ventajoso inocular los RSM usando una cepa bacteriana productora de acetato, incluyendo, pero sin limitación, una cualquiera o más de las siguientes, o variantes genéticamente modificadas de las mismas: *Acetitomaculum ruminis*, *Anaerostipes caccae*, *Acetoanaerobium noterae*, *Acetobacterium carbinolicum*, *Acetobacterium wieringae*, *Acetobacterium woodii*, *Acetogenium kivui*, *Acidaminococcus fermentans*, *Anaerovibrio lipolytica*, *Bacteroides coprosuis*, *Bacteroides propionificiens*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides xylanolyticus*, *Bifidobacterium catenutatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Sifidobacterium breve*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*,

Bifidobacterium pseudolongum, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium acidurici*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium formicaceticum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium lochheadii*, *Clostridium methylpentosum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium thermocellum*, *Desulfotomaculum orientis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Eubacterium limosum*, *Eubacterium ruminantium*, *Fibrobacter succinogenes*, *Lachnospira multiparus*, *Megasphaera elsdenii*, *Moorella thermoacetica*, *Pelobacter acetylenicus*, *Pelobacter acidigallici*, *Pelobacter massiliensis*, *Prevotella ruminicola*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminobacter amylophilus*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus bromii*, *Ruminococcus champanellensis*, *Selenomonas ruminantium*, *Sporomusa paucivorans*, *Succinimonas amyolytica*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophus aciditrophicus*, *Syntrophus gentianae*, *Treponema bryantii* y *Treponema primitia*.

En algunos casos, puede ser ventajoso inocular los RSM usando una cepa bacteriana productora de butirato, incluyendo, pero sin limitación, una cualquiera o más de las siguientes, o variantes genéticamente modificadas de las mismas: *Acidaminococcus fermentans*, *Anaerostipes caccae*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Butyrivibrio crossotus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrivibrio hungatei*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium aurantibutyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium proteoclasticum*, *Clostridium sporosphaeroides*, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium tertium*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Coprococcus eutactus*, *Coprococcus comes*, *Escherichia coli*, *Eubacterium barkeri*, *Eubacterium bifforme*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Eubacterium cylindroides*, *Eubacterium dolichum*, *Eubacterium hadrum*, *Eubacterium halii*, *Eubacterium limosum*, *Eubacterium moniliforme*, *Eubacterium oxidoreducens*, *Eubacterium ramulus*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium saburreum*, *Eubacterium tortuosum*, *Eubacterium ventriosum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Fusobacterium prausnitzii*, *Peptostreptococcus vaginalis*, *Peptostreptococcus tetradius*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*, *Roseburia cecicola*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia horminis* y *Ruminococcus bromii*.

En algunos casos, puede ser ventajoso inocular los RSM usando una cepa bacteriana productora de propionato, incluyendo, pero sin limitación, una cualquiera o más de las siguientes, o variantes genéticamente modificadas de las mismas: *Anaerovibrio lipolytica*, *Bacteroides coprosuis*, *Bacteroides propionificiens*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium methylpentosum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium propionicum*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella ruminicola*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Ruminococcus bromii*, *Ruminococcus champanellensis*, *Selenomonas ruminantium* y *Syntrophomonas wolfei*.

En algunos casos, puede ser ventajoso inocular los RSM usando una cepa bacteriana productora de etanol, incluyendo, pero sin limitación, una cualquiera o más de las siguientes, o variantes genéticamente modificadas de las mismas: *Acetobacterium carbinolicum*, *Acetobacterium wieringae*, *Acetobacterium woodii*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides xylanolyticus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium lochheadii*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lachnospira multiparus*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Paenibacillus macerans*, *Pelobacter acetylenicus*, *Ruminococcus albus*, *Thermoanaerobacter mathranii*, *Treponema bryantii* y *Zymomonas mobilis*.

En algunos casos se puede usar un consorcio de diferentes microbios, que incluyen opcionalmente diferentes especies de bacterias y/o de hongos para realizar la fermentación microbiana concurrente. En algunos casos, se pueden seleccionar los microorganismos adecuados para proporcionar un resultado metabólico deseado a las condiciones de reacción que se pretenden, y después inocularlos a un nivel alto de dosis para desplazar a las cepas de origen natural. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser ventajoso inocular usando un productor de lactato homofermentativo, ya que esto proporciona un potencial de metano más alto en un sustrato de biometano resultante que el que puede proporcionar un productor de lactato heterofermentativo.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de procesamiento de residuos sólidos municipales (RSM) que comprende las etapas de

- (i) proporcionar RSM a un contenido sin agua de entre el 5 y el 40 % y a una temperatura dentro del intervalo de 35 y 75 grados C,
- (ii) someter las partes biodegradables de los RSM a fermentación microbiana y a hidrólisis enzimática a una temperatura dentro del intervalo de 35 y 75 grados C, dando como resultado la licuefacción parcial de partes biodegradables de los residuos y la acumulación de los metabolitos microbianos, seguido de
- (iii) la clasificación de las partes biodegradables licuefactadas del residuo a partir de sólidos no biodegradables para producir un lodo biodegradable caracterizado por comprender sólidos volátiles disueltos de los cuales, al menos el 25 % en peso comprenden cualquier combinación de acetato, butirato, etanol, formiato, lactato y/o propionato, opcionalmente seguido por

(iv) la digestión anaeróbica del biolíquido para producir biometano.

Tras algún período de hidrólisis enzimática y la fermentación microbiana concurrente, los RSM proporcionados a un contenido sin agua de entre el 10 y el 45 % se transforman de manera que los componentes biogénicos o "fermentables" llegan a licuefactarse y los metabolitos microbianos se acumulan en la fase acuosa. Tras algún período de hidrólisis enzimática y la fermentación microbiana concurrente, las partes licuefactadas fermentables del residuo se separan de los sólidos no fermentables. El material licuefactado, una vez separado de los sólidos no fermentables, es lo que los presentes inventores denominan "lodo biodegradable". En algunos casos, al menos el 40 % del contenido sin agua de este lodo biodegradable comprende sólidos volátiles disueltos, o al menos el 35 %, o al menos el 30 %, o al menos el 25 %. En algunos casos, al menos el 25 % en peso de los sólidos volátiles disueltos en el lodo biodegradable comprende cualquier combinación de acetato, butirato, etanol, formiato, lactato y/o propionato, o al menos el 30 %, o al menos el 35 %, o al menos el 40 %. En algunos casos, al menos el 70 % en peso de los sólidos volátiles disueltos comprenden lactato, o al menos el 60 %, o al menos el 50 %, o al menos el 40 %, o al menos el 30 %, o al menos el 25 %.

En algunos métodos de la invención, al menos el 40 % en peso de los sólidos volátiles disueltos del lodo de componentes biodegradables comprende lactato y/o al menos el 40 % en peso del contenido sin agua del lodo de componentes biodegradables comprende sólidos volátiles disueltos.

En algunos casos, la separación de sólidos no fermentables de las partes licuefactadas degradables de los RSM para producir un lodo biodegradable caracterizado por comprender sólidos volátiles disueltos, de los cuales, al menos el 25 % en peso comprenden cualquier combinación de acetato, butirato, etanol, formiato, lactato y/o propionato se lleva a cabo en menos de 16 horas tras la iniciación de la hidrólisis enzimática, o en menos de 18 horas, o en menos de 20 horas, o en menos de 22 horas, o en menos de 24 horas, o en menos de 30 horas, o en menos de 34 horas, o en menos de 36 horas, o entre 36 y 48 horas, o entre 48 y 60 horas, o entre 60 y 72 horas.

La separación de partes licuefactadas degradables de los sólidos no degradables se puede lograr mediante una variedad de medios. En algunos casos esto se puede lograr usando cualquier combinación de al menos dos operaciones de separación diferentes, que incluyen, pero sin limitación, operaciones con prensa de tornillo, operaciones con separador balístico, operaciones con tamiz con vibración u otras operaciones de separación conocidas en la materia. En algunos métodos de la invención, los sólidos no degradables separados de las partes biodegradables de los residuos comprenden, en promedio, al menos aproximadamente el 20 % del peso seco de los RSM procesados, o al menos el 25 %, o al menos el 30 %. En algunos métodos de la invención, los sólidos no degradables separados de las partes degradables de los residuos procesados comprenden, en promedio, al menos el 20 % del peso seco de los materiales reciclables, o al menos el 25 %, o al menos el 30 %, o al menos el 35 %. En algunos casos, la separación usando al menos dos operaciones de separación produce un lodo biodegradable que comprende al menos 0,15 kg de sólidos volátiles por kg de RSM procesados, o al menos 0,10. Un experto en la materia entenderá fácilmente que la composición biogénica inherente de los RSM es variable. No obstante, la cifra de 0,15 kg de sólidos volátiles por kg de RSM procesados refleja una captura total de material biogénico en RSM no clasificados típicos de al menos el 80 % en peso seco. El cálculo de kg de sólidos volátiles capturados en el lodo biodegradable por kg de RSM procesado se puede estimar durante un tiempo en el que se determinan los rendimientos totales y los RSM totales procesados. Para un período dado, se puede calcular la producción promedio de lodo biogénico obtenida como kg de lodo/H; el rendimiento promedio de RSM se calcula como kg de RSM/H; el contenido en SV promedio del lodo se analiza y el resultado se expresa cómo % de SV de la masa total; los kg de SV se calculan como kg de lodo/H * % de SV = kg de SV/H. Entonces, kg de SV/H / kg de RSM/H = kg de SV / kg de RSM.

En algunas realizaciones, tras la separación de los sólidos no degradables de las partes licuefactadas fermentables de los RSM se logra producir un lodo biodegradable, el lodo se puede someter a una fermentación posterior en diferentes condiciones, incluyendo diferente temperatura o pH.

La expresión "sólidos volátiles disueltos" tal como se usa en el presente documento se refiere a una medición simple calculada como sigue: Se centrifuga una muestra de lodo biodegradable a 6900 g durante 10 minutos en un tubo Falcon de 50 ml para producir un sedimento y un sobrenadante. El sobrenadante se decanta y el peso seco del sedimento se expresa como una parte porcentual del peso total inicial de la muestra de líquido. Se seca una muestra de sobrenadante a 60 grados durante 48 horas para determinar el contenido en materia seca. El contenido en sólidos volátiles de la muestra de sobrenadante se determina restando de la medida de materia seca la ceniza tras la combustión en el horno a 550 °C y se expresa como un porcentaje de masa como sólidos volátiles disueltos en %. El contenido en materia seca del sedimento se determina secando a 60 grados C durante 48 horas. La parte líquida del sedimento (1 - materia seca del sedimento) se expresa como un porcentaje de la masa del sedimento. Se estima que la composición de la parte líquida del sedimento es similar al sobrenadante. Por lo tanto, el total de sólidos volátiles disueltos de la muestra es la suma de los sólidos volátiles disueltos del sobrenadante y el (porcentaje de masa de la parte líquida del sedimento)x(los sólidos volátiles disueltos del sobrenadante).

En algunos casos, la invención proporciona composiciones y métodos para la producción de biometano. La discusión detallada anterior referente a casos de métodos de procesamiento de RSM, incluyendo los detalles

referentes a las características composicionales del lodo biodegradable obtenido, se puede aplicar opcionalmente a realizaciones que proporcionan métodos y composiciones para la producción de biometano. En algunos casos, cualquiera de los detalles referentes a características composicionales del lodo biodegradable se pueden obtener mediante un proceso en el que los RSM no clasificados sometidos a fermentación microbiana se someten a la separación de sólidos no degradables para producir un lodo biodegradable, cuyo lodo después se somete a fermentación continua a una temperatura en el intervalo de 35 a 75 grados C, o entre 40 y 55 grados C, o entre 45 y 50 grados C, a un pH en el intervalo de 4,2 a 6,0 durante un tiempo de entre 1 y 72 horas. En algunos casos, esta fermentación continua se complementa con el material biodegradable recuperado por tamices y otros sistemas, de manera que el material que no fuese técnicamente parte del lodo biodegradable inicialmente recuperado, se puede añadir a la composición.

La dinámica metabólica de las comunidades microbianas implicadas en la digestión anaeróbica es compleja. Véase Supaphol et al. 2010; Morita y Sasaki 2012; Chandra et al. 2012. En la digestión anaeróbica (DA) típica para la producción de biogás de metano, los procesos biológicos mediados por microorganismos logran cuatro etapas principales - la *hidrólisis* de macromoléculas biológicas en monómeros constituyentes u otros metabolitos; *acidogénesis*, mediante la cual, se producen ácidos y alcoholes de hidrocarburos de cadena corta; *acetogénesis*, mediante la cual, los nutrientes disponibles se catabolizan a ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono; y *metanogénesis*, mediante la cual, el ácido acético y el hidrógeno se catabolizan mediante arqueas especializadas a metano y dióxido de carbono. La etapa de hidrólisis normalmente es limitante de la velocidad. Véase, por ejemplo, Delgenes et al. 2000; Angelidaki et al. 2006; Cysneiros et al. 2011.

Por consiguiente, es ventajoso en la preparación de sustratos para la producción de biometano que éstos se hidrolicen previamente mediante alguna forma de pretratamiento. En algunos casos, los métodos de la invención combinan fermentación microbiana con hidrólisis enzimática de RSM tanto como un pretratamiento biológico rápido para la producción eventual de metano, así como un método de clasificación de componentes orgánicos degradables de RSM sin clasificar de otro modo. Se han documentado pretratamientos biológicos que usan sustratos sólidos de biometano incluyendo el componente orgánico de clasificación en origen de los RSM. Véase, por ejemplo, Fdez-Guelfo et al. 2012; Fdez-Guelfo et al. 2011 A; Fdez-Guelfo et al. 2011 B; Ge et al. 2010; Lv et al. 2010; Borghi et al. 1999. Se documentaron mejoras en las producciones eventuales de metano a partir de la digestión anaeróbica como una consecuencia de una elevada degradación de los biopolímeros del complejo y una elevada solubilización de los sólidos volátiles. Sin embargo, el nivel de solubilización de sólidos volátiles y el nivel de conversión de ácidos grasos volátiles alcanzado por estos métodos documentados anteriormente ni siquiera se acercan a los niveles logrados mediante los métodos de la invención. Por ejemplo, Fdez-Guelfo et al. 2011 A documentó una mejora *relativa* del 10-50 % en la solubilización de sólidos volátiles lograda a través de diversos pretratamientos biológicos de la parte orgánica preclasificada de los RSM - esto se corresponde con niveles absolutos finales de solubilización de entre aproximadamente el 7 al 10 % de sólidos volátiles. Por el contrario, los métodos de la invención producen sustratos de biometano líquidos que comprenden al menos el 40 % de los sólidos volátiles disueltos.

También se han documentado sistemas de digestión anaeróbica de dos etapas en los que el proceso de la primera etapa hidroliza sustratos de biometano que incluyen el componente orgánico clasificado en origen de los RSM y otros sustratos biogénicos especializados. Durante la primera fase anaeróbica, que es típicamente termófila, los polímeros de cadenas mayores se degradan y se producen ácidos grasos volátiles. Esto va seguido de una segunda etapa anaeróbica llevada a cabo en un reactor separado físicamente en el que dominan la metanogénesis y la acetogénesis. Los sistemas de digestión anaeróbica de dos fases documentados normalmente han utilizado sustratos biogénicos especializados, clasificados en origen, que tienen menos del 7 % de sólidos totales. Véase, por ejemplo, Supaphol et al. 2011; Kim et al. 2011; Lv et al. 2010; Riau et al. 2010; Kim et al. 2004; Schmit y Ellis 2000; Lafitte-Trouque y Forster 2000; Dugba y Zhang 1999; Kaiser et al. 1995; Harris y Dague 1993. Más recientemente, se han documentado algunos sistemas de DA de dos etapas que utilizan sustratos biogénicos especializados, clasificados en origen, a niveles tan altos como el 10 % de los sólidos totales. Véase, por ejemplo, Yu et al. 2012; Lee et al. 2010; Zhang et al. 2007. Ciertamente, ninguno de los sistemas de digestión anaeróbica de dos etapas ha contemplado nunca el uso de RSM no clasificados como un sustrato, mucho menos con el fin de producir un sustrato de biometano líquido alto en sólidos. La digestión anaeróbica en dos etapas busca convertir sustratos sólidos, alimentando de forma continua con sólidos adicionales y eliminar de forma continua los ácidos grasos volátiles del reactor de la primera etapa.

En algunos casos, el método de producción de biometano comprende las etapas de

- (i) proporcionar un sustrato de biometano líquido acondicionado previamente mediante fermentación microbiana, de manera que al menos el 40 % en peso del contenido sin agua exista como sólidos volátiles disueltos, cuyos sólidos volátiles disueltos comprenden al menos el 25 % en peso de cualquier combinación de acetato, butirato, etanol, formiato, lactato y/o propionato,
- (ii) transferir el sustrato líquido a un sistema de digestión anaeróbica, seguido de
- (iii) llevar a cabo la digestión anaeróbica del sustrato líquido para producir biometano.

En algunos casos, la descripción proporciona un sustrato de biometano líquido producido mediante fermentación microbiana e hidrólisis de los residuos sólidos municipales (RSM), o de biomasa lignocelulósica pretratada, como alternativa, que comprende RSM hidrolizados de forma enzimática y fermentados de forma microbiana, o que comprende biomasa lignocelulósica pretratada hidrolizada de forma enzimática y fermentada de forma microbiana caracterizada porque

- al menos el 40 % en peso del contenido sin agua existe como sólidos volátiles disueltos, cuyos sólidos volátiles disueltos comprenden al menos el 25 % en peso de cualquier combinación de acetato, butirato, etanol, formiato, lactato y/o propionato.

En algunos casos, la descripción proporciona un sustrato de biogás líquido orgánico producido mediante fermentación microbiana e hidrólisis de los residuos sólidos municipales (RSM) caracterizado porque

- al menos el 40 % en peso del contenido sin agua existe como sólidos volátiles disueltos, cuyos sólidos volátiles disueltos comprenden al menos el 25 % en peso de cualquier combinación de acetato, butirato, etanol, formiato, lactato y/o propionato.

En algunos casos, la descripción proporciona un método de producción de biogás que comprende las etapas de

- (i) proporcionar un sustrato de biogás líquido acondicionado previamente mediante fermentación microbiana, de manera que al menos el 40 % en peso del contenido sin agua exista como sólidos volátiles disueltos, cuyos sólidos volátiles disueltos comprenden al menos el 25 % en peso de cualquier combinación de acetato, butirato, etanol, formiato, lactato y/o propionato,
- (ii) transferir el sustrato líquido a un sistema de digestión anaeróbica, seguido de
- (iii) llevar a cabo la digestión anaeróbica del sustrato líquido para producir biometano.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sistema de digestión anaeróbica" se refiere a un sistema de fermentación que comprende uno o más reactores que funcionan en condiciones de aireación controlada en las que se produce gas metano en cada uno de los reactores que comprenden el sistema. El gas metano se produce en la medida en que la concentración de metano disuelto generado de forma metabólica en la fase acuosa de la mezcla de fermentación en el "sistema de digestión anaeróbica" se satura a las condiciones usadas y el gas metano se emite desde el sistema.

En algunos casos, el "sistema de digestión anaeróbica" es un sistema de filtros fijos. Un "sistema de digestión anaeróbica de filtros fijos" se refiere a un sistema en el que el consorcio de digestión anaeróbica se inmoviliza, opcionalmente en un biofilm, sobre una matriz de soporte físico.

En algunos casos, el sustrato de biometano líquido comprende al menos el 8 % en peso de sólidos totales, o al menos el 9 % de sólidos totales, o al menos el 10 % de sólidos totales, o al menos el 11 % de sólidos totales, o al menos el 12 % de sólidos totales, o al menos el 13 % de sólidos totales. "Sólidos totales", tal como se usa en el presente documento, se refiere tanto a sólidos solubles como a sólidos insolubles, y efectivamente significa "contenido sin agua". Los sólidos totales se miden mediante el secado a 60 °C hasta que se alcanza un peso constante.

En algunos casos, la fermentación microbiana de los RSM se lleva a cabo en condiciones que disuaden la producción de metano por metanógenos, por ejemplo, a pH de 6,0 o más bajo, o a pH menor de 5,8, o a pH menor de 5,6, o a pH menor de 5,5. En algunos casos, el sustrato de biometano líquido comprende concentraciones de metano disuelto menores que la saturación. En algunos casos, el sustrato de biometano líquido comprende menos de 15 mg/l de metano disuelto, o menos de 10 mg/l, o menos de 5 mg/l.

En algunos casos, antes de la digestión anaeróbica para producir biometano, se pueden eliminar uno o más componentes de los sólidos volátiles disueltos del sustrato de biometano líquido, mediante destilación, filtración, electrodiálisis, unión específica, precipitación u otros medios bien conocidos en la materia. En algunos métodos de la invención, se puede eliminar etanol o lactato del lodo de componentes biodegradables antes de producir la digestión anaeróbica. Además, sujeto a la invención está un lodo de componentes biodegradables preparado de acuerdo con cualquiera de los sujetos para la invención es un lodo de componentes biodegradables preparado de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención. En algunos casos, un sustrato sólido tal como los RSM o la parte de fibra de la biomasa lignocelulósica preparada, se somete a hidrólisis enzimática de manera concurrente con la fermentación microbiana para producir un sustrato de biometano líquido acondicionado previamente mediante fermentación microbiana de manera que al menos el 40 % en peso del contenido sin agua existe como sólidos volátiles disueltos, cuyos sólidos volátiles disueltos comprenden al menos el 25 % en peso de cualquier combinación de acetato, butirato, etanol, formiato, lactato y/o propionato.

