

estos casos, se puede utilizar el control en cascada, que consiste en un lazo de control interno (slave loop) y sobre él un lazo de control externo (master loop). De modo que la consigna del control interno la ajusta el lazo de control externo según varía el proceso (Lim y Lee, 1991). Un ejemplo de aplicación de control en cascada es el control del oxígeno disuelto mediante el control del caudal de aireación (Figura 18); un lazo de control puede verificar que el caudal de aireación sea el requerido (valor consigna) mediante la apertura o cierre de una válvula (control interno) y el control externo fija el valor de consigna del caudal de aire mediante la medición de la concentración de oxígeno disuelto.

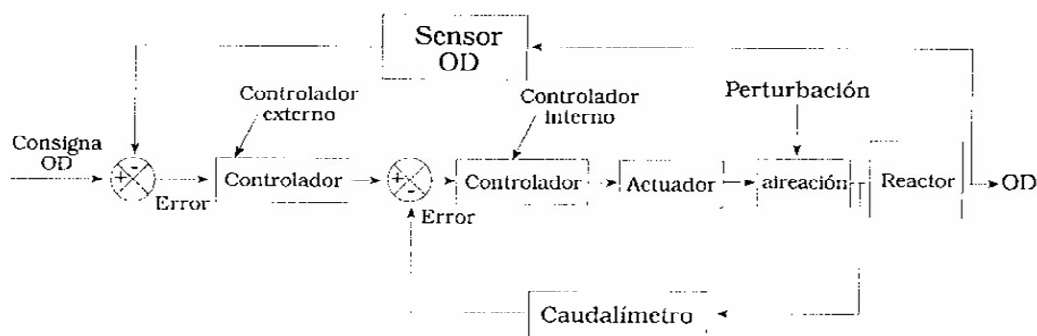


Figura 18. Esquema de un control en cascada para el oxígeno disuelto.

#### a.iv. Control Adaptativo

Cuando la dinámica del proceso cambia en el tiempo, por ejemplo al operar en zonas no lineales del proceso, o cuando las características del proceso cambian, es necesario reajustar los parámetros del controlador y los valores de consigna a las nuevas circunstancias. Esta tarea se puede hacer manualmente si el cambio ocurre esporádicamente, pero este no es el caso habitualmente.

Una metodología de control más reciente, que intenta solucionar este problema, son los sistemas de control adaptativos en los que, mediante un algoritmo estimador de parámetros, el controlador se sintoniza a medida que ocurre el proceso. Dependiendo en la forma en que se realice la sintonía, los sistemas adaptativos se pueden clasificar en: controladores autosintonizables (STR) y control con modelo de referencia (MRAS). En un controlador autosintonizable (STR), éste calcula los parámetros del controlador (por ejemplo un PID) mediante el análisis de las respuestas del proceso a pequeñas perturbaciones de pulso o escalón generadas por el sistema de adaptación (Lim y Lee, 1991). De este modo el controlador se va ajustando automáticamente durante el proceso (Figura 19).

En un control con modelo de referencia (MRAS), se requiere un buen modelo del proceso, puesto que el controlador ajusta sus parámetros en función del comportamiento previsto por el modelo y el comportamiento real del proceso. Este sistema de control adaptativo también es utilizado para mantener una trayectoria predefinida de un proceso, de modo que el controlador se autosintoniza para lograr el objetivo previsto (Wilson, 1991). En un sistema de control con modelo de referencia hay dos lazos de control, similar a un control en cascada (Figura 20). El lazo interno de control por retroalimentación del proceso y el externo de adaptación, que se encarga de ajustar los parámetros del controlador para minimizar la diferencia entre el valor de la variable controlada y el valor previsto por el modelo o trayectoria (Lim y Lee, 1991).

#### b. Control Avanzado

Un sistema de control avanzado es, desde el punto de vista de su arquitectura, un control de alto nivel, es decir, está sobre un sistema de control convencional, realizando las tareas de supervisión del proceso.

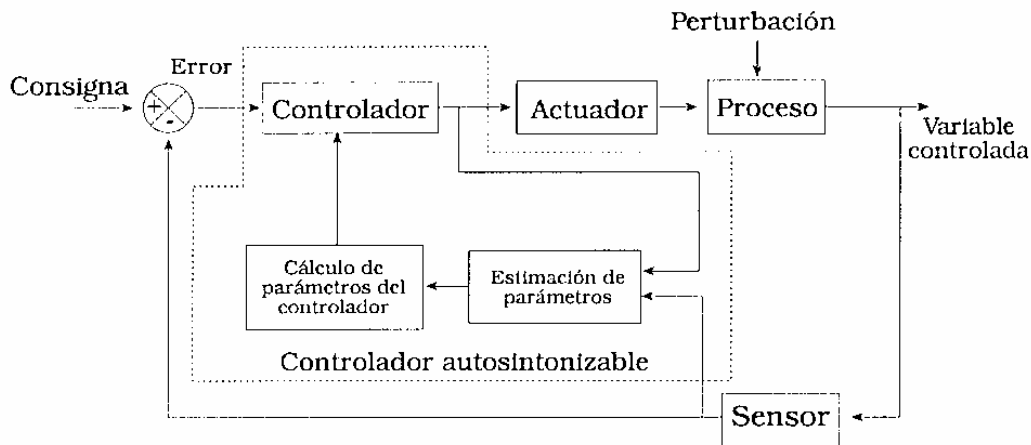


Figura 19. Esquema de un lazo de control adaptivo con controlador autosintonizable (STR).

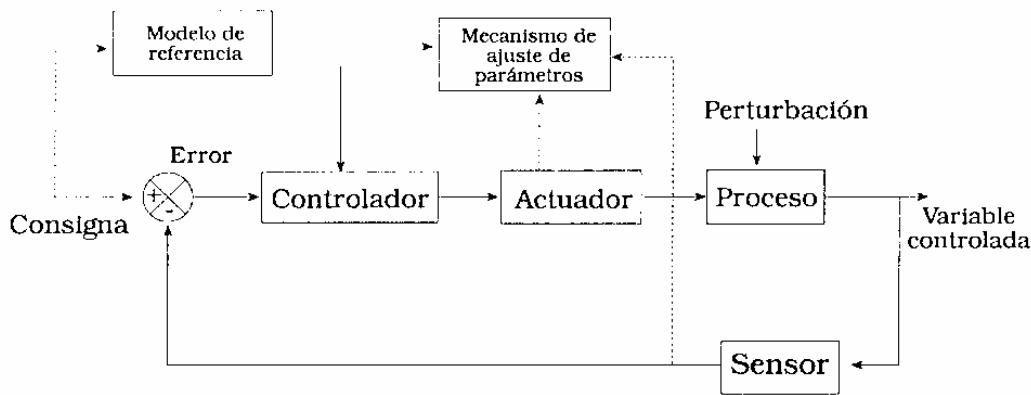


Figura 20. Esquema de un lazo de control adaptivo con modelo de referencia (MRAS).

El sistema de control avanzado deberá efectuar entre otras tareas: la monitorización del proceso, el control del proceso, la validación de los sensores, detección de fallas de sensores, la diagnosis del proceso y ofrecer recomendaciones para la recuperación del proceso en caso de fallas o la continua optimización del proceso (Aynsley et al., 1993).

Las técnicas de control avanzado están basadas en la experiencia de un operador de un proceso (técnicas basadas en el conocimiento), en un historial de datos de entrada/salida o en modelos de caja negra. En este tipo de control no es necesario disponer de un modelo detallado del proceso, sino más bien de la experiencia y conocimiento acumulado por un experto o de datos históricos del proceso.

Cuando los procesos no se pueden describir mediante un modelo sencillo, y es necesario recurrir a modelos complejos y no lineales, o cuando no se cuenta con un modelo detallado del mismo, los sistemas de control basados en el conocimiento se presentan como una buena alternativa para el control avanzado de estos procesos. La aplicación de los sistemas basados en el conocimiento ha aumentado considerablemente en los últimos años. Su crecimiento ha sido especialmente notable en el área biotecnológica, siendo aplicados con cierto éxito en el campo del tratamiento de aguas residuales, producción de levaduras, metabolitos y otros.

### b.i. Configuración de los sistemas basados en el conocimiento

Las posibles configuraciones de sistemas de control basados en el conocimiento son múltiples, pero en general se pueden agrupar en dos tipos: control experto directo e indirecto o supervisor (Konstantinov *et al.*, 1993).

El control experto directo es aquel en que el módulo de control basado en el conocimiento está incorporado en el lazo de control, al mismo nivel que un controlador PID, pero sin las limitaciones de estos últimos (necesidad de un modelo del proceso, linealidad del modelo, etc.) tal como se muestra en la Figura 21. Generalmente, los controladores con esta configuración se conocen como controladores fuzzy porque normalmente están estructurados mediante lógica difusa (Reyero y Nicolás, 1995). Últimamente también se han desarrollado controladores neuronales o híbridos (neuronales-fuzzy). Esta configuración puede ser aplicada satisfactoriamente en lazos de control local de bajo nivel, pero su aplicación a un nivel superior se hace más difícil (Konstantinov *et al.*, 1993).

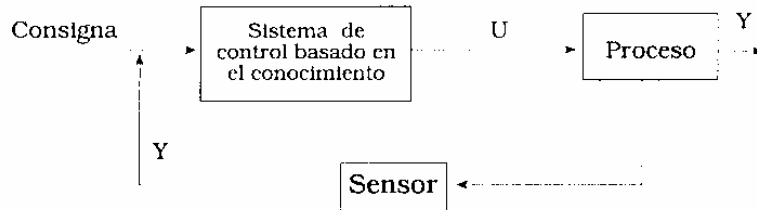


Figura 21. Estructura de un sistema de control experto directo.

La estructura de un control experto indirecto o supervisor cuenta con dos niveles jerárquicos con una distribución de las tareas de control, como se puede apreciar en la Figura 22. El nivel inferior está compuesto por un lazo de control convencional, que se encarga de la medida, filtrado de datos, del control del proceso, etc. El nivel jerárquico superior se encuentra en el sistema de control basado en el conocimiento, el cual se encarga de la supervisión del proceso (Konstantinov *et al.*, 1993).

De este modo el control supervisor no está directamente involucrado en el control del proceso, es decir, no genera señales de control, sino que supervisa el correcto funcionamiento del sistema de control de bajo nivel y lo ayuda a desarrollar bien su tarea. El sistema de control supervisor ofrece nuevas posibilidades de desarrollo de sistemas inteligentes para el control de procesos, cubriendo áreas que el control clásico no pueden manejar (Konstantinov *et al.*, 1993).

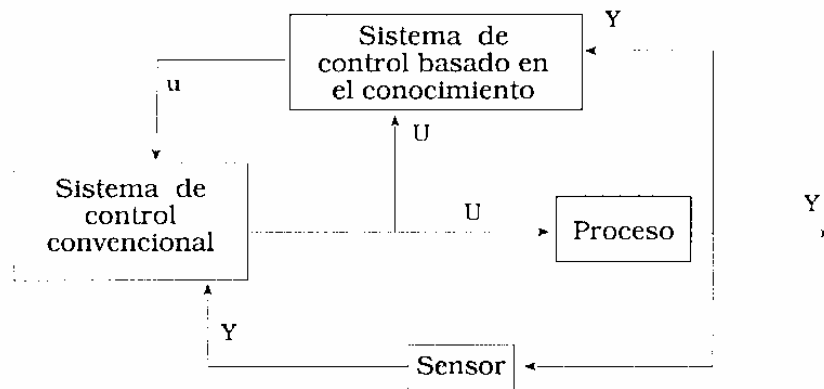
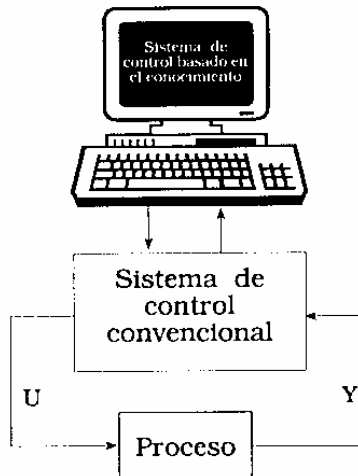


Figura 22. Estructura de un sistema de control supervisor.

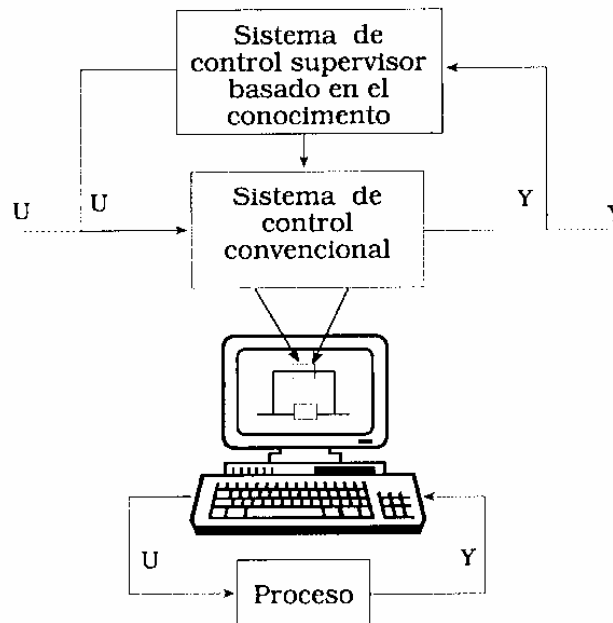
*b.ii. Arquitectura de implementación de un control supervisor*

Dependiendo del modo de integrar el sistema de control basado en el conocimiento, éstos pueden ser: conectados o integrados (Konstantinov et al., 1993). Los sistemas conectados son aquellos en que un ordenador está dedicado a la tarea de supervisión, el cual está conectado a un sistema de control convencional, generalmente ya existente. De este modo las dos partes son independientes, tanto en el software como en el hardware, como se puede apreciar en la Figura 23.



**Figura 23.** Esquema de implementación de un sistema basado en el conocimiento conectado.

En los sistemas integrados, el propio ordenador realiza las dos funciones, es decir, posee el módulo de control basado en el conocimiento y los protocolos del control convencional. En la Figura 24 se presenta un esquema de este tipo de sistema.



**Figura 24.** Esquema de implementación de un sistema basado en el conocimiento integrado.

### 3.3. Metodologías de control avanzado

Dentro de las metodologías de control avanzado se pueden mencionar la modelación del proceso mediante: modelos empíricos funcionales, redes neuronales, algoritmos genéticos, lógica difusa (fuzzy logic), sistemas expertos basados en el conocimiento, métodos estadísticos o combinación de éstos, por ejemplo el control híbrido neuronal/fuzzy.

#### a. Modelos funcionales empíricos

Dentro de los modelos funcionales empíricos más utilizados está el modelo lineal, de la forma:

$$y_i = p_{i,0} + p_{i,1} \cdot u_1 + p_{i,2} \cdot u_2 + p_{i,3} \cdot u_3 + \dots + p_{i,m} \cdot u_m$$

Donde:  $y_i$  representa el valor de salida de una variable  $i$  y  $u_j$  el valor de entrada de una variable  $j$  y  $p_{ij}$  son los parámetros del modelo (constantes). Este tipo de modelos es ampliamente utilizado para el estudio de sistemas en estado estacionario (Olsson y Newell, 1999). La utilización de este tipo de modelos está restringido a sistemas lineales, lo que en la práctica no ocurre frecuentemente.

#### b. Redes neuronales

Las redes neuronales están basadas en capas de neuronas interconectadas, según se muestra en la Figura 25. La primera capa de neuronas (capa de entradas) tiene una neurona por cada variable de entrada ( $u_i$ ). Cada neurona de la capa de entrada alimenta con datos a cada una de las neuronas de la segunda capa (capa invisible). La segunda capa alimenta a otras capas invisibles. Finalmente la última capa invisible alimenta a la capa de salida, existiendo tantas neuronas de salida como variables de salida. El número de neuronas en las capas ocultas y el número de capas ocultas se definen de modo arbitrario.

