



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química.

Análisis y Control de Calidad Químicos.

“EFECTO DEL PRETETRAMIENTO CON ULTRASONIDOS EN LA VALORIZACIÓN DE FANGOS AEROBIOS GENERADOS EN AGUAS RESIDUALES “

Autora: Ainhoa Moreno Solana

Dirigido y tutorizado por:

Ángel Alejandro Filipigh / Silvia Bolado Rodríguez

Septiembre del 2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LA IMPORTANCIA DE LOS FANGOS DE DEPURADORA.....	1
1.2 MÉTODOS DE HIDRÓLISIS DE FANGOS	8
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 BIOMASA DE FANGOS AEROBIOS.....	15
3.2 METODOLOGÍA DE HIDRÓLISIS APLICADA A LA BIOMASA	16
3.2.1 <i>Pretratamiento con ultrasonidos.....</i>	<i>18</i>
3.2.2 <i>Ensayos de hidrólisis alcalina (ALK).....</i>	<i>19</i>
3.2.3 <i>Ensayos de hidrólisis térmica (HT) y combinación térmica-alcalina (HT+ALK)</i>	<i>20</i>
3.2.4 <i>Ensayos de hidrólisis biológica: Enzimática (EH) y Autohidrólisis (AH)</i>	<i>21</i>
3.3 CÁLCULOS	22
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	23
3.4.1 <i>Sólidos totales, volátiles y cenizas.....</i>	<i>23</i>
3.4.2 <i>Análisis de nitrógeno y proteínas.....</i>	<i>23</i>
3.4.3 <i>Análisis de carbohidratos</i>	<i>24</i>
3.4.4 <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....</i>	<i>26</i>
3.4.5 <i>Determinación de lípidos y ácidos húmicos.....</i>	<i>27</i>
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1 EFECTO DEL ULTRASONIDOS EN LOS RENDIMIENTOS DE SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS.....	28
4.2 EFECTO DEL ULTRASONIDOS EN LOS RENDIMIENTOS DE RECUPERACIÓN DE PEPTIDOS	31
4.2.1 <i>Efecto del ultrasonidos en el tamaño de los péptidos recuperados</i>	<i>34</i>
4.3 EFECTO DEL ULTRASONIDOS EN LA RECUPERACIÓN DE MONOSACÁRIDOS	37
5. CONCLUSIONES	43
6. BIBLIOGRAFÍA.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distintas fuentes de origen de las aguas residuales	1
Figura 2: Generación de fangos primarios, secundarios y terciarios en una planta de tratamiento de aguas residuales	2
Figura 3: Concepto de economía circular relacionado con la valorización de residuos y recuperación de recursos a partir de aguas residuales y fangos de depuradora.....	4
Figura 4: Diversos constituyentes de sustancias poliméricas extracelulares en fangos granulares	7
Figura 5: Representación de los fenómenos de cavitación, colapso y liberación del material celular	9
Figura 6: Desarrollo y colapso de la burbuja de cavitación.....	10
Figura 7: Proceso de recuperación de componentes valiosos a partir de biomasa de fangos aerobios generada en las EDAR urbanas	13
Figura 8: Biomasa de fangos aerobios (BS).....	15
Figura 9: Esquema de las alternativas de hidrólisis estudiadas.....	16
Figura 10: Experimentación del proceso secuencial en dos etapas de ultrasonidos seguido de hidrólisis	18
Figura 11: Procedimiento experimental bajo condiciones de NaOH.	19
Figura 12: Experimentación de hidrólisis hidrotérmica (HT) y combinación hidrotérmica+alcalina (HT+ALK).....	20
Figura 13: Experimentación de hidrólisis biológica (autohidrólisis, AH y enzimático, EH)	21
Figura 14: Esquema y equipo experimental para la determinación de proteínas por el método NKT.....	23
Figura 15: HPLC- UV acoplado a RID (Shimazu LC-2050C). Cromatogramas de los principales monosacáridos presentes en la biomasa BS	25
Figura 16: Sistema de electroforesis (SDS-PAGE) para la determinación del tamaño molecular de las proteínas recuperadas.....	27
Figura 17: Efecto del ultrasonido en los rendimientos de solubilización (SY, %) de proteínas y carbohidratos.	30
Figura 18: Efecto del ultrasonido en el rendimiento de recuperación de péptidos	33
Figura 19: Efecto del ultrasonido en los tamaños de los péptidos recuperados.....	35
Figura 20: Tamaño de los péptidos recuperados en hidrolisis individual.....	36

Figura 21: Efecto del ultrasonido en el rendimiento de recuperación de glucosa.....	39
Figura 22: Algunos compuestos de degradación detectados con HPLC-UV. A) Biomasa inicial, B)HT+ALK, C)US-HT+ALK, D) US-AH.....	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diferencias en la composición entre un fango primario y un secundario.....	8
Tabla 2: Condiciones experimentales de hidrólisis individual y combinada térmico+alcalino	17

ABREVIACIONES

- AGV: Ácidos orgánicos volátiles
- AH: Autohidrólisis
- ALK: Hidrólisis alcalina
- BS: Biomasa de fangos aerobios
- DA: Digestión anaerobia
- EDAR: Estación de depurada de aguas residuales
- EH: Hidrólisis enzimática
- EPS: Sustancias poliméricas extracelulares
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- HT: Hidrólisis hidrotérmica
- HT+ALC: Hidrólisis termo-alcalina asistida
- NKT: Nitrógeno total Kjeldahl
- PHA: Polihidroxicarboxilatos
- RID: Detector de índice de refracción
- RY: Rendimientos de recuperación de componentes
- SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
- ST: Sólidos totales
- SV: Sólidos volátiles
- SY: Rendimientos de solubilización de componentes
- TSS: Sólidos solubles totales
- US: Ultrasonidos
- US-AH: Ultrasonidos seguido de autohidrólisis
- US-ALK: Ultrasonidos seguido de hidrólisis alcalina
- US-EH: Ultrasonidos seguido de hidrólisis enzimática
- US-HT: Ultrasonidos seguido de hidrólisis térmica
- US-HT+ALK: Ultrasonidos seguido de hidrólisis termo-alcalina
- WAS: Fangos activos residuales- Waste activated sludge.

RESUMEN

La biomasa de fangos generada en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) es un importante material renovable. A pesar del interés en la utilización de esta biomasa para mejorar la viabilidad económica de las EDAR a través del proceso de digestión anaerobia, son muy escasas las investigaciones dedicadas a la valorización fraccionada de sus principales componentes, las proteínas y carbohidratos. En este estudio se evaluó el efecto del empleo de ultrasonidos (US) seguido de hidrólisis alcalina (US-ALK), térmica (US-HT), termo-alcalina (US-HT+ALK) y biológica, enzimática (US-EH) y autohidrólisis (US-AH) en términos de rendimiento de solubilización (SY) y recuperación (RY) de proteínas y carbohidratos. Se realizaron, además, experimentos bajo hidrólisis individual sin pretratamiento en las mismas condiciones (ALK, HT, HT+ALK, EH, AH) para comprobar el efecto del pretratamiento.

Los resultados revelaron que el US como método de pretratamiento, en general, permitió incrementar la solubilización y recuperación de estos dos componentes respecto a la hidrólisis individual. La combinación secuencial de ultrasonidos e hidrólisis termoalcalina (US-HT+ALK) a 121°C permitió altos rendimientos de solubilización ($\approx 92.3\%$) con pérdidas mínimas ($\approx 17.6\%$) para ambos componentes. A 50°C (US-ALK), la solubilización de proteínas aumentó un 28.2%, respecto a la hidrólisis individual (ALK), mientras que los carbohidratos aumentaron un 41% con pérdidas significativas (≈ 32.7). Se recuperaron péptidos de 70-250 kDa con posibles usos en surfactantes y bio-fertilizantes. Por otro lado, el uso de autohidrólisis como método alternativo a las costosas enzimas comerciales proporcionó rendimientos de solubilización de proteínas de 45% con bajos factores de pérdidas ($\approx 3\%$). La combinación secuencial de US y autohidrólisis (US-AH) consiguió solubilizar el 68% de las proteínas, pero con elevadas pérdidas (37.9%), y reducidos tamaños de los péptidos recuperados (inferiores a 50 kDa).

ABSTRACT

The sludge biomass generated in wastewater treatment plants (WWTPs) is an important renewable raw material. Despite the interest in using this biomass to improve the economic viability of WWTPs through anaerobic digestion process, limited research has been devoted to the fractional valorization of its main components, proteins and carbohydrates. In this study, the effect of the use of ultrasound (US) followed by alkaline (US-ALK), thermal (US-HT), thermal-alkaline (US-HT+ALK), biological, enzymatic (US-EH) and autohydrolysis (US-AH) hydrolysis was assessed in terms of solubilization yield (SY) and recovery (RY) of proteins and carbohydrates. In addition, single hydrolysis experiments without pretreatment were performed under the same conditions (ALK, HT, HT+ALK, EH, AH). The effect of pretreatment was also tested.

The results showed that US as a pretreatment method, in general, allowed to increase the solubilization and the recovery of these two components with respect to the individual hydrolysis. The sequential combination of US and thermo-alkali hydrolysis (US-HT+ALK) at 121°C allowed high yields ($\approx 92.3\%$) with minimal losses ($\approx 17.6\%$) for both components. At 50°C (US-ALK), protein solubilization increased by 28.2%, relative to single hydrolysis (ALK), while carbohydrates increased by 41% with significant losses (≈ 32.7). Peptides of 70-250 kDa with potential uses in surfactants and bio-fertilizers were recovered. On the other hand, protein solubilization yields of 45% with low loss factors ($\approx 3\%$) were obtained using autohydrolysis as an alternative to expensive commercial enzymes. The sequential combination of US and autohydrolysis was able to solubilize 68% of the proteins. However, the losses were high (37.9%) and the size of the recovered peptides was reduced (below 50 kDa).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA IMPORTANCIA DE LOS FANGOS DE DEPURADORA

En la actualidad, la demanda global de agua dulce se encuentra en constante aumento debido al rápido crecimiento de la población y al desarrollo industrial que requieren el tratamiento de caudales de aguas residuales cada vez mayores (Gherghel et al., 2019). Una vez que el agua se utiliza en actividades domésticas e industriales, esta tiende a contaminarse. La liberación directa de estas aguas al entorno natural conlleva diversos efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana, tales como la eutrofización, lixiviación, dispersión de agentes patógenos y el aumento de enfermedades transmitidas por el agua (Jadon et al., 2022).

Por lo tanto, antes de su vertido al entorno, es fundamental someterla a procesos de depuración llevadas a cabo en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) para garantizar su calidad óptima.

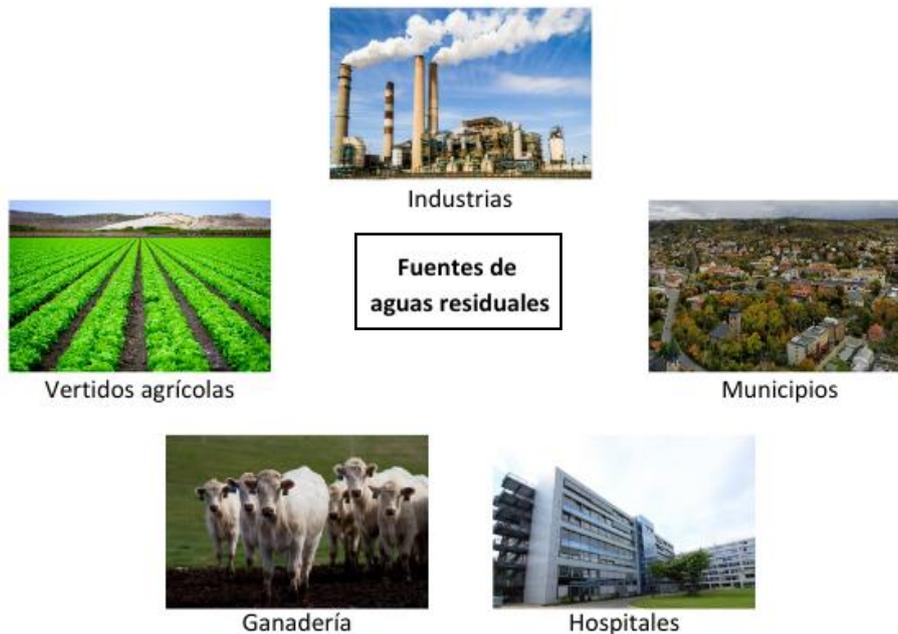


Figura 1: Distintas fuentes de origen de las aguas residuales

El correcto tratamiento de las aguas residuales, además de ser una cuestión vital, también es un requisito respaldado por la ley. En el caso de la Unión Europea, la Directiva 91/271/EEC (EC 91/271), establece los estándares para garantizar que las aguas residuales urbanas reciben un tratamiento adecuado antes de su vertido. En cuanto

la legislación nacional, se debe considerar el Plan Nacional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales, entre otras.

Los fangos o lodos de depuradora constituyen un material semisólido o sólido separado de las aguas residuales en las distintas etapas de su tratamiento (Figura 2). El residuo derivado, como consecuencia del tratamiento físico o químico aplicado para eliminar la materia en suspensión de las aguas residuales en los clarificadores primarios, se denomina *fango primario* (Foladori et al., 2010). Por otra parte, durante los procesos biológicos implementados en el tratamiento secundario de las aguas residuales, se genera un fango biológico o *fango secundario* (Foladori et al., 2010). Las sustancias orgánicas e inorgánicas residuales que permanecen disueltas y han sido arrastradas después de los procesos de clarificación secundaria se eliminan posteriormente en la etapa de tratamiento terciario. Esta combina procesos físicos y químicos avanzados con el objetivo de reducir la turbidez del agua residual, disminuir los niveles de sustancias orgánicas e inorgánicas, así como la cantidad de microorganismos presentes. Como resultado de este tratamiento terciario de las aguas residuales, se genera un fango químico o *fango terciario* (Tyagi & Lo, 2013).

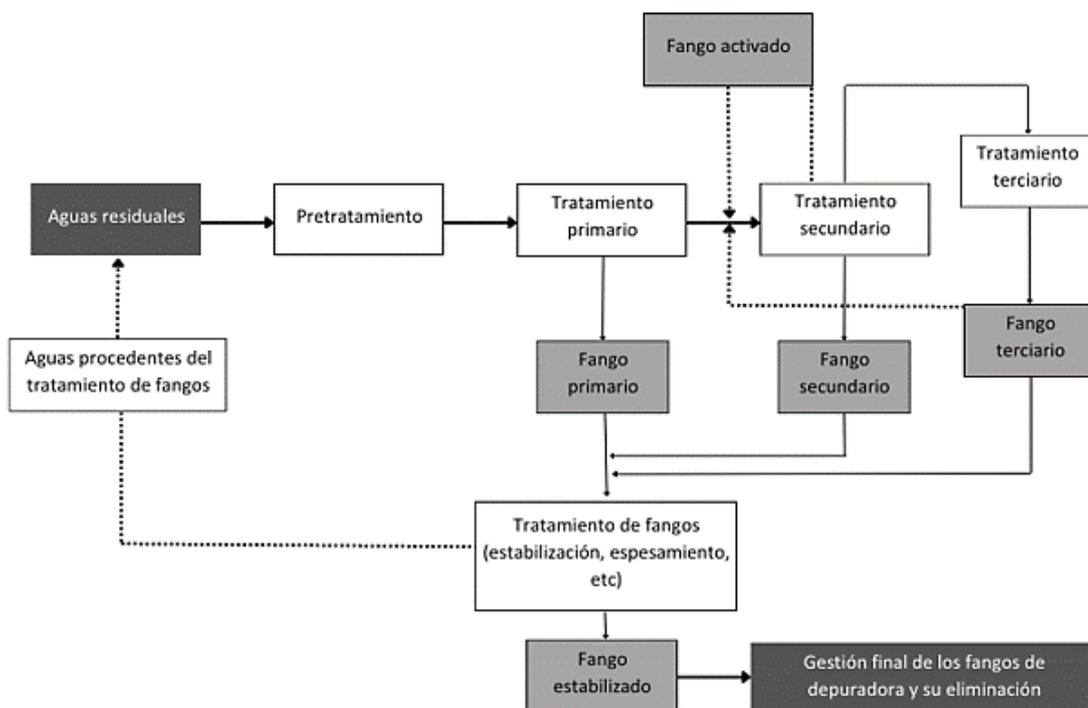


Figura 2: Generación de fangos primarios, secundarios y terciarios en una planta de tratamiento de aguas residuales

En definitiva, los fangos de depuradora constituyen un subproducto importante e inevitable de las diversas estrategias aplicadas para tratar las aguas residuales en las EDAR. Este derivado debe eliminarse de estas instalaciones para garantizar su rendimiento óptimo. La tendencia de producción de este tipo de residuos varía considerablemente a nivel global. En general, la cantidad media anual de producción de fangos de depuradora de los distintos sectores económicos es de aproximadamente 9, 0.36, 2.2, 17.8 y 17.5 millones de toneladas/m³ en Australia, Japón, Europa, China y EE. UU, respectivamente (Cecconet & Capodaglio, 2022; Grobelak et al., 2019). No obstante, la cantidad de fangos de depuradora generados a nivel mundial continúa incrementándose. Por ejemplo, entre 2005 y 2020, la cantidad de fangos de depuradora generados sólo en la Unión Europea (UE) se incrementó casi un 38% (Michalska et al., 2022). Según los informes de la UE, entre los países europeos, Alemania, Reino Unido, España, Francia y Polonia son los que registran la mayor cantidad de fangos de depuradora generados (Grobelak et al., 2019). La gestión de los fangos de depuradora es una tarea oportuna, costosa y complicada, especialmente desde la aplicación de la Directiva 97/271/CE del Consejo Europeo sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas que estableció normativas estrictas que controlan tanto el pretratamiento como el postratamiento de los fangos de depuradora, así como su disposición final. Los costes relacionados con el proceso de tratamiento de aguas residuales y la gestión de los fangos de depuradora dependen, por ejemplo, del tamaño de la EDAR y de la tecnología de tratamiento de aguas residuales aplicada. Los datos bibliográficos (Cecconet & Capodaglio, 2022; Grobelak et al., 2019) revelan que pueden suponer entre el 17% y el 63% del total de los costes de explotación anuales de las EDAR situadas en países de Norteamérica y Europa, respectivamente. Además, los métodos aplicados para el tratamiento de fangos de depuradora pueden consumir hasta el 50% de la demanda energética total de las EDAR y pueden ser responsables de más del 40% de todas las emisiones de gases de efecto invernadero (Foladori et al., 2010).