En algunos casos, un sustrato de biometano líquido que tiene las propiedades anteriores mencionadas se produce mediante hidrólisis enzimática y fermentación microbiana concurrente de material orgánico licuefactado obtenido a partir de RSM no clasificados mediante un proceso de autoclave. En algunos casos, la biomasa lignocelulósica

pretratada se puede mezclar con RSM hidrolizados de forma enzimática y fermentados de forma microbiana, opcionalmente, de tal manera que la actividad enzimática del biolíquido derivado de los RSM proporciona actividad enzimática para la hidrólisis del sustrato lignocelulósico para producir un sustrato de biometano líquido compuesto que proviene tanto de los RSM como de la biomasa lignocelulósica pretratada.

"Biomasa lignocelulósica blanda" se refiere a biomasa vegetal que no es madera que comprende celulosa, hemicelulosa y lignina. Se puede usar cualquier biomasa lignocelulósica blanda, incluyendo biomasa tales como al menos paja de trigo, rastrojos de maíz, mazorcas de maíz, racimos de frutas vacías, paja de arroz, paja de avena, paja de cebada, paja de canola, paja de centeno, sorgo, sorgo dulce, rastrojo de soja, brotes de hierba, hierba Bermuda y otras hierbas, bagazo, pulpa de remolacha, fibra de maíz o cualquier combinación de los mismos. La biomasa lignocelulósica puede comprender otros materiales lignocelulósicos tales como papel, periódicos, cartón u otros residuos municipales o de oficinas. La biomasa lignocelulósica se puede usar como una mezcla de materiales procedentes de diferentes materias primas, puede ser reciente, parcialmente seca, totalmente seca o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, los métodos de la invención se realizan usando al menos aproximadamente 10 kg de materias primas de biomasa, o al menos 100 kg, o al menos 500 kg.

La biomasa lignocelulósica se debería de pretratar generalmente mediante métodos conocidos en la materia antes de llevar a cabo la hidrólisis enzimática y el acondicionamiento microbiano previo. En algunos casos, la biomasa se pretrata mediante pretratamiento hidrotermal. "Pretratamiento hidrotermal" se refiere al uso de agua, bien como líquido caliente, vapor o vapor presurizado que comprende líquido a alta temperatura o vapor o ambos, para "cocer" la biomasa, a temperaturas de 120 °C o superiores, bien con o sin adición de ácidos u otros compuestos químicos.

En algunos casos, las materias primas de biomasa lignocelulósica se pretratan mediante autohidrólisis.

"Autohidrólisis" se refiere a un proceso de pretratamiento en el que el ácido acético liberado mediante la hidrólisis de hemicelulosa durante el pretratamiento cataliza adicionalmente la hidrólisis de hemicelulosa, y se aplica a cualquier pretratamiento hidrotermal de biomasa lignocelulósica llevado a cabo a pH entre 3,5 y 9,0.

En algunos casos, la biomasa lignocelulósica pretratada de forma hidrotermal se puede separar en una parte líquida y en una parte sólida. "Parte sólida" y "parte líquida" se refieren a la partición de la biomasa pretratada en la separación de sólido/líquido. El líquido separado se denomina de forma colectiva "parte líquida". La parte residual que comprende contenido sólido insoluble considerable se denomina "parte sólida". Bien la parte sólida o la parte líquida o ambas combinadas se pueden usar para realizar los métodos de la invención o para producir las composiciones de la invención. En algunos casos se puede lavar la parte sólida.

Ejemplo 1. Captura de biodegradables en un lodo biogénico obtenido mediante hidrólisis y fermentación microbiana de RSM sin actividad celulasa complementaria de preparaciones de enzimas aislados.

Los experimentos se llevaron a cabo en la planta de demostración REnescience en el Amager resource center (ARC), Copenhague, Dinamarca. En la Figura 1 se muestra un dibujo esquemático que muestra las principales características de la planta. El concepto de la Refinería de Residuos REnescience de ARC es clasificar los RSM en cuatro productos. Un lodo biogénico adecuado para la producción de biometano u otros procesos, inertes (vidrio y arena) para el reciclado, y tanto una parte "bidimensional" (2D) como una parte "tridimensional" (3D) de materiales inorgánicos adecuados para la producción de CSR, así como para el reciclado de metales, plástico y madera.

Los RSM de zonas urbanas se recolectan tal cual en bolsas de plástico. Los RSM se transportan hasta la Refinería de residuos REnescience, donde se almacenan en un silo hasta el procesamiento. En función de las características de los RSM, se puede instalar una etapa de clasificación enfrente del sistema REnescience para extraer las partículas de gran tamaño (por encima de 500 mm).

Tal como se muestra en la Figura 1, un flujo de RSM sin clasificar se calienta y su contenido sin agua se ajusta mediante la adición de solución acuosa calentada. En realizaciones previas del proceso de REnescience, los presentes inventores han confiado en la actividad celulasa proporcionada por las preparaciones enzimáticas aisladas para facilitar la rápida degradación del componente biodegradable. Los presentes inventores han añadido previamente preparaciones de enzimas aisladas a los residuos calentados a un contenido sin agua apropiado. Los residuos, con enzimas añadidas, se pueden incubar previamente en un reactor denominado un "reactor enzimático" similar al descrito en el documento WO2011/032557, que presenta una cámara que rota sobre un eje sustancialmente horizontal, equipado con accesorios sobre su superficie interna que forman una matriz espiralada, que mueve los RSM de manera continua desde el extremo de entrada hasta el extremo de salida. En función del grado al que se ajusta el reactor, y en función del tamaño del reactor, se puede controlar el "tiempo de residencia" promedio de los RSM dentro del reactor. El reactor estaba equipado con elementos calentadores, de manera que se pueda mantener una temperatura apropiada.

Mientras que se introducen de manera continua los RSM en el reactor y se eliminan parcialmente de manera continua los RSM degradados del reactor, se obtiene un determinado tiempo de residencia promedio. Los RSM parcialmente degradados eliminados del reactor entonces se someten a dos etapas distintas de separación. En

primer lugar, se aplica un separador balístico que tiene tamices de 40 mm para producir un flujo de lodo biogénico, así como una parte en 3D no degradable y una parte en 2D no degradable. En segundo lugar, la parte en 2D no degradable se somete adicionalmente a deshidratación usando una prensa de tornillo, con recuperación del lodo biogénico adicional que, a su vez, se mezcla con el lodo obtenido de la etapa de separador balístico.

El lodo biogénico obtenido entonces se somete a una separación "fina" adicional usando dos tamices con vibración, teniendo el primero tamices de 8 mm, que separa principalmente contaminantes no degradables. El segundo tamiz con vibración, que tiene tamices de 3 mm, normalmente separa las fibras más grandes, que comprenden una cantidad considerable de material biodegradable. Tras pasar a través del tamiz de 3 mm, la suspensión biogénica obtenida se almacena en un tanque grande que está equipado con células de carga, lo que permite un registro preciso de la masa del lodo biogénico obtenido dentro de un período de tiempo dado.

La parte de sólidos en 2D deshidratados se somete después a un tren de lavado a contracorriente tanto para limpiar la parte de 2D como también para recuperar el material biodegradable adicional que de otro modo se perdería. El parte de sólidos en 2D deshidratados se somete después a un tren de lavado a contracorriente de dos fases en tambores tanto para limpiar la parte en 2D como también para recuperar el material biodegradable adicional que de otro modo se perdería. Los detalles se proporcionan en la Figura 1, que muestra el flujo de agua en el sistema. Se aplica agua dulce para lavar el material en 3D no degradable recuperado del separador balístico en un único tambor.

Este agua de lavado se usa después como agua "limpia" que se introduce en la segunda de dos unidades de lavado idénticas para proporcionar un lavado a contracorriente - el nuevo agua "limpia" se encuentra con la basura "más limpia" mientras de manera consecutiva se aplica más agua a la basura "más sucia" entrante. El tren de lavado funciona tal como sigue: la parte en 2D sucia entra en un tambor en la primera unidad de lavado, en donde los residuos se mezclan con el agua de lavado a contracorriente y se mezclan mecánicamente. Adicionalmente, el agua de lavado sucia se somete a una filtración por tamices que tiene tamices de 0,04 a 0,08 mm, para eliminar fibras, que típicamente comprenden principalmente material biodegradable. La arena y el material pesado también se eliminan mediante sedimentación y un transportador de tornillo en el fondo de cada unidad de lavado. La parte eliminada normalmente es fundamentalmente arena/vidrio/plástico duro/ y otros materiales inorgánicos. Tras el primer lavado, el residuo se mueve mediante una barrena de tornillo a una segunda unidad de lavado, que es idéntica a la primera. El agua de lavado de la primera unidad de lavado típicamente tiene entre el 1 - 4 % en peso de ST mientras que el agua de lavado de la segunda unidad de lavado típicamente tiene el 0,5-3,0 % en peso.

Las aguas de lavado, que comprenden algo de material biodegradable recuperado de los RSM así como microorganismos asociados, se almacenaron después en un depósito "de reserva". La solución acuosa de este depósito "de reserva" entonces se usó para ajustar el contenido sin agua del RSM entrante. Anteriormente, los presentes inventores han calentado primero la solución del depósito "de reserva" aplicando vapor, mezclando después la solución calentada con RSM entrantes para calentarlos de manera simultánea hasta una temperatura apropiada y también ajustar el contenido sin agua.

Tal como se explica en los ejemplos presentados a continuación de este ejemplo 1, los presentes inventores han determinado previamente que la inoculación de los RSM entrantes proporcionada por las aguas de lavado recirculadas mejora lo que los presentes inventores denominan captura de biodegradables que se logra con la ayuda de la hidrólisis enzimática usando preparaciones de celulasa aislada. Por "captura de biodegradables", los presentes inventores se refieren a sólidos volátiles que se capturan en el lodo biogénico, que típicamente se expresa como kg de SV (sólidos volátiles) / kg de RSM procesados.

En este experimento, los presentes inventores intentaron probar cómo de eficaz sería la captura de biodegradables si no aplicasen ninguna preparación de enzimas aisladas, sino que simplemente aplicaron un inóculo de los microorganismos presentes de forma natural en los RSM, para lograr una degradación rápida por hidrólisis y fermentación microbiana.

Para este fin, los presentes inventores ajustaron el depósito "de reserva", a partir del cual se extrae la solución recirculada de agua de lavado para ajustar el contenido sin agua del RSM entrante, con un sistema de intercambio de calor, con el fin de usarlo como un fermentador que mantiene una temperatura de 45 grados C, para promover el crecimiento bacteriano. El depósito "de reserva" está equipado con un sistema de agitación que comprende un eje vertical montado en el centro equipado con dos conjuntos de paletas unidas al eje. Los dos conjuntos de paletas alcanzan dos tercios del diámetro del depósito y una altura sobre el eje que se corresponde con un cuarto de la distancia desde la parte inferior del depósito y tres cuartos de la distancia desde la parte inferior del depósito. Con el fin de evitar calentar el "inóculo" extraído del depósito de reserva/fermentador de tal manera que pudiese dañar a los microorganismos, los presentes inventores usaron diferentes procedimientos para calentar los RSM entrantes en comparación con los procedimientos normales usados cuando se aplican preparaciones de enzimas aisladas.

Los diecisiete (17) días de ensayos documentados en el presente ejemplo se dividieron en cinco secciones tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Trascuro temporal del ensayo de hidrólisis y fermentación microbiana.

Tiempo (horas)	% de enzima añadido	Comentario
0 -153	0,9%	Funcionamiento de la primera enzima
153 - 207		mantenimiento
207 - 250	0 %	Tiempo de ascenso sin enzimas
250 - 319	0 %	Solo fermentación microbiana
319 - 390	0,9%	Funcionamiento de la segunda enzima

Los RSM no clasificados obtenidos de Copenhague, Dinamarca, se cargaron de forma continua en la planta de demostración RENescience. La preparación de enzimas aisladas usada fue una preparación de celulasa comercialmente disponible optimizada para la conversión de biomasa lignocelulósica y proporcionada por NOVOZYMES™ bajo la marca CELLIC CTEC 3™. Durante los períodos en los que se usó la preparación de enzimas aisladas, se añadió una cantidad correspondiente a 9 g de preparación de enzimas para cada kg de RSM entrante (0,9 % en peso) (datos comparativos). Los ajustes para la operación fueron tal como sigue para ambos períodos en los que se añadió la preparación comercial de enzimas aisladas:

- Se introdujo un flujo entrante de RSM en el reactor enzimático a velocidad de 280 kg de RSM/h
- Se ajustó el contenido sin agua del flujo entrante de RSM añadiendo una solución de agua de lavado recirculada, que se había almacenado en el depósito de reserva a temperatura ambiente, después se calentó a aproximadamente 75 grados C en el calentador de agua a la tasa de 560 l de agua/h.
- Se introdujo CTEC 3™ al flujo entrante de RSM al 0,9 % en peso correspondiente a la actividad celulasa de aproximadamente 670 UPF por contenido de litro de agua de los RSM humedecidos.
- Se dejó funcionar el reactor enzimático para lograr un tiempo de retención promedio de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 50 °C, con ajuste de pH usando CaCO₃ hasta estar dentro del intervalo de pH de 4,5 - 5.

Durante el período de "mantenimiento", se detuvo el reactor. Al final de este período, se eliminaron aproximadamente 2000 kg de contenidos del reactor enzimático antes de proceder con la operación continua en el período "sin enzimas".

El período denominado "tiempo de ascenso" sin enzimas se refiere al período durante el cual se eliminó el CTEC3 residual del sistema.

Los ajustes para la operación durante el período sin enzimas (es decir, tanto para el "tiempo de ascenso" como para "solo fermentación microbiana") fue tal como sigue:

- Se introdujo un flujo entrante de RSM en el reactor enzimático/fermentador microbiano a velocidad de 130 kg de RSM/h
- Se ajustó el contenido sin agua del flujo entrante de RSM añadiendo un inóculo, que comprende una solución de agua de lavado recirculada extraída del depósito de reserva/fermentador, que se mantuvo a 45 grados C y se agitó de forma continua usando el agitador descrito anteriormente que funciona a aproximadamente 30 rpm, y en el que se pueden añadir los sustratos para promover el crecimiento bacteriano y la expresión de enzima celulasa, incluyendo aproximadamente el 1 % en peso de extracto de levadura, aproximadamente el 1 % en peso de glucosa/sacarosa mezclada, y aproximadamente el 1 % en peso de celulosa microcristalina (marca AVICEL™). Este "inóculo" se extrajo a través del calentador de agua que se mantuvo a aproximadamente 45 grados C a la tasa de 260 l de agua/hora.
- Se dejó funcionar el reactor enzimático/fermentador microbiano (NOTA, explicar el tiempo de retención) para lograr un tiempo de retención promedio de aproximadamente 36 horas a aproximadamente 45 °C, con ajuste de pH usando CaCO₃ hasta estar dentro del intervalo de 4,5 - 5.

Las muestras se obtuvieron en puntos temporales seleccionados en los siguientes lugares:

- El lodo biogénico obtenido tras pasar a través del tamiz de 3 mm, que se denomina "EC12B"
- Material retenido por el tamiz de 8 mm
- Material retenido por el tamiz de 3 mm
- Material retenido por el tamiz de fibras 1 aplicado a las aguas de lavado
- Material retenido por el tamiz de fibras 2 aplicado a las aguas de lavado
- Aguas de lavado muestreadas tras el aclarado de los tamices de fibras
- Parte no degradable en 2D
- Parte no degradable en 3D
- Parte inferior inerte de ambas unidades de lavado

La producción de lodo biogénico se midió con células de carga en el depósito de almacenamiento. El flujo de entrada de aguas dulces se midió con medidores de flujo. Las otras partes se pesaron por separado en una balanza, de manera que se pudiera contabilizar el flujo de masa total para cualquier período de tiempo dado.

- 5 Con fines de análisis de los contenidos, las muestras también se obtuvieron en puntos de tiempo seleccionados de EC12B, del depósito de reserva/fermentador, y del reactor enzimático/reactor de fermentación microbiana. Estas muestras se hirvieron para detener la actividad microbiana y enzimática.

10 La Figura 2 muestra la suma de los metabolitos microbianos lactato, acetato y etanol, expresados como una concentración en gramos por litro, en muestras de lodos biogénicos obtenidas en diversos puntos temporales. Tal como se muestra, durante el primer período con actividad celulasa añadida, entre las horas 1 y 153, el nivel de metabolitos microbiano aumenta de forma gradual hasta llegar a ser relativamente estable a aproximadamente 35 g/l (datos comparativos). Durante el período solo con fermentación microbiana, entre las horas 250 y 319, el nivel de metabolitos fue en tanto menor pero estable a aproximadamente 27-30 g/l. Durante el segundo período con actividad
15 celulasa añadida, entre las horas 319 y 390, parece aumentar el nivel de metabolitos en relación con el primer período con actividad celulasa añadida a entre 35-40 g/l (datos comparativos). Estos resultados indican, por un lado, que puede ser ventajoso incluir alguna actividad celulasa complementaria con la fermentación microbiana. Por otro lado, estos resultados también indican que el inóculo usado fue suficiente como para promover la rápida degradación de los RSM usando solo fermentación microbiana.

20 La Figura 3 muestra la captura de biodegradables en kg de ST (sólidos totales)/kg de RSM para diversos períodos de tiempo. Normalmente, la captura de orgánicos se determina en términos de sólidos volátiles (SV). Se tomaron estas muestras y los resultados se pueden proporcionar tras la presentación. En este caso, los resultados se presentan en términos de ST, que incluyen el contenido de cenizas.

25 La Figura 3(A) muestra la captura de biodegradables en kg de ST/kg de RSM en muestras de lodo biogénico obtenido tras pasar a través del tamiz de 3 mm, denominado "EC12B". Para un período dado, la producción promedio de lodo biogénico obtenido tras pasar a través del tamiz de 3 mm denominado "EC12B" se calcula como kg de lodo/H; el rendimiento promedio de RSM se calcula como kg de RSM/H; el contenido en SV promedio del lodo se analiza y el resultado se expresa cómo % de SV de la masa total; los kg de SV se calculan como kg de lodo/H *
30 % de SV = kg de SV/H

Entonces, $\text{kg de SV/H} / \text{kg de RSM/H} = \text{kg de SV} / \text{kg de RSM}$. Durante el período solo con fermentación microbiana, entre las horas 250 y 319, se corrigieron las figuras para que no contasen la masa de sustratos especiales añadidos al depósito de reserva/fermentador. Tal como se muestra, durante el primer período con actividad celulasa añadida,
35 entre las horas 1 y 153, el nivel de captura de biodegradables en el lodo biogénico obtenido tras el tamiz de 3 mm fue de aproximadamente 0,21-0,25 kg de ST/kg de RSM (datos comparativos). Durante el período solo con fermentación microbiana, entre las horas 250 y 319, el nivel de "captura de orgánicos" en el lodo biogénico obtenido tras el tamiz de 3 mm se redujo claramente a aproximadamente 0,10 a 0,15 kg de ST/kg de RSM. Durante el
40 segundo período con actividad celulasa añadida, entre las horas 319 y 390, el nivel de captura de biodegradables en el lodo biogénico obtenido tras el tamiz de 3 mm fue similar al observado durante el primer período con actividad celulasa añadida, a aproximadamente 0,21 - 0,25 kg de ST/kg de RSM (datos comparativos). La Figura 3(B) muestra la "captura total de biodegradables" en kg de ST/kg de RSM, combinando tanto los ST obtenidos en muestras de lodo biogénico obtenido tras el paso a través del tamiz de 3 mm denominado "EC12BV" así como los ST obtenidos
45 en las partes de fibras obtenidas por el tamiz de 3 mm y por los tamices de fibras 1 y 2 aplicados a las aguas de lavado. Durante el período solo con fermentación microbiana, entre las horas 250 y 319, se corrigieron las figuras para que no contasen la masa de sustratos especiales añadidos al depósito de reserva/fermentador. Tal como se muestra, durante el primer período con actividad celulasa añadida, entre las horas 1 y 153, el nivel de "captura total de biodegradables" solo fue ligeramente mayor que el nivel de captura de biodegradables en el líquido (datos comparativos). Durante el período solo con fermentación microbiana, entre las horas 250 y 319, el nivel de "captura
50 total de biodegradables" aumentó mucho en comparación con la captura solo en el líquido, hasta niveles aproximadamente iguales a los logrados con la actividad celulasa añadida. Durante el segundo período con actividad celulasa añadida, entre las horas 319 y 390, el nivel de "captura total de biodegradables" fue similar al observado durante el primer período con actividad celulasa añadida (datos comparativos). Estos resultados indican que, aunque
55 la actividad celulasa añadida claramente facilita una degradación más completa de los RSM durante el tiempo de retención corto antes de la separación de los sólidos no degradables, sin embargo, la fermentación microbiana sola puede proporcionar una degradación suficiente del RSM durante un tiempo de retención similarmente corto para permitir una "captura de biodegradables" esencialmente equivalente en la clasificación biológica de RSM.

60 Esto es particularmente significativo porque el lodo biogénico obtenido usando la actividad celulasa comercial añadida no retiene mucha actividad tras la separación de los sólidos no degradables. Este efecto posiblemente surge de un modo sustancialmente diferente de catálisis de celulasa en el caso de la actividad secretada por organismos vivos en la vida real, en comparación con las actividades de los productos secretados, diseñados genéticamente que se han "recolectado" y se proporcionan como CTEC3™. En ensayos previos a la planta de
65 demostración, los presentes inventores han examinado las diversas partes descritas anteriormente, buscando identificar el destino de la actividad celulasa comercial añadida. Los niveles de actividad celulasa (UPF) observados

en el lodo biogénico obtenido tras el tamiz de 3 mm denominado "EC12B" fueron típicamente menores del 0,5 % de los observados en el reactor enzimático antes de la separación de los materiales no degradables.