La salida de cada neurona de las capas ocultas viene dada por una expresión de la forma

$$s_j = \sum_{i=1}^n w_{ij} \cdot u_i$$

Donde:  $u_i$  es la entrada  $i$  a la neurona  $j$ ,  $w_{ij}$  es el peso de la variable  $i$  en la neurona  $j$  y  $s_j$  es la suma ponderada de las variables en la neurona  $j$ . Finalmente la salida de la neurona  $j$ , ( $y_j$ ), viene determinada por una ecuación denominada función de activación sigmoideal.

$$y_j = \frac{1}{1 + e^{-s_j}}$$

Todos los valores de  $w_{ij}$  son los parámetros del modelo. En un principio se asignan pesos aleatorios ( $w_{ij}$ ) a las variables y luego se comienza a entrenar la red neuronal, modificando estos pesos en un proceso iterativo, hasta hacer converger los datos entrada-salida reales con los del modelo neuronal. Una vez finalizado el proceso de aprendizaje, el sistema está listo para ser aplicado a casos nuevos.

La ventaja de esta técnica es que puede utilizarse con sistemas lineales o no lineales, pueden representar relaciones dinámicas o estacionarias y no se requiere de un modelo del proceso, sin embargo se requiere de una serie de datos históricos, los que en ocasiones no se pueden tener. En el entrenamiento de la red neuronal se requiere determinar una gran cantidad de parámetros que no cuentan con significado físico (Olsson y Newell, 1999), pero una vez que la red está entrenada, la aplicación del modelo en plantas similares es muy sencilla por lo que la implementación en varias instalaciones industriales se hace muy económica.

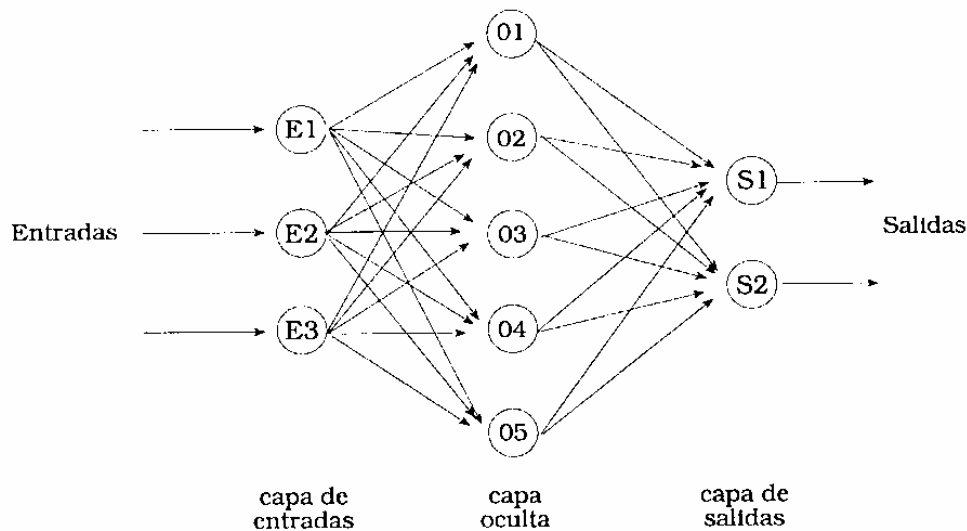


Figura 25. Estructura de una red neuronal con una capa oculta.

### c. Sistemas expertos basados en lógica difusa (Fuzzy logic)

Los sistemas expertos son una metodología de control basado en una serie de reglas de operación previamente descritas por un operador con alta experiencia en el proceso, es lo que se denomina un sistema basado en el conocimiento (SBC) o knowledge based system (KBS). Por lo general las reglas responden a una estructura del tipo “si... y... o... entonces...” (if... and... or... then...). El número de reglas se define arbitrariamente, según la cantidad de conocimiento que se quiera transferir al modelo. En el sujeto de la regla están indicadas las variables de entrada del modelo ( $u$ ) y en el predicado las variables de salida ( $y$ ), por ejemplo, “SI la temperatura es baja ENTONCES conectar la calefacción”.

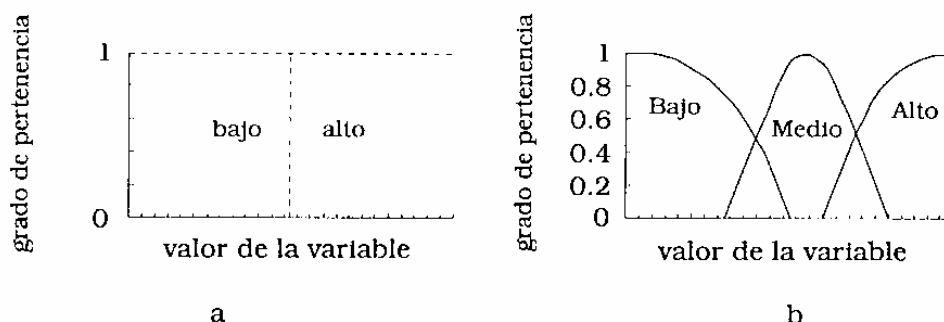
La forma de incorporar los valores de las variables controladas al conjunto de reglas puede hacerse por lógica difusa o por lógica booleana. En este último caso se analizan los valores de estas variables medidas para determinar si pertenecen o no a un subconjunto definido, por ejemplo bien/mal o verdadero/falso, es decir, se determina el valor de pertenencia,  $\mu(x)$ , de la variable medida,  $u$ , a un subconjunto definido previamente, asignando un valor de 0 si no pertenece y 1 si pertenece. Matemáticamente se representa por la siguiente relación, donde A representa el subconjunto analizado:

$$\mu(x) = \begin{cases} 1 & x \in A \\ 0 & x \notin A \end{cases}$$

En el caso de la lógica difusa, los valores de las variables medidas se descomponen en una serie de estados o subconjuntos, denominados etiquetas lingüísticas y se determina el grado de pertenencia de cada variable a cada etiqueta lingüística, generando una respuesta continua en todo el intervalo  $[0,1]$ , es decir:

$$\mu(x) \in [0,1]$$

De este modo la lógica booleana es una simplificación de la lógica difusa, cuando las etiquetas lingüísticas son dos y las funciones de pertenencia son cuadradas como se puede apreciar en la Figura 26.



**Figura 26.** Funciones de pertenencia para una variable analizada mediante lógica booleana (a) y lógica difusa (b).

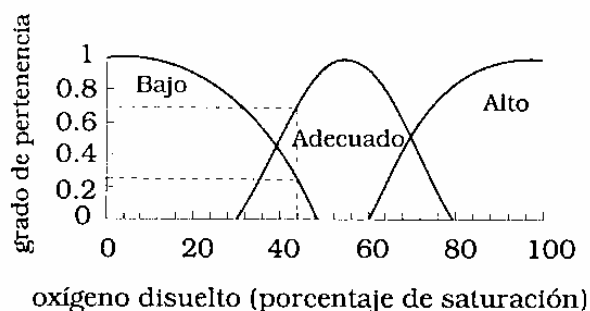
Las funciones de pertenencia en la lógica difusa, pueden ser cuadradas, triangulares, gaussianas o de una forma arbitraria.

La aplicación de la lógica difusa (o motor de inferencia), consta de cinco partes: fuzzificación de las variables de entrada, aplicación de los operadores fuzzy (y-o o AND-OR), implicación del sujeto al predicado de la regla, agregación de los resultados de las implicaciones a través de todas las reglas y desfuzzificación del resultado. En los siguientes apartados se explicarán cada una de estas etapas.

En resumen la lógica difusa es una herramienta que permite expresar matemáticamente, de una forma relativamente sencilla, la experiencia y el conocimiento humano (complicados e intuitivos), algo que resulta imposible mediante el control convencional basado en el análisis científico moderno. La utilización de un lenguaje natural o humano permite además un fácil entendimiento del control difuso por parte del operador de la planta o incluso por parte de personas ajenas a la misma, puesto que el efecto o resultado de cada regla es fácilmente interpretable. La inferencia difusa permite además dirigir operaciones en paralelo y simultáneamente mediante la ejecución de varias reglas de manera que el proceso sea más rápido.

### *c.i. Fuzzificación*

El proceso de cálculo para transformar los valores numéricos de las variables de entrada en valores lingüísticos se denomina fuzzificación y consiste en determinar el grado de pertenencia de la variable a cada subconjunto o etiqueta lingüística, de este modo, una variable puede pertenecer en distintas proporciones a varias etiquetas lingüísticas, por ejemplo en la Figura 27, se puede ver que un valor de oxígeno disuelto de 45% de saturación es: 25% bajo, 75% adecuado y 0% alto, lo que se denomina vector de posibilidad (Olsson y Newell, 1999).



**Figura 27.** Fuzzificación de una variable.

*c.ii. Aplicación de operadores fuzzy*

Como se dijo anteriormente la lógica difusa es una extensión de la lógica booleana, lo que también es válido para la utilización de operadores lógicos. Por ejemplo el operador "y" o intersección (A y B), en lógica difusa es el operador  $\min(A,B)$  que determina el mínimo entre dos subconjuntos. El operador "o" o unión en la lógica booleana (A o B) es el operador  $\max(A,B)$  en la lógica difusa, que determina el valor máximo entre dos subconjuntos A y B. En la Tabla 9 se presentan las equivalencias entre la lógica booleana y la lógica difusa.

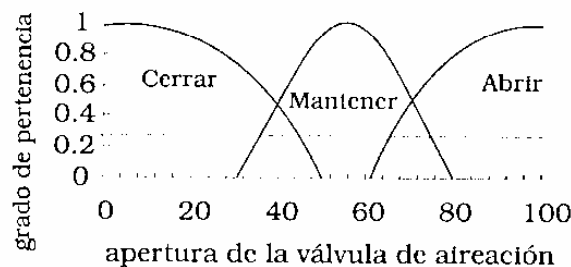
**Tabla 9.** Equivalencia entre los operadores de la lógica booleana y difusa.

Operador		Lógica booleana	Lógica difusa
Intersección	Y	$A \wedge B$	$\min(A,B)$
Unión	O	$A \vee B$	$\max(A,B)$
Complemento	NOT	$\sim A$	$1-A$

Aplicando los operadores fuzzy en el sujeto de la regla se determina el valor de verdad del sujeto. Por ejemplo si la regla dice "si el nivel de oxígeno disuelto es bajo y la aireación es baja, entonces abrir válvula de aireación" y, usando los valores del ejemplo anterior, el nivel de oxígeno disuelto es bajo en un 25% y suponiendo que la aireación es baja en un 60%, entonces el sujeto de la regla se cumple en un 25%, es decir,  $\min(25,60)$ .

*Aplicación del sujeto al predicado de la regla*

La regla general es que si un sujeto se cumple en cierto grado, esto implica que el predicado se cumple también en un cierto grado. Siguiendo el ejemplo anterior, si el sujeto se cumple en un 25%, entonces el predicado ("abrir válvula de aireación") se cumple parcialmente. El operador lógico para esta implicancia es la función  $\min(A,B)$ , donde A es valor de verdad del sujeto y B es la función de respuesta del predicado. En la Figura 28 se ilustra este ejemplo, el área sombreada corresponde a  $\min(25,abrir)$ , es decir, al operador  $\min$  de 25% y de la función "abrir". Por lo tanto el área sombreada corresponde al valor de verdad de la regla estudiada para las condiciones dadas.



**Figura 28.** Aplicación de la implicación del sujeto en el predicado.

*c.iii. Agregación de los predicados a través de todas las reglas*

Supongamos que el motor de inferencia utilizado, posee tres reglas, como la mencionada anteriormente. Una vez realizado los pasos 1, 2 y 3 para cada regla, obtendremos que cada regla se cumple en distinta medida, y el resultado serán tres esquemas como los de la Figura 29. La agregación de predicados con-



siste en sumar las respuestas, generando una respuesta que englobe las tres reglas, es decir se aplica el operador  $\max(A,B,C)$  donde A, B y C son los subconjuntos de respuestas de los predicados de cada una de las reglas.

Por ejemplo, supongamos que las tres reglas son:

1. si el nivel de oxígeno disuelto es bajo entonces abrir válvula de aireación.
2. si el nivel de oxígeno es adecuado, entonces mantener la válvula de aireación.
3. si el nivel de oxígeno es alto, entonces cerrar la válvula de aireación.

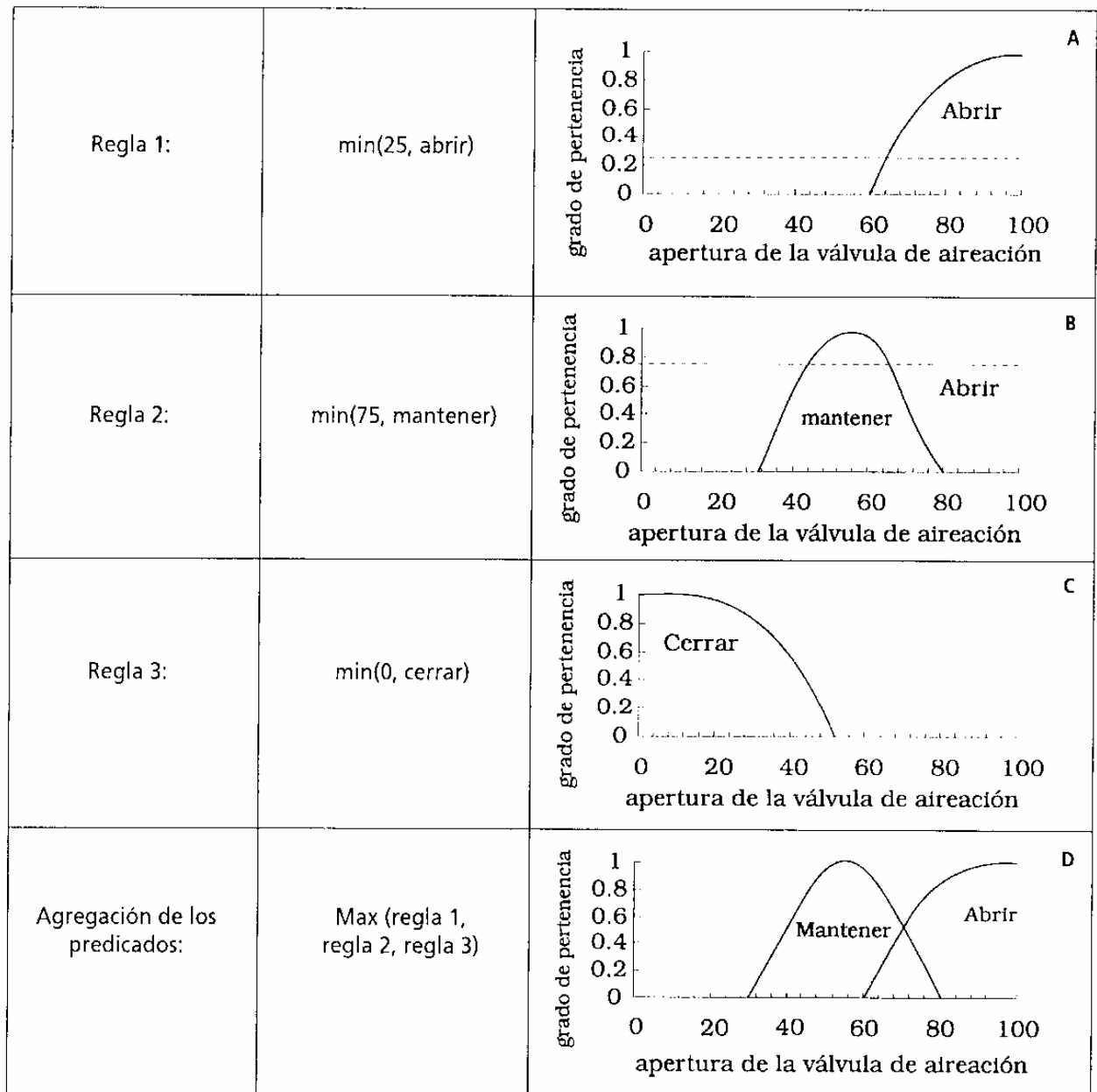


Figura 29. Resultado de la aplicación de tres reglas y de la agregación de los predicados.