Por otro lado, los vertidos que se generan en la gestión de las aguas residuales se reconocen como una reserva de recursos, para la generación de energía, por ejemplo y el crecimiento económico. Por ende, tanto las aguas residuales como los fangos de depuradora, que se forman durante el tratamiento del efluente, presentan un gran potencial para su reutilización y reciclaje contribuyendo de forma significativa al alcance de los objetivos de desarrollo sostenible. Además, se combate contra la escasez

de agua y se atenúan los impactos ambientales que generan las aguas residuales en el entorno (Foladori et al., 2010).

La biomasa de fangos secundarios o WAS (por sus siglas en inglés, *Waste Activated Sludge*) generada en las estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas contiene diversos microorganismos y sustancias poliméricas extracelulares (EPS), incluyendo polisacáridos, proteínas y péptidos, lípidos y ácidos nucleicos; residuos orgánicos no digeridos como residuos vegetales, sólidos en suspensión y compuestos inorgánicos como fósforo, nitrógeno o metales (Tyagi & Lo, 2013). Se han propuesto diversos métodos para el tratamiento de los fangos, por ejemplo, su uso como fertilizante en la agricultura, el vertido, la incineración, la digestión anaerobia (DA) y/o pirólisis (Praspaliauskas & Pedišius, 2017). Dado que los fangos de depuradora contienen nutrientes esenciales, por ejemplo, un 55% de carbono, un 15% de nitrógeno y un 3% de fósforo, pueden contribuir a mejorar la calidad de los suelos tras un adecuado tratamiento (Thomsen et al., 2017). Sin embargo, el uso de fangos como fertilizante agrícola genera numerosos problemas ambientales debido a la presencia de metales pesados (Zn, Pb, Cu, Cr, Ni y Cd) y otras sustancias tóxicas, así como de microorganismos patógenos (Praspaliauskas & Pedišius, 2017). Por otro lado, la digestión anaerobia es el proceso más utilizado para tratar los fangos de EDAR y producir biogás. Sin embargo, la baja eficiencia de la etapa de hidrólisis sigue siendo el paso limitante en la DA limitando sus ventajas y, además, supone la pérdida de un valioso recurso susceptible de ser valorizado.

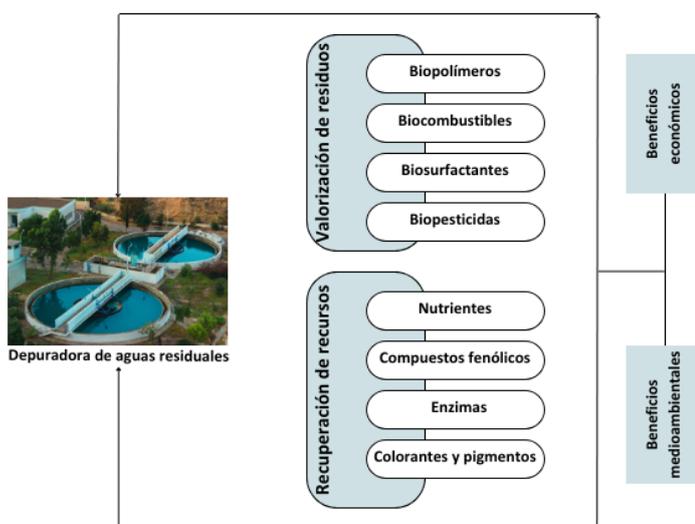


Figura 3: Concepto de economía circular relacionado con la valorización de residuos y recuperación de recursos a partir de aguas residuales y fangos de depuradora

Aunque se han utilizado varios métodos de pretratamiento para acelerar la hidrólisis de los fangos en la DA, el aumento de la solubilización por el pretratamiento no siempre resulta en una mayor producción de biogás debido a la formación de compuestos refractarios (Zhen et al., 2017). Por otro lado, se ha determinado que los procesos de eliminación de fangos son responsables de aproximadamente el 40% de las emisiones totales de gases de efecto invernadero de las EDAR. Esta cifra podría reducirse significativamente si se implementara el enfoque de la economía circular (EC). Por lo tanto, es necesario desarrollar tecnologías rentables y respetuosas con el medio ambiente para el tratamiento de los fangos.

La Directiva europea 2008/CE/98 (CE, 2008) establece como principal prioridad la valorización de los fangos en algunos productos útiles. Además, se promueve la reutilización y el reciclaje de materiales como opciones preferentes sobre la valorización energética de los residuos. Esto implica aprovechar el potencial de los fangos como materia prima en un nuevo enfoque de biorrefinería minimizando o incluso aprovechando los flujos de residuos, aplicando el concepto de bioeconomía circular (Gherghel et al., 2019).

El primer paso en un proceso de biorrefinería para la valorización fraccionada de esta biomasa es maximizar la solubilización de sus componentes principales. Varios procesos químicos, físicos y biológicos han sido desarrollados para tratar o minimizar la producción de WAS a través de procesos como AD donde el aspecto frecuentemente evaluado es el efecto del pretratamiento en la producción de biogás (Gherghel et al., 2019). Teniendo en cuenta que aproximadamente el 60% del peso seco sin cenizas de las células bacterianas son proteínas, ya sea en forma pura o en combinación con otros compuestos como glicoproteínas, ramnolípidos o lipoproteínas (Zhang et al., 2018), es evidente que la recuperación de estos macrocomponentes es altamente prometedora. Sin embargo, la información disponible en cuanto a recuperación de macrocomponentes a partir de esta biomasa es aún más limitada.

Entre los principales macrocomponentes de WAS, la fracción proteica podría ser una importante fuente de péptidos útiles en múltiples aplicaciones: producción de bioestimulantes, biofertilizantes o biopesticidas para plantas en agricultura (Tyagi & Lo, 2013). Los polipéptidos o aminoácidos pueden añadirse a los biofertilizantes con el fin de aumentar la eficiencia de absorción de nutrientes (N y P) (Izydorczyk et al., 2021).

Por otro lado, resulta de interés la obtención de péptidos con propiedades tecno-funcionales para aplicaciones industriales como tensioactivos, espumantes o emulsionantes (Lorenzo-Hernando et al., 2019). Para preparar un agente espumante utilizando péptidos extraídos de biomazas residuales, el rendimiento espumante del hidrolizado depende no sólo del contenido de péptidos, sino también del grado de hidrólisis. El factor clave para la formación y la estabilidad de la espuma es controlar el grado de hidrólisis para convertir las proteínas en polipéptidos en lugar de aminoácidos (Gao et al., 2020). También pueden ser aprovechadas en la producción de biofloculantes, compuestos poliméricos extracelulares principalmente constituidos por glicoproteínas, polisacáridos y proteínas, generados por microorganismos durante la secreción y lisis celular (Aljuboori et al., 2013). Dado su carácter biodegradable, estos biofloculantes se han utilizado ampliamente para la eliminación de contaminantes presentes en las aguas residuales, como sólidos suspendidos, contaminantes orgánicos e iones de metales pesados (Aljuboori et al., 2013). El tamaño de los péptidos recuperados a partir de biomazas es un parámetro crítico que desempeñan un papel fundamental en sus propiedades tecno-funcionales. Además, también afecta a las etapas subsiguientes de separación y purificación (Lorenzo-Hernando et al., 2019; Rojo et al., 2021).

Por otra parte, la fracción de carbohidratos puede ser recuperada como monosacáridos fermentables para la producción de diferentes productos de valor añadido. Una alternativa a los plásticos derivados del petróleo son los polihidroxicanoatos (PHAs), que se producen por fermentación bacteriana de carbohidratos y lípidos. Los PHAs producidos por bacterias tienen propiedades similares a las de los plásticos convencional (Balasubramanian & Tyagi, 2017). El uso de fangos de aguas residuales urbanas como materia prima para la producción de bioplásticos podría ser una alternativa sostenible. Por otro lado, se ha informado también de su uso como biocombustibles (Zhang et al., 2018) a partir de la transesterificación de lípidos y grasas o la generación de bio-alcoholes mediante la fermentación de carbohidratos y otros subproductos procedentes de los mismos como los ácidos orgánicos volátiles (AGV) (Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2018).

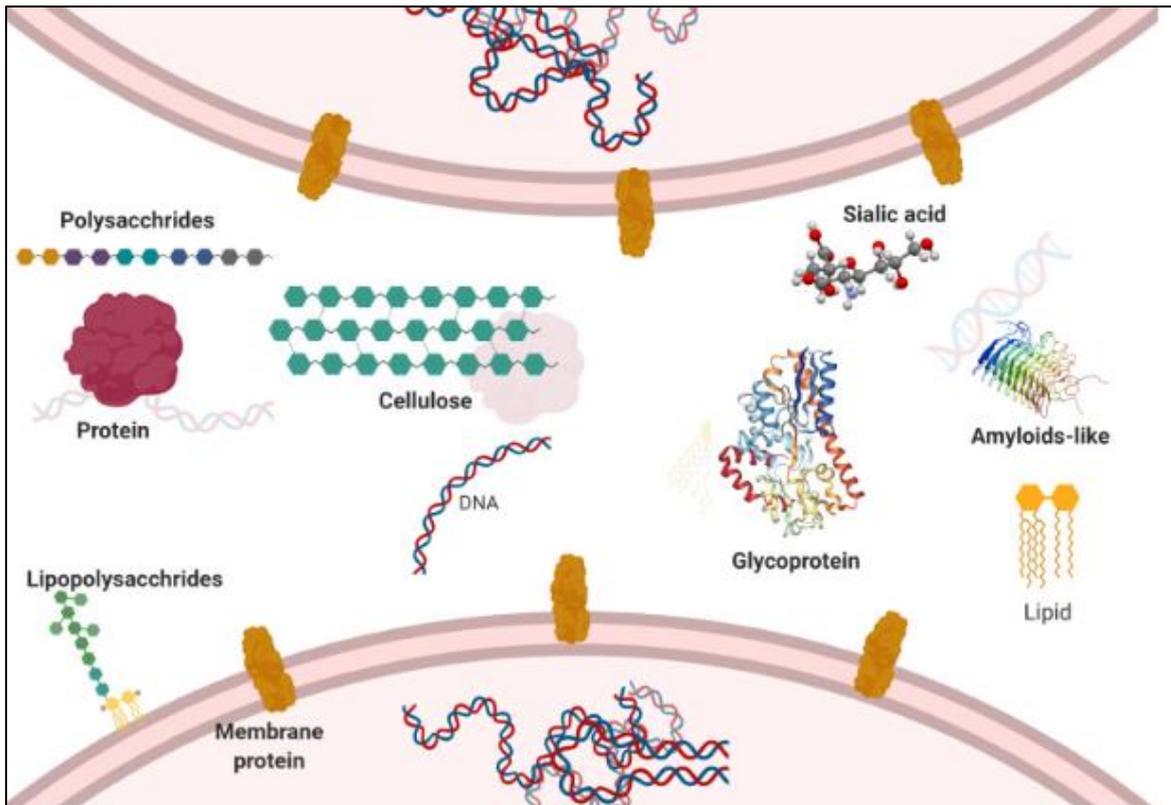


Figura 4: Diversos constituyentes de sustancias poliméricas extracelulares en fangos granulares (Feng et al., 2009)

La mayoría de los estudios, enfocados en mejorar la etapa de hidrólisis en la digestión anaerobia, se centran en la solubilización de la biomasa, en términos de reducción de sólidos totales (ST) o volátiles (SV) incrementando la demanda química de oxígeno de la fracción soluble (DQOs) (Carvajal et al., 2013; Kim et al., 2003; Li et al., 2013; Tian et al., 2016). Estos estudios trabajan con los fangos aerobios debido a su mayor contenido en componentes orgánicos, mayor contenido en nitrógeno y menor contenido en sólidos inorgánicos, grasas y lípidos (Tabla 1). Esta composición facilita el aislamiento, enriquecimiento y purificación del biogás producido durante el proceso de digestión anaerobia (Chen et al., 2019; Devlin et al., 2011). En los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, la mayoría de los microorganismos están presentes en forma de agregados microbianos, como flóculos de fango, biopelículas o gránulos. La presencia de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que constituyen una mezcla compleja de polímeros de alto peso molecular presentes tanto en la superficie de las células como en el interior de los agregados microbianos, también desempeña un papel importante en estos procesos (Nielsen et al., 2002).

Tabla 1: Diferencias en la composición entre un fango primario y un secundario

Parámetro	Fango	
	Primario	Secundario
Sólidos totales (%ST)	2.0-9.0	0.8-3.3
Sólidos orgánicos/sólidos volátiles (%ST)	60-80	59-88
Nitrógeno (N, %ST)	1.5-4.0	2.4-5.0
Fósforo (P, %ST)	0.17-2.8	0.5-2.3
Potasa (K ₂ O, %ST)	0-1	0.5-0.7
Celulosa (%ST)	8.0-15.0	7.0-9.7
Hierro (Fe g/kg)	2-0-4.0	n.d
Sílice (SiO ₂ , %ST)	15-20	n.d
pH	5.0-8.0	6.5-8
Grasas (%ST)	7.0-65	2-12
Proteína (%ST)	20-30	32-41
Ácidos orgánicos	200-2000	1100-1700
Carbohidratos (%ST)	n.d	6.1-9.88

La eficacia de la recuperación de componentes depende del tipo de fango, de la naturaleza y severidad del método de tratamiento. El desafío principal sigue siendo elegir las condiciones óptimas de hidrólisis que permitan maximizar la recuperación de componentes de alto valor añadido. Para la recuperación de las proteínas, es fundamental llevar a cabo la disrupción tanto de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) como de los materiales intracelulares (citoplasma) minimizando las pérdidas y maximizando la recuperación de los componentes solubilizados (Nielsen et al., 2002).

1.2 MÉTODOS DE HIDRÓLISIS DE FANGOS

Se han investigado diversos tratamientos para hidrolizar los fangos aerobios generados en las EDAR, incluyendo métodos de hidrólisis térmicas a bajas (<100°C) y altas temperaturas (> 200°C) (Fernández-Polanco et al., 2021), métodos químicos incluyendo el ajuste de pH o disolventes orgánicos (Chen et al., 2001), así como métodos biológicos (Carvajal et al., 2013), que abarcan la autohidrólisis o el uso de enzimas comerciales (Burgess & Pletschke, 2008) con el objetivo mejorar la etapa de hidrólisis en la digestión anaerobia. Por ejemplo, Yan et al., (2013) consiguieron una

concentración de 3000 mg/L y 520 mg/L de péptidos y monosacáridos solubles tras un tratamiento hidrotérmico a 120°C durante 30 min, a partir de fangos en exceso, alcanzando una producción de hasta 142.6 ml CH₄/g de sólidos volátiles. Carvajal et al., (2013) observaron que el tratamiento por autohidrólisis a 55°C y 12 h, en condiciones de alta concentración de sólidos (8%) y ambiente microaerobio, aumentó en un 40% la solubilización de la materia orgánica y mejoró la productividad de metano en un 23% y se produjo una mejora general de la fluidez de los fangos.