Por el contrario, se puede esperar que el lodo biogénico obtenido usando solo la fermentación microbiana retenga un nivel muy alto de actividad celulasa de origen microbiano, en la medida en que retiene un alto nivel de células vivas. Por consiguiente, al contrario de la degradación dependiente de CTEC3™, la fermentación microbiana permite el simple recurso de fermentación posterior del lodo biogénico, antes de la producción de biometano u otros usos. En la fermentación posterior, la "captura de biodegradables" retenidos por los diversos tamices se mezcla con el lodo biogénico y se permite que continúe fermentando a una temperatura apropiada.

Las muestras de lodo biogénico obtenidas en puntos temporales seleccionados durante el período de fermentación microbiana se analizaron para los sólidos disueltos. El contenido en sólidos volátiles de la muestra de sobrenadante se determinó restando de la medida de materia seca la ceniza tras la combustión en el horno a 550 °C y se expresa como un porcentaje de masa como sólidos volátiles disueltos en %. El contenido en materia seca del sedimento se determina secando a 60 grados C durante 48 horas. La parte líquida del sedimento (1 - materia seca del sedimento) se expresa como un porcentaje de la masa del sedimento. Se estima que la composición de la parte líquida del sedimento es similar al sobrenadante. Por lo tanto, el total de sólidos volátiles disueltos de la muestra es la suma de los sólidos volátiles disueltos del sobrenadante y el (porcentaje de masa de la parte líquida del sedimento)x(los sólidos volátiles disueltos del sobrenadante). Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 3. Las concentraciones de lactato, acetato y etanol se muestran como % de peso global.

Tabla 3. Análisis de lodo biogénico.

Hora	% de SV disueltos del total de SV	% de SV disueltos del total de ST	% en peso de SV disueltos	% en peso de lactato	% en peso de acetato	% en peso de etanol	Suma: lactato, acetato, etanol
259	50,12	32,09	4,32	2,140	0,569	0,074	2,782
271	48,49	30,98	4,08				
284	50,06	32,11	4,47	2,265	0,583	0,109	2,957
296	45,19	24,88	3,77	2,172	0,536	0,109	2,818
308	46,88	26,90	3,79	2,113	0,531	0,108	2,752

Tal como se muestra, como un porcentaje del total de sólidos volátiles, el contenido en sólidos disueltos del lodo biogénico obtenido usando solo la fermentación microbiana fue consistente de entre el 40-50 %. Esto indica que la fermentación microbiana sola es suficiente para degradar sustancialmente los RSM a fin de hacer que el contenido en biodegradables sea susceptible de recuperación en una operación de clasificación biológica tal como se describe en el presente documento. El lodo obtenido tal como se describe era bombeable a todos los períodos temporales durante la fermentación microbiana.

Ejemplo 2. Caracterización de la actividad celulasa de origen microbiano y otras actividades de degradación de RSM expresadas por inóculo microbiano.

Durante el ensayo descrito en el Ejemplo 1, se extrajo una muestra líquida del depósito de reserva/depósito fermentador (inóculo microbiano) en la hora 245. Si bien esta muestra se tomó un poco antes del lavado completo de la actividad CTEC3 residual, la actividad residual de CTEC en el tanque de almacenamiento intermedio/fermentador en este punto no podría haber sido mayor a 8 UPF/l en la estimación del peor caso. Desde el momento en que se extrajo la muestra hasta que comenzó el experimento, pasaron 5,5 horas. Se añadieron 20 ml de inóculo microbiano a 1g de sustrato seco. Los sustratos fueron; pañuelo de papel de pulpa de papel 100 % nueva (LOMELETTER™), la parte celulósica de los residuos modelos y los residuos modelos completos. Los residuos modelo se prepararon usando productos recientes para que comprendan la parte "orgánica" (definida como las partes celulósicas, animales y vegetales) de los residuos sólidos municipales (preparados como en Jensen et al., 2010 basado en Riber et al. 2009). La composición de los residuos modelos completos fue tal como sigue:

% de RSM modelo (peso húmedo)	
Animal	23
Vegetal	81,6
Celulósica	53,2

La parte celulósica consiste en cartón (recubierto y no recubierto), papel limpio, panfletos, envoltorios de regalo y más. La parte animal consiste en proteínas y grasas de aves de corral, cerdos y vacas. Las partes vegetales

contienen frutos, hortalizas y partes no comestibles tales como vainas de guisantes verdes.

Los residuos modelo se almacenaron en alícuotas a -20 °C y se descongelaron toda la noche a 4 °C. El residuo modelo tiene un contenido en materia seca del 28,4 % (se añadieron 3,52 g de residuo modelo para producir 1 g de materia seca (MS)). Además, para cada tipo de sustrato, se aplicó CELLIC CTEC3™ (VDNI0009, NOVOZYMES A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) (CTec3) a una dosificación de 32 mg/g de materia seca en los sustratos, para comparar con la medida de hidrólisis alcanzada por el inóculo microbiano.

La actividad celulasa de CTEC3 se midió anteriormente mediante el método documentado en Ghose, T.K., Measurement of cellulase activities. Pure & Appl. Chem., 1987. 59(2): p. 257-268, y se descubrió que era de 179 UPF/g de preparación enzimática. Por consiguiente, la dosis usada en estos experimentos se corresponde con aproximadamente 5,7 UPF/g de MS o, expresada en términos de volumen de reacción, aproximadamente 286 UPF/l.

Para ajustar y mantener el pH a 5 durante la reacción con CTEC3 añadido, se aplicó un tampón de acetato de sodio (0,05 M) para elevar el volumen total hasta 20 g. Cada reacción se realizó por triplicado, y se incubó una reacción de cada sustrato en paralelo con solo tampón añadido (blanco de sustrato).

Las reacciones se incubaron durante 24 horas en un rotador Stuart Rotator SB3 (que gira a 4RPM) colocado en una cámara calentadora (Binder, GmbH, Tuttlingen, Alemania) establecida a 45 °C. Después se retiraron los tubos del incubador y se fotografiaron. Dado que la estructura física de las muestras parecía parcialmente disuelta, se agitaron vigorosamente los tubos a mano durante aproximadamente 2 segundos y se fotografiaron una vez más.

Después se centrifugaron los tubos a 1350 g durante 10 minutos a 4 °C. Después se decantó el sobrenadante, y se secaron el sobrenadante y el sedimento durante 2 días a 60 °C en la cámara calentadora. El peso del material seco se registró y se usó para calcular la distribución de materia seca. La conversión de materia seca en las muestras se calculó basándose en estos números. Como control, se incubó una muestra de inóculo microbiano (contenido en sólidos del 4,54 % ± 0,06) sin sustrato para evaluar la liberación de sólidos de fondo (33,9 % ± 0,8). La conversión de sólidos de los sustratos añadidos mediante inóculo microbiano se corrigió mediante la resta de la contribución de sólidos a la parte de líquido del propio inóculo microbiano. El fondo relativamente alto en estas muestras posiblemente sobreestima el fondo observado en muestras que contienen sustrato añadido. Este alto contenido puede incluir una contribución considerable de la masa celular que, en ausencia de una fuente adicional de alimento, volvió a una forma soluble durante el transcurso del experimento, en contraste con la forma de un organismo vivo, que precipita fácilmente en estas condiciones experimentales. Para todos los sustratos, la adición del inóculo microbiano dio como resultado una mayor liberación de sólidos que esta liberación de sólidos de fondo, lo que indica la hidrólisis parcial de los sustratos por el inóculo microbiano.

La Figura 4 muestra la degradación comparativa de los sustratos celulósicos y de los RSM modelo mediante el inóculo microbiano y con ayuda de CTEC3. Tal como se muestra, con un sustrato celulósico tal como un pañuelo de papel, CTEC3 proporciona claramente una degradación más extensa al nivel de dosis dado. Usando la degradación comparativa del pañuelo de papel como un estimador de la actividad celulasa, se demuestra que el inóculo microbiano presenta aproximadamente 1/6 de la actividad presentada por CTEC3. La actividad celulasa de origen microbiano expresada mediante el inóculo microbiano, por lo tanto, se puede estimar como (1/6)*286 UPF/l) o aproximadamente 48 UPF/l en el marco temporal de incubación de 24 horas.

Cabe destacar que se desconocen los mecanismos precisos mediante los cuales se proporciona actividad celulasa de origen microbiano. Sin desear quedar sujeto a ninguna teoría, a los presentes inventores les parece que el contacto con el sustrato induce la expresión de actividad celulasa de tal forma que es efectivamente "local" para el organismo donador y efectivamente emerge durante el transcurso de la incubación. En la medida en que esto sea correcto, la actividad celulasa de origen microbiano principalmente "seguirá" a las células vivas.

Las muestras de CTEC3 también demuestran que proporcionan una degradación más extensiva de los RSM. En el presente caso, sin embargo, la degradación del blanco de sustrato es alta, lo que sugiere que también puede haber contribuido alguna actividad microbiana a la degradación con CTEC3.

Irónicamente, a pesar de niveles mucho más bajos de actividad celulasa *per se* en UPF/l, el inóculo microbiano demuestra que logra niveles de degradación de la parte celulósica de los RSM modelo que son comparables con los niveles logrados usando CTEC3.

La Figura 5 muestra una fotografía tomada tras la agitación de estos tres tubos a los que se les añadió como sustrato una parte celulósica de los RSM modelo, mostrando la apariencia comparativa al final de la incubación. Tal como se muestra, la parte celulósica se degrada de manera aproximadamente equivalente al comparar las muestras de CTEC3 y de inóculo. Se ha documentado anteriormente en fermentaciones del ácido láctico con hidrólisis simultánea usando preparaciones de celulasa aislada, véase Schmidt y Padukone 1997, que las actividades celulasa típicas a niveles tan altos como 25 UPF/g de MS digieren papel de revista brillante y otros papeles recubiertos, así como papel de periódico, con menos de la mitad de la eficacia con la que pueden digerir el papel limpio. Los resultados mostrados en este caso sugieren que algunas actividades enzimáticas además de la actividad celulasa se

pueden expresar mediante el inóculo microbiano o su progenie que contribuye a la degradación de la parte celulósica de los RSM modelo.

Ejemplo 3. Caracterización de los recuentos bacterianos de BAL.

Durante el ensayo descrito en el Ejemplo 1, se extrajeron en diversos puntos temporales durante el período de la hora 235 a la 319, las muestras del depósito de reserva/fermentador (inóculo microbiano) así como las muestras del lodo biogénico obtenido tras el tamiz de 3 mm denominado "EC12B".

Se extrajeron alícuotas de las muestras y se determinó el contenido en materia seca mediante secado a temperatura ambiente (para evitar el daño al contenido de ADN). Las muestras no congeladas obtenidas en tubos de 50 ml se congelaron después con añadiendo glicerol al 50 % en peso.

El recuento de células se determinó mediante PCR cuantitativa (qPCR). Se suspendieron 5 ml de las células suspendidas en glicerol en 5 ml de H₂O esterilizada con filtro. Se filtró una alícuota en un filtro y se determinó la concentración de sólidos. El ADN se extrajo de la masa celular filtrada usando un kit FastDNA™ (MP BIOMEDICALS™). El número de copias de genes de ARNr 16S en el ADN extraído se cuantificó mediante análisis de qPCR con cebadores universales de genes de ARNr 16S. El método cuantifica solo bacterias y no arqueas. El número de células bacterianas se calculó basándose en estos datos, asumiendo un promedio de 3,0 números de copias de genes de ARNr 16S por célula viva. Los números calculados de células bacterianas se relacionaron luego con la concentración de materia seca (sólidos totales) en las muestras. Las UFC/g de MS calculadas se usaron para estimar las UFC/l donde el inóculo microbiano era, en promedio, del 3,95 % en peso de MS durante período temporal y donde el lodo biogénico era, en promedio, del 11,98 % en peso de MS.

Los recuentos bacterianos por g de materia seca para las muestras se muestran en la Tabla 4, junto con una estimación de UFC/l.

Tabla 4. Recuentos de bacterias vivas en inóculo microbiano y lodo biogénico.

Hora	UFC/g de ST		UFC/l	
	Inóculo	lodo biogénico	Inóculo	lodo biogénico
235	$5,40 \times 10^{10}$	$4,10 \times 10^9$	$2,13 \times 10^{12}$	$4,84 \times 10^{11}$
283	$1,00 \times 10^{10}$	$4,00 \times 10^9$	$3,95 \times 10^{11}$	$4,72 \times 10^{11}$
307	$5,00 \times 10^{10}$	$2,00 \times 10^9$	$1,98 \times 10^{12}$	$2,36 \times 10^{11}$

Estos resultados demuestran claramente que las células bacterianas vivas siguen el lodo biogénico. Por consiguiente, se puede esperar que el lodo biogénico en sí pueda proporcionar un inóculo eficaz y proporcionará actividad celulosa de origen microbiano para la posterior fermentación de fibras biodegradables recolectadas por los diversos tamices, así como para los sólidos no disueltos retenidos en el lodo en el momento de la separación inicial de los sólidos no degradables.

Estos resultados indican que la hidrólisis y la fermentación microbiana inducida por el inóculo microbiano dio como resultado un crecimiento relativamente estacionario durante el transcurso de la hidrólisis y de la fermentación y que se podría esperar que el lodo biogénico obtenido proporcionase un inóculo apropiado para la fermentación posterior con fibras recuperadas en los diversos tamices.

Generalmente se espera que las BAL comprendan una proporción importante de la población microbiana que evoluciona cuando los RSM simplemente se incuban a temperaturas de entre 37 y 50 °C. Véase, por ejemplo, Akao et al. 2007a; Akao et al. 2007b; Sakai et al. 2000; Sakai et al. 2004. Los recuentos de bacterias BAL vivas del orden de 10^{10} UFC/l se pueden obtener de manera habitual en aproximadamente 12 horas de fermentación del ácido láctico en modelo de residuos de cocina, sin actividad enzimática añadida. Véase Sakai et al. 2000 y Sakai et al. 2004. Los tiempos de duplicación de la generación de bacterias del ácido láctico identificadas en los ejemplos presentados posteriormente son, para este ejemplo 3, del orden de 4 a 5 horas. Véase Liong y Shaw 2005.

La proporción de bacterias vivas en las muestras que representa las bacterias del ácido láctico se puede determinar de manera decisiva a partir de las mediciones del ARN 16S descritas en el Ejemplo 4. Sin embargo, estos resultados no estarán disponibles hasta después de la presentación. En todos los ensayos experimentales previos en la planta de demostración RENescience que implican la inoculación de los RSM entrantes con aguas de lavado recirculadas, cuando las muestras se congelan de manera apropiada con glicerol para proteger a los organismos, las especies de *Lactobacillus* emergen como las predominantes, comprendiendo de manera invariable más del 90 % del total de los organismos detectados en muestras del reactor enzimático/reactor de fermentación microbiana y lodo biogénico. Por consiguiente, cuando los presentes inventores estiman que las especies de *Lactobacillus* (que probablemente no sean las únicas BAL presentes) comprenden al menos el 90 % de las células vivas, los niveles de BAL en la fase

acuosa dentro del reactor enzimático/reactor de fermentación microbiana en el Ejemplo 1 se mantuvieron durante el transcurso de la hidrólisis y la fermentación al menos a $2,1 \times 10^{10}$ UFC/l.

Ejemplo 4. Identificación de microorganismos que proporcionan hidrólisis y fermentación en el ejemplo 1.

Las muestras del lodo biogénico obtenidas tras el paso a través del tamiz de 8 mm denominado "EC12B", y del líquido (inóculo microbiano) del depósito de reserva/fermentador denominado "EA02" así como las muestras del calentador de agua "LB01" se tomaron durante el ensayo a las horas 101 y 125, durante el primer período CTEC3 añadido, a la hora 245, al final del "tiempo de ascenso sin CTEC3" a la hora 269, durante el período solo con fermentación microbiana, y a las horas 341 y 365, durante el segundo período con CTEC3 añadido.

Las muestras líquidas se congelaron en glicerol al 20 % y se almacenaron a -20 °C con el fin de realizar el análisis de ADNr 16S para identificar los microorganismos. Este análisis es bien conocido en la materia y se usa ampliamente para la identificación y el análisis filogenético de procariotas basado en el componente 16S de la subunidad ribosómica pequeña. Las muestras congeladas se enviaron en hielo seco a GATC Biotech AB, Solna, SE, en donde se realizó el análisis de ADNr 16S (GATC_Biotech).

El análisis comprendió: la extracción de ADN genómico, la preparación de la biblioteca de amplicones usando el par de cebadores de cebadores universales que abarca las regiones hipervariables V1 a V3 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG / 534R: ATTACCGCGGCTGCTGG; 507 pb de longitud), el marcaje de PCR con adaptadores GS FLX, la secuenciación en un instrumento Genome Sequencer FLX para obtener un número de 104.000-160.000 lecturas por muestra. Las secuencias resultantes se consultarán en un BlastN frente a la base de datos de ADNr del Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009). La base de datos contiene secuencias de buena calidad con al menos 1200 pb de longitud y una asociación taxonómica del NCBI. La versión actual (RDP versión 10, actualizada el 19 de septiembre de 2012) contiene secuencias de 9.162 bacterias y de 375 arqueas. Los resultados de BLAST se filtrarán para eliminar los accesos cortos y de baja calidad (identidad de secuencia ≥ 90 %, cobertura de alineación ≥ 90 %).

El número de proyecto para las muestras registradas en GATC fue NG-7116. Los resultados estarán disponibles después de la presentación.

Ejemplo 5. La fermentación microbiana concurrente mejora la captura de orgánicos mediante hidrólisis enzimática de RSM no clasificados usando preparaciones de enzimas aisladas.

(Ejemplo comparativo)

Se llevaron a cabo reacciones a escala de laboratorio con la muestra de lodo biodegradable del ensayo descrito en el ejemplo 9.

El sustrato de RSM modelo para las reacciones a escala de laboratorio se preparó usando productos recientes para que comprendan la parte "orgánica" (definida como las partes celulósicas, animales y vegetales) de los residuos sólidos municipales (preparados tal como se describe en Jensen et al., 2010 basado en Riber et al. 2009).

Los RSM se almacenaron en alícuotas a -20 °C y se descongelaron toda la noche a 4 °C. Las reacciones se hicieron en tubos de centrifugación de 50 ml y el volumen total de reacción fue de 20 g. Los RSM modelo se añadieron al 5 % de materia seca (MS) (medida como el contenido en materia seca que permanece tras 2 días a 60 °C).

La celulasa aplicada para la hidrólisis fue Cellic CTec3 (VDNI0003, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) (CTec3). Para ajustar y mantener el pH a pH 5, se aplicó un tampón de citrato (0,05 M) para elevar el volumen total hasta 20 g.

Las reacciones se incubaron durante 24 horas en un rotador Stuart Rotator SB3 (que gira a 4RPM) colocado en una cámara calentadora (Binder GMBH, Tuttlingen, Alemania). Se hicieron controles negativos paralelos para evaluar la liberación de fondo de materia seca del sustrato durante la incubación. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron a 1350 g durante 10 minutos a 4 °C. Después se decantó el sobrenadante, se extrajo 1 ml para el análisis de HPLC y el sobrenadante restante y el sedimento se secaron durante 2 días a 60 °C. Se registró el peso del material seco y se usó para calcular la distribución de materia seca. La conversión de MS en los RSM modelo se calculó basándose en estos números.

Se midieron las concentraciones de ácidos orgánicos y de etanol usando un Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific Dionex) equipado con un detector del índice de refracción (Shodex® RI-101) y un detector de UV a 250 nm. La separación se realizó en una columna de monosacáridos Rezex RHM (Phenomenex) a 80 °C con H₂SO₄ 5 mM como eluyente a un caudal de 0,6 ml/min. Los resultados se analizaron usando el programa informático Chromeleon (dionex).

Para evaluar el efecto de la fermentación y de la hidrólisis concurrente, se añadieron a las reacciones con o sin CTec3 (24 mg/ g de MS) 2 ml/20 g de biolíquido del ensayo descrito en el ejemplo 5 (muestreado el 15 y el 16 de diciembre).

5 Conversión de MS en RSM.

La conversión de sólidos se midió como el contenido de sólidos hallados en el sobrenadante como un porcentaje de materia seca total. La Figura 5 muestra la conversión para el blanco de RSM, la preparación de enzima aislada, el inóculo microbiano solo, y la combinación de inóculo microbiano y enzima. Los resultados muestran que la adición de EC12B del ejemplo 5 dio como resultado una conversión de materia seca significativamente mayor en comparación con la liberación de materia seca de fondo en el blanco de reacción (Blanco de RSM) (pruebas de la t de Student, $p < 0,0001$). La fermentación microbiana concurrente inducida mediante la adición de la muestra de EC12B y la hidrólisis enzimática usando CTec3 dio como resultado una conversión de materia seca significativamente mayor en comparación con la reacción hidrolizada solo con CTec3 y las reacciones solo con EC12B añadido ($p < 0,003$).

Análisis en HPLC de glucosa, lactato, acetato y EtOH.

La concentración de glucosa y los metabolitos microbianos (lactato, acetato y etanol) medida en el sobrenadante se muestra en la Figura 6. Tal como se muestra, hubo una baja concentración de fondo de estas en el blanco del modelo de RSM y el con el contenido de ácido láctico presumiblemente proviene de bacterias autóctonas del modelo de RSM, ya que el material utilizado para crear el sustrato no era de ninguna manera estéril ni calentaba para eliminar bacterias. El efecto de adición de CTec3 dio como resultado un aumento en glucosa y en ácido láctico en el sobrenadante. Las concentraciones más altas de glucosa y de metabolitos bacterianos se hallaron en las reacciones en las que se añadía biolíquido de EC12B del ejemplo 9 de manera concurrente con CTec3. La fermentación y la hidrólisis concurrente, por lo tanto, mejoran la conversión de materia seca en RSM modelo y aumentan la concentración de metabolitos bacterianos en los líquidos. Bibliografía: Jacob Wagner Jensen, Claus Felby, Henning Jørgensen, Georg Ørnskov Rønsch, Nanna Dreyer Nørholm. Enzymatic processing of municipal solid waste. Waste Management. 12/2010; 30(12):2497-503.