Si suponemos, como en el ejemplo anterior, que la condición de operación es de un 45% de saturación del oxígeno disuelto, entonces el vector de posibilidad es de (25; 75; 0). Al analizar los tres sujetos, los valores de verdad de cada uno de ellos es (25; 75; 0). Ya que no hay operaciones lógicas en los sujetos de las reglas, el valor de verdad es igual al vector de posibilidad. Aplicando estos valores de verdad de los sujetos a los predicados se obtienen las Figuras 29-a, b y c. Finalmente se aplica el operador max, para realizar la agregación de los predicados, obteniendo la Figura 29-d.

#### c.iv. Defuzzificación

La última etapa en la máquina de inferencia es la defuzzificación, que consiste en transformar el subconjunto resultado de la agregación de predicados a un valor numérico. La metodología más utilizada es la del centroide, que consiste en determinar el punto central del área bajo la curva de respuesta. Esto implica realizar una integración a través de la curva respuesta para determinar el punto medio. En la Figura 30 se presenta el ejemplo anterior, se puede ver que el centroide determina una apertura de la válvula de aireación de un 60%, es decir, para las condiciones dadas, de un 45% de saturación de oxígeno disuelto, el motor de inferencia propone una apertura de la válvula de aireación al 60%.

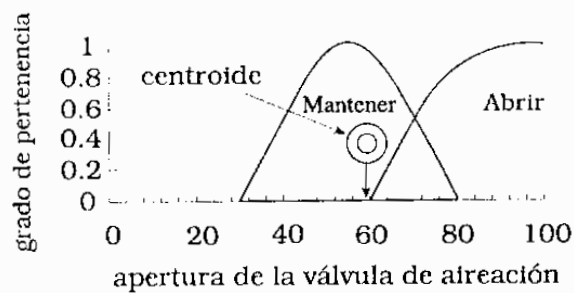


Figura 30. Determinación del centroide de una curva respuesta de la agregación de predicados.

Como se puede apreciar, se ha desarrollado un sistema de control para el nivel de oxígeno disuelto, sin la necesidad de un modelo del proceso, sino mediante el conocimiento del mismo y de la experiencia que un experto pueda entregar para desarrollar las funciones de pertenencia y para elaborar el listado de reglas. La ventaja de esta técnica es que se aprovecha al máximo la experiencia del operador y se facilita la interacción operador-máquina al utilizar valores lingüísticos, propios del razonamiento humano (Zadeh, 1965). Los sistemas expertos basados en lógica difusa se presenta como una gran alternativa para procesos en los cuales existe una alta experiencia operacional y cuando el proceso es muy complejo o los modelos son demasiado complejos y no lineales (Olsson y Newell, 1999).

## 4. CONTROL Y MONITORIZACIÓN DE PROCESOS DE TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES

### 4.1. Aspectos generales

El tratamiento anaerobio es un proceso complejo en el que intervienen diferentes microorganismos y rutas metabólicas (Lema et al., 1991; Renard et al., 1988), que constituye una tecnología válida para el tratamiento de aguas residuales concentradas (Fernández et al., 1995; Steyer et al., 1995), sin embargo, el control aplicado a procesos anaerobios está prácticamente restringido al control de las variables ambientales, como pH, temperatura, etc., (Heinzle et al., 1993), empleando controladores simples de tipo on-off o PID (proporcional integral derivativo).

En este sentido se han propuesto alternativas de control empleando un número de variables limitadas y con estrategias simples de actuación. Buffière *et al.* (1995) emplearon el pH y el caudal de gas para operar un lecho fluidizado, consiguiendo un incremento de la VCO desde 35 hasta 105 kg DQO/m<sup>3</sup>.d en menos de 5 días sin desestabilizar el reactor, y permitiendo al sistema adaptarse a los cambios en la concentración del influente.

El problema de automatización de los procesos biotecnológicos se debe a que los analizadores on-line de variables fundamentales del proceso, como la DQO o la alcalinidad, no existen en el mercado, o bien son sistemas con un coste demasiado alto para su aplicación de forma extensiva. Por otro lado, resulta difícil obtener una medición fiable del estado o de la concentración de microorganismos presentes en el reactor, con lo que solamente se pueden establecer las condiciones de operación óptimas de forma empírica. Estas pueden ser las razones de que en los últimos tiempos se haya dedicado una importante actividad investigadora al desarrollo y mejora de sistemas de monitorización, diagnóstico y en general control de procesos anaerobios (Henze, 1997; Lorenzo *et al.*, 1998; Puñal, 1999a; Puñal *et al.*, 1999b, Puñal *et al.*, 2001a; Ruiz *et al.*, 2005; Ruiz, 2005). Los sistemas de control de procesos empleados a escala industrial son de tipo simple como se mencionó anteriormente y, en la mayoría de los casos, se opera de forma manual. Sin embargo, las plantas de tratamiento de aguas residuales pueden ser operadas adecuadamente por expertos familiarizados con el proceso, lo que indica que se trata de una tarea de conocimiento intensivo (Puñal *et al.*, 2002). En este sentido, es importante disponer de un sistema que tenga capacidad para aportar toda la información posible sobre el estado de la planta. Esta información permitiría establecer las bases del sistema de diagnóstico y las consiguientes acciones de supervisión y control en lazo cerrado.

La mayoría de las estrategias de control se basan en la monitorización de un número de indicadores del proceso que suministran información complementaria (Switzenbaum *et al.*, 1990; Vanrolleghem, 1995; Ruiz, 2005). Durante los últimos años, se hicieron una serie de esfuerzos para encontrar mejores indicadores de la monitorización del proceso (Denac *et al.*, 1988; Switzenbaum *et al.*, 1990; Guiot *et al.*, 1995; Guwy *et al.*, 1995; Vanrollenghem, 1995), haciendo especial hincapié en las variables que aportan información sobre la fase gas (Ruiz *et al.*, 2005). Un indicador ideal sería aquel que fuese fácil de medir, que estuviese disponible en tiempo real y en una base on-line y, por supuesto, que tenga un significado intrínseco que refleje el estado metabólico del sistema en el momento de medida (Switzenbaum *et al.*, 1990). De acuerdo con eso, la información fiable sobre el sistema para poder llevar a cabo el control, resulta de la combinación de los datos disponibles on-line, de las medidas intermitentes off-line y de un mayor conocimiento y entendimiento de los mecanismos microbianos (Hickey *et al.*, 1991).

Un acercamiento al examen de los posibles indicadores del estado del sistema y de los parámetros de control podría basarse en la fase de proceso a la que corresponden los mismos.

#### *a. Fase sólida*

Las medidas de la fase sólida, como la determinación de los parámetros cinéticos de la biomasa o los tests de actividad metanogénica serían de gran importancia, ya que están estrictamente relacionados con el comportamiento de la biomasa, pero desafortunadamente su determinación no se puede llevar a cabo on-line ni en una base de tiempo real (Switzenbaum *et al.*, 1990; Hickey *et al.*, 1991).

#### *b. Fase líquida*

Los parámetros de la fase líquida son los más comúnmente empleados (Soto *et al.*, 1993a; Soto *et al.*, 1993b). Las medidas de pH, AGV, y alcalinidad permiten identificar desestabilizaciones del sistema y su capacidad tampón. La concentración de sustrato, expresada como COT o DQO, no está considerada como de suficiente poder discriminatorio para poder detectar un estado de inestabilidad (Weiland y Rozzi, 1991).

El pH tiene efectos importantes sobre la actividad bacteriana, y así se ha desarrollado instrumentación para su medida on-line que está siendo empleada actualmente. Sin embargo, el pH no es un parámetro muy sensible y su variación, condicionada por la capacidad tampón del sistema (Rozzi, 1991), es, en realidad, el resultado de un desequilibrio avanzado, y por lo tanto no resulta útil como indicador preventivo de alarmas (Switzenbaum *et al.*, 1990).

Los AGV se acumulan cuando la acidogénesis y la metanogénesis presentan un desequilibrio, lo que es típico de situaciones de estrés. Existen algunas propuestas de métodos de determinación de AGV on-line (Powell y Archer, 1989; Rozzi *et al.*, 1985). Algunos autores (Switzenbaum *et al.*, 1990) consideran que la monitorización de AGV sería útil solamente en el caso de desestabilizaciones de evolución lenta, y, por lo tanto, inadecuados para sistemas de alta carga, ya que solamente se podría apreciar la variación de la concentración cuando la desestabilización está en un estado avanzado.

El descenso de alcalinidad es directamente proporcional al incremento de concentración de AGV y por lo tanto al grado de desestabilización del reactor: la relación AI/AT (Alcalinidad Intermedia/Alcalinidad Total) está estrictamente relacionada con la acumulación de AGV. Una concentración suficiente de alcalinidad funcionaría como medio preventivo contra los cambios de pH y contra la interrupción de la metanogénesis, y ese es el motivo por el que habitualmente se suministra bicarbonato al medio. Esto puede suponer un coste relevante en el proceso (Speece, 1996) y, por lo tanto, una razón para que se implemente un sistema de control de alcalinidad (Guwy *et al.*, 1997).

Varios autores (Powell y Archer, 1989; Hawkes *et al.*, 1993; Hawkes *et al.*, 1994; Guwy *et al.*, 1995; de Haas y Adam, 1995) estudiaron y probaron dispositivos para su monitorización on-line y afirman que la monitorización de la alcalinidad es una herramienta útil para detectar sobrecargas de forma rápida, empleándola como parámetro de control en la digestión anaerobia (Ripley *et al.*, 1986; Moosbrugger *et al.*, 1993a; Moosbrugger *et al.*, 1993b; de Haas y Adam, 1995; Wilcox *et al.*, 1995; Buchauer, 1998). Sin embargo, algunos autores consideran que la evolución de la alcalinidad ante una desestabilización no es lo suficientemente rápida como para ser un indicador eficaz. Switzenbaum *et al.* (1990) sostienen que la utilidad de la alcalinidad no está establecida cuando se trabaja en sistemas que pueden estar sometidos a estrés provocados por sustancias tóxicas.

Aunque la caracterización de la fase líquida está reconocida como la fuente de indicadores más adecuados sobre el estado del sistema, y existe mucho trabajo realizado en esa dirección para implementar estos indicadores on-line, algunos investigadores (Switzenbaum *et al.*, 1990) objetan que las variaciones de estos parámetros son el resultado de desequilibrios que deben ser evitados y consideran que las técnicas de medida actuales son problemáticas a largo plazo porque necesitan de calibración y mantenimiento.

### c. Fase gas

Los indicadores de la fase gas han sido adaptados para la monitorización on-line de forma generalizada, ya que no existen los problemas que trae consigo la toma y preparación de la muestra, que afecta a los parámetros de la fase líquida. La producción de gas y la composición de metano son especialmente buenos indicadores del estado del reactor (Hickey *et al.*, 1991; Puñal *et al.*, 2001b). Así, por ejemplo, un descenso en la producción de metano con respecto a la carga orgánica del influente, indica un exceso de AGV en la fase líquida. Algunos autores (Switzenbaum *et al.*, 1990; Hickey *et al.*, 1991) opinan que la variación de la producción de metano solamente es apreciable cuando la desestabilización del proceso ya está en un estado avanzado. Además las variaciones en la producción de metano deben interpretarse comparándolas con la carga orgánica del influente (Switzenbaum *et al.*, 1990) y están indirectamente relacionadas con la alcalinidad del bicarbonato, ya que afecta a la producción de CO<sub>2</sub> (Rozzi, 1991).

Otros componentes de la fase gas presentes en pequeñas cantidades, como CO o H<sub>2</sub>, están considerados indicadores interesantes ya que se trata de productos intermedios que podrían ser utilizados para

establecer alarmas de situaciones de desequilibrio entre los grupos tróficos, antes de que se llegue a un estado de desestabilización en el sistema (Ruiz, 2005). El tiempo de respuesta teórico para diferentes sustancias se muestra en la Tabla 10 (Switzenbaum et al., 1990).

Se han obtenido resultados interesantes con este tipo de indicadores traza, aunque debido al conocimiento incompleto del comportamiento de los microorganismos dentro del digester, y a que su papel en las rutas metabólicas no está perfectamente definido, es necesario el uso de estos indicadores traza conjuntamente con los indicadores convencionales del estado del proceso (Denac et al., 1988; Switzenbaum et al., 1990; Hickey et al., 1991; Guiot et al., 1995; Guwy et al., 1995; Vanrollenghem, 1995).

**Tabla 10.** Tiempo de respuesta teórico para diferentes indicadores de la fase gas.

Sustancia	Tiempo de respuesta
H <sub>2</sub>	15 s
CO <sub>2</sub>	1 h
Acetato	2 h
Propionato	4 h
CH <sub>4</sub>	2 d
CO	(*)

(\*) Posiblemente relacionado con el del H<sub>2</sub>

El Hidrógeno está presente en cantidades en un rango de 15-200 ppm en estado estacionario (Soto et al., 1993a; Soto et al., 1993b). Se trata de un producto intermedio importante en la fermentación del metano, siendo generado por las bacterias formadoras de ácidos durante la hidrólisis de los carbohidratos y de otros substratos, y la posterior oxidación de los ácidos grasos de elevado peso molecular. El hidrógeno es consumido por las bacterias productoras de metano consumidoras obligadas de hidrógeno (Hickey y Switzenbaum, 1991).

Varios investigadores encontraron que un incremento en la concentración de H<sub>2</sub> precede a un estado de desequilibrio en el reactor (Moletta, 1998); eso podría hacer del hidrógeno un indicador de desestabilización excepcional (Ruiz, 2005). Por otro lado algunos autores (Hawkes et al., 1994) objetan que la monitorización del hidrógeno es relativamente cara y solamente aplicable en condiciones controladas a escala de laboratorio. Además Speece (1996) observó que no existe variación de H<sub>2</sub> (acumulación) cuando se produce inhibición por la presencia de algún tipo de tóxico. Finalmente, la razón de los cambios en la concentración de hidrógeno no es siempre evidente (Switzenbaum et al., 1990).

El CO está presente en la fase gaseosa en concentraciones en un rango de 10-100 ppm (Soto et al., 1993a; Soto et al., 1993b) y se piensa que está relacionado con la conversión del acetato a metano. Hickey y Switzenbaum (1991) observaron la estrecha relación entre los AGV y el CO durante unos experimentos realizados a escala laboratorio con lodo activado. La monitorización del CO parece ser una estrategia interesante para poder controlar los procesos anaerobios. Sin embargo, se necesitaría realizar más trabajo para confirmar esta suposición (Hickey y Switzenbaum, 1991).