Los métodos tradicionales de tratamientos de fangos incluyen la hidrólisis química y el pretratamiento físico. La razón del primero es que la operación es sencilla y el efecto es estable, por lo que es ampliamente utilizado. Sin embargo, existen ciertas limitaciones cuando se aplican solos, como la necesidad de dosis elevadas y largos tiempos de tratamiento, que a veces dan resultados insatisfactorios y con costes elevados (Liu et al., 2008; Xiao & Zhou, 2020). En la actualidad, muchos investigadores han optado por combinar varios tipos de tratamientos de forma secuencial (en dos etapas) o asistidas (en una etapa) con el objetivo de mejorar el rendimiento de deshidratación de los fangos o incrementar la producción de biogás a través del proceso de digestión anaerobia (Kim et al., 2010).

La tecnología de ultrasonidos se ha utilizado ampliamente como proceso de pretratamiento para mejorar el proceso de digestión anaerobia de fangos aerobios (Kim & Youn, 2011) y anaerobios (Assawamongkholesiri et al., 2013) y en la recuperación de componentes como proteínas, carbohidratos, y compuestos fenólicos a partir de biomasa hemi- y lignocelulósica (Martin Juárez et al., 2021).

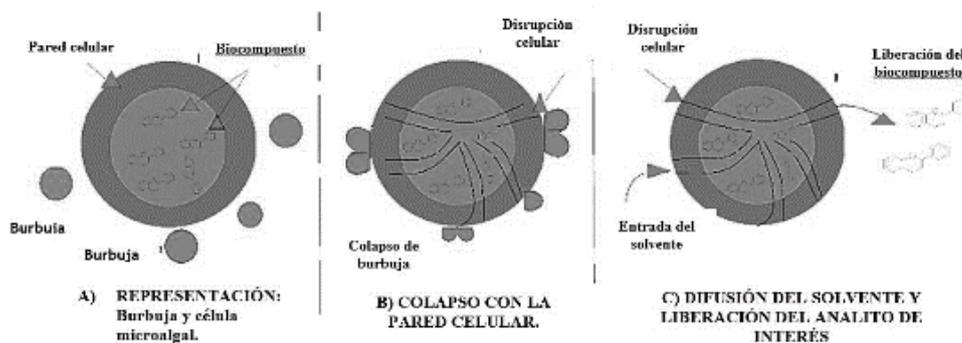


Figura 5: Representación de los fenómenos de cavitación, colapso y liberación del material celular

La cavitación y los efectos térmicos inducidos por las ondas de ultrasonido tienen la capacidad de generar altas temperaturas, altas presiones y fuerzas de cizallamiento mecánico. Esto conduce a la ruptura de la estructura celular bacteriana y mejora el rendimiento en la ruptura de las paredes celulares (Burgess & Pletschke, 2008).

El ultrasonido implica el uso de ondas de sonido de alta frecuencia para descomponer, deshidratar las partículas de fango y liberar el material deseado (Figura 5). Estas ondas sonoras viajan a través de un transductor en el líquido y provocan cambios de presión que dan lugar a la formación de burbujas de cavitación. Estas burbujas aumentan de tamaño a medida que la presión disminuye y finalmente alcanzan un tamaño crítico antes de colapsar de manera abrupta, liberando una considerable cantidad de energía (Burgess & Pletschke, 2008) (Figura 6). El estudio realizado por Martín et al. (2015) reveló que la concentración de carbono orgánico soluble total (TOC_s) en los fangos aumentaba en un 176% cuando se realizaba un tratamiento con ultrasonidos (20 kHz) durante 60 min. Estos resultados demostraron que el ultrasonido puede liberar sustancias intracelulares de las bacterias, lo que es beneficioso para la disolución de proteínas y otras sustancias poliméricas presentes en el floculo del fango.

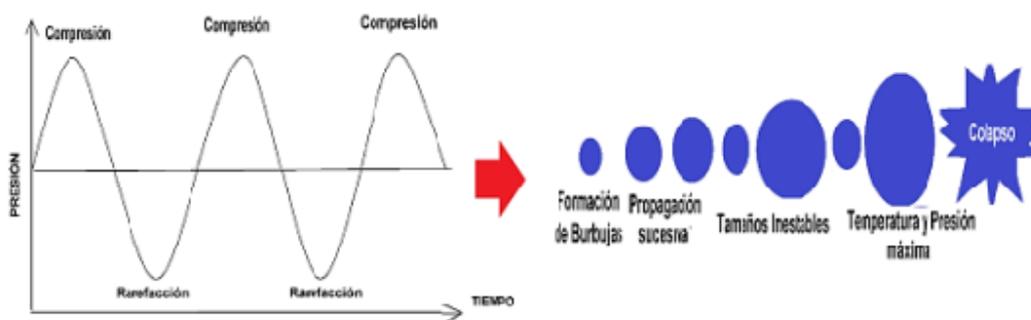


Figura 6: Desarrollo y colapso de la burbuja de cavitación.

La disrupción física causada por los ultrasonidos hace esperar que su combinación secuencial con otros métodos mejore la hidrólisis de la materia orgánica, integrando fenómenos físicos, biológicos, químicos y térmicos. Por ejemplo, Feng et al., (2009) alcanzaron una concentración de péptidos y monosacáridos solubles de 1000 y 200 mg/L tras un pretratamiento con ultrasonidos (10 min, 20 kHz, 26.000 kJ/kg SV) de biomasa WAS. Hwang et al., (2008) aplicaron un proceso secuencial ultrasónico (1010 kJ/kgSV)-alcalino (pH 12) para liberar proteínas de WAS, consiguiendo una concentración de péptidos liberados de 3178 mg/L después de 120 min de pretratamiento. Combinando ultrasonidos y condiciones alcalinas (pH > 12.2), Tian et

al., (2015) observaron que las moléculas pequeñas (con pesos moleculares de aproximadamente 5.6 kDa) en los fangos se disolvían y la concentración de proteínas solubles aumentaba significativamente. Por otro lado, Liu et al., (2008) investigaron los efectos de diversos métodos de pretratamiento, como el termo-ácido (90°C, pH 3), el termo-alcálico (90°C, pH 13), el ultrasónico (28 kHz, 60 min)-alcálico (pH 13) y el ultrasónico (28 kHz, 60 min)-ácido (pH 3) sobre la solubilización de fangos aerobios y la producción de ácidos orgánicos volátiles (AGV). Los resultados indicaron que la proteína soluble era el sustrato principal para la producción de AGV a partir de los WAS después del pretratamiento termo-alcálico o ultrasónico-alcálico. Por un lado, la combinación termo-alcálica, así como la combinación ultrasónicos-alcálicos mejoraban significativamente la solubilización de los WAS a una concentración elevada de sólidos totales (7.4%). La solubilización de los sólidos volátiles (SV) y de la proteína bruta fue del 60.2-61.6% y del 66.8-67.5%, respectivamente. La relación de conversión de SV a ácidos grasos volátiles totales (AGVT) fue de 0.230 en el caso del pretratamiento ultrasónico-alcálico. Mediante este pretratamiento, el nivel de AGTV fue un 68% superior al de los WAS no tratados tras 252 h de fermentación. Se puede esperar que el pretratamiento previo con ultrasónicos extraiga las proteínas de los fangos para reducir el consumo de energía, acortar el tiempo de reacción y evitar reacciones indeseadas.

A pesar de los estudios realizados sobre el efecto de los métodos de hidrólisis en la degradabilidad de WAS, la información disponible en la literatura sobre la recuperación de proteínas y carbohidratos de esta biomasa es muy escasa. García et al., (2017) recuperaron 86% y 87% de proteínas después de tratamiento hidrotérmico y oxidación húmeda. Por otro lado, Chishti et al., (1992) reportaron un 40% de recuperación de proteínas de fangos primarios después de hidrólisis salina con NaCl (180 min, pH 13). Sin embargo, estos estudios no informan sobre la recuperación de la fracción de carbohidratos, o el tamaño de los péptidos recuperados, los cuales tienen una gran influencia para sus posteriores etapas de separación y purificación, así como en sus potenciales aplicaciones. (Lorenzo-Hernando et al., 2019; Rojo et al., 2023).

Existen estudios previos sobre solubilización de proteínas a partir de otras biomásas, como la biomasa algal crecida en fotobiorreactores de tratamiento de purines (Lorenzo-Hernando et al., 2019; Martín Juárez et al., 2021; Martín-Juárez et al., 2019; Rojo et al., 2023). En estos trabajos se han utilizado habitualmente condiciones suaves para preservar la estructura del producto deseado. Por un lado, el uso de hidrólisis químicas a

altas temperaturas puede tener un efecto esterilizante, y evitar la degradación metabólica de los productos liberados, lo cual es de gran interés en la valorización de biomásas con alto contenido bacteriano (Martín Juárez et al., 2021). Por otro lado, la sonicación es un método de pretratamiento con una eficacia moderada, sin embargo, puede combinarse fácilmente con otros métodos de hidrólisis para aumentar la capacidad de disrupción celular ejerciendo un efecto sinérgico sobre la solubilización de los macrocomponentes (Liu et al., 2008; Yan et al., 2020) (Figura 7). Es decir, el empleo de ultrasonidos no es tan altamente efectivo cuando se emplea individualmente. Sin embargo, cuando se combinan junto a otros métodos de hidrólisis ambos resultan más efectivos de lo que serían de forma individual (Chng et al., 2017).

En este contexto, el presente trabajo pretende evaluar el uso de ultrasonidos como método físico de pretratamiento en un proceso secuencial en dos etapas (ultrasonidos seguido de hidrólisis) en la valorización fraccionada de WAS generados en EDAR centrándose en la recuperación de proteínas y monosacáridos. Aplicando un concepto de biorrefinería, se evaluó la solubilización de los principales componentes de la biomasa, carbohidratos y proteínas, analizando el efecto del ultrasonido sobre la posterior hidrólisis bajo diferentes condiciones de severidad. Se utilizaron experimentos controles sin pretratamiento para verificar el efecto del ultrasonido. Además, se determinaron las pérdidas por degradación, en cada caso, y los rendimientos de recuperación de proteínas como péptidos y de los carbohidratos como glucosa y xilosa. Finalmente se analizó el tamaño de los péptidos recuperados.

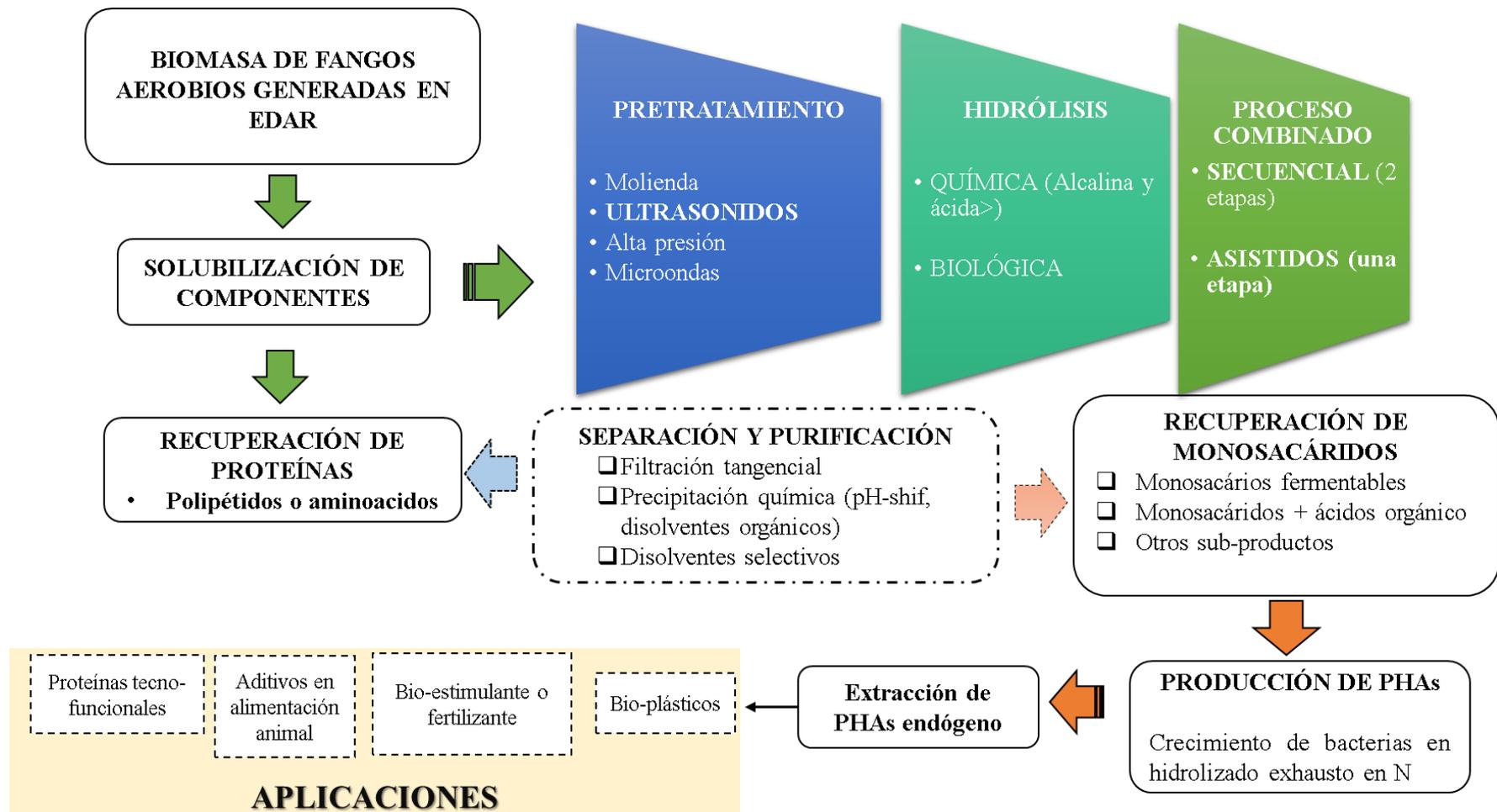


Figura 7: Proceso de recuperación de componentes valiosos a partir de biomasa de fangos aerobios generada en las EDAR urbanas

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo Fin de Máster es evaluar el efecto del pretratamiento con ultrasonidos en la valorización de los principales componentes que conforman la biomasa de fangos aerobios, las proteínas y carbohidratos. Se compararán los rendimientos de solubilización a partir del sólido residual exhausto y los rendimientos de recuperación a partir de los hidrolizados enriquecido mediante la aplicación de métodos combinados secuenciales en dos etapas de ultrasonidos seguido de hidrólisis química, hidrotérmica y biológica bajo diferentes condiciones de dureza. El trabajo se centrará en la fracción mayoritaria y de mayor valor de esta biomasa, la proteica, pero evaluando también la influencia de los diferentes procesos sobre la fracción de carbohidratos.

El estudio se realiza teniendo en cuenta los parámetros de rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos; y los rendimientos de recuperación como péptidos y monosacáridos.

Explícitamente se persiguen los siguientes objetivos específicos:

I. Comparar el efecto que posee el ultrasonido como método físico de pretratamiento en los rendimientos de solubilización y recuperación de proteínas y carbohidratos.

II. Determinar las pérdidas de componentes para cada tratamiento ensayado y, con ello, los rendimientos de recuperación de proteínas como péptidos y de carbohidratos como monosacáridos.

III. Evaluar la influencia del ultrasonido sobre la calidad de los péptidos recuperados en término de tamaño.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 BIOMASA DE FANGOS AEROBIOS

La biomasa de fangos aerobios (BS) utilizada en este estudio se recogió tras la unidad de decantación secundaria de la EDAR urbana local de Valladolid, España, y se concentró mediante centrifugación (Thermo Scientific™ Sorvall X4Pro, 10.000 rpm, 5 min) para reducir el contenido de humedad del 99.8% al 93.3%. La fracción sólida procedente de centrifugación (Figura 8) fue homogeneizada, siendo su composición química (en base seca sin cenizas): $47.9 \pm 2.5\%$ de proteínas, $20.4 \pm 0.8\%$ de carbohidratos (compuestos por $17.4 \pm 0.6\%$ de glucosa, $1.9 \pm 0.2\%$ de xilosa, $1.2 \pm 0.1\%$ de celobiosa y $< 1\%$ de arabinosa), $10.3 \pm 1.1\%$ de lípidos, $9.6 \pm 0.6\%$ de ácido húmico y $25.4 \pm 0.2\%$ de cenizas. La BS se almacenó a $4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ para trabajar con fango fresco en los experimentos de hidrólisis y evitar cualquier actividad biológica (Malhotra & Garg, 2020).