Riber, C., Petersen, C., Christensen, T.H., 2009. Chemical composition of material fractions in Danish household waste. Waste Management 29, 1251-1257.

Ejemplo 6. La fermentación microbiana concurrente mejora la captura de orgánicos mediante hidrólisis enzimática de RSM no clasificados usando preparaciones de enzimas aisladas.

(Ejemplo comparativo)

Los ensayos se realizaron en un reactor por lotes diseñado especialmente y mostrado en la Figura 8, usando RSM no clasificados con el objetivo de validar los resultados obtenidos en experimentos a escala de laboratorio. Los experimentos ensayaron el efecto de añadir un inóculo de microorganismos que comprende biolíquido obtenido de las bacterias del ejemplo 7 con el fin de lograr una fermentación microbiana y una hidrólisis enzimática concurrentes. Los ensayos se realizaron usando RSM sin clasificar.

Los RSM usados para ensayos a pequeña escala fueron un punto focal de la investigación y el desarrollo en RENescience. Para que los resultados de los ensayos fuesen valiosos, se requirió que los residuos fuesen representativos y reproducibles.

Los residuos se recolectaron de Nomi I/S Holstebro en marzo de 2012. Los residuos eran residuos sólidos municipales (RSM) sin clasificar del respectivo área. Los residuos se trituraron a 30x30 mm para su uso en ensayos a pequeña escala y para la colección de muestras representativas para ensayos. Se aplicó la teoría de muestreo para los residuos triturados mediante el submuestreo de residuos triturados en cubos de 22 litros. Los cubos se almacenaron en un contenedor frigorífico a -18 °C hasta su uso. Los "residuos reales" estaban compuestos de ocho cubos de residuo de la colección. Se volvió a mezclar y se volvió a muestrear el contenido de estos cubos con el fin de asegurar que la variabilidad entre repeticiones era tan baja como fuese posible.

Todas las muestras se sometieron a condiciones similares en cuanto a agua, temperatura, rotación y efecto mecánico. Se usaron seis cámaras: tres sin inoculación y tres con inoculación. El contenido sin agua designado durante el ensayo se estableció al 15 % del contenido sin agua mediante adición de agua. La materia seca en el material de inoculación se contabilizó de modo que la adición de agua dulce en las cámaras inoculadas fue menor. Se añadieron 6 kg de RSM a cada cámara, como fue 84 g de CTEC3, una preparación comercial de celulasa. Se añadieron 2 litros de inóculo a las cámaras inoculadas, con una correspondiente reducción en el agua añadida.

El pH se mantuvo a 5,0 en las cámaras inoculadas y a pH 4,2 en las cámaras no inoculadas usando respectivamente la adición de NaOH al 20 % para aumentar el pH y H₂SO₄ al 72 % para reducir el pH. El pH más bajo en la cámara no inoculada ayudó a asegurar que las bacterias intrínsecas no floreciesen. Los presentes inventores han demostrado que, usando la preparación de enzimas usada, CTEC3 Tm, en el contexto de hidrólisis

de RSM, no se puede discernir diferencias en la actividad entre el pH de 4,2 y el pH d 5,0. La reacción continuó a 50 grado C durante 3 días, proporcionando agitación rotativa constante con el reactor experimental.

Al final de la reacción, las cámaras se vaciaron a través de un tamiz y un biolíquido que comprende material licuefactado producido por hidrólisis enzimática y fermentación microbiana concurrente de RSM.

Se determinaron la materia seca (ST) y los sólidos volátiles (SV) mediante el método de la materia seca (MS): Se secaron las muestras a 60 °C durante 48 horas. El peso de la muestra antes y después del secado se usó para calcular el porcentaje de MS.

$$\text{MS de la muestra (\%)} = \frac{\text{Peso seco de la muestra}}{\text{Peso húmedo (g)}} \times 100$$

Método de sólidos volátiles:

Los sólidos volátiles se calculan y se presentan como el porcentaje de MS menos el contenido en cenizas. El contenido en cenizas de una muestra se descubrió quemando la muestra presecada a 550 °C en un horno dura durante un mínimo de 4 horas. Después se calculó las cenizas como:

Porcentaje de cenizas de la materia seca en la muestra:

$$\frac{\text{Peso de cenizas de la muestra (g)}}{\text{Peso seco de la muestra (g)}} \times 100$$

Porcentaje de sólidos volátiles:

(1 - porcentaje de cenizas en la muestra)

x porcentaje de MS de la muestra

Los resultados fueron tal como se muestran a continuación. Tal como se muestra, se obtuvo un mayor contenido en sólidos totales en el biolíquido obtenido en las cámaras inoculadas, lo que indica que la fermentación microbiana y la hidrólisis enzimática concurrentes fueron superiores a la hidrólisis enzimática sola.

	Biolíquido			
	ST (kg)	SV (kg)		
Bajo lactato std.	1,098	0,853		
Pode. lactato alto	1,376	1,041		
ST + SV pode. añadidos	ST	SV		
Kg	0,228	0,17		
Producido				
	Biolíquido			
	ST (kg)	stdev	SV (kg)	stdev
bajo lactato std.	1,098	0,1553	0,853	0,116
Pode. lactato alto	1,148	0,0799	0,869	0,0799
	más %		más %	
bajo lactato std.				
Pode. lactato alto	4,5579		1,8429	

Suma de compuestos metabólicos producidos (lactato, acetato y etanol)		más %
std prom.	92,20903g/l	
pode prom.	342,6085g/l	271,5564
Suma de compuestos metabólicos (lactato, acetato y etanol) "capturados"		más %
std prom. (bajo en lac)	189,6075g/l	
pode prom. (alto en lac)	461,6697g/l	143,4871

Ejemplo 7. La fermentación microbiana concurrente mejora la captura de orgánicos mediante hidrólisis enzimática de RSM no clasificados usando preparaciones de enzimas aisladas.

5

(Ejemplo comparativo)

Los experimentos se llevaron a cabo en la planta de demostración REnescience ubicada en el Amager resource center (ARC), Copenhagen, Dinamarca. En la Figura 1 se muestra un dibujo esquemático que muestra las principales características de la planta. El concepto de la Refinería de Residuos REnescience de ARC es tal como se describe de forma general en el ejemplo 1.

10

La tecnología de REnescience tal como se ensaya en este ejemplo comprende tres etapas.

15

20

La primera etapa es un calentamiento suave (pretratamiento, tal como se muestra en la figura 4) del RSM mediante agua caliente hasta temperaturas en el intervalo de 40-75 °C durante un período de 20-60 minutos. Este período de calentamiento y de mezclado abre las bolsas de plástico y proporciona un despulpado adecuado de los componentes degradables preparando una fase orgánica más homogénea antes de la adición de enzimas. La temperatura y el pH se ajustan en el período de calentamiento hasta el óptimo de las preparaciones de enzimas aisladas que se usa para la hidrólisis enzimática. Se puede añadir agua caliente como agua limpia del grifo o como agua de lavado usada por primera vez en los tambores de lavado y después recirculada al calentamiento suave tal como se indica en la figura 1.

25

La segunda etapa es la hidrólisis enzimática y la fermentación (licuefacción, tal como se muestra en la figura 4). En la segunda etapa del proceso de REnescience se añaden enzimas y, opcionalmente, microorganismos seleccionados. La licuefacción y fermentación enzimáticas se realizan de forma continua en un tiempo de residencia de aprox. 16 horas, a una temperatura óptima y pH óptimos para el rendimiento de la enzima. Mediante esta hidrólisis y fermentación, la parte biogénica de los RSM se licuefacta en un biolíquido con alto contenido de materia seca entre materiales no degradables. El pH se controla mediante la adición de CaCO_3 .

30

35

40

La tercera etapa de la tecnología REnescience tal como se realiza en este ejemplo, es una etapa de separación en la que el biolíquido se separa de las partes no degradables. La separación se realiza en un separador balístico, en tambores de lavado y en prensas hidráulicas. El separador balístico separa los RSM tratados con enzimas en el biolíquido, en una parte de materiales en 2D no degradables y en una parte de materiales en 3D no degradables. La parte en 3D (objetos físicos en 3 dimensiones como latas y botellas de plástico) no se unen a grandes cantidades de biolíquido, de manera que una única etapa de lavado es suficiente en la parte en 3D del lavado. La parte en 2D (textiles y láminas, por ejemplo) se unen a una cantidad significativa de biolíquido. Por lo tanto, la parte en 2D se prensa usando un preno de tornillo, se lava y se prensa de nuevo, para poder optimizar la recuperación de biolíquido y para obtener una parte en 2D "limpia" y seca. El material inerte que es arena y vidrio se tamiza a partir del biolíquido. El agua usada en todos los tambores de lavado se puede recircular, calentar y usar entonces como agua caliente en la primera etapa para el calentamiento.

El ensayo documentado en el presente ejemplo se dividió en tres secciones tal como se muestra en la tabla 5

45

Tabla 5.

Tiempo (horas)		Rodalon	Agua de grifo / Agua de lavado para calentamiento suave
27 - 68	+		agua de grifo
86 - 124	-		agua de grifo
142 - 187	-		agua de lavado

En un ensayo de 7 días, los RSM no clasificados obtenidos de Copenhagen, Dinamarca, se cargaron de forma continua a 335 kg/h en la planta de demostración REnescience. En el calentamiento suave se añadieron 536 kg/hora

(agua de grifo o agua de lavado) calentada hasta aprox. 75 °C antes de entrar en el reactor de calentamiento suave. La temperatura se ajusta, por el presente documento, a aprox. 50 °C en los RSM y el pH se ajusta a aprox. 4,5 mediante adición de CaCO₃.

- 5 En la primera sección, el agente Rodalon™ (cloruro de bencilalquilamonio) antibacteriano y activo en superficie se incluyó en el agua añadida a 3 g de ingrediente activo por kg de RSM.

10 En el reactor de licuefacción se añaden, aprox. 14 kg de Cellic Ctec3 (preparación de celulasa comercialmente disponible de Novozymes) por tonelada húmeda de RSM. La temperatura se mantuvo en el intervalo de 45-50 °C y el pH se ajustó en el intervalo de 4,2 - 4,5 añadiendo CaCO₃. El tiempo de retención del reactor enzimático es de aprox. 16 horas.

15 En el sistema de separación del separador balístico, de las prensas y de los tambores de lavado, el lodo biodegradable obtenido se separa de los materiales no degradables.

20 Las aguas de lavado se vertieron de forma selectiva, se registró el contenido en orgánicos o se recircularon y se reutilizaron para el calentamiento suave de los RSM húmedos entrantes. La recirculación del agua de lavado tiene el efecto de realizar la inoculación bacteriana usando organismos que prosperan en condiciones de reacción de 50 °C a niveles superiores a los inicialmente presentes. En el esquema del proceso usado, el agua de lavado recirculada se calentó en primer lugar a aproximadamente 70 °C, con el fin de llevar los RSM entrantes hasta una temperatura apropiada para la hidrólisis enzimática, en este caso, aproximadamente 50 °C. Particularmente en el caso de las bacterias del ácido láctico, se ha demostrado previamente que el calentamiento a 70 °C proporciona una selección e "inducción" de la expresión de tolerancia térmica.

25 Las muestras se obtuvieron en puntos temporales seleccionados en los siguientes lugares:

- El biolíquido que deja el tamiz pequeño, que se denomina "EC12B"
- El biolíquido en el depósito de almacenamiento
- Agua de lavado tras los tamices de suero
- 30 - Parte en 2D
- Parte en 3D
- Parte inferior inerte de ambas unidades de lavado

35 La producción de lodo biodegradable se midió con células de carga en el depósito de almacenamiento. El flujo de entrada de aguas dulces se midió con medidores de flujo, el agua de lavado reciclada o drenada se midió con células de carga.

40 Los recuentos bacterianos se examinaron tal como sigue: Las muestras elegidas de biolíquido se diluyeron 10 veces en SPO (solución de sal de peptona) y se coloca 1 ml de las diluciones a una profundidad de siembra en el extracto de agar (3,0 g/l de extracto de carne de vaca, (Fluka, Cas.: B4888), 10,0 g/l de triptona (Sigma, n.º de cat.: T9410), 5,0 g/l NaCl (Merck, n.º de cat. 7647-14-5), 15,0 g/l de agar (Sigma, n.º de cat. 9002-18-0)). Las placas se incubaron a 50 grados, respectivamente, en atmósfera aeróbica y anaeróbica. El cultivo anaeróbico tuvo lugar en los recipientes apropiados que se mantuvieron anaeróbicos mediante gasificación con Anoxymat y adición de letras iltfjernende (AnaeroGen de Oxoid, n.º de cat. AN0025A). Se hizo un recuento de colonias aeróbicas tras 16 horas y de nuevo tras 24 horas. Se cuantificaron las bacterias de crecimiento anaeróbico tras 64-72 horas.

50 La Figura 9 muestra el contenido total en sólidos volátiles en muestras de lodo biodegradables en EC12B como kg por kg de RSM procesado. Se obtuvieron estimaciones puntuales en diferentes puntos temporales durante el experimento considerando cada uno de los tres períodos experimentales separados como un período temporal separado. Por lo tanto, se expresó una estimación puntual durante el período 1 (Rodalon) en relación con los balances de masas y los flujos de material durante el período 1. Tal como se muestra en la Figura 5, durante el período 1, que comenzó tras una parada prolongada debido a complicaciones en la planta, se ve que los sólidos totales capturados en el lodo biodegradable caen de forma constante, consistente con un ligero efecto antibacteriano de Rodalon™. Durante el período 2, los sólidos totales capturados vuelven a niveles ligeramente superiores.

55 Durante el período 3, cuando la recirculación proporciona una "inoculación" eficaz de los RSM entrantes, la captura en lodos biodegradables en kg de SV/kg de basura aumenta hasta niveles considerablemente mayores de aproximadamente el 12 %.

60 Para cada uno de los 10 puntos temporales en la Figura 9, se tomaron muestras de biolíquido (EC12B) y se determinó los sólidos totales, los sólidos volátiles, los sólidos volátiles disueltos y las concentraciones de los presuntos metabolitos bacterianos acetato, butirato, etanol, formiato y propionato mediante HPLC. Estos resultados, incluyendo las concentraciones de glicerol, se muestran a continuación en la Tabla 6. Todos los porcentajes dados son porcentajes de peso global.

Tabla 6. Análisis de muestras de lodo biodegradable.

Tiempo	Sólidos totales	SV	SV disueltos	Lactato	Ácido fórmico	Acetato	Propionato	Etanol	Glicerol
horas	%	%	%	%	%	%	%	%	%
45	10,30	8,69	7,00	3,22	0,00	0,35	0,00	0,12	0,4165
53	9,77	8,22	6,62	3,00	0,00	0,42	0,00	0,17	0
63	9,31	7,74	6,07	2,74	0,09	0,41	0,03	0,17	0,415
67	8,66	7,15	5,54	2,82	0,00	0,39	0,03	0,20	0,475
88	9,57	7,97	6,02	3,24	0,00	0,31	0,04	0,13	0,554
116	10,57	8,90	6,77	3,27	0,01	0,25	0,00	0,11	0,5635
130	9,93	8,33	6,43	3,39	0,00	0,25	0,00	0,11	0
141	12,07	9,08	6,76	4,16	0,00	0,28	0,00	0,14	0,6205
159	11,30	8,68	6,33	4,63	0,00	0,31	0,00	0,11	0
166	11,04	8,17	5,72	4,50	0,00	0,32	0,03	0,12	0,646
181	11,76	8,75	6,11	5,48	0,12	0,37	0,00	0,11	1,38
188	11,20	8,05	6,20	5,40	0,00	0,40	0,00	0,11	0

Para las muestras de lodos biodegradables tomadas en cada uno de los diez puntos temporales, la Figura 10 muestra tanto recuentos de bacterias vivas determinado en condiciones aeróbicas y presentados como recuentos por ml, como también el porcentaje en peso de "metabolitos bacterianos" (que significa la suma de acetato, butirato, etanol, formiato y propionato) expresado como un porcentaje de sólidos volátiles disueltos. Tal como se muestra, el porcentaje en peso de metabolitos bacterianos aumenta claramente con el aumento de la actividad bacteriana, y se asocia con una mayor captura de sólidos en el biolíquido.

Ejemplo 8. Identificación de microorganismos que contribuyen a la fermentación concurrente en el ejemplo 7.

Se analizó la composición microbiana de las muestras de biolíquido obtenidas del ejemplo 7.

Las especies microbianas presentes en la muestra se identificaron mediante comparación de sus secuencias génicas de ARNr 16S con las secuencias génicas de ARNr 16S de especies bien caracterizadas (especies de referencia). El valor límite normal para la identificación de especies es el 97 % de similitud de secuencias génicas de ARNr 16S con una especie de referencia. Si la similitud está por debajo del 97 %, lo más probable es que sea de una especie diferente.

Las secuencias resultantes se consultaron en un BlastN frente a la base de datos del NCBI. La base de datos contiene secuencias de buena calidad con al menos 1200 pb de longitud y una asociación taxonómica del NCBI. Solo se incluyeron los accesos de BLAST con una identidad ≥ 95 %.

El lodo biodegradable muestreado se transfirió directamente al análisis sin congelar antes de la extracción de ADN.

Se identificaron un total de 7 especies de bacterias (Figura 11) y 7 especies de arqueas. En algunos casos, no se pudo asignar la subespecie de la especie bacteriana (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. sobrius*, *L. reuteri*, *L. frumenti*, *L. fermentum*, *L. fabifermentans*, *L. plantarum*, *L. pentosus*)

Ejemplo 9. Análisis detallado de captura de orgánicos usando fermentación microbiana e hidrólisis enzimática concurrentes de RSM no clasificados usando preparaciones de enzimas aisladas.

(Ejemplo comparativo)

La planta de demostración REnescience descrita en el ejemplo 1 y en el ejemplo 7 se usó para hacer un estudio detallado de la captura total de orgánicos usando fermentación bacteriana e hidrólisis enzimática concurrentes de RSM no clasificados. La basura de Copenhague se caracterizó mediante Econet para determinar su contenido.

Se ha analizado el análisis de residuos para determinar el contenido y la variación. Se ha administró una gran muestra de RSM a Econet A/S, que realizaron los análisis de los residuos. La muestra primaria se redujo a una submuestra de alrededor de 50 - 200 kg. Esta submuestra se clasificó mediante personal especializado en 15 partes de residuos diferentes. Se registró el peso de cada parte y se calculó una distribución.

Tabla 7 Composición de los residuos como (%) del total,

analizados por Econet durante el ensayo de 300 horas											
Muestra:	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	promedio	Desviación estándar
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Envases de plástico	5,1	6,7	8,0	4,9	6,2	2,5	6,2	7,5	6,4	5,9	1,64
Lámina de plástico	10,8	8,6	10,7	7,9	10,1	7,8	8,8	8,5	9,5	9,2	1,13
Otros plásticos	0,7	0,8	0,5	0,7	1,0	0,7	1,6	0,4	0,9	0,8	0,33
Metal	2,5	3,6	2,7	2,0	2,5	2,1	3,6	2,1	3,6	2,7	0,68
Vidrio	0,2	0,0	0,5	0,6	0,6	0,0	0,6	0,4	0,0	0,3	0,27
Residuos de jardinería	0,7	3,5	1,9	1,8	0,9	2,7	0,6	4,5	2,8	2,1	1,33
WEEE (baterías, etc.)	0,7	0,1	0,6	0,4	0,7	0,8	1,1	0,1	0,5	0,6	0,33
Papel	14,8	8,3	13,3	8,8	10,5	5,6	10,2	12,6	12,4	10,7	2,86
Envases de plástico y de cartón	10,4	21,4	11,9	8,6	11,0	6,7	10,7	11,8	13,9	11,8	4,13
Residuos alimenticios	19,8	15,6	25,9	27,6	26,3	24,5	24,5	23,3	18,0	22,8	4,09
Pañales	8,0	10,3	6,9	18,8	8,1	25,1	15,2	10,1	14,0	12,9	6,00
Papel sucio	8,5	6,7	7,3	7,4	8,5	8,6	7,9	5,7	6,3	7,4	1,03
Papeles finos	9,7	2,5	4,2	2,1	4,5	4,7	2,7	7,0	4,9	4,7	2,40
Otros combustibles	2,0	0,9	0,8	1,2	1,8	0,7	0,7	2,2	0,8	1,2	0,61
Otros no combustibles	6,2	11,1	5,0	7,3	7,2	7,6	5,6	3,7	6,2	6,7	2,07
suma	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100,0	

La composición de los residuos varía de vez en cuando, en la tabla 7 se presenta el resultado del análisis de diferentes muestras recogidas durante 300 horas. La mayor variación se ve en las partes de pañales, envases de plástico y de cartón y residuos alimenticios que son todas las partes que afectan al contenido de material orgánico que se puede capturar.

Durante todo el trascurso del "ensayo de 300 horas", el promedio de material biodegradable capturado expresado como kg de SV por kg de RSM procesado fue de 0,156 kg de SV/kg de RSM de entrada.

Las muestras representativas de lodo biodegradable se tomaron en diversos puntos temporales durante el trascurso del experimento, cuando la planta estaba en un período de funcionamiento estable. Las muestras se analizaron mediante HPLC y para determinar los sólidos volátiles, los sólidos totales y los sólidos disueltos tal como se describe en el ejemplo 7. Los resultados se muestran en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8. Análisis de muestras de biolíquido.