**REFERENCIAS**

- APHA. (1992). Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters. Washington DC, American Public Health Association.
- Aynsley, M., Hofland, A., Morris, A.J., Montague, G.A. and Di Massimo, C. (1993). Artificial intelligence and the supervision of bioprocesses (Real time knowledge based systems and neural networks). *Advances Biochem. Eng. Biotechnol.* 48,1-27.
- Baeza, J., Gabriel, D. and Lafuente, J. (2002). In-line fast OUR (oxygen uptake rate) measurements for monitoring and control of WWTP. *Wat. Sci. Technol.* 45(4-5), 19-28.
- Buchauer, K. (1998). A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste-water and sludge treatment processes. *Water S.A.* 24(1), 49-56.
- Buffière, P., Steyer, J.P. and Moletta, R. (1995). A new control strategy for highly loaded anaerobic digestion processes. In: *Proceedings of International Workshop on Monitoring and Control of Anaerobic Digestion Process*, 85-89. December, 6-7<sup>th</sup>. Narbonne, France.
- CEN. (1997). Water analysis: Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC). European Committee for Standardization. EN-1487:1997.
- De Haas, D. W. and Adam, N. (1995). Use of a simple titration procedure to determine H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> alkalinity and volatile fatty acids for process control in waste-water treatment. *Water S.A.* 21(4), 307-318.
- Denac, M., Griffin, K., Lee, P.L. and Greenfield, P.F. (1988). Selection of controlled variables for a high rate anaerobic reactor. *Environ. Technol. Letters.* 9(10), 1029-1040.
- Endress Hauser. (1993) *Aguas residuales. Medicion y automatización.* Endress Hauser International, Reinachm Suiza.
- Fernández, J.M., Méndez, R. and Lema, J.M. (1995). Anaerobic treatment of Eucalyptus fibreboard manufacturing wastewater by a hybrid USBF lab-scale reactor. *Environ. Technol.* 16(7), 677-684.
- Guiot, S.R., Frigon, J.C. and Tartakivzky, B. (1995). Hydrogen as a key-parameter for control of anaerobic digesters: liquid- versus gas-phase monitoring. In: *International Workshop on Monitoring and Control of Anaerobic Digestion*. December, 6<sup>th</sup>-7<sup>th</sup>. Narbonne, France.
- Guwy, A.J., Hawkes, D.L., Hawkes, F.R. and Rozzi, A.G. (1995). Characteristics of a prototype industrial on-line analyser for bicarbonate/carbonate monitoring. *Biotechnol. Bioeng.* 44(11), 1325-1330.
- Guwy, A.J., Hawkes, F.R., Wilcox, S.J. and Hawkes, D.L. (1997). Neural network and on-off control of bicarbonate alkalinity in a fluidised-bed anaerobic digester. *Water Res.* 31(8), 2019-2025.
- Hawkes, F.R., Guwy, A.J., Rozzi, A.G. and Hawkes, D.L. (1993). A new instrument for on-line measurement of bicarbonate alkalinity. *Water Res.* 27(1), 167-170.
- Hawkes, F., Guwy, A., Hawkes, D. and Rozzi, A. (1994). On-line monitoring of anaerobic digestion: application of a device for continuous measurement of bicarbonate alkalinity. *Wat. Sci. Technol.* 30(12), 1-10.
- Heinzel, E., and Dunn, I. (1993). Methods and instruments in fermentation gas analysis. *Advances Biochem. Eng. Biotechnol.* 48, 27-74.
- Henze, M. (1997). Trends in advanced wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 35(10), 1-4.
- Hickey, R.F. and Switzenbaum, M.S. (1991). The response and utility of hydrogen and carbon monoxide as process indicators of anaerobic digesters subject to organic and hydraulic overloads. *Research Journal WPCF.* 63(2), 129-140.
- Hickey, R.F., Wu, W.M., Veiga, M.C. and Jones, R. (1991). Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic systems. *Water Sci. Technol.* 24(8), 207-255.
- Konstantinov, K.B., Aarts, R. and Yoshida, T. (1993). Expert Systems in bioprocess control: requisite features. In: Fiechter A. (Ed.). *Advances Biochem. Eng. Biotechnol.* 48, 169-191. Springer-Verlag. Berlin, Germany.
- Lema, J.M., Méndez, R., Iza, J., García, P. and Fernández-Polanco, F. (1991). Chemical reactor engineering concepts in design and operation of anaerobic treatment processes. *Wat. Sci. Technol.*, 24(8), 79-86.

- Lim, H. and Lee K. (1991). *Biotechnology: measuring, modelling and control*. Vol. Ed. K. Schugerl. 1991. VCH Publishers Inc. New York, USA
- Lorenzo, A., Puñal, A., Roca, E., Hernández, C. and Lema, J.M. (1998). A PLC-PC real time data acquisition and supervision system for industrial wastewater treatment plants. In: *Proceedings of International Workshop on Decision and Control in Waste Bio-Processing*. (on CD-ROM). February, 25-27<sup>th</sup>. Narbonne, France.
- Moletta, R. (1998). Anaerobic digestion monitoring and control. In: *Fifth Latin-american Workshop-Seminar Wastewater Anaerobic Treatment*. October, 27-30<sup>th</sup>. Viña del Mar, Chile.
- Moosbrugger, R.E., Wentzel, M.C., Ekama, G.A. and Marais, G.v.R. (1993a). Lauter tun (brewery) waste in UASB systems – Feasibility, alkalinity requirements and pH control. *Water S.A.* 19(1), 41-52.
- Moosbrugger, R.E., Wentzel, M.C., Loewenthal, R.E., Ekama, G.A. and Marais, G.v.R. (1993b). Alkalinity measurement: Part 3 – A 5 pH point titration method to determine the carbonate and SCFA weak acid/bases in aqueous solution containing also known concentrations of other weak acid/bases. *Water S.A.* 19(1), 29-40.
- Olsson, G. and Newell, B. (1999). *Wastewater treatment systems: Modelling, diagnostic and control*. IWA publishing. London, U.K.
- Powell, G.E. and Archer, D.B. (1989). On-line titration method for monitoring buffer capacity and total volatile fatty acid levels in anaerobic digesters. *Biotechnol. Bioeng.* 33(5), 570-577.
- Puñal, A. (1999a). Estrategias de arranque, operación y control de digestores anaerobios. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Puñal, A., Lorenzo, A., Roca, E., Hernández, C. and Lema, J.M. (1999b). Advanced monitoring of an anaerobic pilot plant treating high strength wastewaters. *Wat. Sci. Technol.* 40 (8), 237-24.
- Puñal, A., Rodríguez, J., Franco, A., Carrasco, E.F., Roca, E. and Lema, J.M. (2001a). Advanced monitoring and control of anaerobic treatment plants: Diagnosis and Supervision by a Fuzzy-Based Expert System. *Wat. Sci. Technol.* 43(7), 191-198.
- Puñal, A., Melloni, P., Roca, E., Rozzi, A. and Lema, J.M. (2001b). Automatic start-up of UASB reactors. *J. Environ. Eng.* 127(5), 397:402.
- Puñal, A., Roca, E. and Lema, J.M. (2002). An expert system for monitoring and diagnosis of anaerobic wastewater treatment plants. *Wat. Res.* 36,2656-2666.
- Renard, P., Dochain, R., Bastin, G., Naveau, H. and Nyns, E. J. (1988). Adaptive control of anaerobic digestion process. A pilot-scale application. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 287-294.
- Reyero, R. y Nicolás, C.F. (1995) Sistemas de control basados en lógica difusa: "Fuzzy control". Omron Electronics S.A. Centro de Investigaciones Tecnológicas IKERLAN, Madrid, España.
- Ripley, L.E., Boyle, J.C. and Converse, J.C. (1986). Improved alkalimetric monitoring buffer capacity and total volatile fatty acid levels in anaerobic digestion of high-strength wastes. *JWPCF.* 58(5), 406-411.
- Rosén, Ch. (1998). *Monitoring Wastewater treatment Systems*. PhD Thesis. Department of Industrial Electrical Engineering and Automattion. Lund Institute of Technology. Lund University.
- Rozzi, A. (1991). Alkalinity considerations with respect to anaerobic digesters. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv.* 56(4a), 1499-1514. Gent, Belgium.
- Rozzi, A., Di Pinto, A.C. and Brunetti, A. (1985). Anaerobic process control by bicarbonate monitoring. *Environ. Technol. Lett.* 6, 594-601.
- Ruiz, G.; Castellano, M.; González, W.; Roca, E. and Lema, J.M. (2005). Transient state detection and prediction of organic overload in anaerobic digestion process using statistical tools. In: M-N Pons and J. van Impe (Eds). *Computer application in Biotechnology 2004*. Elsevier, London pp. 357-362.
- Ruiz, G. (2005). Monitorización y control avanzado de Reactores Anaerobios. Serie Tesis Doctorales. Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos. Lápicos 4. Santiago de Compostela, España.
- Schurbuscher, D. and Wandrey, C. (1991). *Biotechnology: measuring, modelling and control*. Vol. Ed. K. Schugerl. VCH Publishers Inc. New York, USA.

- Smith, C. y Corripio, A. (1991) Control automático de procesos: Teoría y práctica. Limusa S.A. México.
- Soto, M., Méndez, R. and Lema, J.M. (1993a). Operacion y control de digestores anaerobios (I). Ing. Quim. 25(294), 467-474.
- Soto, M., Méndez, R. and Lema, J. M. (1993b). Operacion y control de digestores anaerobios (II). Ing. Quim. 25(295), 131-136.
- Spanjers, H., Vanrollenghem, P., Olsson, G. and Dold, P. (1998). Respirometry in control of the activated sludge process: principles. IAWQ scientific and technical report N° 7.
- Speece, R.E. (1996). Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters. Archae Press, USA.
- Stephanopoulos, G. (1984) Chemical process control: An introduction to theory and practice. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. USA.
- Steyer, J.P., Rolland, D., Bouvier, J.C. and Moletta, R. (1997). Hybrid fuzzy neural network for diagnosis - Application to the anaerobic treatment of wine distillery wastewater in a fluidized bed reactor. Water Sci. Technol. 36(6/7), 209-217.
- Switzenbaum, M.S., Giraldo-Gomez, E. and Hickey, R.F. (1990). Monitoring of the anaerobic methane fermentation process. Enzyme Microb. Tech. 12(10), 722-730.
- Vanrolleghem, P.A. (1995). Sensors for anaerobic digestion: an overview. In: International Workshop on Monitoring and Control of Anaerobic Digestion. December, 6<sup>th</sup>-7<sup>th</sup>. Narbonne, France.
- Weiland, P. and Rozzi, A. (1991). The start-up, operation and monitoring of high-rate anaerobic treatment systems: Discusser's report. Water Sci. Technol. 24(8), 257-277.
- Wilcox, S.J., Hawkes, D.L., Hawkes, F.R. and Guwy, A.J. (1995). A neural network, based on bicarbonate monitoring, to control anaerobic digestion. Water Res. 29(6), 1465-1470.
- Wilson, J.A. (1991). Measurement and control in bioprocessing. Ed. K.G.Carr-Brion. Elsevier science publishers Ltd, England
- Zadeh, L.A. (1965). Fuzzy sets. Information and control. 8, 338.
- Ziegler, J.G. and Nichols, N.B. (1942). Optimum setting for automatic controllers. Trans ASME.64:759-768.



## **Capítulo 7**

# TECNOLOGÍAS LIMPIAS Y TRATAMIENTO DE RESIDUOS

Rolando Chamy M.  
María Elvira Zúñiga H.  
David Jeison N.

## **1. ASPECTOS GENERALES SOBRE TECNOLOGÍAS LIMPIAS**

### **1.1. Desarrollo, medio ambiente y tecnologías limpias**

El desarrollo económico-social es en su esencia un proceso de transformación del ambiente natural y, como tal, implica un factor de interferencia con éste y con las leyes naturales que lo rigen. Importante es entonces, mantener un balance apropiado entre lo deseable para el desarrollo y lo necesario para la mantención del equilibrio ecológico. Por ejemplo, el agua es factor de desarrollo y está ampliamente reconocido y demostrado que un plan de manejo del recurso constituye la base de cualquier planificación territorial que contemple el desarrollo en términos generales, conservando las exigencias de protección del medio ambiente.

Los problemas ambientales se han originado, generalmente, porque se planifica el desarrollo económico-social sin considerar el impacto en el medio ambiente que conlleva este desarrollo.

Esta preocupación por el medio ambiente se ha vinculado al desarrollo de la ciencia y la tecnología y ha tenido un crecimiento espectacular. La investigación y el desarrollo de procesos adecuados para la conservación del medio ambiente, ya sea en el tratamiento de residuos sólidos, líquidos o gaseosos, o la implementación de tecnologías limpias han aportado soluciones claras a algunos problemas y permiten entrever en otros casos, soluciones tecnológicamente posibles a un costo relativamente bajo, e incluso con beneficios económicos directos.

Dentro de la gran variedad de problemas que se presentan en esta área, la generación de tecnologías para la producción limpia ha sido de los últimos tomados en cuenta. Hoy en día, la gran mayoría de los países desarrollados cuentan con una legislación que incentiva a la industria a realizar innovaciones en los procesos para la minimización y prevención en la generación de residuos. Por tanto, es importante en países en vías de desarrollo, contar con una legislación similar en cuanto al control de la contaminación y vincular, de alguna manera, todas las instituciones, que puedan aportar a las investigaciones y desarrollos de procesos pertinentes.

Existe creciente interés en la industria por la aplicación de este tipo de tecnologías. Los recientes niveles de contaminación como consecuencia del acelerado desarrollo industrial y la conciencia pública del problema, permiten visualizar la adopción a corto plazo en muchos países de medidas legales más

estrictas para el control y sanción de la emisión industrial de contaminantes. Ello pone de relevancia la trascendencia de los trabajos, políticas y proyectos desarrollados en esta área.

Estos cambios tecnológicos involucran tanto una modificación de procesos como una adecuada selección de materias primas e insumos. Esto último trae consigo una reducción en el volumen de contaminación durante la fase de manufactura, de tal manera que el producto terminado tiene menos impacto sobre el medio ambiente. También es importante producir un producto en sí menos contaminante de tal manera de aumentar su vida útil y favorecer su disposición. Esta etapa puede incluir acciones tales como el desarrollo de productos que requieran menos químicos, con mayor calidad y durabilidad, o la incorporación de un análisis del ciclo de vida del producto, que incluya alternativas para el uso y disposición final de éste.

Por otro lado, los cambios de proceso involucran la modificación de algunas o todas las operaciones con el objetivo de disminuir la contaminación en origen. Se pueden mencionar cambios en las materias primas o en la tecnología. Lógicamente, se requieren acciones de gestión productiva orientadas al área ambiental, entre las cuales se incluyen la realización de cursos de capacitación a fin de crear conciencia sobre un trabajo ecológicamente seguro. Además, se deben generar procedimientos de control orientados tanto desde un punto de vista productivo como ambiental.

Como ya se ha mencionado, siempre va a ser una buena estrategia aplicar técnicas de prevención en vez de centrar todos los esfuerzos en tratar y/o disponer los residuos. No obstante lo anterior, el adecuado tratamiento de los residuos forma parte de las tecnologías limpias, requiriéndose sin lugar a dudas desarrollar alternativas específicas para cada problema en particular. Se debe pensar en tecnologías que permitan, por ejemplo, la recuperación de subproductos o la reutilización del agua.

## 1.2. Innovación tecnológica y desarrollo

Resulta fundamental el desarrollo de políticas para la innovación tecnológica, única manera de encarar la segunda fase exportadora y el desarrollo futuro de los países en vías de desarrollo. Para seguir creciendo se requiere producir productos que generen un mayor valor agregado, pero esto no se logra **comprando** tecnología, se logra **desarrollando** tecnología. El aumento de productividad asociado a la adquisición de tecnología, no genera ventajas competitivas frente a quienes la desarrollan, por el contrario, siempre generan dependencia.

No se deben confundir términos tales como “implementar tecnología de punta”, “automatizar”, “informatizar” con “innovación tecnológica”. Si bien todo lo indicado es importante, necesariamente para crecer a un ritmo importante se debe pensar en términos tales como “crear”, “innovar”, “nosotros podemos”. Siempre hay voces que indican que no hay que preocuparse de la tecnología ya que ésta se compra y que lo importante es vender, sin embargo siempre es más rentable vender tecnología y no productos derivados de ella.

Entre los cambios tecnológicos más importantes e imperativos que debe adoptar la industria, están los asociados a las tecnologías limpias que no sólo aumentan la productividad sino que permiten mantenerse e integrarse en el mercado externo, cada vez más exigente en los aspectos del cuidado del medio ambiente.

La implementación de tecnologías limpias necesariamente requieren de una serie de aspectos relevantes que es de suma importancia implementar:

- a) Generar herramientas para el incentivo de la Innovación Tecnológica
- b) Generar conciencia de que los proyectos asociados a tecnologías limpias son en su mayoría proyectos rentables en el corto o mediano plazo

- c) Las empresas deben generar políticas internas para el desarrollo de la innovación tecnológica, en donde estén involucrados todos los estamentos
- d) Debe existir una acción concertada para lograr una real concientización del problema
- e) Debe asegurarse la existencia de una asesoría externa que no esté comprometida con soluciones
- f) Debe reflejarse claramente, a través de una buena difusión, la importancia económica directa que tienen estas tecnologías

Las tecnologías limpias tienen una indudable importancia ambiental ya que no sólo disminuyen los costos de tratamiento sino que además permiten obtener un mayor precio de venta por marketing ambiental, dan seguridad a la empresa frente a posibles denuncias ambientales, permiten un trabajo seguro y generan un cambio de procesos hacia tecnologías no contaminantes.