Figura 8: Biomasa de fangos aerobios (BS)

La biomasa BS inicial contiene los 18 de los 20 tipos de aminoácidos que pueden medirse por el método analítico propuesto por (Moore & Stein, 1948) siendo los más abundantes el ácido glutámico (43.2%) y el ácido aspártico (38.9%) seguidos de alanina (33.8%), leucina (26.6%), lisina (19%), tirosina y valina ($\approx 17\%$) y finalmente la fenilalanina, serina y cisteína se encontraron en torno al $\approx 16\%$. La relación entre los aminoácidos esenciales y los no esenciales (Eaa/NEaa) en la BS fue de un 74.7%. Los aminoácidos esenciales predominantes eran la treonina (17.9%), la arginina (23.8%), la valina (17.3%), la fenilalanina (16%), la leucina (26.6%) y la lisina (19.3%). Las concentraciones de histidina (12.7%) y metionina (7.3%) eran ligeramente inferiores a las recomendaciones de la OMS/FAO (Becker, 2007).

3.2 METODOLOGÍA DE HIDRÓLISIS APLICADA A LA BIOMASA

Se compararon diferentes métodos para la solubilización de proteínas y carbohidratos, así como para la recuperación de péptidos y monosacáridos a partir de la biomasa BS. Las condiciones de hidrólisis se seleccionaron con base en la experiencia previa del grupo de valorización de biomasa, con biomasa algal procedente de fotobiorreactores que tratan aguas residuales porcinas (Bolado-Rodríguez et al., 2016; Lorenzo-Hernando et al., 2019; Martín-Juárez et al., 2019; Rojo et al., 2023), los trabajos previamente publicados dirigidos a mejorar el potencial bioquímico de producción de metano de la biomasa WAS mediante el proceso AD (Carvajal et al., 2013; Tian et al., 2016; Zhen et al., 2017) y las escasas referencias sobre la solubilización de la fracción orgánica a partir de biomasa de fangos aerobios (Hui et al., 2022; Hwang et al., 2008).

Para evaluar la contribución de la aplicación de ultrasonidos como método de pretratamiento sobre la solubilización y recuperación de macrocomponentes, se llevaron a cabo experimentos de hidrólisis individual (sin ultrasonidos) en todas las condiciones de operación de acuerdo con el esquema de la Figura 9 y las condiciones de operación se muestran en la Tabla 2.

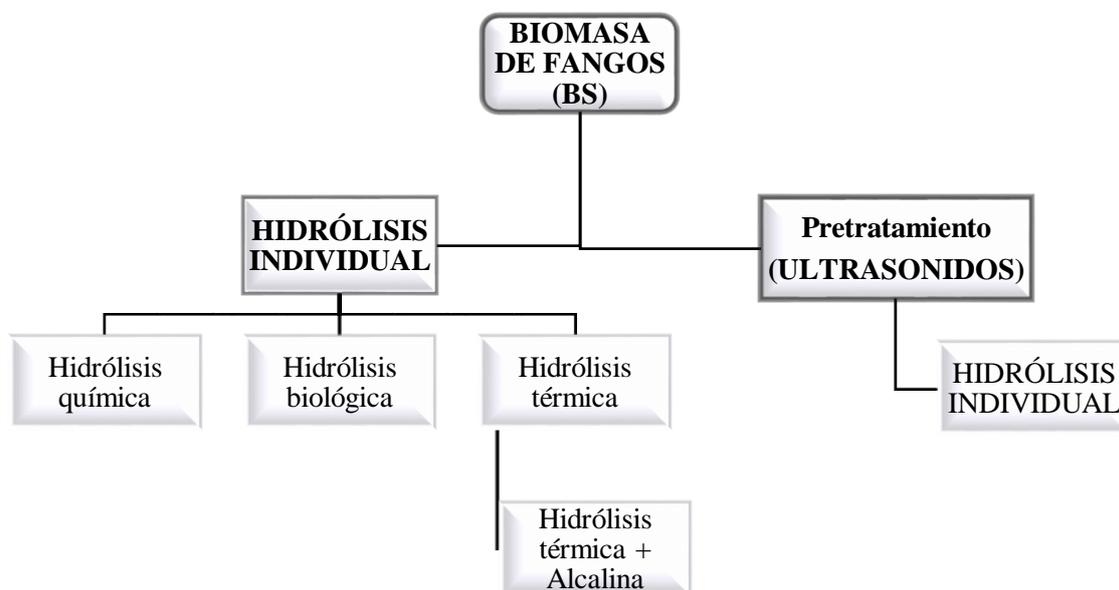


Figura 9: Esquema de las alternativas de hidrólisis estudiadas

Para este estudio, todos los experimentos de hidrólisis se realizaron por duplicado empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL utilizando un volumen útil de 150 mL de

suspensión de biomasa BS a una concentración del 4% (g/g en base a la biomasa seca) a fin de mejorar la fluidez de los fangos espesados (Carvajal et al., 2013; Liu et al., 2008).

Para comparar los diferentes métodos de hidrólisis entre sí, la mayoría de los experimentos se realizaron a 50°C durante 180 min, excepto los experimentos en condiciones más severas que evalúan el efecto de la temperatura y el tiempo, que se realizaron a 121°C durante 30 y 60 min. Después de cada tratamiento, el hidrolizado se centrifugó a 10,000 rpm (Thermo Scientific™ Sorvall X4Pro) durante 10 min a 4°C para separar las fracciones líquidas y sólidas. Las fracciones sólidas y líquidas fueron pesadas tras los diferentes métodos de hidrólisis aplicados. Con el objetivo de verificar los rendimientos de solubilización, se analizó en la fracción solida residual el contenido en sólidos totales y volátiles, nitrógeno total y carbohidratos. En las fracciones líquidas para verificar los rendimientos de recuperación, se analizó el contenido de monosacáridos y proteínas además se obtuvo el tamaño de los péptidos recuperados en todos los experimentos ensayados. Todos los experimentos de análisis e hidrólisis se realizaron por duplicado. Por otro lado, los reactivos y estándares utilizados en este estudio (HCl, NaOH, glucosa, xilosa, celobiosa, arabinosa, metanol, cloroformo, ácido sulfúrico, ácido húmico), con una pureza superior al 95% o grado reactivo se adquirieron a Sigma Aldrich (España) y Panreac Applichem (España).

Tabla 2: Condiciones experimentales de hidrólisis individual y combinada térmico+ alcalino

Hidrólisis	Reactivo	Concentración (M)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Alcalino (ALK)	NaOH	0.5	50	180
		1		
		0.5	50	60
		1		
Hidrotérmico (HT)	Agua	-	121	30
				60
Hidrotérmico + Alcalino (HT+ALK)	NaOH	0.5 M	121	30
		1 M		
		0.5 M	121	60
		1 M		
Autohidrólisis (AH)	Agua	pH 6.5	50	180
				60
Enzimático (EH)	Protamex	0.5% 1%	50	180

3.2.1 Pretratamiento con ultrasonidos

Los experimentos secuenciales en dos etapas se llevaron a cabo empleando ultrasonidos como método de pretratamiento con el objetivo de incrementar la superficie de contacto para la posterior hidrólisis sobre la solubilización de los componentes de interés (Burgess & Pletschke, 2008).

La suspensión de biomasa al 4% (g/g) en los mismos medios de suspensión de las hidrólisis individuales mostradas en la Tabla 2 fueron previamente sonicadas a 1.1 W/mL (Gao et al., 2021) empleando una sonda de ultrasonidos (UIP1000hd Hielscher Ultrasound Technology, Alemania, 1000 W) y operando a 20 kHz y 50% de amplitud durante 5 min. La suspensión se colocó en un reactor de acero inoxidable de 150 mL con agitación mecánica. El reactor de acero posee un encamisado por la que circula agua fría para mantener la temperatura de reacción a 50°C. Tras el pretratamiento ultrasónico, la suspensión se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, y los experimentos de hidrólisis individual se llevaron a cabo según las condiciones operativas mostradas en la Tabla 2 explicadas en detalles a continuación. Además, se utilizó un experimento control que sólo implicaba el uso de ultrasonidos sin posterior hidrólisis.



Figura 10: Experimentación del proceso secuencial en dos etapas de ultrasonidos seguido de hidrólisis

3.2.2 Ensayos de hidrólisis alcalina (ALK)

En el proceso de hidrólisis química, se añadieron al BS volúmenes adecuados de una disolución de NaOH para obtener una suspensión con una concentración al 4% en masa de sólido seco. Los álcalis pueden inducir la solubilización de las proteínas de la membrana, la saponificación de los lípidos de la membrana y el daño de la célula microbiana (Rojo et al., 2023).

En este contexto, se eligió el hidróxido de sodio (NaOH) como el reactivo alcalino, ya que es el más utilizado en la recuperación de proteínas a partir de biomasa generada en aguas residuales, como las microalgas (Rojo et al., 2023). Además, el NaOH favorece la solubilización de la materia orgánica a partir de fangos aerobios (Xiang et al., 2017) en comparación con otros álcalis como el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o KOH. También se ha informado de que el KOH solubiliza menos proteínas que el NaOH, y el coste del KOH para obtener un contenido similar de proteínas era mayor que el del NaOH (Xiang et al., 2017).

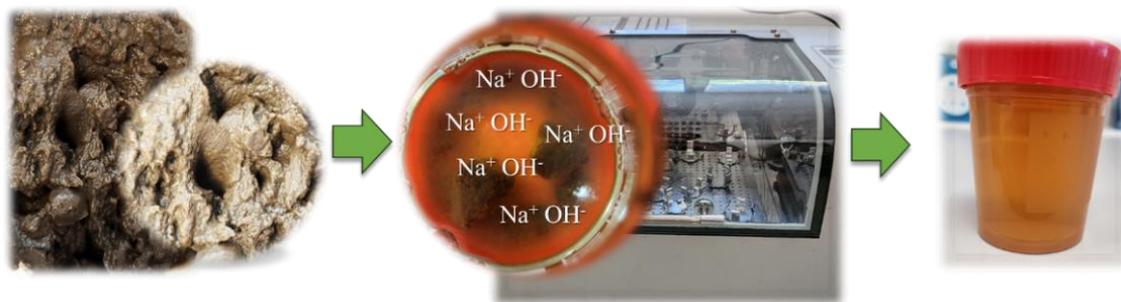


Figura 11: Procedimiento experimental aplicado a la suspensión del 4% de BS bajo condiciones de NaOH (ALK) a 0.5 y 1 M durante un tiempo de 60 y 180 min a 50°C.

Dado que la pared microbiana de los flóculos de fangos es bastante débil (Liu & Fang, 2002) en comparación con otras biomazas residuales como la biomasa de algas (D'Hondt et al., 2017) o la biomasa lignocelulósica (Bolado-Rodríguez et al., 2016), se consideraron dos niveles de concentración relativamente bajos (0.5 M y 1 M) para los ensayos con el fin de mantener la integridad de los componentes liberados. Los ensayos se realizaron en un agitador rotatorio (Comecta-Ivymen, Spain) a 200 rpm y 50°C con un tiempo de hidrólisis de 60 y 180 min (incluyendo el tiempo de calentamiento inicial).

3.2.3 Ensayos de hidrólisis térmica (HT) y combinación térmica-alkalina (HT+ALK)

La combinación de altas temperaturas (121°C) como método hidrotérmico (HT) alcalino han proporcionado altos rendimientos de solubilización con tiempos de reacción cortos (Nitsos et al., 2020) en diversas biomazas residuales como fangos aerobios (García et al., 2017), microalgas (Martin Juárez et al., 2021; Martín-Juárez et al., 2019; Rojo et al., 2023) y biomasa lignocelulósica (Bolado-Rodríguez et al., 2016). Además, este proceso hidrotérmico alcalino ha demostrado tener un efecto esterilizante en biomazas con alto contenido bacteriano, lo cual puede ser de gran interés para evitar la degradación metabólica de los productos liberados (Fuentes et al., 2016; Martin Juárez et al., 2021). Esto evita la presencia de bacterias viables en el hidrolizado, que podrían degradar los productos de valorización y competir con los microorganismos de fermentación en las posteriores etapas de valorización (Fuentes et al., 2016; Martin Juárez et al., 2021).

Experimentalmente, para la hidrólisis hidrotérmica (HT), se llevó a cabo una suspensión acuosa de BS al 4% en masa de sólido seco a pH 6.5 empleando agua destilada como medio de hidrólisis y esta se llevó a autoclave (RaypaTM Steam sterilizer) a 121°C y 1 bar durante 30 min (Chen et al., 2019) y 60 min (Bolado-Rodríguez et al., 2016). Para la combinación simultánea de hidrólisis química e hidrotérmica (HT+ALK) la biomasa de BS al 4% en las mismas condiciones descritas para el ensayo ALK (0.5 M y 1 M) fue expuesta a 121°C en autoclave durante 30 y 60 min (Bolado-Rodríguez et al., 2016).



Figura 12: Experimentación de hidrólisis hidrotérmica (HT) y combinación hidrotérmica+alcalina (HT+ALK) a la suspensión del 4% de biomasa BS.

3.2.4 Ensayos de hidrólisis biológica: Enzimática (EH) y Autohidrólisis (AH)

Por último, se utilizaron dos tipos de métodos biológicos (enzimático y autohidrólisis). Por un lado, en el proceso de recuperación de proteínas, se ha recurrido al uso de enzimas comerciales, como las proteasas, debido a su alta selectividad. Sin embargo, el alto coste de estas enzimas y la dificultad de encontrar la dosis adecuada en relación con el sustrato a veces limitan su aplicabilidad (Rojo et al., 2021).

Experimentalmente, la hidrólisis enzimática se llevó a cabo empleando la enzima comercial Protamex (Novozyme A/S, Denmark) a dos concentraciones 0.5% y 1% (g/100 g de sólido seco) (Rojo et al., 2021) empleando agua destilada como disolvente a la temperatura (50°C) y pH (6.5) óptimo de la enzima empleando un agitador rotatorio (Comecta-Ivymen, Spain) a 200 rpm durante 180 minutos (Rojo et al., 2023). La enzima Protamex es una mezcla de endo y exo-proteasas (combinación de las cepas *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloquefaciens*) con una actividad enzimática de 1.4 AU-N/g capaz de extraer proteínas de altos pesos moleculares respecto a otras proteasas, como la Alcalasa, cuando se comparan con el mismo sustrato (Rojo et al., 2021).

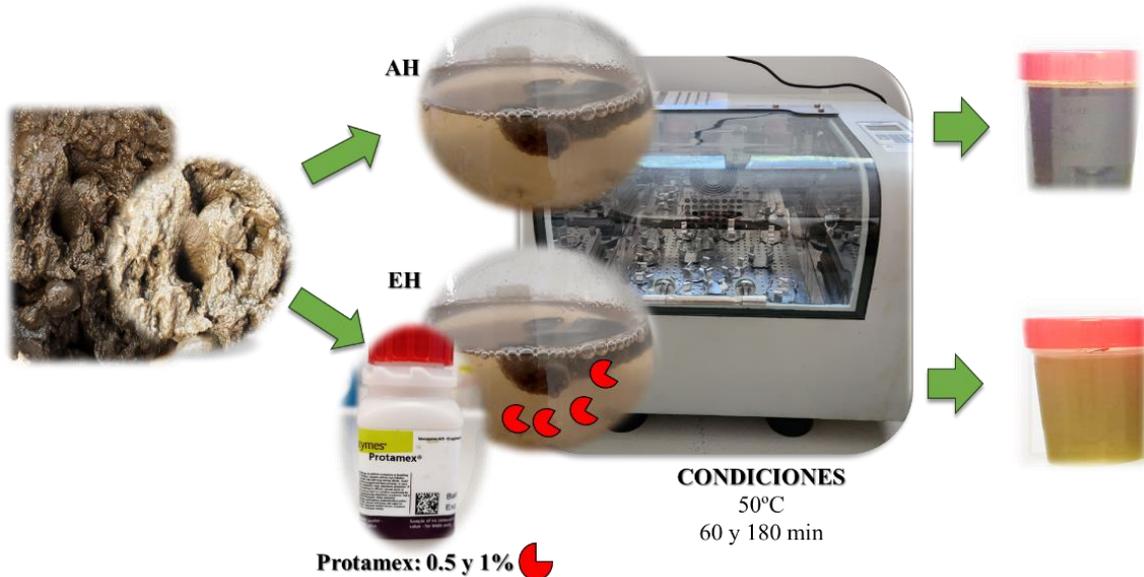


Figura 13: Experimentación de hidrólisis biológica (autohidrólisis, AH y enzimático, EH) aplicados a una suspensión al 4% de biomasa BS.

Por otro lado, la autohidrólisis (AH), como método biológico, sencillo y barato, permite establecer condiciones de pH y temperatura que permita a los microorganismos que forman parte de la biomasa liberar las enzimas hidrolíticas contenidas en su propio sistema metabólico (Carvajal et al., 2013), evitando el uso de costosas enzimas comerciales.

Experimentalmente, la autohidrólisis (AH) se realizó utilizando un agitador rotatorio (Comecta-Ivymen, España) a temperatura constante (50°C), y agitación (200 rpm) a pH 6.5 durante 60 y 180 min, incluyendo el tiempo de calentamiento inicial, correspondientes a las condiciones óptimas de la enzima proteasa (Rojo et al., 2021). Estas condiciones de operación, que favorecen la actividad de las enzimas de tipo proteasa presentes en los WAS, fueron seleccionadas siguiendo los trabajos de Carvajal et al., (2013) y Burgess & Pletschke, (2008).