Tiempo	Sólidos totales	SV	SV disueltos	Ácido fórmico	Lactato	Acetato	Propionato	Etanol	Glicerol
horas	%	%	%	%	%	%	%	%	%
212	10,45	8,36	5,95	0,00	5,36	0,46	0,03	0,46	0,82
239	10,91	8,64	5,85	0,00	6,08	0,33	0,00	0,33	0,77
264,5	11,35	8,82	6,25	0,00	4,97	0,49	0,00	0,49	1,06
294	10,66	8,48	5,60	0,08	3,37	0,39	0,00	0,39	0,55

Ejemplo 10. Identificación de microorganismos que contribuyen a la fermentación concurrente en el ejemplo 9.

Nota: En este ejemplo, las muestras de material analizado para la identificación de microorganismos se congelaron sin glicerol. Los resultados obtenidos son inconsistentes con los altos niveles de lactato observados y con todos los otros resultados obtenidos en todos los otros ensayos en los que las muestras se congelaron con glicerol agregado y no se cree que sean precisos.

Se extrajo una muestra de lodo biodegradable "EC12B" durante el ensayo descrito en el ejemplo 9 el 15 y el 16 de diciembre de 2012 y se almacenó a -20 °C con el fin de realizar el análisis de ADNr 16S para identificar los microorganismos en la muestra. El análisis de ADNr 16S se usa ampliamente para la identificación y el análisis filogenético de procariotas basado en el componente 16S de la subunidad ribosómica pequeña. Las muestras congeladas se enviaron en hielo seco a GATC Biotech AB, Solna, SE, en donde se realizó el análisis de ADNr 16S (GATC_Biotech). El análisis comprendió: la extracción de ADN genómico, la preparación de la biblioteca de amplicones usando el par de cebadores de cebadores universales que abarca las regiones hipervariables V1 a V3 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG / 534R: ATTACCGCGGCTGCTGG; 507 pb de longitud), el marcaje de PCR con adaptadores GS FLX, la secuenciación en un instrumento Genome Sequencer FLX para obtener un número de 104.000-160.000 lecturas por muestra. Las secuencias resultantes se consultaron después en un BlastN frente a la base de datos de ADNr del Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009). La base de datos contiene secuencias de buena calidad con al menos 1200 pb de longitud y una asociación taxonómica del NCBI. La versión actual (RDP versión 10, actualizada el 19 de septiembre de 2012) contiene secuencias de 9.162 bacterias y de 375 arqueas. Los resultados de BLAST se filtraron para eliminar los accesos cortos y de baja calidad (identidad de secuencia ≥ 90 %, cobertura de alineación ≥ 90 %).

Se identificaron un total de 226 bacterias diferentes.

La bacteria predominante en la muestra de EC12B fue *Paludibacter propionigenes* WB4, una bacteria productora de propionato (Ueki et al. 2006), que comprendió el 13 % de las bacterias totales identificadas. La distribución de las 13 bacterias predominantes identificadas (*Paludibacter propionigenes* WB4, *Proteiniphilum acetatigenes*, *Actinomyces europaeus*, *Levilinea saccharolytica*, *Cryptanaerobacter phenolicus*, *Sedimentibacter hydroxybenzoicus*, *Clostridium phytofermentans* ISDg, *Petrimonas sulfuriphila*, *Clostridium lactatifermentans*, *Clostridium caenicola*, *Garciella nitratireducens*, *Dehalobacter restrictus* DSM 9455, *Marinobacter lutaoensis*) se muestra en la Figura 11.

La comparación a nivel de género de las bacterias identificadas demostró que *Clostridium*, *Paludibacter*, *Proteiniphilum*, *Actinomyces* y *Levilinea* (todas anaerobias) representaban aproximadamente la mitad de los géneros identificados. El género *Lactobacillus* comprendía el 2 % de las bacterias identificadas. La especie bacteriana predominante, *P. propionigenes* WB4 pertenece al segundo de los géneros más predominantes (*Paludibacter*) en la muestra de EC12B.

La bacteria patógena predominante en la muestra de EC12B fue *Streptococcus spp.*, que comprendió el 0,028 % de las bacterias totales identificadas. No se halló ninguna bacteria patógena formadora de esporas en el biolíquido.

Streptococcus spp. fue la única bacteria patógena presente en el biolíquido en el ejemplo 9. *Streptococcus spp.* es la bacteria con la mayor tolerancia a las temperaturas (de las no formadoras de esporas) y el D-valor, que indica la cantidad de tiempo necesaria a una temperatura dada para reducir diez veces la cantidad de células vivas de *Streptococcus spp.*, es mayor que cualquiera de las otras bacterias patógenas documentadas por Déportes et al. (1998) en los RSM. Estos resultados muestran que las condiciones aplicadas en el ejemplo 9 son capaces de desinfectar los RSM durante la clasificación en el proceso de RENescience hasta un nivel al que solo está presente *Streptococcus spp.*

La competición entre organismos por los nutrientes y el aumento en la temperatura durante el proceso reducirá el número de organismos patógenos de manera significativa y, tal como se muestra anteriormente, eliminará la presencia de patógenos en RSM clasificados en el proceso de RENescience. Otros factores como pH, a_w , tolerancia al oxígeno, CO₂, NaCl y NaNO₂ también influyen en el crecimiento de bacterias patógenas en el biolíquido. La interacción entre los factores mencionados anteriormente, podría reducir el tiempo y la temperatura necesarios para reducir la cantidad de células vivas durante el proceso.

Ejemplo 11. Análisis detallado de captura de orgánicos usando fermentación microbiana e hidrólisis enzimática concurrentes usando preparaciones de enzimas aisladas de RSM no clasificados obtenidos de diferentes localizaciones geográficas.

(Ejemplo comparativo)

La planta de demostración RENescience descrita en el ejemplo 7 se usó para procesar RSM importados de los Países Bajos. Se descubrió que los RSM tenían la siguiente composición:

Tabla Y. Composición total de los residuos (5), analizada por Econet durante el ensayo de van Gansewinkel,

	%
Envases de plástico	5
Lámina de plástico	7
Otros plásticos	2
Metal	4
Vidrio	4
Residuos de jardinería	4
WEEE (baterías, etc)	1
Papel	12
Cartón	12
Pañales	4
Papel sucio	2
Otros combustibles	15
Otros no combustibles	5
Residuos alimenticios	13
Papeles finos	9
Total	100

El material se sometió a hidrólisis enzimática y a fermentación microbiana concurrentes tal como se describe en el ejemplo 7 y 9 y se ensayó el funcionamiento de 3 días en una planta. Se obtuvieron y caracterizaron muestras de lodo biodegradable obtenidas en diversos puntos temporales. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Los porcentajes dados son el porcentaje de peso total.

Tabla 9. Análisis de biolíquido.

Tiempo	Sólidos totales	SV	SV disueltos	Lactato	Ácido fórmico	Acetato	Propionato	Etanol	Glicerol
horas	%	%	%	%	%	%	%	%	%
76	7,96	6,08	3,07	4.132	0,08	0.189	0	0.298	0,4205
95	9,19	6,99	6,66	6.943	0	0.352	0.034	0.069	0,6465

Los SV disueltos se han corregido con el 9 % de acuerdo con la pérdida de lactato durante el secado.

Ejemplo 12. Producción de biometano usando biolíquido obtenido de la fermentación microbiana y la hidrólisis enzimática concurrentes de RSM no clasificados usando preparaciones de enzimas aisladas.

5 (Ejemplo comparativo)

El lodo biodegradable obtenido en el experimento descrito en el ejemplo 9 se congeló en cubos de 20 litros y se almacenó a -18 °C para su uso posterior. En este material se ensayó la producción de biometano usando dos sistemas idénticos de digestión anaeróbica de filtro fijo bien preparados que comprenden un consorcio de digestión anaeróbica dentro de una biopelícula inmovilizada en el soporte del filtro.

Se tomaron muestras iniciales tanto para la entrada como para el líquido de dentro del reactor. Las concentraciones de AGV, tCOD y sCOD y amoníaco usando ensayos de cubeta HACH LANGE con un Espectrofotómetro DR 2800 y se determinaron diariamente los AGV de forma detallada mediante HPLC. Las mediciones de ST VS también se determinan mediante el método gravimétrico.

Las muestras de gas para el análisis de CG se toman a diario. La verificación de la tasa de entrada se realiza midiendo el volumen de espacio vacío en el depósito de alimentación y también la cantidad de efluente que sale del reactor. El muestreo durante el proceso se realizó cogiendo líquido o efluente con una jeringa.

Se observó la producción estable de biogás usando ambos sistemas de digestión durante un período de 10 semanas, que se corresponde a entre 0,27 y 0,32 l/g de CO₂.

La entrada del lodo se interrumpió en uno de los dos sistemas y se supervisó la vuelta a las condiciones de partida, tal como se muestra en la Figura 13. El nivel de producción de gas estable se muestra mediante la línea horizontal indicada como 2. El punto temporal al cual la entrada fue discontinua se muestra como las líneas verticales indicadas como 3. Tal como se muestra, tras meses de funcionamiento constante, quedaba un material resiliente residual que se convirtió durante el período indicado entre las líneas verticales indicadas como 3 y 4. La vuelta a las condiciones de partida o "descenso" se muestra en el período que sigue la línea vertical indicada como 4. Tras un período de condiciones iniciales, se inicia de nuevo la entrada en el punto indicado mediante la línea vertical indicada como 1. El aumento a la producción de gas en estado estacionario o "ascenso" se muestra en el período siguiente a la línea vertical indicada como 1.

Los parámetros de producción de gas a partir del biolíquido, incluyendo el "ascenso" y el "descenso" medidos tal como se describe se muestran a continuación.

Parámetro	Unidad	Nombre de la muestra de los residuos de Amager de 300 horas
Velocidad de entrada	l/día	1,85
Entrada total	Litro	3,7
Tiempo de ascenso *	Horas	15
Tiempo de descenso **	Horas	4
Tiempo de quemado***	Días	4
Producción de gas en fase estable ****	l/día	122
Gas total producido	l	244
% de CH ₄	%	60
Producción total	Lgas/lenrada	66
Gas de orgánicos fácilmente convertibles	%	53

Parámetro	Unidad	Nombre de la muestra de los residuos de Amager de 300 horas
COD de entrada	g/l	124
Entrada total de COD	g	459
producción de COD	l de gas/g de COD	0,53
producción específica de COD	l de CH ₄ /g de COD	0,32
COD explicado por el balance de masa	% de COD de entrada	96
COD a gas	g	418
COD a gas	%	91

*El tiempo de ascenso es el tiempo desde la primera entrada hasta que la producción de gas se aprovecha para aumentar y estabilizarse. El tiempo de ascenso indica el nivel de orgánicos fácilmente convertibles en la entrada.

**El tiempo de descenso es el tiempo transcurrido desde la última entrada hasta que la producción de gas se desploma y cae abruptamente. El tiempo de descenso muestra la producción de gas a partir de orgánicos fácilmente convertibles.

***El quemado es el tiempo tras el tiempo de descenso hasta que la producción de gas vuelve totalmente al nivel inicial. El tiempo de quemado muestra la producción de gas a partir de orgánicos de conversión lenta.

****Corregido para la producción de gas de fondo de 2 l/día.

Ejemplo 13. Comparación de producción de biometano usando lodo biodegradable obtenido a partir de la hidrólisis enzimática de RSM no clasificados usando preparaciones de enzimas aisladas con y sin fermentación microbiana concurrente.

5 Los lodos biodegradables "alto en lactato" y "bajo en lactato" obtenidos en el ejemplo 6 se compararon en cuanto a producción de biometano usando el sistema de digestión anaeróbica de filtro fijo descrito en el ejemplo 8. Se obtuvieron las medidas y se determinaron los tiempos de "ascenso" y de "descenso" tal como se describe en el ejemplo 11.

10 La Figura 14 muestra la caracterización del "ascenso" y del "descenso" del biolíquido "alto en lactato". El nivel de producción de gas estable se muestra mediante la línea horizontal indicada como 2. El punto temporal al cual se inició la entrada se muestra como las líneas verticales indicadas como 1. El aumento a la producción de gas en estado estacionario o "ascenso" se muestra en el período siguiente a la línea vertical indicada como 1. El punto temporal al cual la entrada fue discontinua se muestra como la línea vertical indicada como 3. La vuelta a las condiciones de partida o "descenso" se muestra en el período que sigue la línea vertical indicada como 3 al período en la línea vertical indicada como 4.

20 La Figura 15 muestra la misma caracterización del biolíquido "bajo en lactato", con los puntos relevantes indicados tal como se describe para la Figura 14.

Los parámetros comparativos de la producción de gas de biolíquido "alto en lactato" y "bajo en lactato", incluyendo el "ascenso" y el "descenso" medidos tal como se describe se muestran a continuación.

25 La diferencia en los tiempos de "ascenso"/"descenso" muestran diferencias en la facilidad de biodegradación. Las biomásas bioconvertibles más rápidas finalmente tendrán la mayor tasa de conversión orgánica total en una aplicación de producción de biogás. Además, los sustratos de biometano "más rápidos" son más idóneos para la conversión mediante sistemas de digestión anaeróbica muy rápidos, tales como los digestores de filtro fijado.

30 Tal como se muestra, el biolíquido "alto en lactato" presenta un tiempo de "ascenso" y de "descenso" mucho más rápido en la producción de biometano.

Parámetro	Unidad	Nombre de la muestra	
		Residuos de Holstebro altos en lactato	Residuos de Holstebro bajos en lactato
Velocidad de entrada	l/día	1,0	1,0
Entrada total	Litro	2,83	3,95
Tiempo de ascenso *	Horas	16	48
Tiempo de descenso **	Horas	6	14

Parámetro	Unidad	Nombre de la muestra	
		Residuos de Holstebro altos en lactato	Residuos de Holstebro bajos en lactato
Tiempo de quemado***	Días	2	2
Producción de gas en fase estable ****	l/día	59	40
Gas total producido	l	115	140
% de CH ₄	%	60	60
Producción total	Lgas/lentrada	41	35
Gas de orgánicos fácilmente convertibles	%	86	82
COD de entrada	g/l	106	90
Entrada total de COD	g	300	356
producción de COD	l de gas/g de COD	0,38	0,39
producción específica de COD	l de CH ₄ /g de COD	0,23	0,24
COD explicado por el balance de masa	% de COD de entrada	91	95
COD a gas	g	197	240
		Residuos de Holstebro altos en lactato	Residuos de Holstebro bajos en lactato
COD a gas	%	66	68

*El tiempo de ascenso es el tiempo desde la primera entrada hasta que la producción de gas se aprovecha para aumentar y estabilizarse. El tiempo de ascenso indica el nivel de orgánicos fácilmente convertibles en la entrada.

**El tiempo de descenso es el tiempo transcurrido desde la última entrada hasta que la producción de gas se desploma y cae abruptamente. El tiempo de descenso muestra la producción de gas a partir de orgánicos fácilmente convertibles.

***El quemado es el tiempo tras el tiempo de descenso hasta que la producción de gas vuelve totalmente al nivel inicial. El tiempo de quemado muestra la producción de gas a partir de orgánicos de conversión lenta.

****Corregido para la producción de gas de fondo de 2 l/día.

Ejemplo 14. Producción de biometano usando lodo biodegradable obtenido de la fermentación microbiana y la hidrólisis enzimática concurrentes de paja de trigo pretratada de forma hidrotermal usando preparaciones de enzimas aisladas.

5 (Ejemplo comparativo)

10 La paja de trigo se pretrató (parámetros), se separó en una parte de fibra y una parte líquida, y después se lavó la parte de fibra por separado. Después se incubaron 5 kg de fibra lavada en un reactor de tambor giratorio horizontal con dosis de Cellic CTEC3 con un inóculo de microorganismos fermentadores que consiste en el lodo biodegradable obtenido del ejemplo 7. La paja de trigo se sometió a hidrólisis y fermentación microbiana simultáneas durante 3 días a 50 grados. Después se ensayó el biolíquido para la producción de biometano usando el sistema de digestión anaeróbica de filtro fijado descrito en el ejemplo 11. Se obtuvieron las medidas para el tiempo de "ascenso" tal como se describe en el ejemplo 11.

15 La Figura 16 muestra la caracterización del "ascenso" del biolíquido de paja de trigo hidrolizada. El nivel de producción de gas estable se muestra mediante la línea horizontal indicada como 2. El punto temporal al cual se inició la entrada se muestra como las líneas verticales indicadas como 1. El aumento a la producción de gas en estado estacionario o "ascenso" se muestra en el período siguiente a la línea vertical indicada como 1.

20 Los parámetros de la producción de gas a partir del biolíquido de hidrolizado de paja de trigo se muestran a continuación.

25 Tal como se muestra, la biomasa lignocelulósica pretratada también se puede usar fácilmente para realizar métodos de producción de biogás y para producir nuevos sustratos de biometano de la invención.

Parámetro	Unidad	Nombre de la muestra de hidrolizado de trigo + biolíquido
Velocidad de entrada	l/día	1
Entrada total	Litro	1,2
Tiempo de ascenso *	Horas	29
Tiempo de descenso **	Horas	NP
Tiempo de quemado***	Días	NP
Producción de gas en fase estable ****	l/día	56
Gas total producido	l	NP
% de CH ₄	%	60
Producción total	Lgas/entrada	NP
Gas de orgánicos fácilmente convertibles	%	NP
COD de entrada	g/l	144
Entrada total de COD	g	173
producción de COD	l de gas/g de COD	NP
producción específica de COD	l de CH ₄ /g de COD	NP
COD explicado por el balance de masa	% de COD de entrada	NP
COD a gas	g	NP
COD a gas	%	NP

*El tiempo de ascenso es el tiempo desde la primera entrada hasta que la producción de gas se aprovecha para aumentar y estabilizarse. El tiempo de ascenso indica el nivel de orgánicos fácilmente convertibles en la entrada.

**El tiempo de descenso es el tiempo transcurrido desde la última entrada hasta que la producción de gas se desploma y cae abruptamente. El tiempo de descenso muestra la producción de gas a partir de orgánicos fácilmente convertibles.

***El quemado es el tiempo tras el tiempo de descenso hasta que la producción de gas vuelve totalmente al nivel inicial. El tiempo de quemado muestra la producción de gas a partir de orgánicos de conversión lenta.

****Corregido para la producción de gas de fondo de 2 l/día.

Ejemplo 15. Fermentación microbiana e hidrólisis enzimática concurrentes de RSM usando organismos seleccionados.

- 5 Las reacciones de hidrólisis microbiana y enzimática concurrentes usando bacterias de monocultivo específicas se llevaron a cabo a escala de laboratorio usando los RSM modelo (descritos en el ejemplo 5) y el procedimiento descrito siguiendo el procedimiento del ejemplo 5. Las condiciones de la reacción y la dosificación de la enzima se especifican en la Tabla 10.
- 10 Las cepas bacterianas vivas de *Lactobaccillus amylophilus* (DSMZ N.º 20533) y *propionibacterium acidipropionici* (DSMZ N.º 20272) (DSMZ, Braunschweig, Alemania) (almacenadas a 4 °C durante 16 horas hasta su uso) se usaron como inóculo para determinar el efecto de estas sobre la conversión de materia seca en RSM modelo con o sin adición de CTec3. Los principales metabolitos producidos por éstas son ácido láctico y ácido propiónico, respectivamente. La concentración de estos metabolitos se detectó usando el procedimiento de HPLC (descrito en el ejemplo 5).

Dado que *propionibacterium acidipropionici* es un anaerobio, el tampón aplicado en las reacciones en las que se aplica esta cepa, se purgó usando nitrógeno gaseoso y el cultivo vivo se inoculó a los tubos de reacción dentro de una cámara anaeróbica móvil (Atmos Bag, Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.) también se purgó con nitrógeno gaseoso. Los tubos de reacción con *P. propionici* estuvieron cerrados antes de transferirlos al incubador. Las reacciones se inocularon con 1 ml de *P. propionici* o bien de *L. amylophilus*.

Los resultados presentados en la tabla 10 muestran claramente que se produjeron los metabolitos esperados; el ácido propiónico se detectó en las reacciones inoculadas con *p. acidipropionic*, mientras que no se detectó ácido propiónico en el control que contiene RSM modelo con o sin CTec3. La concentración de ácido láctico en la reacción de control añadida solo del modelo de RSM fue casi la misma que en las reacciones con *L. amylophilus* solo

añadida. La producción de ácido láctico en esta reacción de control se atribuye a las bacterias autóctonas del modelo de RSM. Se esperaban algunas bacterias de fondo, dado que los componentes individuales del residuo eran de producción reciente, congelados, pero no se habían esterilizado de ningún modo antes de la preparación de los RSM. Cuando se añadió *L. amylophilus* de manera concurrente con CTec3, la concentración de ácido láctico casi de duplica (Tabla 10).

El efecto positivo sobre la liberación de MS al sobrenadante tras la hidrólisis se demostró como una mayor conversión de MS en las reacciones con adición de *L. amylophilus* o *P. propionici* junto con CTec3 (aumento del 30-33 % en comparación con las reacciones solo con CTec3 añadido) (datos comparativos). Tabla 10. Cultivos bacterianos ensayados a escala de laboratorio solos o de manera concurrente con hidrólisis enzimática. Se muestra la temperatura, el pH y la dosificación de CTec3 de 96 mg/g. Las reacciones de control con RSM en tampón con o sin CTec3 se realizaron en paralelo para evaluar el fondo de los metabolitos bacterianos en la reacción. (Se muestra el promedio y la desviación estándar de 4 reacciones excepto para los RSM de control que se hicieron de forma individual).

Nd. No detectado, por debajo del límite de detección.