Cuando se habla de tecnologías limpias se incluyen cambios en los procesos orientados a la minimización y revalorización de residuos, a la gestión interna de residuos, a la adecuada selección de sistemas de tratamiento y directamente a cambios de tecnologías. No hay que olvidar la necesidad de cambiar la mentalidad a través de una adecuada capacitación y el nombramiento de gestores ambientales al interior de la industria.

Finalmente, es preciso referirse al tema del tratamiento de los residuos, en donde debe generarse una acción mancomunada con la autoridad para generar sistemas más económicos y de mayor productividad, desarrollados para cada empresa en particular. En este punto es posible reducir notablemente los costos de tratamiento desarrollando tecnología propia sin necesidad de comprar tecnología que no necesariamente generará los resultados esperados. Además, se debe propender a generar sistemas que incluyan la optimización energética y el fomento de fuentes renovables de energía.

### 1.3. La industria del futuro y las tecnologías limpias

El futuro se vislumbra con una presión ambiental creciente y con un país que requiere de innovación tecnológica si es que quiere superar los niveles actuales de desarrollo, sin innovación tecnológica es imposible el desarrollo futuro del país. Estos dos factores hacen que la innovación tecnológica dirigida hacia las tecnologías limpias sea uno de los pilares sobre los cuales el país debe crecer. El estado, los empresarios y el país en general deben proponer e implementar políticas adecuadas. Sin innovación tecnológica no tendremos desarrollo y no existe una real innovación sin tecnologías limpias.

### 1.4. Gestión de efluentes

Las nuevas legislaciones, cada vez más estrictas y punitivas, junto con el aumento de la conciencia ecológica de la ciudadanía, han generado en los últimos años un creciente interés por implementar tecnologías tendientes al tratamiento de efluentes de alta carga orgánica, especialmente aquellos provenientes del sector industrial. Sin embargo, al establecer una estrategia para el control de esta polución, no existen soluciones estándar, ya que dentro de lo general, cada problema posee soluciones particulares.

Lo que realmente existe es una serie de técnicas que se pueden utilizar en cada caso y, por tanto, para establecer la estrategia a seguir, es recomendable recopilar una serie de antecedentes con anterioridad al diseño de un sistema de tratamiento de aguas, tales como el conocimiento del sistema medio ambiental, los flujos de materia y energía y su impacto en la generación de aguas residuales, factores políticos y sociales, etc.

A través de una adecuada gestión de efluentes, se propone una estrategia previa a la selección y diseño de una planta de tratamiento, ya que existe un gran riesgo cuando se aborda un problema de esta na-

turalidad sin el conocimiento cabal de los caudales y cargas contaminantes de cada una de las corrientes generadas. Sin embargo, esta situación es bastante corriente y conduce a sistemáticos fracasos, lo que a su vez implica bajos índices de depuración contribuyéndose a dar una falsa imagen de los sistemas de tratamiento.

Los pasos a seguir, para realizar una adecuada gestión de efluentes, se presentan en la Figura 1:

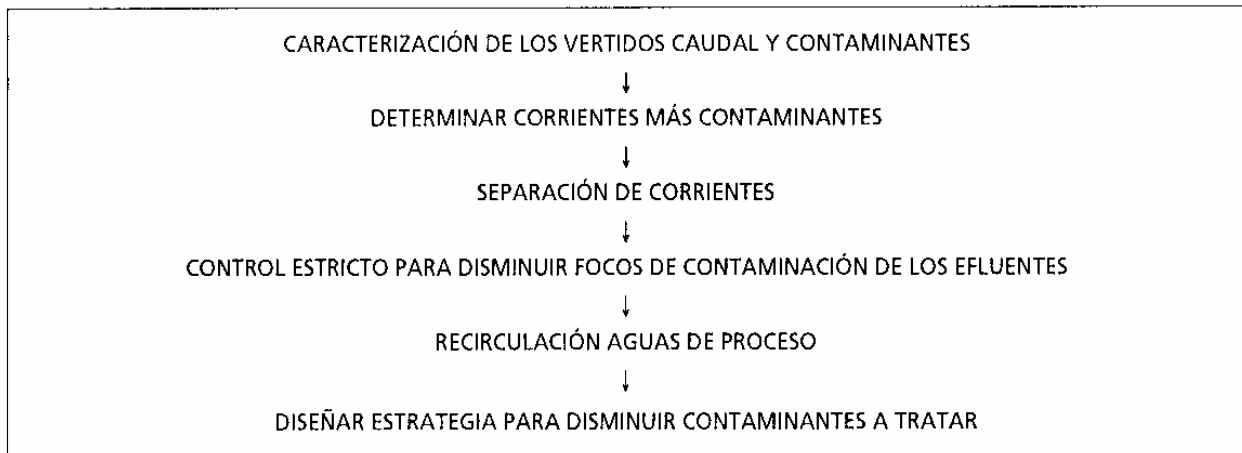


Figura 1. Estrategia de reducción de contaminantes.

Una caracterización previa de los vertidos resulta imprescindible para realizar un diseño conveniente. Un conocimiento sobre los caudales y concentraciones de los contaminantes en las diferentes corrientes, permitirá obtener una información preliminar que indique pautas a seguir.

La estrategia global debe estar orientada a disminuir la calidad de agua y contaminantes a tratar, ojalá incrementando la concentración global de los contaminantes que ingresan al tratamiento, disminuyendo de esta manera, los costos del proceso de depuración.

Bajo este concepto, el agua debe ser considerada como un insumo que hay que cuidar, y no como un efluente a tratar. Para ello, se deben realizar estudios en las diversas industrias a fin de delimitar cuáles son las corrientes más contaminantes, recirculándose lo más posible el agua de proceso. Así por ejemplo, el cierre de circuitos, la separación de aguas, la recirculación interna y el control estricto son medidas que pueden hacer disminuir la contaminación y/o el caudal de agua a tratar, con las ventajas económicas que estas acciones derivan.

Para ilustrar este problema, en la Tabla 1 se mencionan la industria azucarera, conservera de productos marinos y láctea, las cuales con un adecuado plan de gestión de efluentes pueden llegar a reducir en más de un 95% los efluentes a tratar. Cabe mencionar que los ejemplos de la Tabla 1 permiten generalizar el efecto de la gestión sobre la reducción de los efluentes, pero no permiten generalizar los números a otras industrias similares, ya que cada caso debe ser estudiado y analizado en forma individual.

La industria azucarera, con un adecuado plan de gestión de efluentes puede llegar a utilizar 0,2 m<sup>3</sup> de agua/tonelada de remolacha para el lavado y transporte de la materia prima si mantiene el circuito cerrado. Sin embargo, si no se realiza la recirculación, esta cifra llega a 10 m<sup>3</sup> de agua/tonelada de remolacha. Resulta evidente que una planta para tratar 50 veces más agua, resultará mucho más cara e ineficiente.

En la industria conservera de pescado, utilizada en el ejemplo, las aguas de los cocederos contienen el

**Tabla 1.** Reducción del volumen de contaminantes industriales con gestión de los efluentes.

Tipo de efluente	Porcentaje de volumen a tratar	
	Sin Gestión	Con Gestión
Industria Azucarera	100	2
Industria Conservera de Pescado	100	3
Industria Láctea	100	4.1

64,9% de la contaminación, sin embargo, ésta corresponde sólo a un 3% del caudal total de los efluentes. Esto implica que tratando el 3% de las aguas se puede resolver en gran medida el problema de la contaminación.

Por su parte, en la industria láctea, el suero o permeado de suero se une con las aguas de lavado cuya carga orgánica es inferior a la del suero. La separación de estos caudales permitirá tratar sólo aquel volumen de mayor carga orgánica, es decir, el suero, siempre y cuando no se revalorice tal como se sugiere en el acápite siguiente.

### 1.5. Revalorización de los efluentes

Recién concluida la etapa de gestión de efluentes, corresponde actuar sobre la eliminación de los agentes contaminantes. De nuevo se tiene más de una alternativa, por un lado el tratamiento directo y por otro la revalorización de los efluentes, dándole un valor agregado mediante algún tipo de transformación.

En este segundo caso, se trata de estudiar la valoración de subproductos agroindustriales relevantes, por ejemplo a través de la acción específica de biocatalizadores sobre ciertos componentes del subproducto que permitan mejorar sus propiedades funcionales y nutricionales.

Dos de los casos en los que se han propuesto alternativas de reuso, son con subproductos de la industria de harina de pescado y láctea, en especial con suero de queso que presenta problemas importantes de contaminación sobre todo en verano, cuando la capacidad de los secadores está copada por la elevada cantidad de leche recepcionada por la planta y en las medianas y pequeñas queserías que carecen de estos equipos.

A manera de ejemplo, en la Figura 2 se presentan distintas alternativas de revalorización del suero generado en la industria del queso.

Para el suero de leche existen alternativas de valoración mediante biocatalizadores enzimáticos y celulares, orientados al mejoramiento de sus propiedades funcionales nutricionales, que le permiten ampliar significativamente su espectro de uso en la formulación de alimentos, como se expone en la siguiente sección.

Lógicamente, para llegar a la implementación de estos procesos, es necesaria una evaluación de los productos y de la factibilidad técnico-económica de los procesos desarrollados, sin embargo, el estudio de factibilidad técnico-económica depende del valor que se le dé a la materia prima, en este caso el contaminante.

### 1.6. Prevención

Naturalmente, siempre la prevención de la contaminación deberá ocupar un papel preponderante en la gestión de residuos, ya que siempre será más económico prevenir que tratar o disponer. El esquema

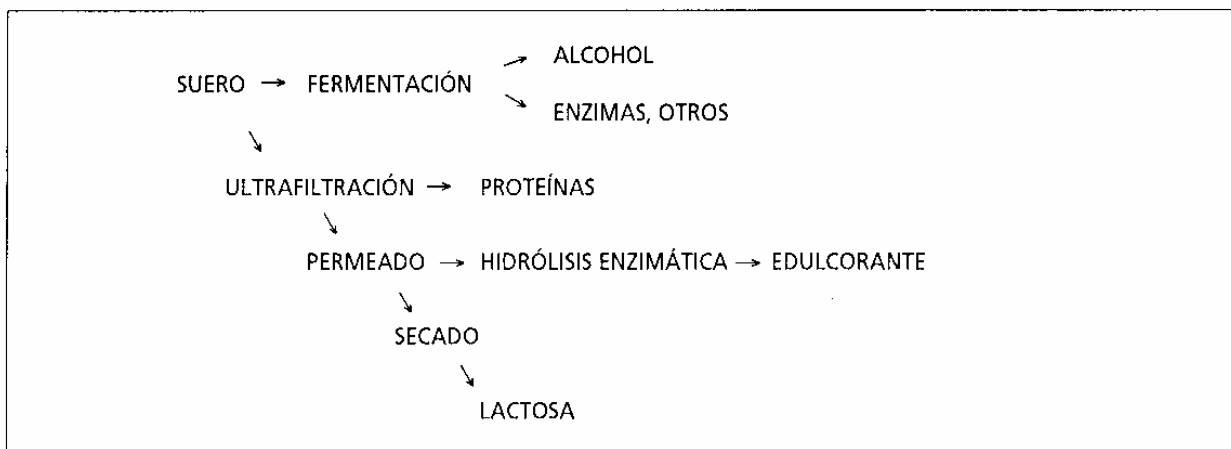


Figura 2. Alternativas de revaloración del suero de queserías.

presentado en la Figura 3 muestra una descripción de los métodos de prevención, destacándose los referidos a cambios de proceso y cambios de producto. Los cambios de producto reducen el volumen de contaminación durante la fase de manufactura, de tal manera que el producto terminado tiene menos impacto sobre el medio ambiente, como también durante su uso último y su eventual disposición, determinarán su vida útil. Esta etapa puede incluir el desarrollo de productos que requieran menos químicos, con mayor calidad y durabilidad, la incorporación de un análisis del ciclo de vida del producto, que incluya alternativas para el uso y disposición final de éste, etc.



Figura 3. Métodos de reducción de contaminantes en la fuente.

Por otro lado, los cambios de proceso involucran la modificación de algunas o todas las operaciones con el objetivo de disminuir la contaminación en origen. Se pueden mencionar cambios en la materia prima (por ejemplo no usar pigmentos derivados de metales pesados) o de tecnología (por ejemplo instalar sistemas de recuperación de vapores con tubería pesada para capturar y devolver las emisiones).

Las acciones de gestión productiva orientadas al área ambiental, deben incluir la realización de cursos de capacitación a los operarios a fin de crearles conciencia sobre un trabajo ecológicamente seguro. Además, se deben generar procedimientos de control orientados tanto desde un punto de vista productivo como ambiental. Como ya se ha mencionado, siempre va a ser una buena estrategia aplicar técnicas de prevención en vez de centrar todos los esfuerzos en tratar y/o disponer los residuos.

## **2. GENERACIÓN DE TECNOLOGÍAS LIMPIAS A TRAVÉS DE LA MODIFICACIÓN DE PROCESOS: EL CASO DE LA BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA**

La biotecnología se ha consolidado en los últimos años como el conjunto de tecnologías encaminadas a la producción de bienes y servicios mediante la utilización de sistemas biológicos o sus productos. El área de impacto de la biotecnología es amplia y diversa y crece cada día junto con el conocimiento de la complejidad biológica. El ámbito de aplicación de la biotecnología abarca el mercado farmacéutico, terapéutico, diagnóstico, cosmético, minería, agroalimentario, agricultura, químico, energético y medio ambiente.

Los rápidos avances tecnológicos derivados de la tecnología de ADN recombinante e ingeniería de proteínas han facilitado el creciente rol de la biotecnología en las operaciones industriales, ya sea en la obtención de nuevos procesos o nuevos productos, como en el mejoramiento de los procesos ya existentes.

Al ampliarse capacidad del hombre para manipular el material y los procesos biológicos, se logra una aproximación lógica para el desarrollo sustentable, su contribución a las tecnologías limpias es una consecuencia de la alta eficiencia de los organismos vivos, de su capacidad para lograr transformaciones bajo condiciones suaves de operación, y su potencialidad para generar residuos o efluentes reciclables o biodegradables.

En general los procesos biológicos contemplan biotransformaciones por la acción de cultivos celulares, principalmente de microorganismos o por reacción enzimática. Actualmente existen en el mercado una gran versatilidad de preparados enzimáticos de bajo costo que justifican su aplicación en procesos industriales con el propósito de reducir o mejorar la recirculación de efluentes, valorizar residuos y reducir el uso de agentes químicos contaminantes.

Existen numerosos ejemplos en sectores como la minería, industria química, alimentaria, etc. que pueden ilustrar los beneficios económicos y ambientales de la aplicación industrial de la biotecnología, como por ejemplo la obtención de productos de química fina y farmacéuticos por transformación biológica desplazando a la industria química, con procesos ambientalmente más amigables. La obtención biotecnológica de productos biodegradables ha sido muy beneficiosa para el desarrollo sustentable, algunos ejemplos de ello son los plásticos biodegradables, biofertilizantes, biopesticidas, etc.

La aplicación de procesos biotecnológicos en la industria manufacturera es amplísima, abarca todos los conceptos de biotecnología, incluyendo la biotecnología tradicional, tecnología de enzimas y otras tecnologías más avanzadas. La biotecnología enzimática es probablemente la de mayor aplicación al momento de contribuir con las tecnologías limpias. En los párrafos siguientes se muestran algunos ejemplos de aplicaciones enzimáticas que favorecen el desarrollo de tecnologías limpias en distintos sectores industriales.



## 2.1. Reducción de ayuda filtrante en procesos alimentarios

Con la incorporación de un tratamiento enzimático previo a la filtración, se logra una reducción de la viscosidad por la hidrólisis enzimática de polímeros como pectinas, almidones, celulosa, hemicelulosa, beta glucanos, proteínas, etc. En la producción de cerveza por ejemplo, el empleo de enzimas en el macerado de la cebada con actividades de  $\beta$ -glucanasa entre otras, acelera el tiempo de filtración de las levaduras y reduce el requerimiento de diatomeas, los  $\beta$ -glucanos son parte natural de los cereales y muy significativos en la cebada, estas sustancias gomosas aumentan la viscosidad del mosto, siendo más difícil filtrarlo en la cuba filtro (Bamforth *et al.*, 1997).