3.3 CÁLCULOS

A partir del balance de masas para cada componente (proteínas y carbohidratos) se definieron los siguientes parámetros para evaluar los rendimientos de solubilización (Ec.1), rendimientos de recuperación (Ec.2) así como las pérdidas de componentes (Ec.3) por los tratamientos aplicados.

$$SY (\%) = \left(1 - \frac{\text{g componentes en sólido residual } (FS)_{DH}}{\text{g componente en biomasa inicial BS}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

$$RY (\%) = \left(\frac{\text{g componente en hidrolizado } (FL)_{DH}}{\text{g componente en biomasa inicial BS}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

$$CL (\%) = \left(\frac{SY (\%) \text{ de componente} - RY (\%) \text{ de componente}}{SY (\%) \text{ de componente}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

donde SY es el rendimiento de solubilización (%), RY es el rendimiento de recuperación (%) y CL son las pérdidas de componentes solubilizados (%). "Componente" hace referencia a proteínas/péptidos y carbohidratos/monosacáridos en gramos (g) en la fracción sólida (FS) y en la líquida (FL), después del tratamiento de hidrólisis (DH) o en la biomasa de fango inicial (BS).

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 Sólidos totales, volátiles y cenizas

Para la determinación del contenido de humedad se llevó a cabo un análisis de sólidos totales a la biomasa inicial, así como a las fracciones sólidas tras los diferentes tratamientos secando la muestra a $105\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Posteriormente, estas muestras fueron calcinadas a $550\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 24h para obtener el contenido de sólidos volátiles.

3.4.2 Análisis de nitrógeno y proteínas

El contenido de nitrógeno orgánico en las fracciones sólidas, líquidas y en la biomasa inicial se determinó de acuerdo con el método del Nitrógeno Total Kjeldahl (NKT) según el método estándar descrito en detalle en (USEPA, 2001). El método NKT consta de tres etapas: digestión, destilación y valoración (Figura 14)

- En la primera etapa, se realizó una *digestión* ácida de las muestras. Para ello, se depositaron las muestras en unos tubos de digestión junto con ácido sulfúrico concentrado al 96% en exceso para mantener el equilibrio ácido-base y una pastilla de catalizador Kjeldahl ($0.3\% \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) junto a unas bolitas de cerámica. La digestión se realizó mediante una rampa de temperatura de 15 min (150°C), 45 min (270°C) y 120 min (370°C) convirtiendo el nitrógeno orgánico (procedente de las proteínas) en ion amonio (R_1). Tras finalizar la digestión, se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que las muestras tornaron a transparente.

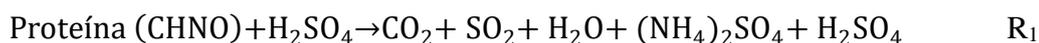
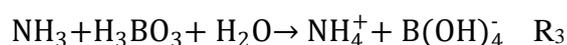
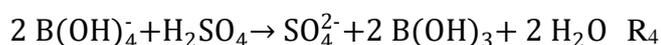


Figura 14: Esquema y equipo experimental para la determinación de proteínas por el método NKT

- La segunda etapa, la de *destilación*, tuvo lugar en la unidad de destilación (KjeFlex K-360). La muestra, digerida en la primera fase, se alcaliniza con NaOH 13 N, provocando que el nitrógeno se desprenda en forma de amoniaco (R₂). El amoniaco se recoge sobre un Erlenmeyer que contiene una disolución de ácido bórico al 4% junto con un indicador mixto de Tashiro. Esta destilación tiene lugar en exceso de ácido bórico, el cual se utiliza como solución absorbente que captura el amonio formando iones amonio solvatados (R₃).



- La tercera etapa, la etapa de *valoración*, se lleva a cabo la cuantificación del contenido de nitrógeno amoniacal de las muestras. A partir de la cantidad de ion borato que se formado, el cual es equivalente al nitrógeno absorbido, se realizó una valoración volumétrica ácido-base (R₄) de manera directa con ácido sulfúrico (0.05-0.1 N según el contenido de N en la muestra) previamente normalizada frente a un patrón primario de hidrógeno ftalato de potasio. En dicho proceso, la muestra inicialmente de color verde se tornará violeta cuando haya concluido la reacción (intervalo de viraje del indicador de Tashiro entre pH 4.4 a 5.8).



A partir del volumen utilizado de ácido sulfúrico y su normalidad, se puede calcular la cantidad de nitrógeno presente en la muestra inicial, la fracción sólida residual y la fracción líquida, y con ella saber la cantidad de proteínas que contienen a partir de un factor Nitrógeno a Proteína de 4.3 obtenido a partir del perfil de aminoácidos de la biomasa inicial (Templeton & Laurens, 2015).

3.4.3 Análisis de carbohidratos

Los carbohidratos, que son polihidroxi aldehidos o polihidroxi cetonas, están compuestos por una o varias unidades de monosacáridos. Mediante hidrólisis ácida, todos los carbohidratos se descomponen en monosacáridos, siendo esta reacción más eficiente a temperaturas elevadas (Martín-Juárez et al., 2019). Para determinar el contenido de carbohidratos en la biomasa inicial, en las fracciones sólidas y en las fracciones líquidas se empleó el protocolo de NREL (Wycken & Laurens, 2013).

Dicho método implica la hidrólisis ácida de los carbohidratos presentes en la biomasa, seguida de la medición cuantitativa de los monosacáridos resultantes mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-Vis que lleva acoplado a un detector de índice de refracción (HPLC-RID). En primer lugar, la biomasa inicial, así como las fracciones sólidas obtenidas tras los tratamientos de hidrólisis, se sometieron a una hidrólisis ácida concentrada con ácido sulfúrico al 72% en peso a 35°C en tubos de vidrio. Se dejó que la hidrólisis tuviese lugar en un baño termostático a 35°C durante 1 hora, a la vez que se agitaban los tubos cada 5-10 minutos para favorecer la solubilización. Tras esta primera digestión se añadieron 84 mL de agua destilada para reducir la concentración de ácido hasta un 4% en peso y las muestras se sometieron a autoclave (P-Selecta) a 121°C durante 60 min. Posteriormente, se separaron las fracciones sólidas de las líquidas. Finalmente, la fracción líquida resultante de la hidrólisis del sólido se filtró con filtros de membrana de nylon de 0.22 µm

Los principales monosacáridos se cuantificaron en las fracciones líquidas (las fracciones líquidas obtenidas tras los experimentos de hidrólisis aplicada y las fracciones líquidas procedentes de la hidrólisis ácida de los sólidos) utilizando una columna de exclusión iónica Aminex® HPX-87H (Bio-Rad) (300 x 7,8 mm, 9 µm de tamaño de partícula, 8% de enlace cruzado, rango de pH 1-3) instalada en un módulo de separación Shimadzu LC-2050C.

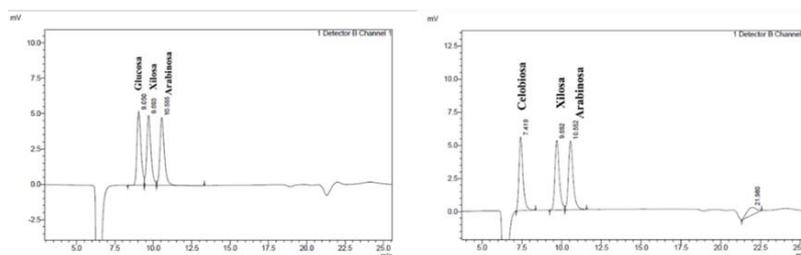


Figura 15: HPLC- UV acoplado a RID (Shimadzu LC-2050C). Cromatogramas de los principales monosacáridos presentes en la biomasa BS

Se utilizó un detector de índice de refracción (RID) para cuantificar la concentración de monosacáridos utilizando una fase móvil isocrática constituida por una solución de ácido sulfúrico 25 mM (calidad HPLC) con un caudal de 0.6 mL/min. La columna y el RID se mantuvieron a 50°C. Se preparó una solución de calibración multiestándar por dilución de estándares individuales (glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa) disponibles comercialmente con una pureza > 95% (Sigma, Aldrich, España).

Además, con el propósito de considerar cualquier descomposición que pudiera haber ocurrido durante la hidrólisis ácida de los monosacáridos, se aplicó un tratamiento de hidrólisis ácida utilizando H₂SO₄ a las muestras comerciales de glucosa, arabinosa, celobiosa y xilosa, para calcular los factores de corrección necesarios. En última instancia, el cálculo del contenido de carbohidratos se efectuó sumando las cantidades de todos los monosacáridos (glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa).

Monosacárido	F. Degradación
GLUCOSA	1.05
XILOSA	1.04
ARABINOSA	1.04
CELOBIOSA	0.72

3.4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El tamaño de las proteínas recuperadas en todas las fracciones líquidas se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-page) según el método descrito por Rojo et al., (2021). La electroforesis SDS-page con Tris-Glicina se realizó utilizando una unidad de electroforesis Mini-PROTEAN (laboratorios Bio-Rad, EE.UU) y un gel Mini-PROTEAN 10-20% Tris-Glicina (Laboratorios Bio-Rad, EE.UU.). La separación de proteínas se llevó a cabo según las especificaciones del fabricante (BIORAD). Las muestras de las fracciones líquidas (20 µL) se mezclaron con 20 µL de una solución compuesta por Laemmli y 50 mM de reactivo de Cleland (DTT, ditioneitol) y se calentaron a 100 °C durante 5 minutos.

Posteriormente, se cargaron 30 µL en los geles prefabricados de la unidad de electroforesis que contienen running buffer 10x Tris/Glicina/SDS (25 mM de Tris, 192 mM de tricina y 0,1% de SDS, pH 8.3). Las condiciones de funcionamiento se ajustaron

a una tensión constante de 200 V. La corriente eléctrica fue disminuyendo con el tiempo, pasando de 60 mA, inicialmente, a 30 mA. Se utilizó el marcador proteico PageRuler Plus Prestained (Thermo Scientific) como marcador molecular con un rango de tamaño de proteínas de 10 - 250 kDa.

Las bandas de proteínas se fijan con una solución fijadora (40% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético) durante 30 minutos. A continuación, se tintaron con una solución de tinción (0.1% de Coomassie Blue R-250, 40% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético) durante 1 hora. Para finalizar, los geles se destiñen con una solución compuesta por metanol: ácido acético: agua en proporción (40:10:50, v/v).

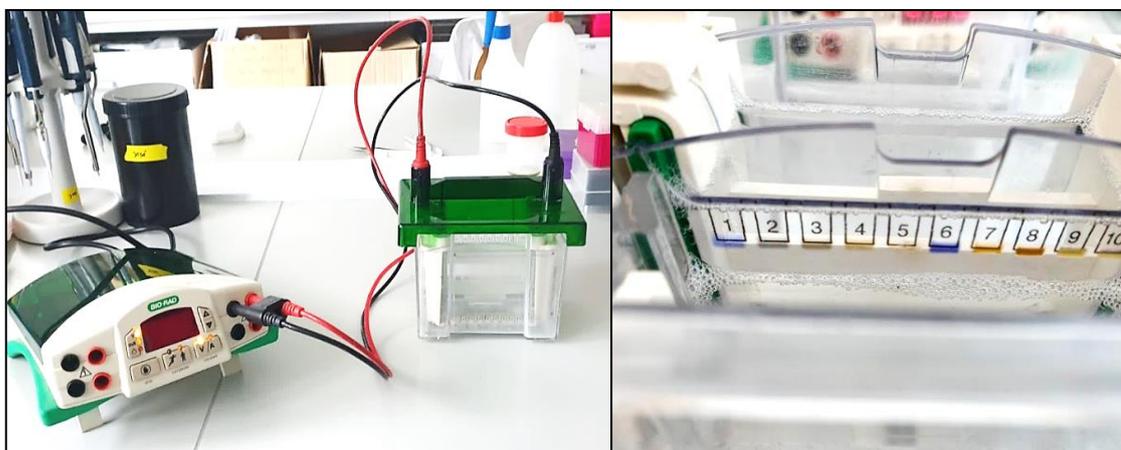


Figura 16: Sistema de electroforesis (SDS-PAGE) para la determinación del tamaño molecular de las proteínas recuperadas

3.4.5 Determinación de lípidos y ácidos húmicos

La determinación de lípidos en la biomasa inicial se llevó a cabo de acuerdo con el método de extracción con cloroformo:metanol (2:1, v/v) propuestos por Bligh, E.G. and Dyer, (1959). Por otro lado, el contenido de ácidos húmicos se determinó siguiendo el protocolo de hidrólisis alcalina con NaOH (2 M) seguida de precipitación ácido (HCl, 2 M) propuesto por Shahbazi et al., (2019). Como es habitual en la biomasa de fangos aerobios generados en las EDAR la composición de lípidos y ácidos húmicos en la biomasa inicial resultaron bajas (10.3% y 9.6%, respectivamente) para considerar su valorización y estos componentes no fueron monitorizado a lo largo de los procesos estudiados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EFECTO DEL ULTRASONIDOS EN LOS RENDIMIENTOS DE SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS.

La Figura 17 muestra los resultados de la solubilización de proteínas y carbohidratos obtenidos tras la aplicación secuencial de un método físico como el ultrasonido (20 kHz, 50% de amplitud) durante 5 min seguido de hidrólisis individual según se especifica en el apartado experimental bajo las condiciones operativas mostradas en la Tabla 2. Además, se muestra también los resultados de rendimiento de solubilización bajo hidrólisis individual sin pretratamiento con el objetivo de observar la influencia que tiene el ultrasonido. Los resultados de los rendimientos de solubilización se expresan en referencia a la masa de proteínas y carbohidratos contenidos en la biomasa inicial (BS).

El pretratamiento con ultrasonidos (US) es una técnica ampliamente utilizada para mejorar la eficiencia de la hidrólisis y solubilización de componentes orgánicos en numerosas biomásas residuales. Como se ha mencionado anteriormente, la aplicación de US a la biomasa puede generar fenómenos de cavitación, microturbulencia y cambios de presión que facilitan la desestabilización de la matriz celular y la liberación de compuestos orgánicos (Chng et al., 2017).

A la vista de los resultados, el pretratamiento con ultrasonidos ha demostrado ser eficaz en la solubilización de las proteínas y carbohidratos mostrando una mayor influencia en aquellos métodos de hidrólisis bajo suaves condiciones (ALK, EH, AH) mientras que para las condiciones de mayor severidad (HT, HT+ALK) su influencia fue menos marcada. Por ejemplo, no se observó una diferencia notable del ultrasonidos, respecto a la hidrólisis sin pretratamiento (HT+ALK) en los rendimientos de solubilización de proteínas ($\approx 92\%$ y 87% con NaOH 1M, 60 min), aunque su influencia en la fracción de carbohidratos fue mucho más marcada cuando la concentración de NaOH fue mínima con un incremento del 65% (HT+ALK, 0.5 M) hasta un 95% (US-HT+ALK, 0.5 M). Cuando la concentración de NaOH fue 1 M (US-HT+ALK) permitió solubilizar ambos componentes prácticamente en la misma proporción ($\approx 92\%$). El efecto del ultrasonido sin duda fue mucho más marcado en la fracción de carbohidratos que en la proteica, de hecho, el blanco realizado sólo con US (dato no mostrado en las

gráficas) se observó una mayor solubilización de carbohidratos (26.7%) que de proteínas (15.9%). Por otro lado, para el tratamiento hidrotérmico el pretratamiento con US permitió que en tan solo 30 min de hidrólisis (US-HT) los rendimientos de proteínas y carbohidratos se vieron incrementados hasta en un 18% y 21% respecto al ensayo hidrotérmico sin pretratamiento (HT) mientras que tras 60 min estos incrementos fueron más moderados alcanzando rendimientos de solubilización del 75.5% para las proteínas y del 63.4% para los carbohidratos, aproximadamente un 16% superior al ensayo HT a 60 min sin pretratamiento. Passos et al., (2015) obtuvieron una liberación insignificante de componentes macromoleculares al aplicar un tratamiento con ultrasonidos (70 W, 30 min, 26.700 J/g ST) a microalgas cultivadas en aguas residuales urbanas. Martín-Juárez et al., (2021) estudiaron el efecto del tiempo de aplicación de US con biomasa algal generada en corrientes residuales, pasando de una solubilización del 28% y 10% de carbohidratos y proteínas con 5 min a 479 W hasta un 42% y 27% tras 20 min.