Temperatura	pH	Organismo	CTec3	Conversión de MS	Ácido propiónico (g/l)	Ácido láctico (g/l)
30 °C	7	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	96 mg/g de MS	17,0±1,0 40,8±2,2	6,2±1,8 3,7±0,09	
		RSM de control	96 mg/g de MS	21 30,6	Nd. Nd.	
	6,2	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	96 mg/g de MS	19,7±2,2 41,7±6,5		8,4±0,8 21,2±0,7
		RSM de control	96 mg/g de MS	21 32		10,3 16,9

Ejemplo 16. Identificación de microorganismos que contribuyen a la fermentación concurrente en el ejemplo 11.

Se tomaron muestras del biolíquido "EC12B" y del agua recirculada "EA02" durante el ensayo descrito en el ejemplo 11 (el muestreo se hizo el 21 y el 22 de marzo). Las muestras de líquido se congelaron en glicerol al 10% y se almacenaron a -20 °C con el fin de realizar el análisis de ADNr 16S para identificar los microorganismos que se usa ampliamente para la identificación y el análisis filogenético de los procariotas basado en el componente 16S de la subunidad ribosómica pequeña. Las muestras congeladas se enviaron en hielo seco a GATC Biotech AB, Solna, SE, en donde se realizó el análisis de ADNr 16S (GATC_Biotech). El análisis comprendió:

la extracción de ADN genómico, la preparación de la biblioteca de amplicones usando el par de cebadores de cebadores universales que abarca las regiones hipervariables V1 a V3 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG / 534R: ATTACCGCGGCTGCTGG; 507 pb de longitud), el marcaje de PCR con adaptadores GS FLX, la secuenciación en un instrumento Genome Sequencer FLX para obtener un número de 104.000-160.000 lecturas por muestra. Las secuencias resultantes se consultaron después en un BlastN frente a la base de datos de ADNr del Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009). La base de datos contiene secuencias de buena calidad con al menos 1200 pb de longitud y una asociación taxonómica del NCBI. La versión actual (RDP versión 10, actualizada el 19 de septiembre de 2012) contiene secuencias de 9.162 bacterias y de 375 arqueas. Los resultados de BLAST se filtraron para eliminar los accesos cortos y de baja calidad (identidad de secuencia ≥ 90 %, cobertura de alineación ≥ 90 %).

En las muestras EC12B-21/3, EC12B-22/3 y EA02B 21/3, EA02-22/3 se identificaron un total de 452, 310, 785, 594 bacterias diferentes.

El análisis mostró claramente, a nivel de especie, que *Lactobacillus amylolyticus* era de lejos la bacteria más dominante, representando del 26 % al 48 % de toda la microbiota detectada. La microbiota en las muestras de EC12B fue similar; la distribución de las 13 bacterias predominantes (*Lactobacillus amylolyticus* DSM 11664, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*, *Lactobacillus similis* JCM 2765, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* DSM 20072, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus hamsteri*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus buchneri*) era prácticamente la misma comparando las dos fechas de muestreo diferentes.

Las muestras de EA02 fueron similares a EC12B aunque *L. amylolyticus* era menos dominante. La distribución de las 13 bacterias predominantes (*Lactobacillus amylolyticus* DSM 11664, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* DSM 20072, *Lactobacillus similis* JCM 2765,

Lactobacillus delbrueckii subsp. *indicus*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Weissella ghanensis*, *Lactobacillus oligofermentans* LMG 22743, *Weissella beninensis*, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811, *Weissella soli*, *Lactobacillus paraplantarum*) también fue similar, con la excepción de la presencia de, con la excepción de la existencia de *Pseudomonas extremaustralis* 14-3 en las 13 especies bacterianas predominantes. Esta *Pseudomonas* encontrada en EA02 (21/3) se ha aislado previamente de un estanque temporal en la Antártida y debería ser capaz de producir polihidroxialcanoato (PHA) tanto a partir de octanoato como de glucosa (Lopez et al., 2009; Tribelli et al., 2012).

La comparación de los resultados a nivel de género mostró que *Lactobacillus* comprendía el 56-94 % de las bacterias identificadas en las muestras. De nuevo, la distribución a lo largo de los géneros es extremadamente similar entre las dos fechas de muestreo de EC12B y EA02. Curiosamente, en las muestras de EA02, los géneros *Weissella*, *Leuconostoc* y *Pseudomonas* están presentes en gran medida (1,7-22 %) aunque estos solo se encuentran como constituyentes menores de la muestra de EC12B (>0,1 %). Tanto *Weissella* como *Leuconostoc* pertenecen al orden de lactobacillales, el mismo de *Lactobacillus*.

Las bacterias patógenas predominantes en las muestras de EC12B y EA02 tomadas durante el ensayo descrito en el ejemplo 11 comprendían el 0,281-0,539 % y el 0,522-0,592 %, respectivamente, del total de bacterias identificadas. Las bacterias patógenas predominantes en las muestras de EC12B fueron *Aeromonas spp.*, *Bacillus cereus*, *Brucella sp.*, *Citrobacter spp.*, *Clostridium perfringens*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Providencia sp.*, *Salmonella spp.*, *Serratia sp.*, *Shigellae spp.* y *Staphylococcus aureus* (véase la Figura 3). No se identificaron bacterias patógenas formadoras de esporas en las EC12B y EA02 descritas en el ejemplo 11. La cantidad total de bacterias patógenas identificadas tanto en EC12B como en EA02 se redujo durante el tiempo, casi disminuyendo la cantidad de bacterias totales en EC12B en un día.

En Déportes et al. (1998) se hizo una descripción general de los patógenos que se sabe que están presentes en los RSM. Los patógenos presentes en los RSM descritos en los ejemplos 7, 9 y 11 se muestran en la Tabla 11 (Déportes et al. (1998) y análisis de ADNr 16S). Además de los patógenos descritos por Déportes et al. (1998), también se encontró *Proteus sp.* y *Providencia sp.* en las muestras de EC12B y EA02 tomadas durante el ensayo descrito en el ejemplo 11. Aunque *Streptococcus spp.* fue la única bacteria patógena presente en el biolíquido en el ejemplo 9, en este caso no estaba presente. Esto indica que está presente otra comunidad bacteriana en EC12B y EA02 en el ejemplo 11, que puede deberse a la competencia entre los organismos por los nutrientes y a un ligero descenso en las temperaturas durante el proceso que favorecerá el crecimiento de otra comunidad bacteriana.

Tabla 12. Descripción general de los patógenos presentes en los ejemplos 7, 9 y 11

Organismo	Óptimo	Max (crecimiento)	Temperatura Bactericida	Tiempo req. [min]	D-valor [min]	Min	Max	Min	Max	Nivel de bioseguridad	Origen Hallado en RSM	Ref sobre condiciones de cultivo
<i>Aeromonas sp.</i>	37	55	55	0,25				0,94	1-2		(Déportes et al. 1998)	Roufand Rigney 1971, Spinks et al 2006, Santos et al 1994
<i>Bacillus cereus</i>	37	50	95	10		4,8	9,3	0,951	2		(Déportes et al. 1998)	Lanciotti et al 2001
<i>Brucella sp.</i>									3		(Déportes et al. 1998)	
<i>Citrobacter sp.</i>		52,5	7		4,5			0,94	1-2		(Déportes et al. 1998)	Verrips y Kwaps 1977, Smith y Bhagwat 2013, Colavita et al 2003
<i>Clostridium perfringens</i>	37	50	61	23		5	8,5	0,95	2		(Déportes et al. 1998)	Jay, J.M. 1991
<i>Klebsiella sp.</i>		55		0,5	<3				1-2		(Déportes et al. 1998)	
<i>Salmonella sp.</i>	37	45	55	2,5		3,7	9,5	0,94	2-3		(Déportes et al. 1998)	Jay, J.M. 1991, Spinks et al 2006
<i>Serratia sp.</i>		55		1,5					2		(Déportes et al. 1998)	Spinks et al 2006
<i>Shigellae spp.</i>	37	48	60	1		5	8		2-3		(Déportes et al. 1998)	Spinks et al 2006
<i>Staphylococcus aureus</i>		47,8				4	9	0,86	2		(Déportes et al. 1998)	Jay, J.M 1991

Organismo Bacterias	Óptimo	Máx (creciment o)	Temperatura Bactericida	Tiempo req. [min]	D-valor [min]	intervalo de pH		aw Min	Nivel de bioseguridad	Origen Hallado en RSM	Ref sobre condiciones de cultivo
						Min	Máx				
<i>Streptococcus spp</i>		65		20					2	(Déportes et al. 1998)	Frands, A.E. 1959

Identificación de cepas y depósitos de DSMZ

Las muestras de EA02 del 21 y del 22 de marzo extraídas del ensayo descrito en el ejemplo 7, se enviaron para cultivo en placa al Novo Nordic Centre for Biosustainability (NN Center) (Hoersholm, Dinamarca) con el fin de identificar y obtener monocultivos de bacterias aisladas. Tras la llegada al NN center, las muestras se incubaron toda la noche a 50 °C, después se colocaron en diferentes placas (GM17, caldo de soja tríptico y extracto de ternera (agar GM17: 48,25 g/l de agar m17, tras 20 minutos de autoclave, se añadió glucosa hasta una concentración final al 0,5 %, Agar de soja tríptico: 30 g/l de caldo de soja tríptico, 15 g/l de agar, caldo de ternera (Statens Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca) se añadieron 15 g/l de agarosa y se cultivó de forma aeróbica a 50 °C. Tras un día, las placas se inspeccionaron visualmente y se seleccionaron colonias que se recultivaron en estrías sobre las placas correspondientes y se enviaron a DSMZ para la identificación.

Las siguientes cepas aisladas del agua recirculada de EA02 se han puesto en el depósito de patentes en DMSZ, DSMZ, Braunschweig, Alemania:

Muestras identificadas

ID de la muestra: 13-349 (*Bacillus safensis*) originario de (EA02-21/3), DSM 27312
 ID de la muestra: 13-352 (*Brevibacillus brevis*) originario de (EA02-22/3), DSM 27314
 ID de la muestra: 13-353 (*Bacillus subtilis* sp. *subtilis*) originario de (EA02-22/3), DSM 27315
 ID de la muestra: 13-355 (*Bacillus licheniformis*) originario de (EA02-21/3), DSM 27316
 ID de la muestra: 13-357 (*Actinomyces bovis*) originario de (EA02-22/3), DSM 27317

Muestras no identificadas

ID de la muestra: 13-351 originario de (EA02-22/3), DSM 27313
 ID de la muestra: 13-362A originario de (EA02-22/3), DSM 27318
 ID de la muestra: 13-365 originario de (EA02-22/3), DSM 27319
 ID de la muestra: 13-367 originario de (EA02-22/3), DSM 27320

Bibliografía:

Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., & Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 37 (suppl 1), (D141-D145). GATC_Biotech supporting material. Defining the Microbial Composition of Environmental Samples Using Next Generation Sequencing. Version 1.
 Tribelli, P. M., Iustman, L. J. R., Catone, M. V., Di Martino, C., Reyale, S., Méndez, B. S., López, N. I. (2012). Genome Sequence of the Polyhydroxybutyrate Producer *Pseudomonas extremaustralis*, a Highly Stress-Resistant Antarctic Bacterium. *J. Bacteriol.* 194(9):2381.
 Nancy I. López, N. I., Pettinari, J. M., Stackebrandt, E., Paula M. Tribelli, P. M., Potter, M., Steinbüchel, A., Méndez, B. S. (2009). *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) Producer Isolated from an Antarctic Environment. *Cur. Microbiol.* 59(5):514-519.

Lista de referencias

Abe and Takagi (1990), "Simultaneous Saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid", *Biotechnology and Bioscience* 37:93-96
 Angelidaki, I. et al. (2006), "Enhanced biogas recovery by applying post-digestion in large-scale centralized biogas plants," *Water Science & Technology* 54(2):237-244
 Akao et al. (2007a) "Effects of PH and temperature on products and bacterial community in l-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition" *Water Research* 41:2636-2642
 Akao et al. (2007b) "Semi-continuous l-lactate fermentation of garbage without sterile condition and analysis of the microbial structure", *Water research* 41:1774-1780
 Arriaga, S., et al. (2011), "Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter," *International Journal of Hydrogen Energy* 36:3442.
 Asha et al. (2012), "Purification and Characterization of a thermophilic cellulose from a novel cellulolytic strain *Paenibacillus barcinonensis*", *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(11):1501-1509
 Ballesteros, M. et al. (2010), "Ethanol production from the organic fraction obtained after thermal pretreatment of Municipal Solid Waste," *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161:423-431

- Bandounas L et al (2011), "Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential", MNC Biotechnology, 11:94
- 5 Bendixen, H. (1994), "Safeguards against pathogens in Danish biogas plants," Water Science and Technology 30(12): 171
- Bilanin, M., et al. (1997), "Influence of fermented cereal and lactic acid and lactic acid bacteria concentrate on sewage sludge digestion," Environmental Technology 18:1061.
- 10 Blume et al. (2013), "Characterization of clostridium thermocellum isolates grown on cellulose and sugarcane bagasse", Bioenerg. Res. 6:763-775
- Bugg T et al (2011) "The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation", Current Opinion in Biotechnology, 22:394-400
- 15 Carrington, E. et al. (1998), "Review of the scientific evidence relating to the controls on the agricultural use of sewage sludge. Part - 1 The evidence underlying the 1989 Department of the Environment Code of Practice for agricultural use of sludge and the Sludge (Use in Agriculture) Regulations, Report DETR 4415/3. Part 2 - Evidence since 1989 relevant to controls on the agricultural use of sewage sludge, Report No. DETR 4454/4. WRC report to the Department of the Environment, Transport and the Regions, Department of Health, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food and UK Water Industry Research Limited. ISBN 1 898920 37 0. WRC Publications, Swindon. *NOTA falta el texto completo*
- 20 Chaganti, S., et al. (2012), "Impact of oleic acid on the fermentation of glucose and xylose mixtures to hydrogen and other byproducts," Renewable Energy 42:60.
- 25 Chandra R. et al (2011) "Bacterial decolorization of black liquor in axenic and mixed condition and characterization of metabolites", Biodegradation 22:603-611
- 30 Chandra, R., et al. (2012), "Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production," Renewable and Sustainable Energy Reviews 16:1462-1476.
- Chen Y.H., Chai L.Y. (2011), "Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain *Comamonas* sp. B-) isolated from eroded bamboo slips", Journal of applied Microbiology 1364-5072
- 35 Chen and Lee (1997) "Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass", Applied Biochemistry and biotechnology 63-65:435-448
- Consonni, S., et al. (2005) "Alternative strategies for energy recovery from municipal solid waste - Part A: Mass and energy balances," Waste Management 25:123
- 40 Cysneiros, D. et al. (2011) "Temperature effects on the trophic stages of perennial rye grass anaerobic digestion," Water Science & Technology 64(1):70-76
- 45 Dahlen, L. et al. (2007). Comparison of different collection systems for sorted household waste in Sweden. Waste Management. 27, 1298-1305.
- Davis et al. (2012), "Genome Sequence of *amycolatopsis* sp. strain ATCC 39116, a plant biomass-degrading actinomycete", Journal of Bacteriology 194(9):2396-2397
- 50 Del Borghi et al. (1999), "Hydrolysis and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid waste," Bioprocess Engineering 20:553-560
- Delgenes, J. et al. (2000), "Investigations on the changes in anaerobic biodegradability and biotoxicity of an industrial microbial biomass induced by a thermochemical pretreatment," Water Science and Technology 41(3):137-144
- 55 Déportes, I. et al. (1998), "Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (MSW) composting," Journal of Applied Microbiology 85:238-246
- 60 Diaz, J., et al., (2011), "Co-digestion of different waste mixtures from agro-industrial activities: Kinetic evaluation and synergistic effects," Bioresource Technology 102:10834.
- Dong-Yeol Lee et al (2010) "Continuous H₂ and CH₄ production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge", Bioresource Technology 101
- 65

- Dugba Prince N, Zhang Ruihong (1999) "Treatment of dairy wastewater with two-stage anaerobic sequencing batch reactor systems", *Biosource Technology* 68:225-233
- 5 Eida M.F et al (2012) "Isolation and characterization of cellulose-decomposing bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts", *Microbes Environ* 27(3):226-233
- ENVIO Biogas Beteiligungs GmbH, 26 August 2010, DE 10 2009 009 985
- 10 Fdez-Guelfo et al. (2011-A), "The use of thermochemical and biological pretreatments to enhance organic matter hydrolysis and solubilisation from organic fraction of municipal solid waste (MSW)," *Chemical Engineering Journal* 168:249-254
- 15 Fdez-Guelfo et al. (2011-B), "Biological pretreatment applied to industrial organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW): Effect on anaerobic digestion," *Chemical Engineering Journal* 172:321-325
- Fdez-Guelfo et al. (2012) "New parameters to determine the optimum pretreatment for improving the biomethanization performance," *Chemical Engineering Journal* 198-199:81-86
- 20 Fukuhara Y et al (2010) "Characterization of the isophthalate degradation genes of momamonas sp. strain E6" *Applied and Environmental Microbiology* 76(2):519
- Gao et al (2008) "Rice straw fermentation using lactic acid bacteria", *Bioresource technology* 99:2742-2748
- 25 Ge, H. et al. (2010), "Pre-treatment mechanisms during thermophilic-mesophilic temperature phased anaerobic digestion of primary sludge," *Water Research* 44:123-130
- Ghose, T.K. (1987), Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, 59(2): p. 257-268
- 30 Goto et al: (2004), "Hydrothermal conversion of municipal organic waste into resources." *Bioresource Technology* 93:279-284.
- Hansen, T. et al. (2007b). Composition of source-sorted municipal organic waste collected in Danish cities. *Waste Management*. 27, 510-518
- 35 Harris W.L., Dague R.R. (1993) "Comparative performance of anaerobic filters at mesophilic and thermophilic temperatures", *Water Environment Research* 65(6):764-771
- Hartmann, H., and Ahring, B. (2006), "Strategies for the aerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: an overview," *Water Science & Technology* 53(8):7.
- 40 Hyun-Woo Kim et al (2011) "A comparison study on the higher rate co-digestion of sewage sludge and good waste using a temperature-phased anaerobic sequencing batch reactor system", *Bioresource Technology* 102:7272-7279
- 45 Iwaki H et al.(2011), "Tropicibacter phthalicus sp.nov., A Phthalate-Degrading bacterium from seawater", *Curr. Microbiol* 64:392-396
- Iwaki H.et al (2012) "Isolation and characterization of marine bacteria capable of utilizing phthalate", *World J Microbiol Biotechnol* 28:1321-1325
- 50 Jensen, J. et al. (2010), "Enzymatic processing of municipal solid waste," *Waste Management* 30:2497-2503
- Jensen, J., et al. (2011) "Cellulase hydrolysis of unsorted MSW," *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165:1799.-1811
- 55 Ji S et al (2012) "An untapped Bacterial cellulytic community enriched from coastal marine sediment under anaerobic and thermophilic conditions", *Microbiol Lett* 335:39-46
- Kaiser S.K et al (1995) "Initial studies on the temperature-phased anaerobic biofilter process, *Water environment research*", 67(7):1095-1103
- 60 Kask, S., et al. (1999), "A study on growth characteristics and nutrient consumption of *Lactobacillus plantarum* in A-stat culture," *Antonie van Leeuwenhoek* 75:309.
- 65 Kato et al (2004), "*Clostridium straminisolvens* sp. nov." a moderately thermophilic aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:2043-2047

- Kato et al (2005) "Stable Coexistence of Five Bacterial Strains as a cellulose-degrading community", *Applied and environmental microbiology* 71(11):7099-7106
- 5 Kim H.W et al (2004) "Anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste using temperature-phased anaerobic digestion process", *Water Science and Technology* 55(9):107-114
- Kim, D., and Kim, M., (2012), "Thermophilic fermentive hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures," *International Journal of Hydrogen Energy* 37:2021.
- 10 Kornilowicz-Kowalska T., Bohacz J(2010), "Dynamics of growth and succession of bacterial and fungal communities during composting of feather waste", *Bioresource Technololy* 101:1268-1276
- Kristensen et al. (2009), "Yield determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose," *Biotechnology for Biofuels* 2:11.
- 15 Kubler, H. and Schertler, C, (1994) "Three phase anaerobic digestion of organic wastes," *Water Science and Technology* 30(12):367-374
- Kumar et al (2008) "Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives", *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:377-391
- 20 Lafitte-Trouque S., Forster C.F. (2000) "Dual anaerobic co-digestion of sewage sludge and confectionery waste", *Bioresource Technology* 71:77-82
- Latorre I et al (2012)" PVC biodeterioration and DEHP leaching by DEHP-degrading bacteria", *International Biodeterioration and Biodegradation* 69:73-81
- 25 Lee, D. et al. (2010), "Continuous H₂ and CH₄ production from high solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge," *Bioresource Technology* 101:S42.
- 30 Li, A. et al. (2007) "Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bioethanol conversion," *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 30:189-196
- Li, S. et al. (2012), "Production of fermentable sugars from enzymatic hydrolysis of pretreated municipal solid waste after autoclave process," *Fuel* 92:84-88
- 35 Liang et al (2008) "Phthalates biodegradation in the environment", *Appl Microbiol Biotechnol* 80:183-193
- Liang et al (2010) "Genetic diversity of phthalic acid esters-degrading bacteria isolated from different geographical regions of China", *Antonie van Leeuwenhoek* 97:79-89
- 40 Liong,M. and Shah, N. (2005), "Optimisation of chlolesterol removal, growth and fermentation patterns of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4862 in the presence of mannitol, fruto-oligosaccharide and inulin: a response surface methodology approach," *Journal of Applied Microbiology* 98:1115.
- 45 Lv, W. et al. (2010), "Putting microbes to work in sequence: Recent advances in temperature-phased anaerobic digestion processes," *Bioresource Technology* 101:9409
- Maki et al (2012) "Newly isolated and characterized bacteria with great application potential for decomposition of lignocellulosic biomass", *J Microbiol Biotechnol* 22:156-66
- 50 Malkow, T. (2004) "Novel and innovative pyrolysis and gasification technologies for energy efficient and environmentally sound MSW disposal", *Waste Management* 24:53-79
- Matthews et al (2004) "Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification", *Applied and environmental microbiology* 70(10):5715-5731
- 55 Matthews et al (2006), " A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology", *Australian journal of grape and wine research* 12:235-244
- 60 Meyers, S.A.et al. (1996) "Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil", *Food microbiology* 13:383-389
- Morita, M., and Sasaki, K. (2012), "Factors influencing the degradation of garbage in methanogenic bioreactors and impacts on biogas formation," *Applied Microbiol. Biotechnol.* 94:575-582
- 65