En la industria de azúcar, el alto contenido de almidón que permanece en el jugo de caña, provoca problemas en la filtración de esta solución los cuales se eliminan con el empleo de amilasas. En la misma industria cuando el azúcar de caña se ha contaminado microbiológicamente, se generan dextranos que deben ser tratados con dextranasas para aliviar la operación de filtración

En los procesos de producción de jugos de fruta o vitivinícola, el efecto de las pectinasas es muy importante cuando la empresa usa ultrafiltros, porque éstos son más fáciles de obstruirse reduciendo la velocidad de filtración (Girard y Fukumoto, 2000). La aplicación de preparados pectinolíticos alivia en gran parte este problema.

En los vinos la presencia de glucanos puede ser causada por los glucomananos de la pared celular de las levaduras o bien por la infección de las uvas con el hongo *Botrytis cinerea*, que ataca las uvas produciendo un coloide de glucano que molesta a los vinos. Las uvas botritizadas se usan para producir vino Sauternes, un vino dulce parecido al licor y es uno de los más difícil de clarificar y filtrar (van Oort y Canal-Llauberes, 2002), por lo cual es necesario trabajar con  $\beta$ -glucanasa.

## 2.2. Aplicación en la Industria láctea

De la fabricación del queso se obtiene el suero que contiene fundamentalmente lactosa, el azúcar de la leche, y una pequeña proporción de proteínas. La recuperación de las proteínas se logra por ultrafiltración y el permeado que se obtiene en esta operación es el residuo principal de la industria láctea y contiene toda la lactosa de la leche original. Su descarte no es posible porque presenta una alta DBO y su empleo en la formulación de alimentos está restringido por su alto contenido en lactosa (Marwaha y Kennedy, 1988).

Existe poco interés industrial por lactosa, pues posee muy baja solubilidad siendo poco adecuada en concentrados y congelados lácteos, donde su precipitación afecta la estabilidad y textura de producto. También existe una población adulta con intolerancia a la lactosa, provocada por deficiencia de la enzima lactasa en el organismo, siendo más incidente en la población negra y de ascendencia indígena, también algunos infantes de cualquier raza que nacen con una inmadurez en la síntesis de su propia lactasa (Greenberg y Mahoney, 1981).

Los inconvenientes del permeado de suero de leche pueden eliminarse por hidrólisis enzimática de la lactosa a sus monómeros galactosa y glucosa. El suero delactosado incrementa su potencial uso ya sea como aditivo en otros alimentos o como edulcorante con una conversión enzimática cercana al 70- 90%, este hidrolizado puede ser sometido a una isomerización obteniéndose un jarabe con un alto poder edulcorante (Wittig de Penna *et al.*, 1995). El proceso enzimático más adecuado consiste en un reactor continuo con lactasa de hongos inmovilizada (Illanes *et al.*, 1990).

En las plantas de procesamiento de productos lácteos se emplea agua oxigenada para desinfectar los equipos y fittings. Para mantener una tecnología limpia los restos de peróxido se eliminan con el uso de catalasa que transforma el agua oxigenada en agua y oxígeno.

### 2.3. Procesamiento de frutas

Las pectinasas son ampliamente usadas en la industria vitivinícola y de jugos, su función principal es reducir la viscosidad de los zumos de frutas y facilitar las operaciones de separación (Alkorta et al., 1998; Pilnik y Voragen, 1993).

En algunos procesos cuando se desea un alto rendimiento de jugo de manzana, se utiliza un preparado de pectinasa con arabanasa, para degradar el arabanano que se extrae de las paredes celulares de esta fruta causando enturbiamiento (Urlaub, 2002). Con el uso de enzimas se reduce la generación de residuos sólidos.

Al emplear un preparado enzimático compuesto principalmente con pectinasa, celulasa, hemicelulasa y arabanasa en el agua de procesado de una planta de elaboración de jugos de frutas, aumenta el agua reciclada reduciéndose a su vez el consumo de agua fresca y las aguas residuales. En la extracción de aceites esenciales de cítricos el empleo de complejos enzimáticos ha permitido reducir el agua residual y los requerimientos de agua fresca entre un 50-75% además de aumentar el rendimiento de aceites esenciales (Novozymes, 1993).

El empleo de enzimas en el pelado de las frutas, reduce los requerimientos de soda cáustica del proceso tradicional, además de mejorar la textura y apariencia del producto (Grassin y Fauquembergue, 2002).

### 2.4. Extracción de aceite vegetal

El proceso convencional de extracción de aceites vegetales se efectúa principalmente por un pre-prensado y posterior extracción con hexano, o bien sólo extracción con hexano cuando el contenido de aceite de la semilla es muy bajo.

Se ha reportado que por cada tonelada de semilla de oleaginosa procesada se pierden de entre 0,8 y 8 L de hexano (Johnson y Lusas, 1983), también se afirma que las pérdidas de hexano no exceden los 5 kg de disolvente por cada tonelada corta de lámina extraída (Young y col., 1994). Si se asume una planta que procesa 3000 t/d, significa que una sola industria emite al ambiente entre 8 y 80 millones de litros de hexano al año.

Las emisiones de compuestos orgánicos volátiles (COV), provocan serios daños ambientales al reaccionar con elementos contaminantes, en especial con óxido nitroso, que en presencia de la luz solar, forman ozono (O<sub>3</sub>) y otros elementos conocidos como oxidantes fotoquímicos. A pesar que el ozono es esencial en la alta atmósfera para filtrar los rayos violetas del sol, a nivel del suelo es indeseable, provocando daños a la salud humana. Además puede causar daños a los cultivos agrícolas y al ecosistema forestal (Rosenthal y col., 1996). También contribuye con lo anterior, el efecto tóxico por exposición que pueden provocar disolventes como hexano, benceno y acetona entre otros.

Varios países han diseñado leyes para reducir por parte de las industrias las emisiones de los COV. El estado de avance en esta materia es variable. Las entidades ambientales proponen a las empresas europeas fundamentalmente dos indicaciones: exigir a las plantas un plan de gestión de los disolventes, o bien fijar límites de emisión de COV por sectores industriales. Además, se proponen incentivos o protecciones económicas para aquellos procesos que eliminen completamente las fuentes que provocan los COV (Marlowe y col., 1991).

El tratamiento con enzimas que degradan las paredes celulares de las semillas de estas oleaginosas favorece la extracción del aceite. Se ha comprobado para éstas y muchas otras semillas que la incorporación de enzimas en la extracción de aceites vegetales mejora el rendimiento y en general la calidad del aceite y la harina desgrasada. La aplicación de la tecnología enzimática en la extracción de aceites vegetales por prensado en frío permite mejorar el rendimiento en aceite, revalorizar la harina desgrasada mejorando

su calidad nutritiva y mejorar la calidad del aceite (Zúñiga *et al.*, 2001; 2002a, 2002b; Guerra y Zúñiga, 2003; Zúñiga *et al.*, 2003; Santamaría *et al.*, 2003).

La aplicación industrial de enzimas en la extracción de aceites comestibles aún tiene limitaciones debido al costo de las enzimas. Su proyección es más importante en la extracción de aceites cosméticos como aceite de rosa mosqueta, de avellana, borraja etc., donde el uso de solventes orgánicos es restringido por la aplicación del aceite, además los precios más elevados de estos aceites justifican la incorporación de las enzimas.

## 2.5. Alimento animal

Las enzimas auxiliares añadidas al alimento animal complementan las enzimas digestivas naturales del mismo, con mayor relevancia en animales jóvenes cuyo sistema digestivo no está totalmente desarrollado. Las enzimas auxiliares desempeñan un rol importante en la nutrición de aves de corral y cerdos. Estos animales monogástricos pueden digerir los polisacáridos no almidonosos (PNA) (Chaplin y Bucke, 1990).

La partida más costosa en la cría de aves de corral y cerdos es el alimento, cuyo principal componente son los cereales. El empleo de enzimas que degradan polímeros como hemicelulosa y celulosa y beta glucano presentes en cereales y residuos agroindustriales mejora la digestibilidad del alimento y reduce las emisiones de metano al ambiente o fosfato en los excrementos. Por ejemplo, uno de los compuestos que tradicionalmente se han evitado en alimentos de ganado es la cebada por su alto contenido en fibra, la incorporación de más de un 10% de este cereal en una dieta para broilers, produce excrementos pegajosos, húmedos y reduce el crecimiento. Estos efectos negativos se deben parcialmente al betaglucano presente en las paredes celulares del grano de cebada. Este problema se soluciona con enzimas auxiliares que degradan parcialmente estos componentes, además, la eliminación de estas fibras libera el almidón y las proteínas ocultas en la estructura celular del cereal, aumentando la energía metabolizable y la asimilación de proteína (Campbell y Bedford, 1992).

Según sea el cereal o alimento, es el preparado enzimático que se aplica, existe un tipo de enzimas para trigo, mezclas de trigo y cebada, centeno; otro para cebada y otro para soya, colza (raps), guisantes (arvejas) y otras proteínas vegetales. Estos preparados enzimáticos se constituyen de mezclas de actividades como celulasas, hemicelulasas, beta glucanasas, entre otras (Uhlig, 1998).

Cerca del 50-80% del fósforo presente en el alimento animal está como fitato, el cual no puede ser absorbido por los animales monogástricos. El fitato forma complejos con algunas proteínas, con algunos cationes como calcio, magnesio, fierro y zinc, reduciendo la capacidad nutritiva del alimento (Oryschak *et al.*, 2002; Boling *et al.*, 2000). El fitato que no es consumido por el animal da excrementos con altos niveles de fósforo que son dañinos al ambiente. En la última década ha salido al mercado una fitasa industrial que se incorpora al alimento de cerdos y pollos (Kornegay, 1996).

Esta misma tecnología que se ha empleado para revalorizar los residuos agroindustriales como alimento animal, también puede aplicarse para valorizarlos como nutrientes en el cultivo de microorganismos para la producción de productos químicos, alimentos y enzimas, entre otros.

## 2.6. Alcohol combustible

Actualmente el campo de interés en las destilerías es la producción de alcohol combustible, en este caso la destilación se lleva hasta un 99% de alcohol. El alcohol puro representa una alternativa económica para uso como aditivo en combustibles, refuerza el octanaje de la gasolina y reduce las emisiones nocivas (Sheehan y Himmel, 1999). Según un Ministerio de Estados Unidos de estudio de la Energía, el bioetanol fabricado de fibras de las plantas puede reducir emisiones de gas hasta en un 99% comparado a la gasolina regular.

Una planta comercial de bioetanol considera principalmente como materia prima los residuos de la industria azucarera como coseta de remolacha o caña de azúcar, aunque también puede utilizar residuos del trigo, de avena o de cebada. El jarabe de remolacha y caña de azúcar se procesa directamente, pero el resto debe transformarse en azúcares fermentables por vía enzimática. Entonces, utilizando métodos convencionales, estos azúcares se fermentan y se destilan en el combustible.

La materia prima se muele y a la harina se le agrega alfa amilasa y amiloglucosidasa, hidrolizando el almidón en azúcares fermentables, en la sacarificación también se añade una enzima disgregante de hemicelulosa y celulosa que mejora la recuperación de fibra y sólidos suspendidos de la pulpa tras la fermentación. Las celulasas reducen la viscosidad de la pulpa fermentada, y el etanol se recupera por destilación desde la pulpa (Picataggio y Zhang, 1996). Los sedimentos tienen un alto contenido en sólidos secos que se recuperan del fondo del alambique, se secan y se granulan, resultando un componente para alimento animal llamado lías de la destilación del grano. Este co-producto contiene un 35% de proteínas y se usa para sustituir el alimento animal de gluten de maíz importado.

## 2.7. Industria de detergentes y otros artículos de limpieza

El empleo de enzimas en detergentes ha sido uno de los grandes contribuyentes al desarrollo de enzimas industriales. Esta área es la de mayor aplicación de enzimas industriales. Se usan en los detergentes de ropa, lavavajillas e industriales. Sus mayores beneficios son: en general un mejor lavado, disminución de los tiempos de lavado, requerimientos de menor temperatura, se reduce el consumo de agua por su alta eficiencia y disminuye el pH del agua de lavado con menor impacto ambiental por sus efluentes, en los cuales se han reemplazado agentes químicos por enzimas biodegradables (Christensen *et al.*, 1987). El ahorro de energía debido a la disminución de la temperatura de lavado desde 90 a 60°C se ha estimado que sólo en Dinamarca reduce las emisiones de CO<sup>2</sup> en 38.000 toneladas al año (OECD, 1998).

Históricamente las proteasas alcalinas fueron las primeras enzimas usadas con efectividad en los detergentes. Actualmente la mayoría de los detergentes contiene también lipasas y amilasas incrementando los beneficios mencionados. La adición de celulasas mejora la suavidad de las telas de algodón hidrolizando las microfibrillas de la tela (Walsh y Headon, 1994).

Las impurezas son removidas por la acción mecánica, las enzimas hidrolíticas, surfactantes que reducen la tensión superficial y mejora las fuerzas repulsivas entre las impurezas y la tela y otros agentes que actúan para quelar o precipitar sales de calcio y magnesio, proveer alcalinidad y capacidad tampón, evitar la redeposición de las impurezas y/o inhibir la corrosión.

Las enzimas se usan también en las formulaciones de detergentes de membranas, en la industria de jugos de frutas y cervecera. En pasta de dientes y enjuague bucal, la incorporación de glucoamilasa y glucosa oxidasa, evita el desarrollo de placas bacterianas. Incorporando proteasas a estos productos es posible mejorar los resultados en menor tiempo de lavado (Chaplin y Bucke, 1990).

En la limpieza de lentes de contacto, la mayoría de las soluciones que se emplean con este fin contienen proteasas o lipasas o ambas. Los residuos de agua oxigenada usada como desinfectante son eliminados con catalasa (Jha *et al.*, 1999).

## 2.8. Industria textil

La aplicación de tecnología enzimática en la industria textil ha permitido reducir los requerimientos de agentes químicos, ahorrar agua y energía y obtener una producción de residuos sólidos (Cortez *et al.*, 1999).

La fibra de algodón crudo consiste en celulosa cubierta por impurezas como pectinas. Previo a que el hilo de algodón o tela sean teñidos, el algodón debe pasar por una serie de tratamientos para eliminar

las impurezas, donde son utilizados severos agentes químicos, los que provocan una pérdida de fuerza y peso en la tela, liberándose al medio una enorme cantidad de agua contaminada. La incorporación de un tratamiento enzimático con pectato liasa para degradar la pectina facilita la remoción de otras impurezas presentes en las capas exteriores de la fibra, mejorándose su calidad y el rendimiento del proceso.

Comparado con el proceso químico tradicional, se emplean condiciones de operación más suaves, reduciéndose el pH desde 14 a 9 y la temperatura del 95 a 55°C. Esto significa un ahorro de energía y de productos químicos dañinos. El impacto ambiental es minimizado al requerirse un 50% menos de agua de enjuague, al emplear enzimas biodegradables y reducir los agentes químicos en los efluentes.

Otra aplicación de las celulasas en la industria textil se conoce como "bio stoning". Proceso que se realiza sobre telas vaqueras, eliminando parcialmente pequeñas fibras con tinta sobre la tela, dándole un aspecto de prelavado. Esta técnica también permite reducir los requerimientos de agua y de energía en comparación al proceso sin enzimas (Kochovi *et al.*, 1990)

Otras enzimas que se aplican en la industria textil son amilasas para remover agentes de encolado de las telas, oxidoreductasas y peroxidasas para el blanqueo de fibras, como, por ejemplo, catalasa para remover el peróxido residual en el blanqueo de las fibras, amilasas para el retiro de impurezas en el algodón, proteasas para remover serina, una sustancia gomosa asociada con la seda natural (Cortez *et al.*, 1999; Kierulff, 1997; Lewis, 1992).

## 2.9. Curtiembre

La primera patente de aplicación de proteasas en el procesamiento de cueros data de principios de siglo. Proteasas y lipasas se aplican en el depilado y desgrasado de las pieles y cueros previo al curtido de los mismos.