Los resultados mostraron un importante efecto del ultrasonido en los rendimientos de solubilización bajo suaves condiciones (ALK) alcanzándose con US-ALK, (50°C, 60 y 180 min) rendimientos muy similares a los de las combinaciones US-HT+ALK y US-HT, lo que supone un aumento de $\approx 65\%$. Por lo tanto, el efecto combinado del ultrasonido seguido de álcali puede destruir eficazmente las células del lodo y solubilizar más proteínas que el ultrasonido o el álcali por sí solos. Como importante tecnología de ruptura de biomasa, el ultrasonido genera una fuerza de cizallamiento durante el funcionamiento que puede descomponer eficazmente los flóculos de lodos y, seguidamente, exponer las células microbianas de los flóculos rotos al entorno alcalino, acelerar la transferencia de masa de la solución alcalina (Tian et al., 2016) y la disolución de las células por el álcali. Chiu et al., (1997) estudiaron la solubilización de WAS (1%, p/v) pretratado con la combinación de ultrasonidos (14.4 s/mL) y alcalino (NaOH, 40 meq/L) y encontraron que el 50-60% de TSS (sólidos solubles totales) puede ser solubilizado bajo esta combinación. Liu et al., (2008) consiguieron solubilizar el 70% de proteínas con un tratamiento ultrasónico (28 kHz, 60 min)- alcalino (NaOH, pH 13), similar al rendimiento obtenido con una combinación termo-acalina a 90°C ($\approx 67\%$). Gao et al., (2021) observaron que 20 min de ultrasonidos a 2 W/mL a pH 12 proporcionaron un rendimiento de solubilización de proteínas del 81.4 %, mientras que, en las mismas condiciones, el rendimiento de extracción de proteínas fue sólo del 7.1 % sólo con ultrasonidos.

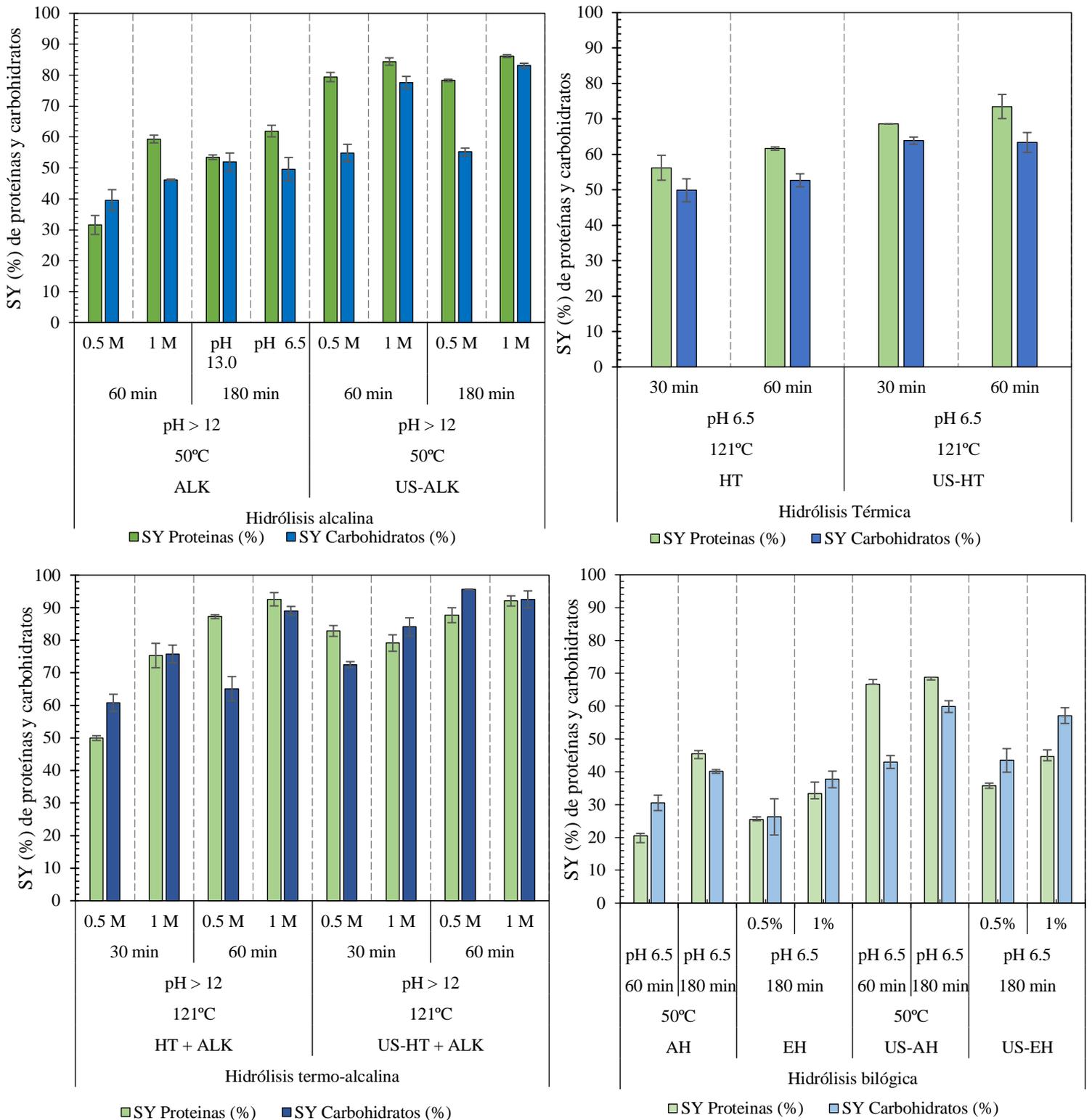


Figura 17: Efecto del ultrasonido en los rendimientos de solubilización (SY, %) de proteínas y carbohidratos en referencia a la masa de carbohidratos y proteínas inicial tras el tratamiento de ultrasonidos-hidrólisis aplicado a la biomasa BS. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de 4 determinaciones analíticas (etapa de hidrólisis analizada en réplica). Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.

Por último, el pretratamiento con ultrasonidos permitió incrementar las escasas solubilizaciones conseguidas con los métodos biológicos, logrando incrementar la solubilización de proteínas desde un 20.5% (AH) hasta un 66.6% (US-AH) tras 60 min de incubación (casi un 69% superior), mientras que para los carbohidratos los incrementos fueron más moderados (\approx 29%) mientras que tras 180 min de incubación los rendimientos se vieron incrementados en un 33% para ambos componentes. Sin embargo, en los experimentos de hidrólisis enzimática, el efecto del US resultó moderado, especialmente para las proteínas. Se observó que el tratamiento con ultrasonidos seguido de hidrólisis enzimática con Protamex (US-EH) favoreció la solubilización de carbohidratos respecto a la hidrólisis enzimática individual (EH) con incrementos que van del 39.5% y 33% cuando se incrementó la concentración de enzima de 0.5% al 1% mientras que para las proteínas solo se observaron ligeros incrementos del 25% al 29%, existe la posibilidad de que algunas de las proteínas que se encuentran formando parte de la composición del fango de depuradora, tengan estructuras para las que la acción de Protamex no resulte óptima. En este sentido, Martín Juárez et al., (2021) consigue sólo 14% y 47% de solubilización de proteínas y carbohidratos a partir de biomasa algal generada en aguas residuales, tras 21 min de ultrasonidos seguidos de 12h de hidrólisis enzimática con una mezcla comercial de Celluclast + Novozyme 18

4.2 EFECTO DEL ULTRASONIDOS EN LOS RENDIMIENTOS DE RECUPERACIÓN DE PEPTIDOS

En la Figura 18 se muestran los resultados de los rendimientos de recuperación de péptidos en hidrólisis individual y combinada termo-alcalina sin y con pretratamiento de ultrasonidos, respectivamente. La diferencia entre las proteínas solubilizadas (SY) y los péptidos recuperados (RY) proporcionó información sobre las pérdidas totales de proteínas causadas por la severidad de la hidrólisis o debido al metabolismo activo de las bacterias presentes en la biomasa inicial (Liu et al., 2008; Martín Juárez et al., 2021), además, en líneas continuas se presentan las pérdidas de proteínas solubilizadas.

Las pérdidas de proteínas claramente variaron en función del tipo de hidrólisis llevada a cabo. En los dos experimentos termo-alcalinos sometidos a una duración de hidrólisis de 60 minutos, que resultaron en la mayor solubilización de proteínas, dieron lugar a pérdidas de proteínas del 6.2% y 11.1% para las concentraciones de NaOH 0.5 y

1 M, respectivamente. La concentración de álcali no influyó en la recuperación de proteínas cuando el ensayo HT+ALK se realizó durante 60 min, obteniendo recuperaciones del 81.3% para ambas concentraciones de NaOH debido a una mayor solubilización a alta concentración de alcalí. Por otro lado, en la hidrólisis termoalcalina tras el pretratamiento con ultrasonidos se observaron pérdidas de solo el 3.1% y 8.9% de las proteínas solubilizadas tras 30 y 60 min de hidrólisis US-HT+ALK con NaOH 0.5 M logrando recuperaciones muy similares a las obtenidas en la hidrólisis individual ($\approx 80.1\%$).

Al incrementar la concentración de álcali en dicho método (US-HT+ALK), de 0.5 M a 1 M, se observó una mayor degradación de las proteínas solubilizadas ($\approx 16\%$) el cual fue compensando por la alta solubilización que presentó la combinación US-HT+ALK dando lugar a recuperaciones del 66.1% (\approx a US-HT) y 76.6% tras 30 y 60 min de hidrólisis, mientras que para el ensayo US-HT, sin alcalí, se consigue recuperar solo un 60% tras 60 min. Rojo et al., (2023), obtuvieron también un 81% de recuperación de péptidos de biomasa algal mediante hidrólisis alcalina con NaOH 2M a 120°C durante 60 min y observaron un importante efecto de la temperatura con recuperaciones del 46.1% a 60°C y del 26.8% a 40°C.

El incremento en la solubilización lograda con el pretratamiento de ultrasonidos (US-ALK) dio lugar a pérdidas del mismo orden que en el experimento US-HT+ALK ($\approx 16.5\%$), sin diferencias significativas en la dosis de NaOH y el tiempo, dando lugar a recuperaciones del 71%. Hui et al., (2022) emplearon un tiempo de 9h para conseguir una concentración máxima de 549.86 mg/L y una tasa de extracción de 60.72% de proteína a partir de fangos aerobios (20 g/L) a pH 13 y 90°C.

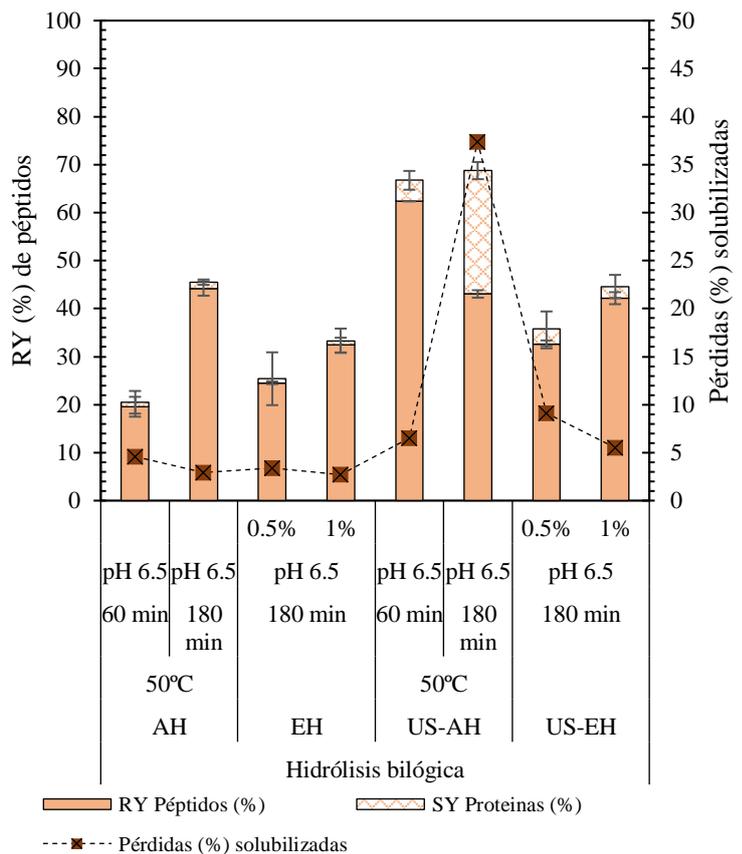
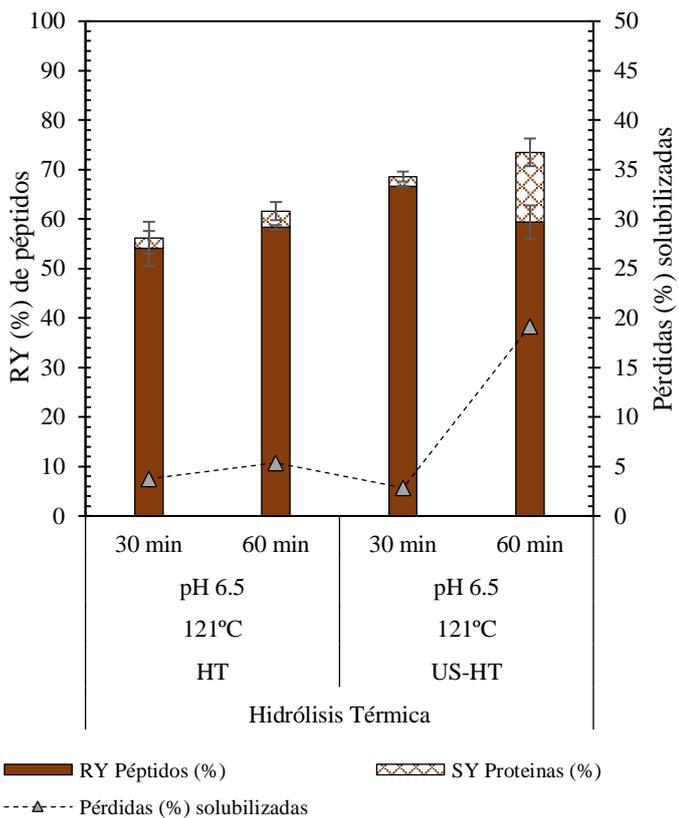
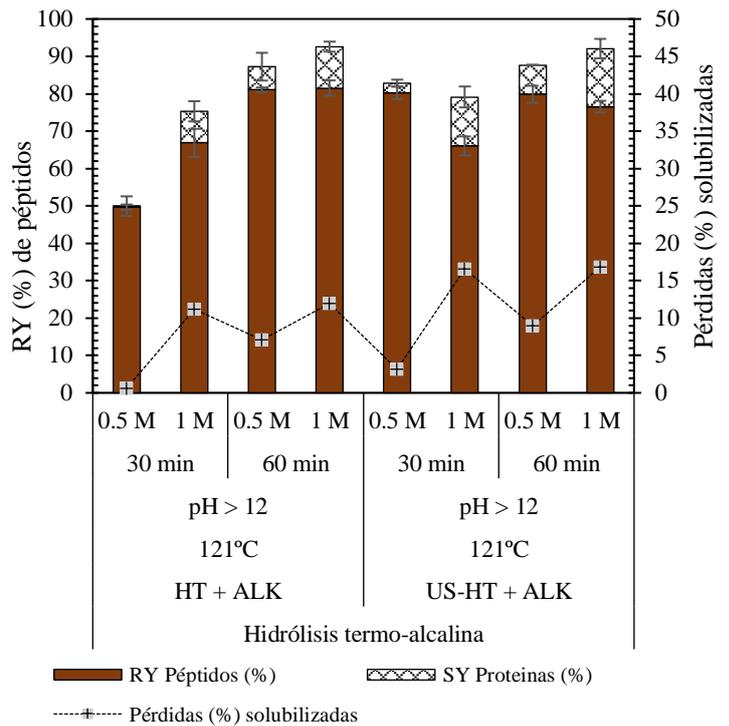
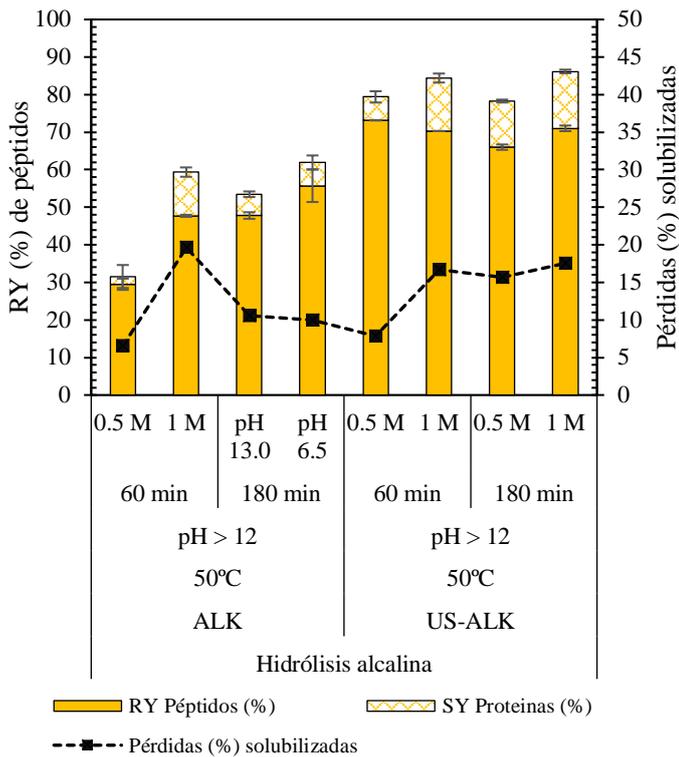


Figura 18: Efecto del ultrasonido en el rendimiento de recuperación de péptidos (RY, %) respecto al contenido de proteínas en la biomasa inicial tras el proceso secuencial de ultrasonidos-hidrólisis. Las barras discontinuas muestran los rendimientos de solubilización (%) proteínas en referencia al contenido inicial. La diferencia entre los SY y RY muestra las pérdidas totales proteínas debido al proceso aplicado. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de 4 determinaciones analíticas (etapa de hidrólisis analizada en réplica). Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.