- Muhle, S. et al. (2010). Comparison of carbon emissions associated with municipal solid waste management in Germany and the UK. *Resources Conservation and Recycling*. 54, 793-801
- 5 Nakasaki, K. et al. (1996) "The use of *Bacillus licheniformis* HA1 to accelerate composting of organic wastes," *Compost. Sci. & Utilization* 4(4):1.
- Nakasaki, K. et al. (2013) "Inoculation of *Pichia kudriavzevii* RB1 degrades the organic acids present in raw compost material and accelerates composting," *Bioresource Technology* 144:521
- 10 Navacharoen A., Vnagnai A.S (2011) "Biodegradation of diethyl phthalate by an organic-solvent-tolerant *Bacillus subtilis* strain 3C3 and effect of phthalate ester coexistence", *International Biodeterioration and Biodegradation* 65:818-816
- 15 Ou, M., et al. (2011), "Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38:599.
- Papadimitriou, E.K., (2010) "Hydrolysis of organic matter during autoclaving of commingled household waste," *Waste Management* 30:572.
- 20 Parajo et al (1997) "Production of lactic acid from lignocellulose in a single stage of hydrolysis and fermentation, *Food Biotechnology* 11(1):45-58
- Park et al (2009) "Biodegradation of diisodecyl phthalate (DIDP) by *Bacillus* sp. SB-007", *Journal of Basic Microbiology* 46:31-35
- 25 Patel, M., et al. (2005), "Simultaneous saccharification and co-fermentation of crystalline cellulose and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to lactate by thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp." *Biotechnol. Prog.* 21:1453.
- 30 Riau et al (2010) "Temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) to obtain class A biosolids: A semi-continuous study", *Bioresource Technology* 101:2706-2712
- Riber, C. et al. (2007) Method for fractional solid-waste sampling and chemical analysis. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 87 (5), 321-335.
- 35 Riber, C. et al. (2009), "Chemical composition of material fractions in Danish household waste," *Waste Management* 29:1251
- 40 Sakai et al. (2000) "Selective proliferation of lactic acid bacteria and accumulation of lactic acid during open fermentation of kitchen refuse with intermittent pH adjustment", *Food Sci. Tech.* 6(2):140-145
- Sakai et al. (2004) "Flourescent In Situ hybrdaization of open lactic acid fermentation of kitchen refuse using rRNA-targeted oligonucleotide Probes", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(1):58-56
- 45 Sasaki et al (2012) "Acceleration of cellulose degradation and shift of product via methanogenic co-culture of a cellulolytic bacterium with a hydrogenotrophic methanogen", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114(4):435-439
- Schmidt and Padukone (1997)" Production of lactic acid from wastepaper as a cellulosic feedstock", *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology* 18:10-14
- 50 Schmit Kathryn H., Ellis Timothy G (2001) "Comparison of Temperature-Phased and Two-Phase Anaerobic CoDigestion of Primary Sludge and Municipal Solid Waste", *Water Environment Research* 73:314-321
- 55 Schneider, R., (2002). "Sustainable recovery of animal by-products, of which the disposal is regulated, in a pilot facility at the animal by-product recovery plant of St. Erasmus." Final report to the Bavarian Ministry for State-Development and Environmental Affairs, Germany. Project No. E79, ATZ-EVUS, Centre for Development and Process Engineering, Sulzbach-Rosenberg, Germany.
- 60 Shanwei Xu et al.(2012) "Biodegradation of specified risk material and fate of scrapie prions in compost, *Journal of environmental science and health*", Part A 48:26-36
- Shiratori H et al (2006) "Isolation and characterization of a new *Clostridium* sp. that performs effective cellulosic waste digestion in af thermophilic methanogenic bioreactor", *Appl Environ Microbiol* 72(5):3702-3709
- 65

- Shiratori H et al (2009) "Clostridium clariflavum sp. nov. and clostridium caenicola sp.nov., moderately thermophilic cellulose-/cellobiose-digesting bacteria isolated from methanogenic sludge", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:1764-1770
- 5 Simmons, P. et al. (2006). The state of Garbage in America. Biocycle. 47, 26-43.
- Six and Debaere (1992) "Dry anaerobic conversion of municipal solid waste by means of the Dranco process, Water Science and Technology 25(7):295-300
- 10 Sizova et al (2011), "Cellulose- and Xylan-Degrading Thermophilic Anaerobic Bacteria from Biocompost", Applied and Environmental Microbiology 77(7):2282-2291
- Stehlik Petr. (2009) "Contribution to advances in waste-to-energy technologies," Journal of Cleaner Production 17:919.
- 15 Supaphol, S. et al. (2011), "Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste," Bioresource Technology 102:4021-4027
- Tai et al (2004), "Isolation and characterization of a cellulytic geobacillus thermoleovorans T4 strain from sugar refinery wastewater", Extremophiles 8:345-349
- 20 Tonini, T., and Astrup, T. (2012) "Life-cycle assessment of a waste refinery process for enzymatic treatment of municipal solid waste," Waste Management 32:165-176
- 25 Van den Keybus (2006) WO2006/029971
- Wu et al. (2010) "Complete degradation of di-n-octyl phthalate by biochemical cooperation between Gordonia spstrain JDC-2 and Arthrobacter sp. Strain JDC-32 isolated from activated sludge", Journal of Hazardous Material 176:262-268
- 30 Wu, S., et al. (2008), "Dark fermentive hydrogen production from xylose in different bioreactors using sewage sludge microflora," Energy & Fuels 22:113
- Wu et al (2011) "Isolation and characterization and characterization of four di-nbutyl phthalate (DBP)-degrading gordonia sp. strains and cloning the 3,4 phthalate dioxygenase gene", World J Micorbiol Biotechnol 27:2611-2617
- 35 Yang et al (2001), "Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation", Bioresource technology 78:277-280
- 40 Yoshida, H., Takavoli, O., (2004). "Sub-critical water hydrolysis treatment for waste squid entrails and production of amino acids, organic acids, and fatty acids." Journal of Chemical Engineering of Japan 37 (2), 253-260
- Yu et al (2012) "Experimental and modelling study of a two-stage pilot scale high solid anaerobic digester system", Bioresource Technology 124:8-17
- 45 Zhang et al. (2007), "Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic wastes", Water Research 41:4468-4478
- Zhang, D. et al. (2010), "Municipal solid waste management in China: Status, problems and challenges," Journal of Environmental Management 91:1623.
- 50 Zverlov et al (2010) "Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass", Eng Life Sci 10(6):528-536

REIVINDICACIONES

1. Un método de procesamiento de residuos sólidos municipales (RSM) que comprende las etapas de
 - 5 - proporcionar un flujo de RSM no clasificados hacia un reactor de fermentación microbiana en el que los RSM se fermentan con agitación a un contenido sin agua de entre el 10 y el 50 % en peso y a una temperatura de entre 35 y 75 °C durante un período de entre 1 y 72 horas, en condiciones suficientes como para mantener una concentración de bacterias del ácido láctico vivas de al menos $1,0 \times 10^{10}$ UFC/l, en donde se proporciona actividad celulasa de origen microbiano de al menos 30 UPF/l mediante un consorcio microbiano que
 - 10 proporciona fermentación microbiana y
 - eliminar un flujo de RSM no clasificados fermentados del reactor y someterlo a una etapa de separación mediante la cual, los sólidos no degradables se eliminan para proporcionar un lodo de componentes biodegradables.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el flujo entrante de RSM se inocula con un inóculo de microorganismos que se dan de forma natural en los residuos, y se "generan" en residuos locales o en componentes de residuos locales como una fuente de alimento en condiciones de fermentación de temperatura en el intervalo de 37 a 55 °C, o 40 a 55 °C, o 45 a 50 °C y a un pH en el intervalo de 4,2 y 6,0.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde se ha añadido contenido de agua al residuo para lograr un contenido sin agua apropiado, y/o en donde se logra un contenido sin agua apropiado mediante la adición a los RSM de una proporción de masa constante de agua de entre 0,5 y 2,5 kg de agua por kg de RSM.
- 25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la actividad celulasa se añade mediante inoculación con un microorganismo seleccionado que presenta actividad celulasa extracelular.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el lodo de componentes biodegradables se somete a fermentación posterior tras la separación de los sólidos no degradables.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la inoculación del flujo entrante de RSM se proporciona reciclando aguas de lavado o soluciones del proceso usadas para recuperar material orgánico residual de sólidos no degradables y/o en donde la inoculación del flujo entrante de RSM se proporciona antes o de manera concurrente con la adición de actividades enzimáticas.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos el 40 % en peso de los sólidos volátiles disueltos del lodo de componentes biodegradables comprende lactato y/o en donde al menos el 40 % en peso del contenido sin agua del lodo de componentes biodegradables comprende sólidos volátiles disueltos.
- 40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fermentación microbiana se lleva a cabo dentro del intervalo de temperaturas de 45-50 grados C.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se han calentado los RSM hasta una temperatura no mayor de 75 grados C.
- 45 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los sólidos no biodegradables separados comprenden al menos aproximadamente el 20 % del peso seco de los RSM y/o en donde los sólidos no biodegradables separados comprenden al menos aproximadamente el 20 % en peso seco de los materiales reciclables.
- 50 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la clasificación de sólidos no biodegradables se realiza en 36 horas desde el comienzo de la hidrólisis enzimática, o en donde la clasificación de los sólidos no degradables se realiza en 24 horas desde el comienzo de la hidrólisis enzimática.
- 55 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el etanol o el lactato se extraen primer del lodo de componentes biodegradables antes de la digestión anaeróbica para producir biometano.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se ha añadido contenido de agua a los residuos con el fin de lograr un contenido sin agua apropiado.
- 60 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el contenido en agua del RSM se ajusta para que el RSM comprenda un contenido sin agua de entre el 12 y el 40 %.
- 65 15. Un lodo de componentes biodegradables preparado de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

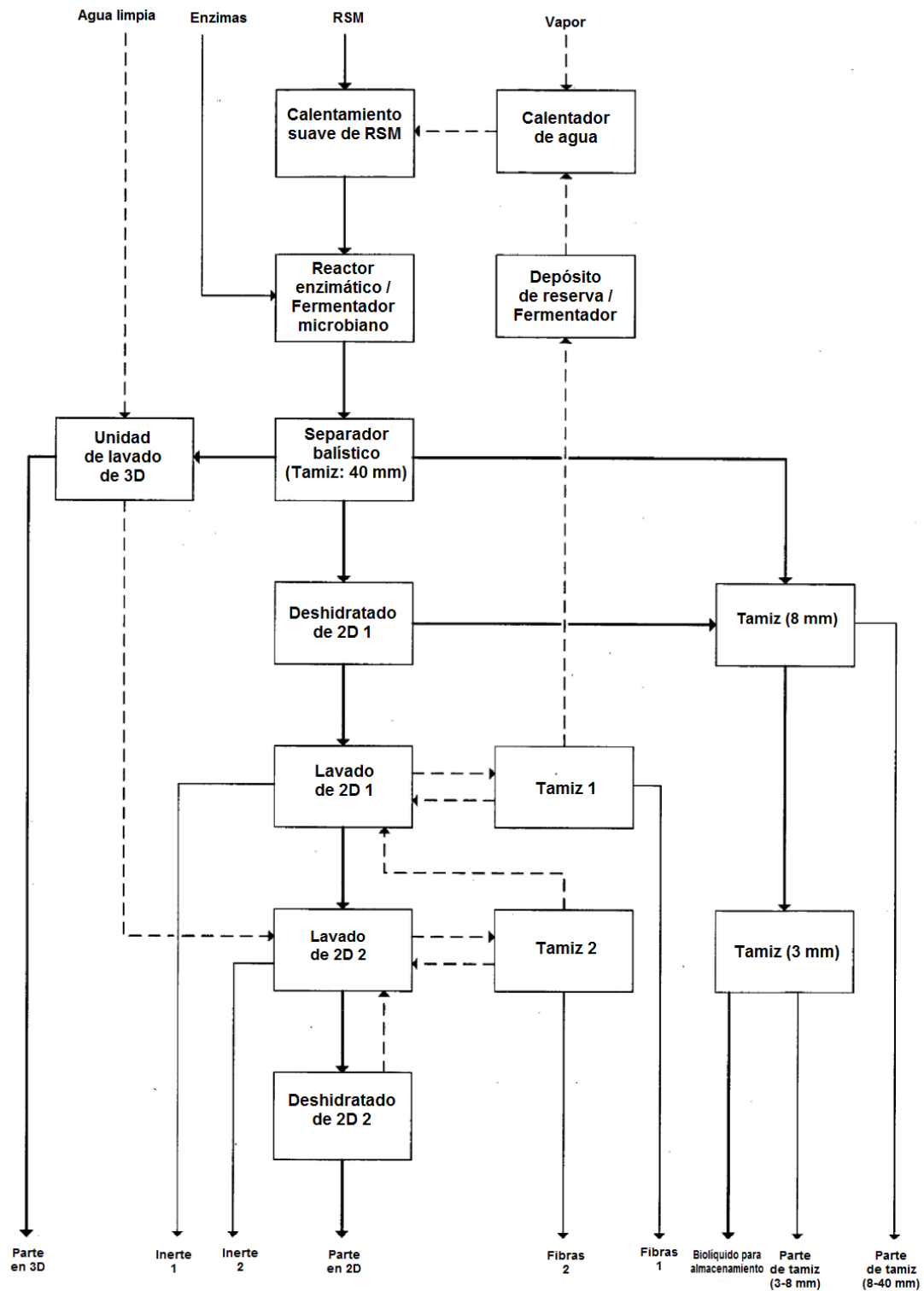


Figura 1. Ilustración esquemática de las principales características de la planta de demostración

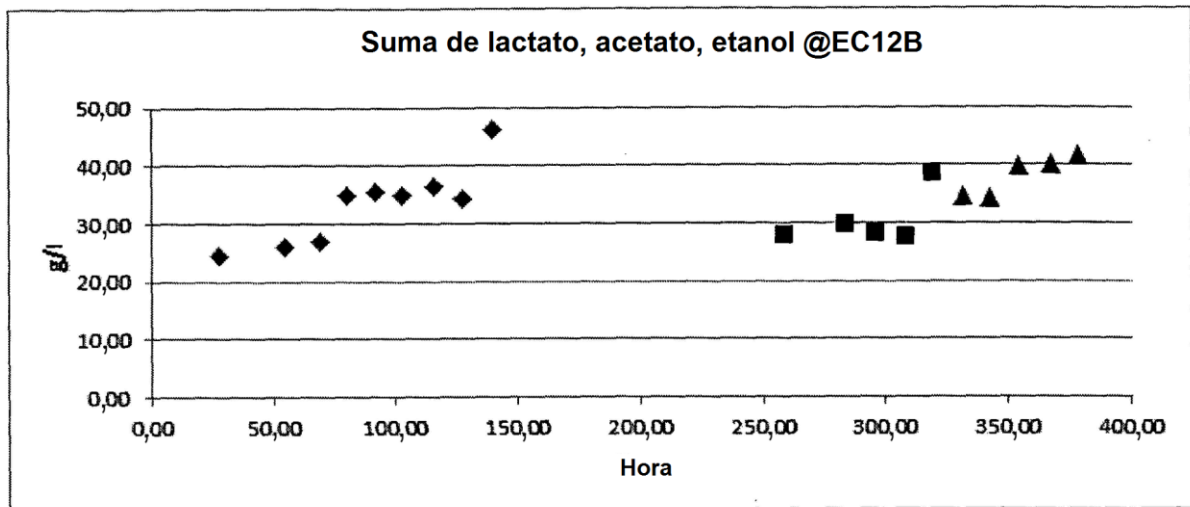


Figura 2: Suma de las concentraciones de lactato, acetato y etanol en el lodo biogénico obtenido con y sin actividad celulasa complementaria proporcionada por preparaciones de enzimas aisladas.

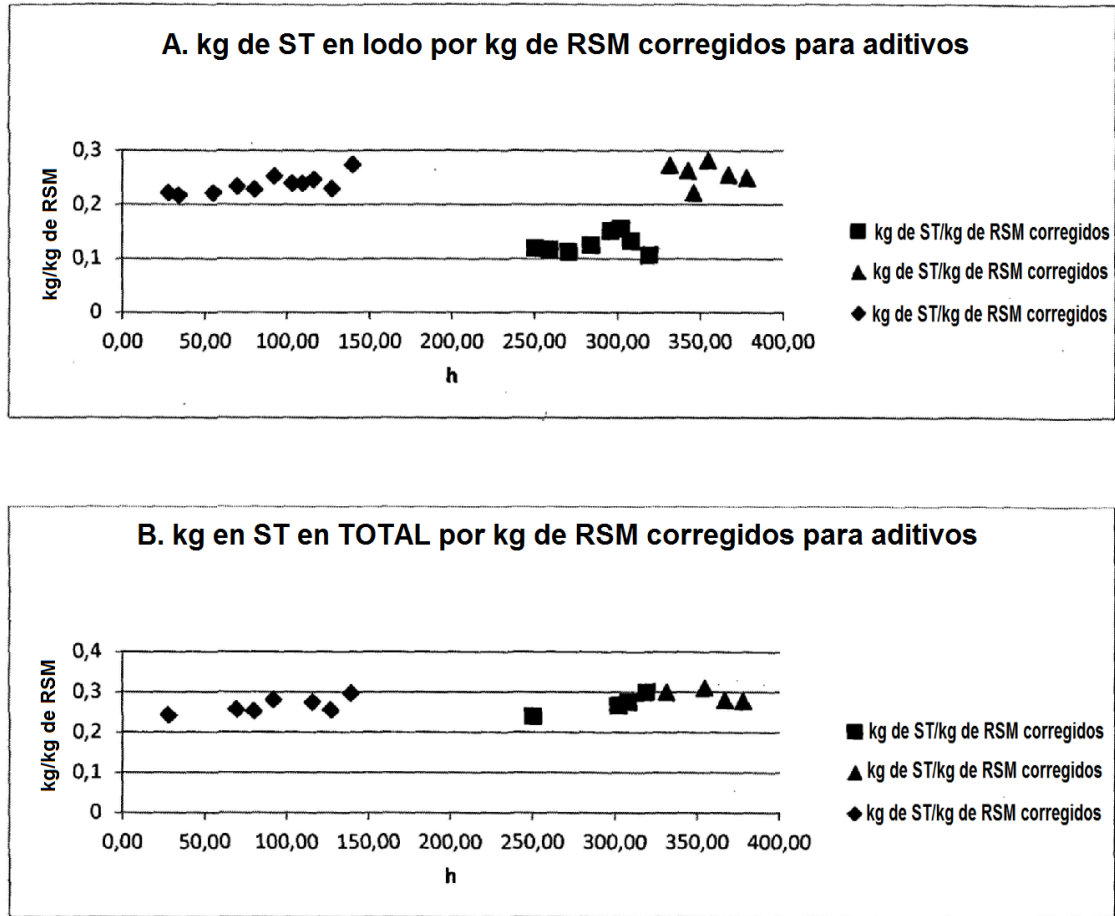


Figura 3. Captura de biodegradables en kg de ST/ kg de residuos. (A). En lodos biogénicos tras tamices de 3 mm. (B) Captura total incluyendo el material retenido por los tamices.

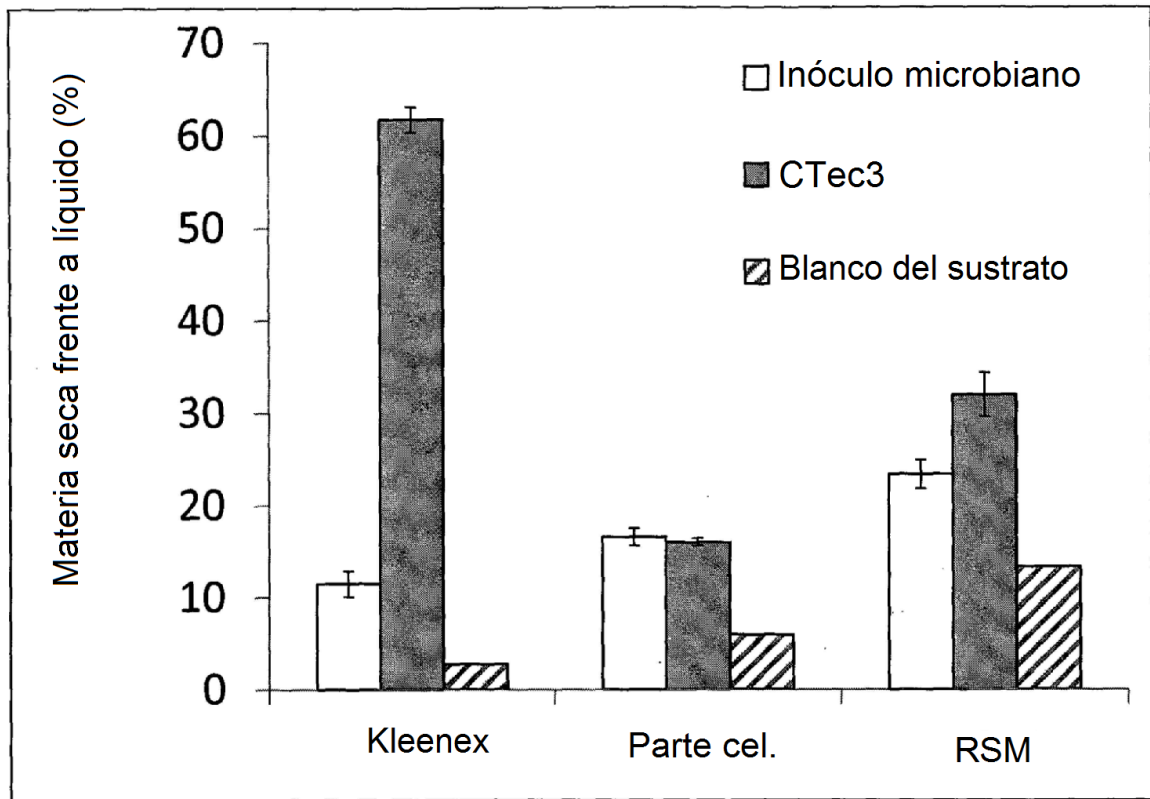


Figura 4. Degradación de sustratos celulósicos y de RSM modelo por inóculo microbiano y CTEC3.