Durante el depilado se aplica una proteasa alcalina que contribuye al debilitamiento estructural del cuero. En comparación con el proceso químico con sulfuro de sodio la tecnología enzimática reduce la cantidad de sulfuro en un 50%, con ello se aumenta el rendimiento en superficie, se produce un producto más limpio y se disminuye la presencia de químicos en los efluentes. Posteriormente en el curtido para dar la suavidad que requiere el cuero según su uso (por ejemplo guantes o zapatos) se emplea una proteasa bacteriana y tripsina que actúan a pH 2.5-5 (Alexander, 1988).

Las lipasas se han utilizado en vez de solventes o surfactantes en el desgrasado. Su ventaja es que interfieren menos en la estructura de la piel, además que el proceso es ambientalmente más aceptable que el proceso basado en agentes químicos (UNEP, 1991)

Otras aplicaciones de proteasas en este tipo de industria se proponen para reducir la viscosidad de los efluentes de la misma.

## 2.10. Industria de la pulpa y el papel

La biotecnología también contribuye a una producción más limpia en el sector de la pulpa y del papel. El tratamiento de las virutas de madera con hongos conocido como biopulping previo a la operación termo mecánica puede dar lugar a un ahorro del 30% de la energía eléctrica requerida para ésta última (OECD, 1998).

Tratar la pulpa de madera con celulasas y hemicelulasas permite que el agua drene más rápidamente de las fibras de la celulosa en pulpa mojada, reduciendo el tiempo de transformación y la energía usados para secar en un 7% aproximadamente (OECD, 1998).

En el blanqueo de la pulpa de papel la tecnología enzimática ha tenido un crecimiento extraordinario en la última década (Martínez *et al.*, 2004). Su penetración en este mercado radica en su efecto sobre

la reducción en los requerimientos de blanqueantes químicos como el cloro y el dióxido de cloro en valores cercanos al 50%. Las reglamentaciones medioambientales restringen la presencia de compuestos clorados en los efluentes.

Las xilanasas se añaden a la pasta Kraft antes el blanqueo, necesitándose una menor dosis de blanqueantes. Las xilanasas eliminan selectivamente el xilano que está en la superficie y en los poros de las fibras, aumentando la sensibilidad de las fibras al blanqueo (Viikari *et al.*, 1994).

En un molino que procesaba 375.000 ton de pasta al año, se realizaron ensayos con dióxido de cloro y enzimas. Al incorporar xilanasas al proceso se redujo la cantidad de compuestos clorados emitidos de 1,6 a 1,3 ton día y la cantidad de cloratos bajó de 4,6 a 2,5 ton día (Novozymes, 1992).

Enzimas como celulasas y hemicelulasas también pueden ser usadas en el destintado del papel reciclado, disminuyendo los requerimientos de energía y agentes químicos además de mejorar la calidad del producto (Bajpai, y Bajpai, 1998; Zollner y Schroeder, 1998).

### 2.11. Industria Petrolera

En los próximos años el sector industrial, y en particular el petrolero, estará sujeto a una normativa ambiental cada vez más estricta, y la necesidad de producir combustibles más limpios. Para hacer frente a estos factores, la biotecnología se presenta como una alternativa que se espera será viable en el mediano y largo plazo.

La recuperación del petróleo residual que queda en los yacimientos después de la producción primaria y secundaria (65% de la cantidad original), por inyección de gas y de vapor es restringida debido a razones económicas (Moritis, 1999).

La recuperación mejorada de petróleo mediante el uso de microorganismos nativos de los yacimientos y/o microorganismos con características especiales para producir metabolitos específicos, que favorecen la liberación del petróleo del yacimiento, es un aporte de la biotecnología en esta área, aunque los mecanismos a través de los cuales tiene lugar la liberación y recuperación son demasiado complejos e involucran múltiples procesos bioquímicos.

Por otro lado, un desarrollo sostenido, sustentable y ambientalmente adecuado puede lograrse mediante la transformación biológica del petróleo y del gas natural mejorando su valor agregado y reduciendo la contaminación del petróleo. Un ejemplo es la remoción biológica por bacterias de sus componentes organoazufrados (Ohshiro e Izumi, 1999) y nitrógeno (Kilbane y col., 2000) que contribuyen a la lluvia ácida y corrosión. Otros ejemplos son la remoción de metales como vanadio y níquel por enzimas (Xu y cols., 1998) y la transformación de asfaltenos en crudos más ligeros por acción biológica (Premuzic, 1999).

Existen otros ejemplos que muestran el aporte de las biocatalizadores enzimas en el desarrollo de tecnologías limpias en procesos, como ejemplo en la industria de plásticos y adhesivos donde se usa peroxidasa para reemplazar el formaldehído en la producción de resinas fenólicas.

Estos ejemplos muestran el enorme potencial de la biotecnología de enzimas en la contribución de las tecnologías limpias, el conocimiento de los procesos y de la potencialidad de las enzimas industriales permitirán ampliar aún más estos horizontes.

### 3. ALTO EL CARMEN: UN EJEMPLO EXITOSO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO INTEGRAL Y UTILIZACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL EN PRODUCCIÓN LIMPIA

#### 3.1. Antecedentes Generales

El presente trabajo se desarrolló en conjunto con la Cooperativa Agrícola Pisquera Elqui Ltda., Capel, para el diseño de una planta de tratamiento de aguas residuales de su planta pisquera de Alto El Carmen, III Región, Chile, con el fin de contar con una tecnología apropiada para reducir el impacto negativo que se produce por la evacuación directa de sus residuos líquidos al ambiente. Paralelamente se buscaba generar agua de calidad de regadío, dada la escasez de dicho recurso y la considerable actividad agrícola de la zona.

El pisco es una bebida alcohólica preparada por medio de la destilación de mostos fermentados producidos principalmente con cepas tipo moscatel de Alejandría. Las Figuras 4 y 5 muestran diagramas de flujo con las operaciones involucradas en el proceso productivo, antes y después de la fermentación, respectivamente.

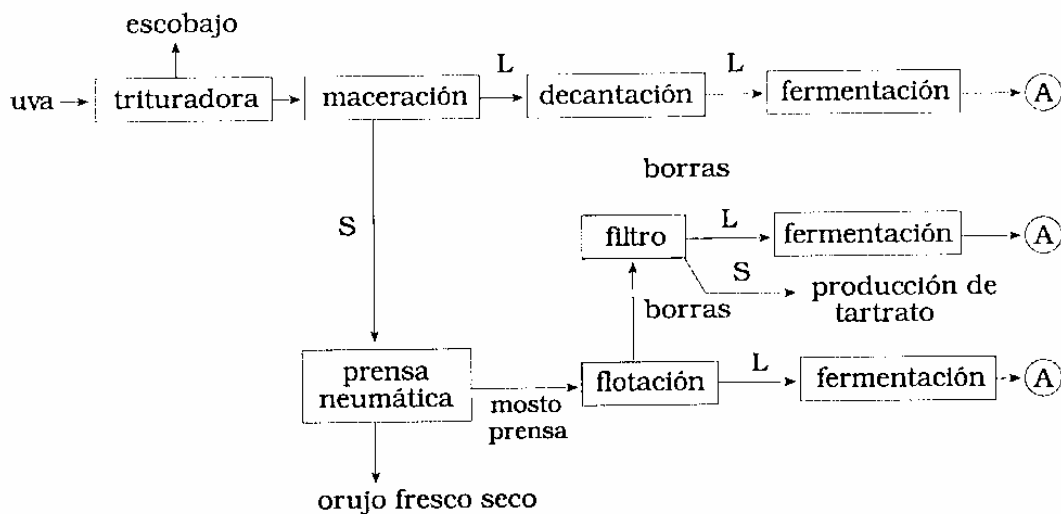


Figura 4. Diagrama de flujo del proceso hasta la fermentación (S: sólido, L: líquido).

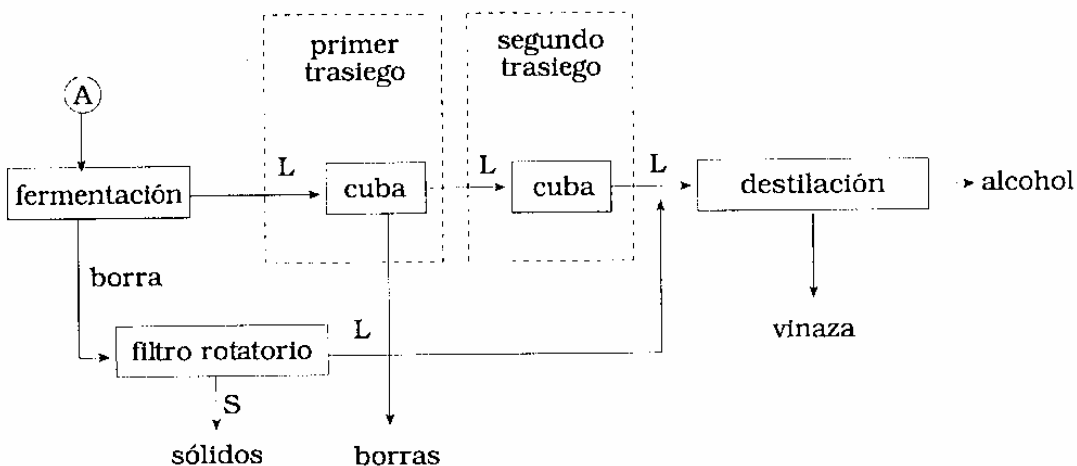


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso después de la fermentación (S: sólido, L: líquido).

Las operaciones de maceración, sedimentación, prensado, filtración de mostos frescos y gran parte de la fermentación se realizan durante la época de vendimia, aquella en la cual se recibe la uva en la planta. Esta se extiende durante los meses de marzo, abril y parte de mayo.

### 3.2. Selección de la tecnología de tratamiento

Para seleccionar el tratamiento más adecuado, fue necesario realizar una evaluación previa de los efluentes. Para ello se caracterizaron todas las corrientes y se determinaron las biodegradabilidades tanto anaerobias como aerobias. Los resultados fueron ampliamente positivos, indicando la conveniencia de considerar un tratamiento biológico. A continuación y en base a los resultados antes mencionados se evaluaron por casi un año a nivel laboratorio diversas tecnologías anaerobias (EGSB y UASB) y aerobias (lodos activos), con el fin de seleccionar la tecnología más adecuada, y establecer condiciones y protocolos de operación. Resulta importante destacar que muchas de las fallas en sistemas de tratamiento son el producto de la aplicación de tecnologías desarrollados para un tipo diferente de residuo, sin etapas previas de experimentación que permitan su validación. Esto se traduce en costos elevados, debido a la necesidad de corregir conductas, o reacondicionar instalaciones, pudiendo incluso terminar con el fracaso del sistema de tratamiento.

En el caso de la compañía pisquera, en base a los resultados observados a escala laboratorio y a las ventajas que presenta frente a la alternativa aerobia, se seleccionó la digestión anaerobia como tecnología de tratamiento. Las ventajas son básicamente las siguientes:

- Menores costos de operación, debido a la inexistencia de aireación.
- La mayoría de la materia orgánica metabolizada por los microorganismos termina en la forma de biogás, una mezcla de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  y otros gases en bajas concentraciones.
- La generación de lodos es notablemente más baja que los procesos aerobios en los que la materia orgánica es transformada en parte importante en biomasa.
- El biogás es subproducto útil, en la medida en que puede ser utilizado con fines energéticos.
- Menores requerimientos de nutrientes.

La utilización del tratamiento anaerobio se enmarcó en un plan integral Producción Limpia, el cual considera el tratamiento de las aguas residuales como una oportunidad generadora de subproductos, más que una necesidad previa a la disposición de los residuos. En este sentido, la aplicación del tratamiento anaerobio permite los siguientes beneficios:

#### a. Agua de calidad de regadío

La digestión anaerobia posee un requerimiento de nutrientes reducido. Debido a esto, las aguas tratadas anaeróbicamente pueden contener cantidades importantes de nutrientes como nitrógeno y fósforo. De ser esta agua descargada a un curso de agua natural, tal característica representaría una desventaja, en la medida en que implicaría la necesidad de etapas extras de tratamiento. Sin embargo, la presencia de estos compuestos puede ser beneficiosa si el agua tratada se utiliza con fines de irrigación agrícola, en la medida en que estos nutrientes serían utilizados de manera provechosa, reduciendo la necesidad de fertilizantes (Chamy *et al.*, 2003). Para comprobar esta hipótesis se realizaron una serie de experimentos en los cuales se sometió a diversos regimenes de riego a plantas bajo condiciones controladas, utilizando agua tratada y agua de riego normal. Los resultados fueron positivos, en la medida en que las plantas irrigadas con agua tratada mostraron algunas características de crecimiento superiores que los controles, a los que se les aplicó agua normal. Este punto es especialmente trascendental en el caso de la industria pisquera, pues como se mencionó la zona geográfica donde se ubica la producción de pisco se caracteriza por una actividad agrícola importante y una escasez de agua.



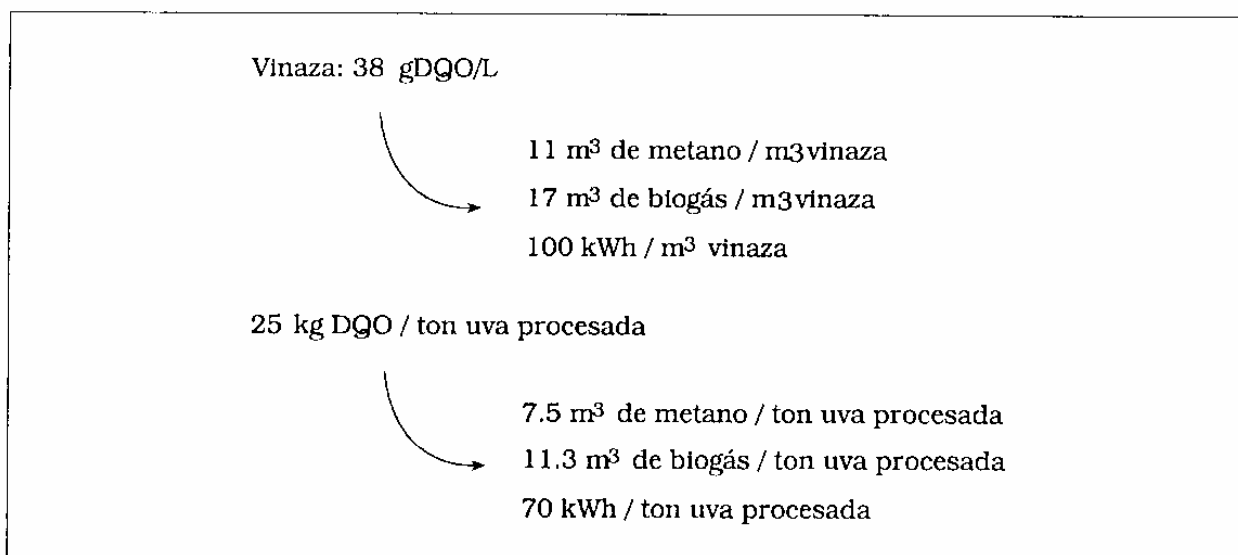
### b. Generación de lodo anaerobio de calidad

La generación de lodos en los procesos de digestión anaerobia es notoriamente menor que la ocurrida en procesos aerobios (alrededor de 5 veces). Por otra parte, los lodos anaerobios se encuentran prácticamente estabilizados, lo que no es el caso de los lodos aerobios. Esto significa que son de lenta degradación, lo que favorece su utilización como mejorador de suelos. Además, los lodos anaerobios granulares, dada su alta actividad y al creciente interés en los procesos anaerobios, constituyen un bien que eventualmente puede ser destinado a la inoculación y arranque de otras instalaciones. Es por esto, que en ocasiones, puede dejar de ser considerado como un residuo.

### c. Ahorro de combustible por generación de biogás

La producción de biogás es una de las ventajas importantes de la digestión anaerobia. Este puede ser utilizado como fuente de energía en la misma planta. En el caso de la industria pisquera, existe un consumo de energía importante debido a la producción de vapor que se utiliza en el proceso de destilación.