Sin embargo, cuando se aplicó ultrasonidos seguido de hidrólisis alcalina bajo suaves condiciones (US-ALK) se observó un incremento considerable de las pérdidas de proteínas solubilizadas: a 60 y 180 min con NaOH 1 M las pérdidas fueron del 17.5% con recuperaciones promedio del $\approx 71\%$, mientras que con NaOH 0.5 M a pesar de haber solubilizados la misma cantidad de proteínas ($\approx 79\%$) las pérdidas se vieron incrementadas desde un 8% (60 min) hasta un 17.5% (180 min) lo que tuvo un fuerte impacto en los rendimientos finales de recuperación (73% y 66%), respectivamente. A diferencia del ensayo alcalino individual (ALK) donde no se encontró influencia de la dosis de álcali en las pérdidas de las proteínas solubilizadas (aproximadamente entre un 6.9% y 5.9% para los experimentos a 60 y 180 min, respectivamente) y se logró una recuperación del 55.7% para el experimento con NaOH 1 M que presentó una mayor solubilización durante la hidrólisis individual mientras que a baja concentración de NaOH los rendimientos de recuperación fueron, en valor promedio, de un 47% a 60 y 180 min.

Para los experimentos de hidrólisis biológica las pérdidas de proteínas se encontraron entre un 2% y 5% para la autohidrólisis y enzimas. A pesar de que el pretratamiento con ultrasonido (US-AH, US-EH) logró incrementar en gran medida las solubilizaciones de estos tratamientos se observó un mayor porcentaje de pérdidas, especialmente en la autohidrólisis a 180 min (37%). Posiblemente la presencia de bacterias aún viables en estos tratamientos sea responsable de las altas pérdidas registradas. Por otro lado, la hidrólisis enzimática consigue recuperaciones de hasta el 42.2% (un 23% superior a la hidrólisis enzimática sin pretratamiento previo). Estos resultados indican que la aplicación secuencial de ultrasonidos seguido de hidrólisis enzimática como método de disrupción complementario mejoró significativamente la eficiencia en la extracción de proteínas. Posiblemente, la fuerza generada por el ultrasonido creó cavidades que facilitaron la transferencia de materia y mejoraron el contacto entre los compuestos intracelulares y las enzimas, lo que sugiere que el ultrasonido puede influir en la actividad de la enzima.

4.2.1 Efecto del ultrasonido en el tamaño de los péptidos recuperados

A través de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), se determinaron los tamaños de los péptidos presentes en todas las fracciones líquidas

resultantes de la hidrólisis. Los resultados revelaron notables diferencias en el tamaño molecular de los péptidos entre los diferentes experimentos, lo que destacó la fuerte influencia del tipo de hidrólisis aplicado en el fraccionamiento de las proteínas recuperadas. El tamaño del péptido influye en las propiedades funcionales de las proteínas recuperadas y, por tanto, en sus posibles aplicaciones (Lorenzo-Hernando et al., 2019) así como en las posteriores etapas de separación y purificación. El uso de péptidos como agentes espumantes, tensioactivos o espesantes requiere el contenido de polipéptidos con tamaños superiores a 20 kDa (Xiao y Zhou, 2020).

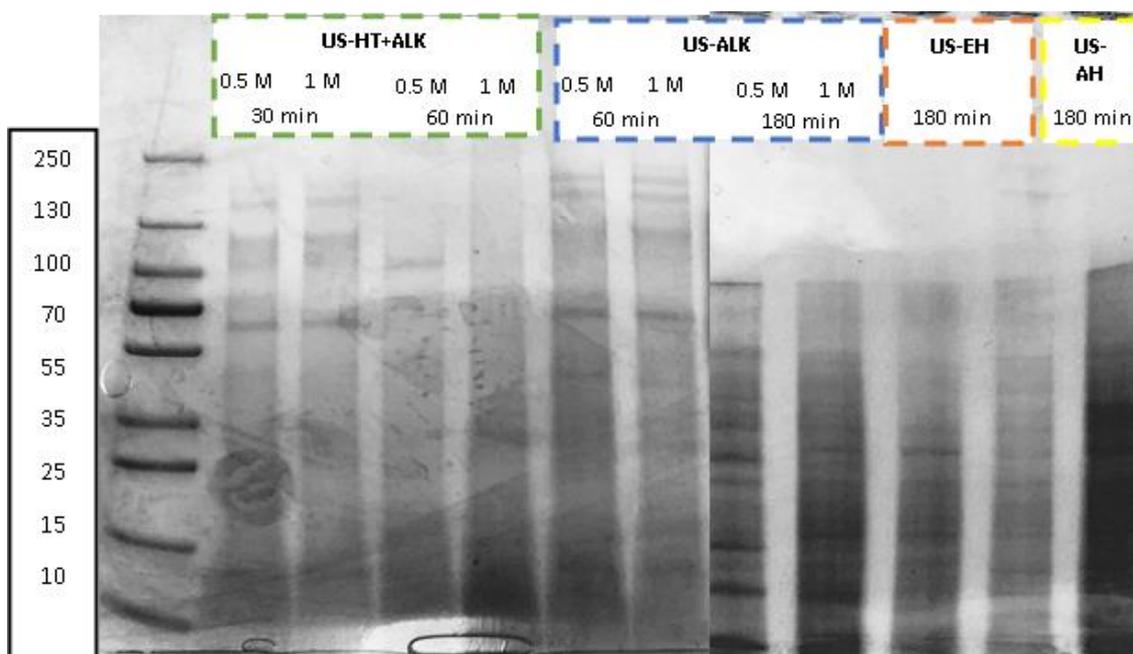


Figura 19: Efecto del ultrasonido en los tamaños de los péptidos recuperados

Los péptidos recuperados tras el pretratamiento con ultrasonidos seguido de la hidrólisis bajo las diferentes condiciones de dureza (Figura 19) solo mostraron bandas en algunos de los experimentos. Se observó una tendencia similar que, en las hidrólisis sin pretratamiento (Figura 20), aunque con menores tamaños de los péptidos recuperados. A pesar de que tanto la hidrólisis US-HT+ALK y HT+ALK tuvieron recuperaciones muy similares entre sí ($\approx 81\%$) se observó que la aplicación del ultrasonido provocó un mayor fraccionamiento de los péptidos, de hecho, sin ultrasonidos (HT+ALK) el tamaño de los péptidos varió entre 250-70 kDa en cualquiera de las condiciones mientras que aplicando 5 minutos de ultrasonidos solo se observaron péptidos en el experimento a menor tiempo de hidrólisis (30 min, US-HT+ALK) que

estuvieron comprendidos entre ≈ 130 kDa y ≈ 50 kDa mientras que a 60 min no se apreciaron bandas en el gel de electroforesis.

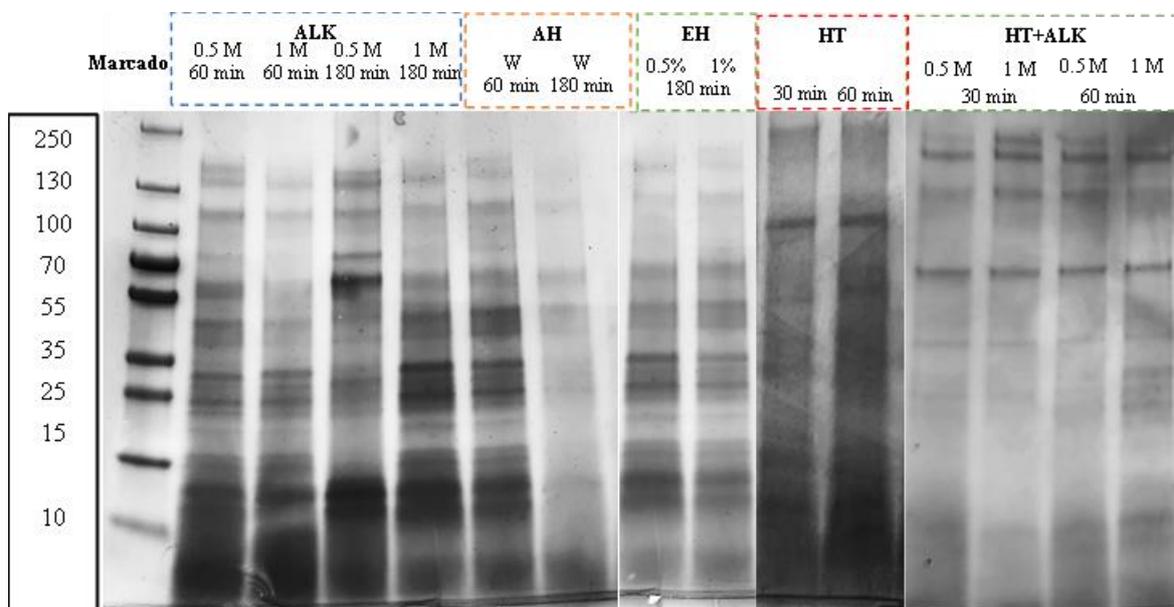


Figura 20: Tamaño de los péptidos recuperados en hidrólisis individual

Teniendo en cuenta los cambios de las características de los péptidos, puede ser posible recuperar péptidos de distintos tamaños, ajustando el tipo y condiciones de la hidrólisis. En el tratamiento US-ALK a 60 min se consiguió recuperar péptidos que estuvieron entre los 250-130 kDa (muy similares a los obtenidos en HT+ALK), que permanecieron en el hidrolizado en forma de cadenas largas, mientras que a 180 min los péptidos estuvieron por debajo de los 100 kDa. Esta misma tendencia se observó para los experimentos US-HE y US-AH. Un tiempo de hidrólisis muy prolongado puede dar lugar a una descomposición de las proteínas en polipéptidos pequeños, aminoácidos e incluso degradarlos a amonio. Hui et al., (2022) observó una única banda de péptidos de 16 kDa tras 9h de hidrólisis alcalina a pH 13. Sin embargo, Rojo et al., (2023) trabajando con biomasa de algas y bacteria con un proceso de hidrólisis enzimática con Protamex asistida por ultrasonidos (UAEE) a 20kHz, y 60 min obtuvieron péptidos grandes de varios tamaños (≈ 11 kDa, 63 kDa y 135 kDa).

En los tratamientos alcalinos (ALK), se observaron bandas de péptidos en las fracciones líquidas, pero no se detectó una influencia del tiempo de hidrólisis en el tamaño de estos péptidos en los gels de electroforesis. Todos los hidrolizados presentaron 3 bandas entre 130 y 70 kDa, y dos bandas entre 35 y 25 kDa. El resto de las bandas no son claramente identificables, lo que implica la presencia de péptidos de

muy pequeños tamaños. En el tratamiento térmico a 121°C (HT) sólo se observaron 2 bandas de 100 kDa a 30 y 60 min. Sin embargo, cuando el tratamiento alcalino se llevó a cabo a altas temperaturas (HT+ALK) durante 30 y 60 min y a ambas concentraciones de NaOH (0.5 y 1 M) las proteínas presentaban tamaños de péptidos de 250 kDa, 130 kDa y 70 kDa muy bien definidas. Esto sugiere que las proteínas no se fraccionaron completamente y se mantuvieron en la fase líquida en forma de cadenas largas. De hecho, parece que la combinación de temperatura y medio alcalino ayuda a recuperar las proteínas con alto peso molecular, mayor que cada tratamiento por separado. Wang et al., (2016) descubrieron que el pretratamiento térmico-alcalino a pH 12 durante 24 h y temperatura de 120 °C durante 30 min puede alterar el patrón principal de estiramiento S-S de la conformación de la proteína lo que resulta en una mayor susceptibilidad de la proteína a la hidrólisis proteolítica (76.3% frente a 47.0%).

En cuanto a los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis biológica, se observó que tras el tratamiento AH a 180 min prácticamente no había bandas identificables. Por otro lado, la hidrólisis enzimática con la proteasa (EH), originó bandas de proteínas muy difusas en la parte inferior del gel, las cuales no se pudieron identificar con claridad, aunque si se pueden observar algunas bandas interesantes entre los 70kDa y 15 kDa, el resto de las bandas probablemente indicaban la presencia de péptidos de baja masa en el hidrolizado, con tamaños inferiores a 15 y 10kDa. Posiblemente, de acuerdo con lo descrito por Martin Juárez et al., (2021), bacterias viables presentes en este tipo de biomasa bacteriana consumieron las proteínas fraccionando los péptidos a fin de mantener la estabilidad de la colonia. Rojo et al., (2023) obtuvieron péptidos con tamaños moleculares mayores, de alrededor de 11 kDa, 63 kDa, 75 kDa y 135 kDa, tras una hidrólisis enzimática con Protamex (1%, 50°C, 180 min) de biomasa de algas y bacterias.

4.3 EFECTO DEL ULTRASONIDOS EN LA RECUPERACIÓN DE MONOSACÁRIDOS

Las barras continuas en la Figura 21 muestran los rendimientos de recuperación de monosacáridos, en forma de glucosa, obtenidos tras el proceso de pretratamiento seguido de hidrólisis aplicado a la biomasa en referencia al contenido de carbohidratos en la biomasa inicial, además, también se muestran los rendimientos de recuperación sin

pretratamiento con el objetivo de observar el efecto que tuvo el ultrasonido sobre este componente.

Las barras discontinuas muestran el rendimiento de solubilización (SY, %) de carbohidratos que dan idea de las pérdidas totales de carbohidratos. Las líneas continuas muestran las pérdidas de los carbohidratos solubilizados. Los dos monosacáridos más abundantes en la biomasa inicial (BS) fueron la glucosa y la xilosa, sin embargo, esta última no fue recuperada en ninguno de los ensayos. Se observó una tendencia muy clara en términos de recuperación de carbohidratos respecto a los rendimientos de recuperación de proteínas: mientras que las altas condiciones alcalinas favorecieron la recuperación de proteínas, para los carbohidratos, fue mucho más beneficioso el uso de condiciones con menor alcalinidad.

Se puede observar que el empleo de ultrasonidos resultó tener un efecto positivo sobre los rendimientos de recuperación de carbohidratos contenidos en la biomasa puesto que los porcentajes se han visto incrementados en todas las hidrólisis respecto a las hidrólisis sin pretratamiento. Esto puede deberse a que las ondas generadas han conseguido descomponer las estructuras de las matrices biopoliméricas donde se encontraban retenidos dichos carbohidratos. Por tanto, el pretratamiento de US mejora la accesibilidad a estas macromoléculas.

Analizando las pérdidas, se puede observar que los porcentajes, de forma general, son mucho menores a las pérdidas de las hidrólisis sin pretratamiento. La mayor recuperación de carbohidratos se obtuvo cuando se aplicó 5 min de ultrasonidos seguido de hidrólisis termo-alcalina (US-HT+ALK). En este caso, la combinación de una alta solubilización y pérdidas moderadas (18% y 21% para 30 y 60 min de hidrólisis) dio lugar a recuperaciones superiores a las obtenidas sin pretratamiento (50.6% y 36.5% para el método HT+ALK 0.5 M a 30 y 60 min). A diferencia de la hidrólisis sin pretratamiento (HT+ALK), donde los elevados factores de pérdidas de carbohidratos, entre un 44% (30 min) y 53% (60 min) a la mayor concentración de NaOH (1M) redujeron la recuperación, no se encontraron diferencia entre la concentración de álcali entre los ensayos US-HT+ALK realizados al mismo tiempo de hidrólisis en los rendimientos de recuperación con rendimientos promedios del $\approx 74\%$ en las condiciones de 60 min y $\approx 63\%$ tras 30 min de hidrólisis a ambas concentraciones de álcali.