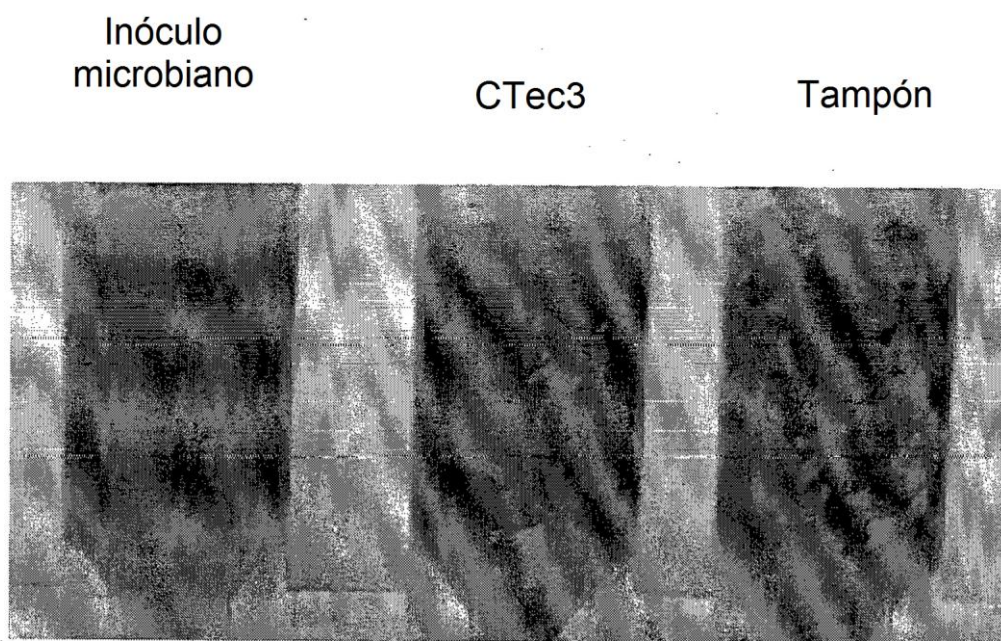


Figura 5. Degradación comparativa de la parte celulósica de RSM modelo por inóculo microbiano y CTEC3.

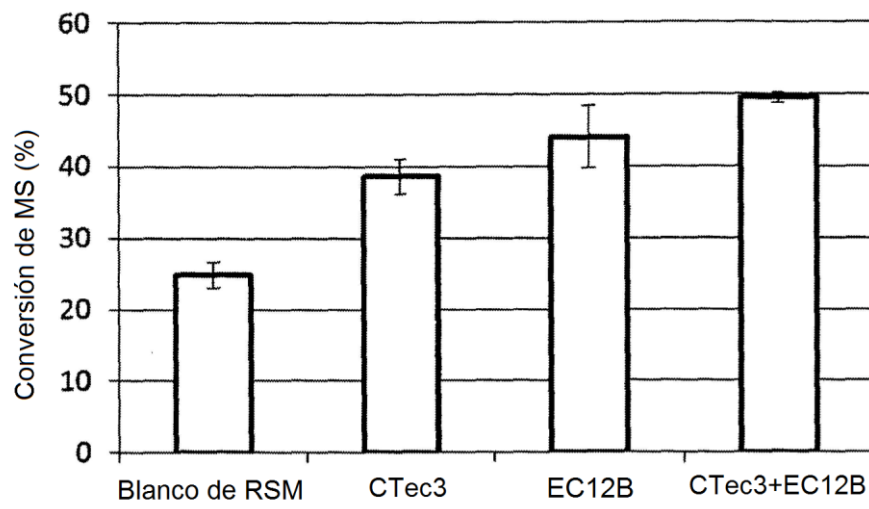


Figura 6. Conversión de materia seca en hidrólisis enzimática simultánea con fermentación microbiana y de CTEC3.

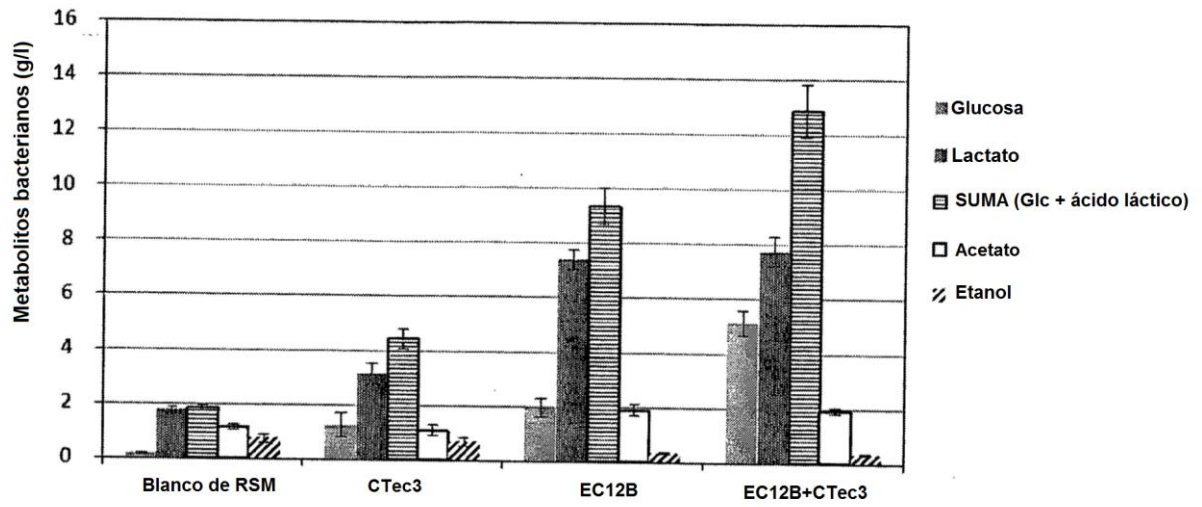


Figura 7. Metabolitos bacterianos recuperados en sobrenadante tras la hidrólisis enzimática simultánea con fermentación microbiana y de CTec3.

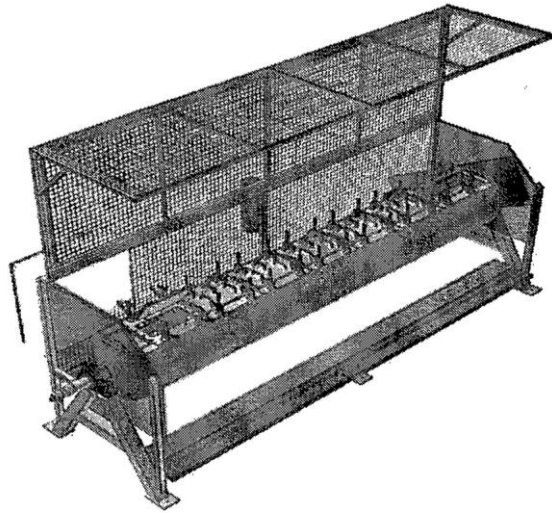


Figura 8. Representación gráfica del reactor de ensayo REnescience.

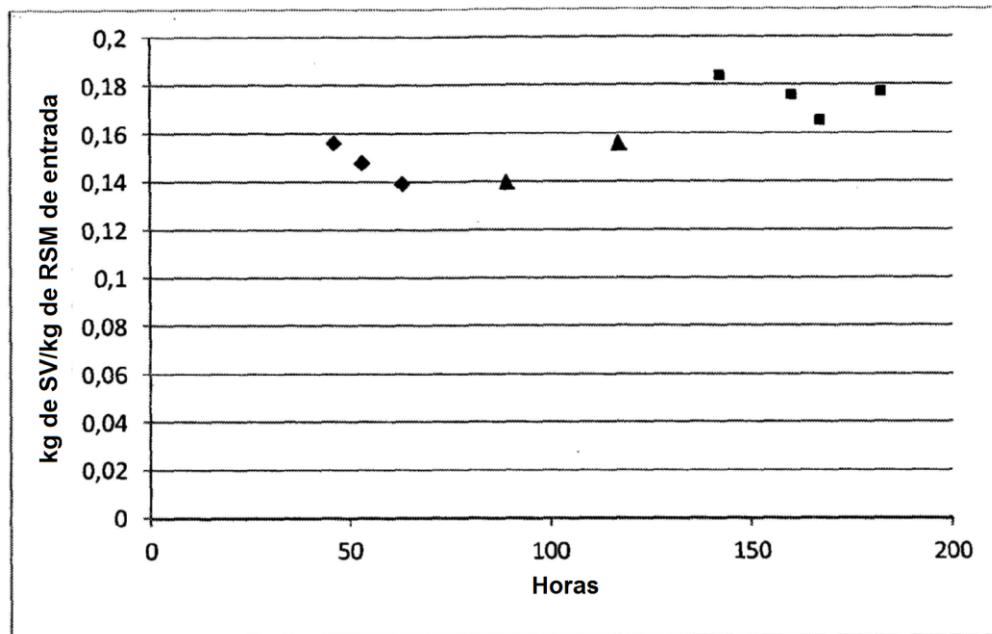


Figura 9. Captura de biodegradables en lodo biogénico durante diferentes períodos de tiempo expresados como kg de SV por kg de RSM procesado.

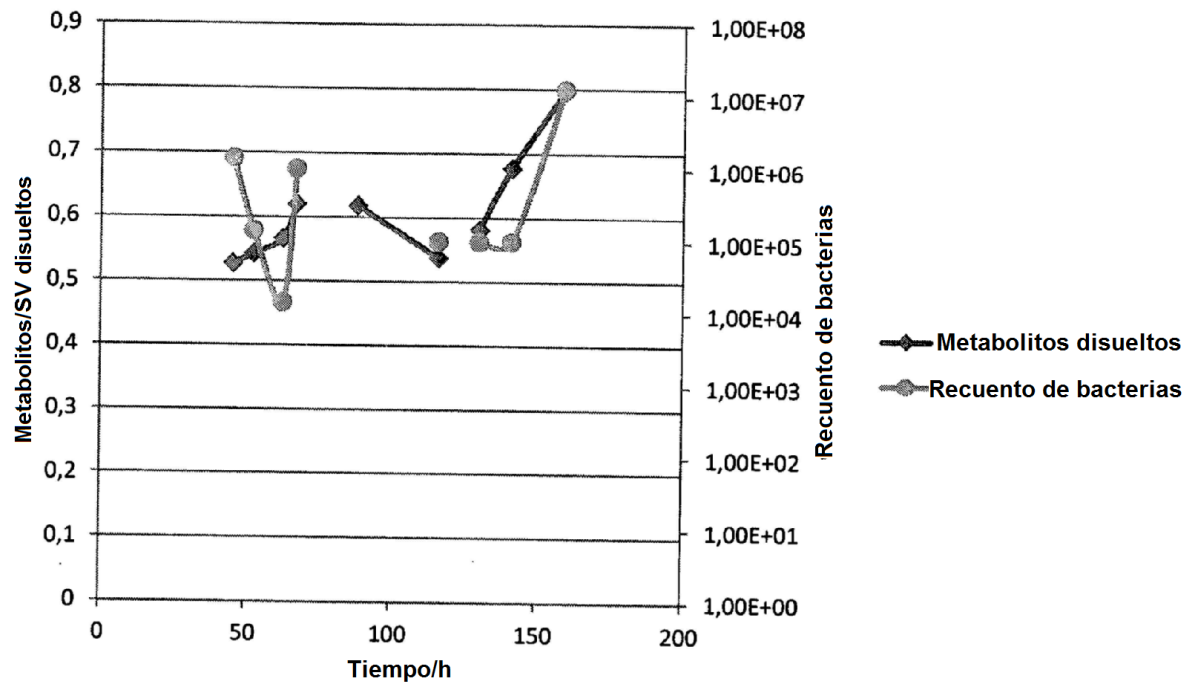


Figura 10. Metabolitos bacterianos en lodo biogénico y recuentos de bacterias aeróbicas en diferentes puntos temporales.

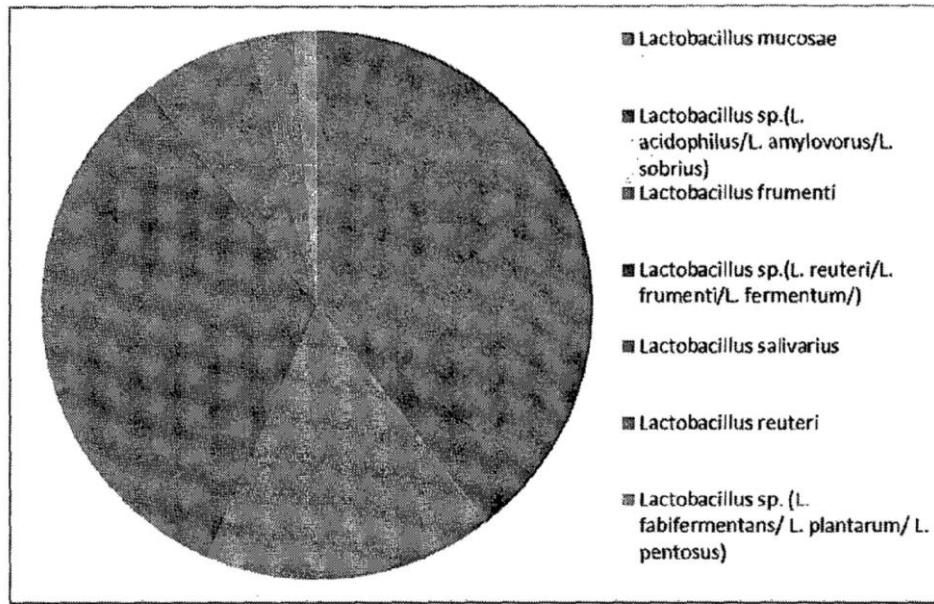


Figura 11. Distribución de especies bacterianas identificadas en el lodo biogénico del ejemplo 7.

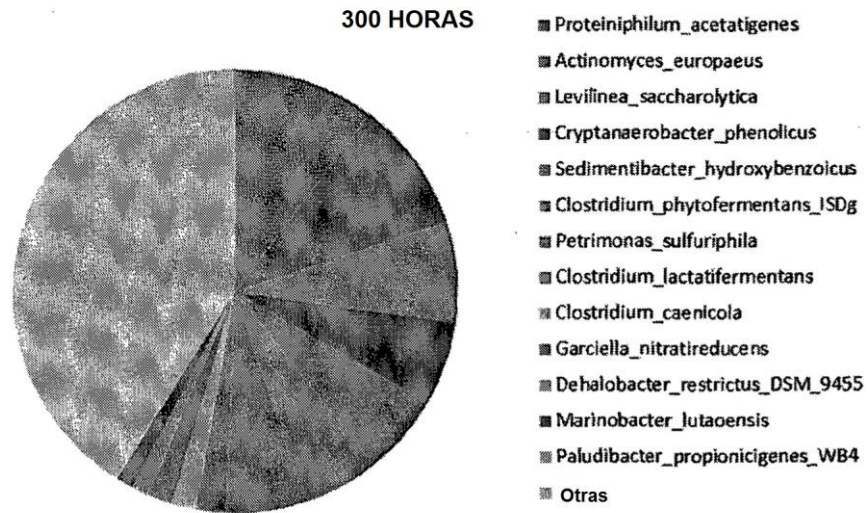


Figura 12. Distribución de las 13 bacterias predominantes en el lodo biogénico del ejemplo 9.

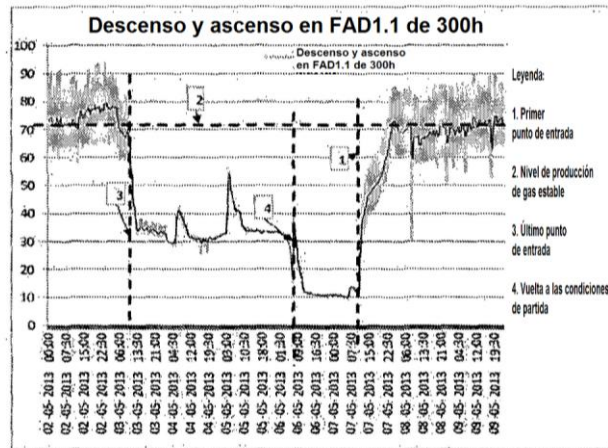


Figura 13. Ascenso y descenso en la producción de metano que usa el lodo biogénico del ejemplo 9.

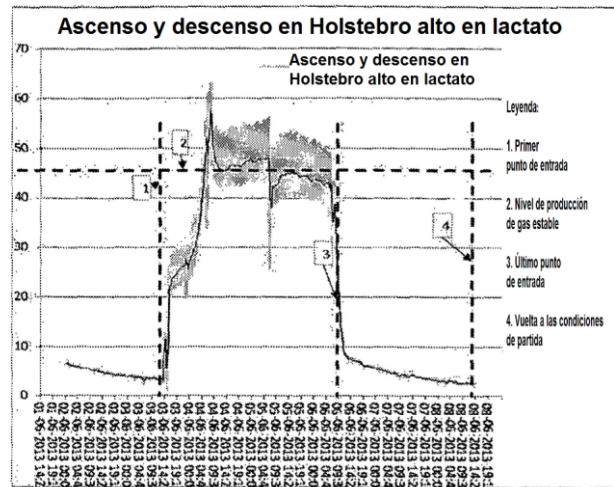


Figura 14. Caracterización del ascenso y del descenso en la producción de biometano en el biolíquido “alto en lactato” del ejemplo 6.

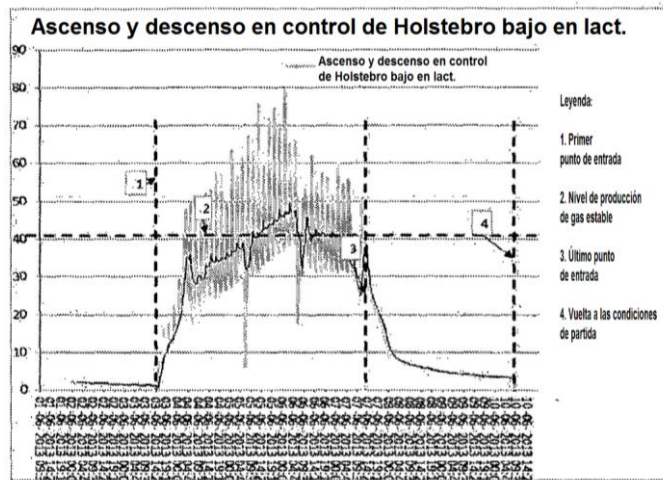


Figura 15. Caracterización del ascenso y del descenso en la producción de biometano en el biolíquido “bajo en lactato” del ejemplo 6.

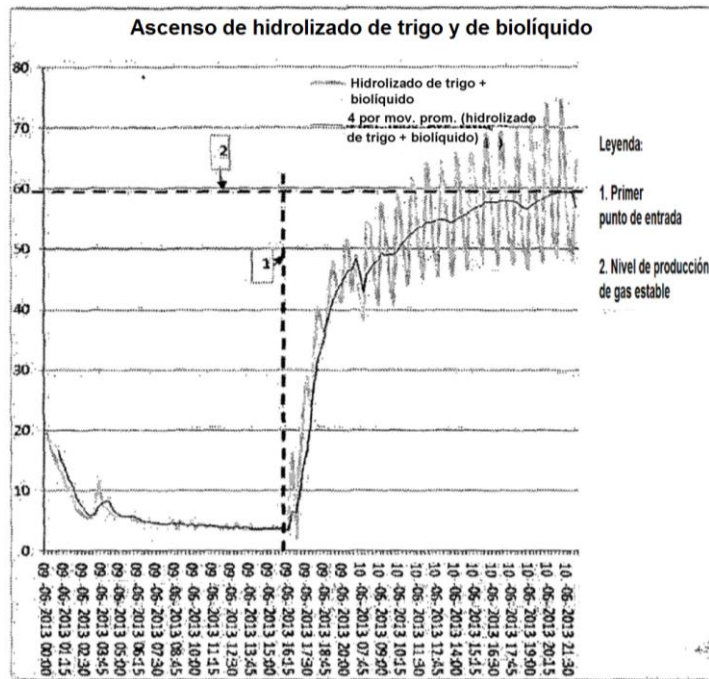


Figura 16. Caracterización del ascenso en la producción de biometano del biolíquido de paja de trigo hidrolizado