Por cada kg de DQO removido por los microorganismos anaerobios, en promedio se producen cerca de 300 L de metano, lo que representa poco más de 3 kWh (2650 kcal) de energía química. Por ejemplo, dado que la vinaza posee una concentración de 38 gDQO/L, por m<sup>3</sup> de vinaza podrían obtenerse 100 kWh de energía. La Figura 6 muestra los rendimientos esperados tanto por m<sup>3</sup> de vinaza como por tonelada de uva procesada.



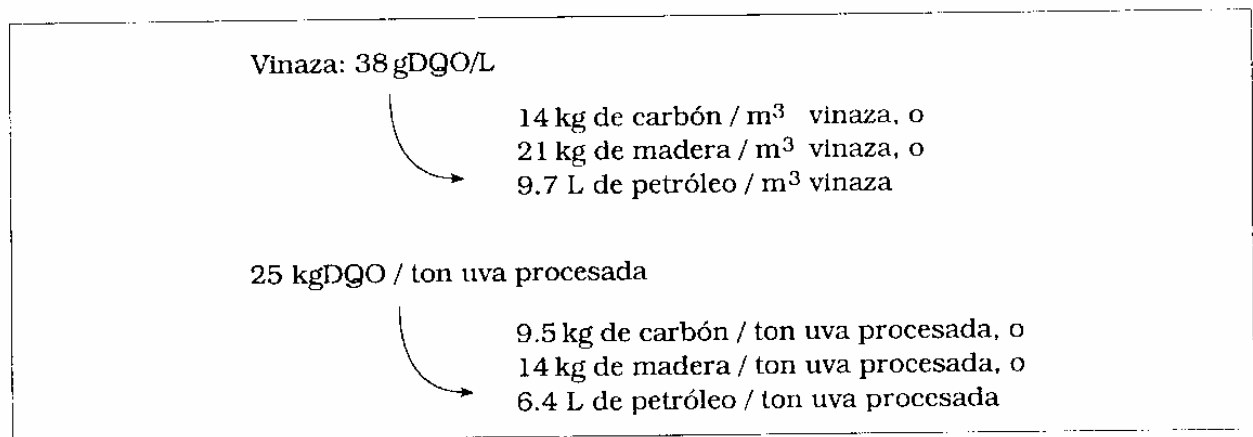
**Figura 6.** Rendimientos energéticos debido a la producción de biogás (1kWh = 860 kcal). Se asume un contenido de metano en el biogás de 65%.

La Tabla 2 muestra el poder calorífico de algunos de los combustibles más comunes. Se incluye la equivalencia con el biogás, asumiendo un contenido de metano del 65% (el mismo que espera se produzca durante el tratamiento de las aguas de la industria pisquera).

**Tabla 2.** Poder calorífico de diversos combustibles. Se asume un 65% de metano en el biogás.

Combustible	kcal/m <sup>3</sup>	kcal/kg	cantidad equiv. a 1000 m <sup>3</sup> de biogás
Biogás	5750		1000 m <sup>3</sup>
Gas natural	9185		626 m <sup>3</sup>
Metano	8847		650 m <sup>3</sup>
Propano	22052		260 m <sup>3</sup>
Carbón		6870	837 kg
Madera (seca)		4650	1237 kg
Petróleo		11357	506 kg – 570 L

Con los datos de la Tabla 2, y las equivalencias de la Figura 6 es posible estimar el ahorro en combustibles generado por la utilización de un proceso de digestión anaerobia, el que se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Ahorro estimado en combustibles debido a la utilización de digestión anaerobia, por m<sup>3</sup> de vinaza (de vino) tratada y por ton de uva procesada.

La tecnología de tratamiento finalmente seleccionada considera un reactor anaerobio de manto lodos de flujo ascendente (UASB), el que tiene las siguientes cualidades que lo hacen atractivo para su aplicación:

- . No posee partes móviles para el mezclamiento.
- . Es posible adaptarlo para el tratamiento de una amplia gama de compuestos recalcitrantes.
- . Se pueden aplicar altas velocidades de carga orgánica
- . Puede permanecer fuera de operación por tiempos prolongados sin una pérdida irreversible de su actividad.
- . Es capaz de retener una alta concentración de biomasa con una alta actividad específica
- . Los costos de capital son más bajos que otros reactores anaerobios o aerobios, dado que la separación sólido-líquido-gas se lleva a cabo en el reactor, y no se requiere de soportes para la biomasa.
- . No presenta los problemas de canalización existentes en sistemas de biomasa fija, ni requiere los altos consumos de energía que el lecho fluidizado necesita.
- . Se puede adaptar al trabajo a altas concentraciones de tóxicos.

Se optó por esta opción por sobre tecnologías más recientes como el reactor EGSB, debido a que en los ensayos previos mostraron un desempeño similar. Los menores costos de inversión y operación de la opción seleccionada definieron su elección.

### 3.3. Descripción de la planta de tratamiento

La planta de tratamiento está conformada por el reactor UASB, junto a algunos estanques que permiten el manejo del agua residual. Las aguas de lavado son recolectadas en un pozo recolector y bombeadas al pozo recolector principal, donde se juntan con la vinaza, conformando el agua residual a tratar. Este RIL es posteriormente bombeado al estanque equalizador desde donde se alimenta el estanque acondicionador, para finalmente ser depurado en el reactor UASB.

Como se mencionó anteriormente, las instalaciones de tratamiento han sido concebidas como parte de un programa integral de producción limpia. En el marco de este concepto el digestor anaerobio se considera como parte del proceso de producción, en la medida en que este sólo concluye cuando se el recurso agua retorna al medio ambiente en su estado original, o de manera que no afecte su lugar de disposición. Considerando los positivos resultados que arrojaron los ensayos de irrigación, se decidió utilizar el agua tratada para irrigar una plantación de eucalyptus, ubicada en terrenos aledaños de la planta. Esto permitió transformar lo que hasta entonces constituía un problema (el tratamiento y disposición de las aguas residuales), en una oportunidad de desarrollo.

En lo referente al biogás, su utilización ha sido evaluada tanto técnica como económicamente, llegando a la conclusión que es factible y recomendable desde ambas perspectivas. Dentro de la planificación estratégica de la compañía en el ámbito mediambiental se ha pensado la utilización del biogás en la producción de vapor, la que se implementará en futuras plantas.



Figura 8. Vista frontal de la Planta de RILES Alto del Carmen (Reproducción autorizada por la empresa).

## REFERENCIAS

- Alexander K. T. W. (1988). Enzymes in the Tannery-Catalysts for Progress?: The 1988 John Arthur Wilson Memorial Lecture Journal of the American Leather Chemists Association 83(9), 287-316.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama M.J., Serra, J.L. (1998). «Industrial applications of pectic enzymes: a review. Process Biochemistry. 33(1), 21.
- Bajpai, P. and Bajpai, P.K. (1998) Deinking with enzymes: a review, Tappi J., 81(12), 111-117.
- Bamforth, C.W., Moore, J., McKillop, D., Williamson, G. and Kroon, P.A. (1997). Enzymes from barley which solubilize b-glucan. Proceedings of the 26th EBC Congress. Maastricht, The Netherlands, 75-82.
- Boling, S. D., M. W. Douglas, R. B. Shirley, , C. M. Parsons, and K. W. Koelkebeck, (2000). The effects of various dietary levels of phytase and available phosphorus on performance of laying hens. Poult. Sci. 79(4), 535-538.
- Chamy, R.; Jeison, D. and E. Salgado (2003). Anaerobically treated wastewater in agricultural irrigation as an alternative for post treatment in water demanding zones. Applied Biochemistry and Biotechnology 109:197-206.
- Campbell, G. L., Bedford, M. R. (1992). Enzyme application for monogastric feeds: a review. Canadian Journal of Animal Science 72, 449-466.
- Chaplin, M.F., Bucke, C. (1990). The Large Scale Use of Enzymes in Solution. En Enzyme Technology, (Eds. M.F: Chaplin, C. Bucke), Cambridge University Press, Cambridge, 138.
- Christensen P. N, K. Thomsen, S. Branner. (1987). Development of Detergent Enzymes, Proceedings Second World Conference on Detergents, American Oil Chemists Society, 182.
- Cortez J., Mangiapane H., Kalum L. and Griffin M. (1999). Applications of Enzyme Technology in the Textile Industry. The Nottingham Trent University.
- Girard, B. and Fukumoto, L.R. (2000). Membrane processing of fruit juices and beverages: A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 40, 91-159.
- Grassin C. and P. Fauquembergue, (2002) Enzymes in Fruit Processing. In: Whiterhurst, R.J. and B. Law, eds, Enzymes in Food Technology, Sheffield academic Press Ltd, Sheffield UK, 184-200.
- Greenberg, N., Mahoney, R. (1981). Immobilization of lactose ( $\beta$ -galactosidase) for use in dairy processing: A Review Process Biochem. 16(2) , 2-8.
- Guerra E. G., Zúñiga, M. E. (2003). Tratamiento Enzimático en la Extracción de Aceite de Pepa de Uva, Vitis vinifera, por Prensado en Frío. Grasas y Aceites. 54(1).
- Illanes, A., Ruíz, A., Zúñiga, M.E., Aguirre, C., O'Reilly, S., Curotto, E. (1990). Inmovilization of lactase for the continuous Hidrolysis of whey Permetate. Bioprocess Engineering. 5, 257-262.
- Jha, B. K., Kanicky, J. R., Patist, A., Subramani, S., Patel, H. and Shah, D.O.(1999). Performance Characteristics and Design Strategies for the 21st Century Laundry Detergent,» Proceedings of the 39th International Detergency Conference, Luxembourg, Sept. 6-8.
- Johnson, L.A., Lusas, E.W. (1983). Comparison of alternative for oils extraction. J. Am. Oil Chem. Soc., 60 (2), 181A-194A.
- Kierulff, J. V.(1997). Denim Bleaching, Textile Horizons, Oct/Nov, 33-36.
- Kilbane II, J.J., R. Ranganathan, L. Cleveland, K.J.Kayser, C. Ribiero, M.M. Linhares, (2000). Selective removal of nitrogen from quinoline and petroleum by Pseudomonas ayucida IGTN9m. Appl. Environ. Microbiol. 66, 688-693,
- Kochovi, D., Videbaek, T and Cedroni, D.(1990). Optimising Processing Conditions in Enzymatic Stone-washing, Amer. Dyes. Rep., 9, 24-28.
- Kornegay, E. T. (1996). Nutritional, Environmental, and Economic Considerations for Using Phytase in Pig and Poultry Diets. In Nutrient Management of Food Animals to Enhance and Protect the Environment . E. T. Kornegay (ed.), CRC Press, Inc.

- Lewis, D. M., 1992, *Wool Dyeing*, J. of the Soc. of Dyers and Colourists, 182.
- Marlowe, I.T., Giddings, T.J., Ricardson, S.J., Stentiford, A. (1991). UK Industry and ozone pollution from volatile organic compound emissions, II: Update to October. Warren Spring Laboratory Publications. LR 878 (PA). The Environmental Technology Executive Agency of the Department of Trade and Industry.
- Martínez, I., R. Chamy and A. Markovits (2004). Lipase catalyzed solvent free transesterification of wood sterols. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 112(1):55-62.
- Marwaha, S., Kennedy, J. (1988). Review whey-pollution problem and potential utilization. *Internat. J. Food Science & Technol.* 23, 323-336.
- Moritis, G., (1999). Massive oil resource to be targeted by new EOR techniques. *Oil & Gas Journal*, 97(50) diciembre.
- Novozymes. (1992). Una Bomba era todo lo que necesitaba el Molino Mörrum. *Biotimes*, 7(2), 6-7.
- Novozymes. (1993). Citrozym CEO gives more oil while using less water. *Biotimes*, 8(3), 4-5.
- OECD. (1998). *Biotechnology for Clean Industrial Products and Processes: Towards to Industrial Sustainability*, OECD, Paris.
- Ohshiro, T., Y. Izumi, (1999). Microbial desulfurization of organic sulfur compounds in Petroleum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 1-9.
- Oryschak M. A., P. H. Simmins, and R. T. Zijlstra. (2002). Effect of dietary particle size and carbohydrase and/or phytase supplementation on nitrogen and phosphorus excretion of grower pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 82, 533-540.
- Picataggio, S. and M. Zhang. (1996). Biocatalyst development for bioethanol production from hydrolysates, 163–178. In Charles E. Wyman (ed.) *Handbook on bioethanol*, Taylor and Francis, Washington, DC.
- Pilnik, W., Voragen, A.G.J. (1993). Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture. In: *Enzymes in Food Processing*, (Nagodawithana, T. and Reed, G. Eds), 367-371. Academic Press, New York.
- Premuzic, E.T. y M.S. Lin, (1999). Biochemical upgrading of oils US Patent 5858766.
- Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme Microb. Technol.* 19( 11), 402-420.
- Santamaría, R.I.; Soto., C.; Zuñiga, M.E.; Chamy R.; and López-Munguía A. (2003) Enzymatic extraction of oil from guevina avellana, the chilean hazelnut. *Journal of American Oil Chemists Society.* 80(1)33-36.
- Sheehan, J. and M.E. Himmel. (1999). Enzymes, energy, and the environment: Cellulase development in the emerging bioethanol industry. *Biotechnology Progress*, 15:3:817827.
- Uhlig, H. (1998). *Industrial Enzymes and their application*. John Wiley & Sons, New York, : 390-396.
- United Nations Environmental Program. (1991). *Tanneries and the Environment: A Technical Guide* UNEP: Paris.
- Urlaub R. (2002). Enzymes in fruit and vegetable juice extraction. In: *Enzymes in Food Technology*, Whiterhurst, R.J. and B. Law, eds, Sheffield academic Press Ltd, Sheffield UK, 144-182.
- van Oort M, and R.M. Canal-Llauberes. (2002). Enzymes in wine production. In: *Enzymes in Food Technology*, Whiterhurst, R.J. and B. Law, eds, Sheffield academic Press Ltd, Sheffield UK, : 76-89.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. and Linko, M. (1994) Xylanases in bleaching: From an idea to the industry, *FEMS Microbiol. Rev.*, vol.13, 335-330.
- Walsh, G. and Headon, D. (1994). *Protein Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England, 302-336.
- Ward, O.P., (1983). «Proteinases». En *Microbial Enzymes in Biotechnology*, (Ed. Fogarty, W.M). Applied Science Publishers Ltd, England, 289.
- Wittig de Penna, E., Alfaro, S., Zúñiga, M.E., Torti, H., Lopez, C., Bunge, A., List, D. (1995). Utilización del Suero de Queserías en la Elaboración de Jarabe de Permeato de Hidrolizado con Lactasa Inmovilizada. *La Alimentación Latinoamericana* . 205, 28-34.

- Xu, G.W., K.W. Mitchell, D.J. Monticello. (1998). Fuel product produced by demetalizing a fossil fuel with an enzyme. US Patent 5624844.
- Young, F.V.K., Poot, C., Biernoth, E., Krog, N., Davison, N.G.J., Gunstone, F.G., 1994. Processing of fats and oils. In: Gunstone, F., D., Harwood, J., L., Padley, F., B (Eds.) .The lipid handbook.2nd edition. pp 249- 254. Chapman & Hall, London.
- Zoelner, H.K. and Schroeder, L.R. (1998). Enzymatic deinking of non impact printed white office paper with alfa-amylase», *Tappi J.* 81(3), 166-170.
- Zuñiga M.E., J.Concha, C. Soto, R. Chamy. (2001a). Enzyme Formulation Effect of the Rosehip Oil Cold-Pressed Extraction Process. In: Proceedings of the World Conference and Exhibition on Oilseed Processing and Utilization (R.F. Wilson, ed.) AOCS Press, Illinois., 32, 210 – 213.
- Zuñiga M.E., R. Chamy, J.M. Lema. (2001b). Canola and Chilean Hazelnut Products Obtained by Enzyme-Assisted Cold-Pressed Oil Extraction. In: Proceedings of the World Conference and Exhibition on Oilseed Processing and Utilization (R.F. Wilson, ed.) AOCS Press, Illinois., 31, 203 – 209.
- Zuñiga, M.E., Soto, C., Mora A., Chamy, R., Lema, J.M. (2003). Enzymic pre-treatment of Guevina avellana mol oil extraction by pressing. *Process Biochemistry*