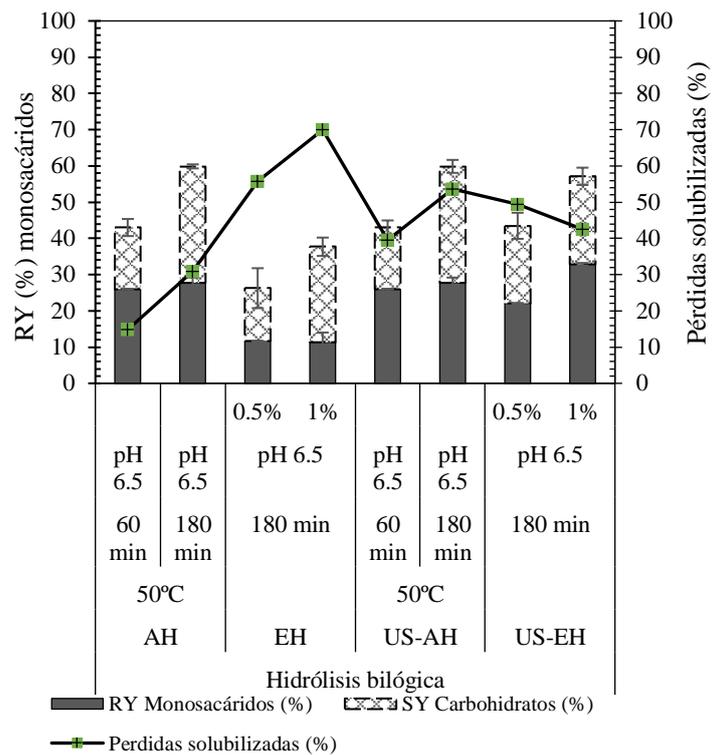
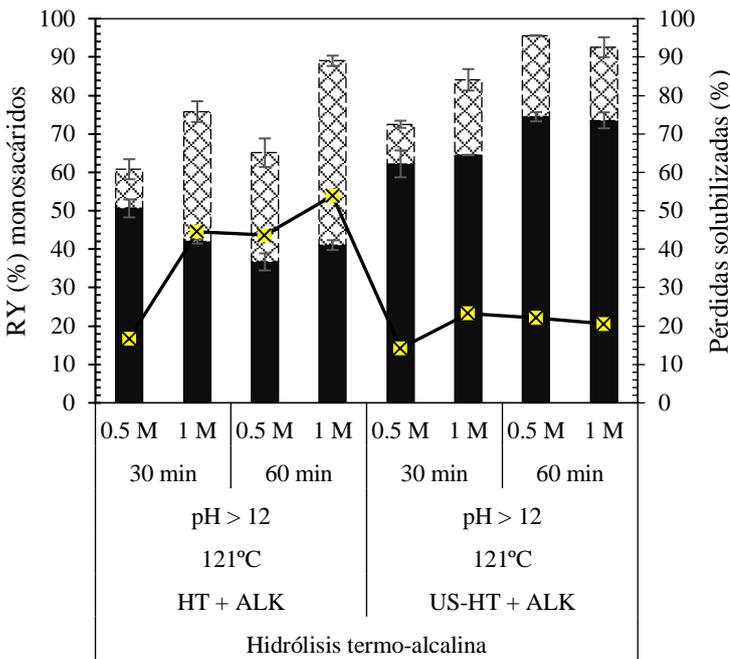
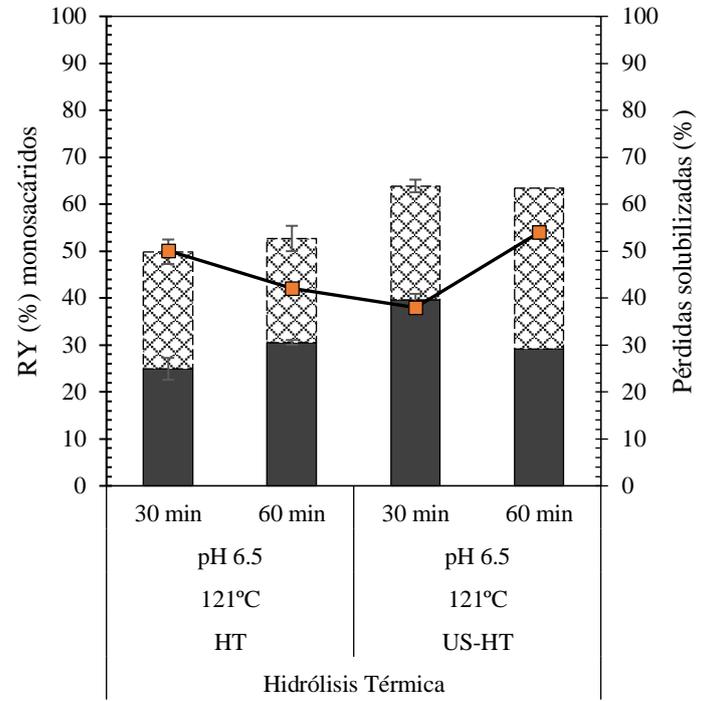
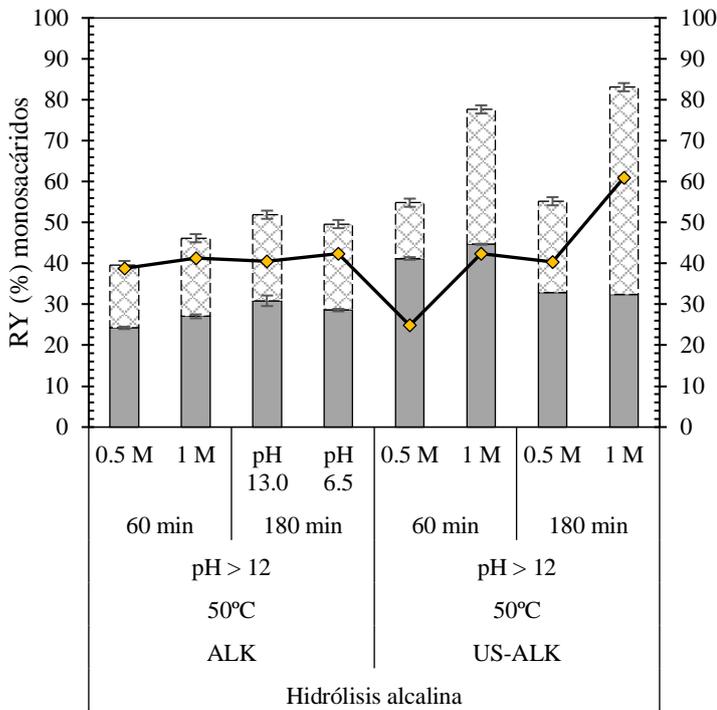


Figura 21: Efecto del ultrasonido en el rendimiento de recuperación de glucosa (RY, %) respecto al contenido de carbohidratos en la biomasa inicial. Las barras discontinuas muestran los rendimientos de solubilización (SY, %) carbohidratos en referencia al contenido inicial. La diferencia entre los SY y RY muestra las pérdidas totales de carbohidratos debido al proceso de hidrólisis. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de 4 determinaciones analíticas (etapa de hidrólisis analizada en réplica). Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.

Es posible que la aplicación de ultrasonidos seguido de unas temperaturas más elevadas rompa las estructuras de celulosa o hemicelulosa, favoreciendo su descomposición y, por tanto, incrementando las recuperaciones en términos de glucosa. El pretratamiento de ultrasonidos puede ayudar a descomponer las estructuras complejas de los carbohidratos en el fango de depuradora. Esto facilita la posterior hidrólisis y reduce las pérdidas de carbohidratos durante el proceso. Martín Juárez et al., (2021) también observaron elevados factores de pérdidas de carbohidratos (en torno al 70%) en el tratamiento termo-alkalino (NaOH 2M, 121°C) y la combinación alcalino-peróxido de biomasa algal. Rojo et al., (2023), trabajando con consorcios de microalgas-bacterias cultivadas en aguas residuales porcinas, reportaron elevadas pérdidas de glucosa (83.3% y 61%) tras la hidrólisis termoalcalina y alcalina (NaOH, 2 M, 120 y 60°C). Por otro lado, Mahdy et al. (2014) informaron de rendimientos de solubilización de carbohidratos inferiores operando en condiciones más suaves, del 43.5% (5% NaOH (p/v), 50°C, 48 h) y del 36% (2% KOH (p/v), 120 °C, 2 h) para las microalgas *Scenedesmus* sp y *Tetraselmis suecica* puras crecidas en medio sintético con rendimientos de recuperación inferiores al 25% para ambas. En un medio alcalino, los grupos funcionales de los carbohidratos, como los grupos hidroxilo, pueden ser más susceptibles a reacciones químicas y a la degradación, lo que puede resultar en una mayor pérdida de carbohidratos (Tan et al., 2012).

Para las condiciones más suaves (US-ALK, US-HE, US-AH) a pesar de que el ultrasonido potenció la solubilización de los carbohidratos, al final, los elevados factores de pérdidas redujeron la recuperación a rendimientos que oscilaron entre un 45% y 33%. Alvajeh et al. (2020) recuperaron un 40% de monosacáridos de *Chlorella vulgaris* pura con ultrasonidos seguido de hidrólisis enzimática y observaron, al igual que en nuestro estudio, altos factores de pérdidas de carbohidratos (>50%). Esta misma tendencia se observó en los experimentos sin pretratamiento con ultrasonidos con rendimientos de recuperación de carbohidratos especialmente bajos en la hidrólisis térmica (27.7%), hidrólisis alcalina (25.7%), hidrólisis enzimática (11.5 %) y autohidrólisis (23.2%) como resultado de la baja solubilización y las elevadas pérdidas de carbohidratos atribuibles al metabolismo activo de las bacterias presentes en la biomasa cruda (Fuentes et al., 2016; Liu et al., 2008). Para un consorcio de microalgas-bacterias formadas por *Alphanothece* sp y *Scenedesmus obliquus* con elevado contenido bacteriano crecidas en un fotobiorreactor alimentada con aguas residuales, Martín

Juárez et al., 2016) reportaron un alto rendimiento de solubilización de carbohidratos bajo hidrólisis enzimática (81.7%) con una recuperación de monosacáridos tan baja como el 1%. Encontraron, además, cantidades importantes de subproductos como ácido acético, ácido fórmico, metanol, ácido succínico, y ácido butírico en los hidrolizados formados probablemente debido a la acción oxidativa y fermentativa sobre los monosacáridos como la glucosa y la xilosa, a través de las diferentes rutas metabólicas de las bacterias presentes en este tipo de biomasa. Chen et al., (2007) también reportaron altas concentraciones de subproductos (ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico y ácido butírico) como resultado de la fermentación acidogénica de carbohidratos en lodos activados.

A pesar de las elevadas pérdidas de carbohidratos obtenidas bajo las condiciones experimentales propuesta en este trabajo, los hidrolizados aún pueden tener potenciales aplicaciones como medio de cultivo rico en compuesto carbonoso (ácidos orgánicos, alcoholes, entre otros). Este medio puede emplearse como sustrato para procesos de fermentación bacteriana. Recientemente, nuestro grupo ha mostrado la utilidad los hidrolizados, una vez separados los péptidos de mayor tamaño, como medio de cultivo de *Paraccocus denitrificans*. Estas bacterias acumulan el carbono orgánico en forma de polihidroxicanoatos utilizados para la producción de bioplásticos.

Aunque no se pudieron cuantificar estos subproductos de degradación de los carbohidratos recuperados si se pudieron identificar ciertos picos en los cromatogramas, utilizando un detector UV-Vis a 210 nm, que nos dan idea de algunos compuestos de degradación que no estaban presentes inicialmente en la biomasa BS (Figura 22 A) así como en los experimentos HT+ALK (22 B), AH (22 C), US-HT+ALK (22 D). Se observaron algunos picos importantes a 13.4 min (ácido láctico), 14.7 min (ácido fórmico), 15.9 min (ácido acético), 20.1 min (ácido butírico), 18.6 min (ácido levulínico), 19.4 (metanol), 21.6 min (etanol).

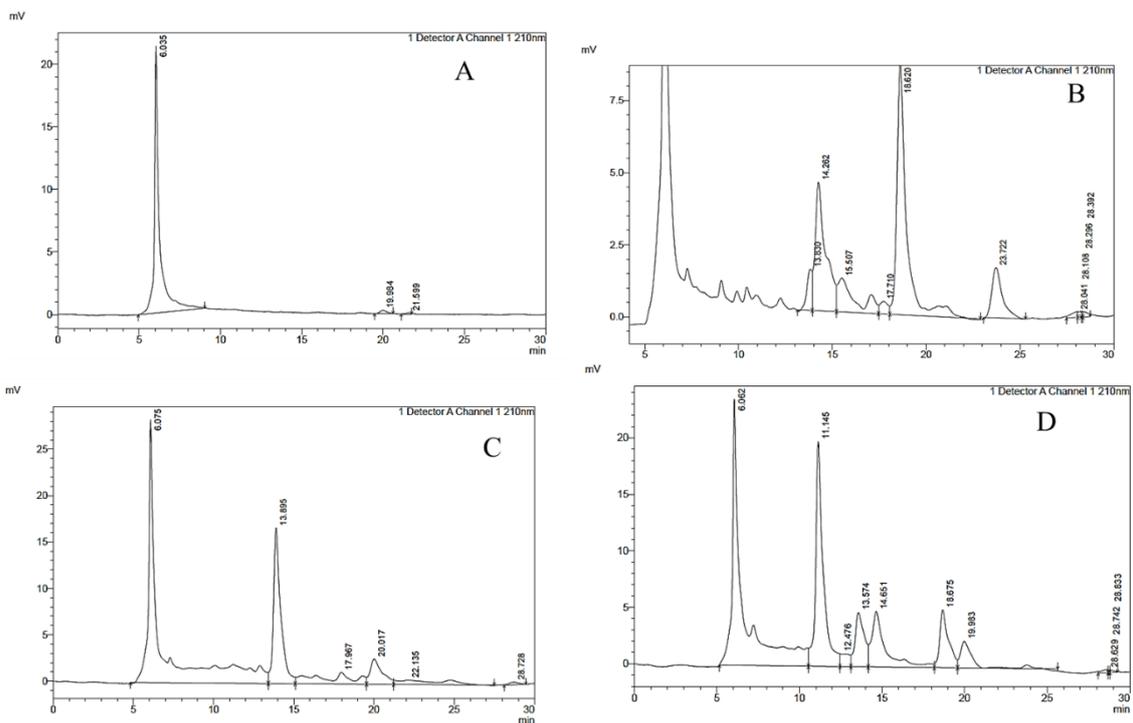


Figura 22: Algunos compuestos de degradación detectados con HPLC-UV. A) Biomasa inicial, B) HT+ALK, C) US-HT+ALK, D) US-AH

5. CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se ha logrado cumplir con el objetivo general, la valorización fraccional de los principales componentes que forman los fangos. Además, se ha podido concluir que, de forma general, el pretratamiento de ultrasonidos es capaz de mejorar e incrementar los rendimientos de solubilización y recuperación de proteínas y carbohidratos frente a los resultados de las hidrólisis que se realizan sin pretratamiento. El empleo de ultrasonidos tuvo un efecto más marcado en la solubilización de carbohidratos en comparación con las proteínas. Con el método US-HT+ALK, un tiempo de hidrólisis de 60 minutos y NaOH 0.5M se consiguió un rendimiento de solubilización de carbohidratos del 95% frente al 65,1% que se obtuvo con el mismo método, pero sin pretratamiento ultrasónico. Por otro lado, las solubilizaciones de los métodos biológicos también fueron significativamente superiores tras el pretratamiento de US. En particular, se destacó la mejora en la solubilización de proteínas, que pasó de un 20.5% (AH) a un 66.6% (US-AH) después de 60 minutos de incubación. En general, los carbohidratos muestran mayor sensibilidad a los cambios en las condiciones de tratamiento en comparación con las proteínas. Los aumentos en la solubilización de carbohidratos fueron más pronunciados en respuesta a cambios en la temperatura, concentración y tiempo, favoreciéndose con mayores tiempo de hidrólisis y temperaturas.

Por otro lado, el pretratamiento con ultrasonidos mostró ser una estrategia efectiva para mejorar la recuperación de monosacáridos y péptidos, reduciendo las pérdidas de carbohidratos y proteínas en comparación con los procesos sin pretratamiento. El pretratamiento con ultrasonidos antes de la hidrólisis termo-alcalina redujo las pérdidas de proteínas, resultando pérdidas del 3.1% y 8.9% después de 30 y 60 minutos de hidrólisis con NaOH 0.5 M. En cuanto a la hidrólisis enzimática con pretratamiento de ultrasonidos, se lograron recuperaciones de hasta el 42.2%, un 23% superior a la hidrólisis enzimática sin pretratamiento previo, lo que indica una mejora significativa en la extracción de proteínas. En lo que respecta a la recuperación de carbohidratos, la aplicación de ultrasonidos tuvo un efecto positivo sobre dichos rendimientos, puesto que los porcentajes se incrementaron en todas las hidrólisis en comparación con las hidrólisis sin pretratamiento. La recuperación de carbohidratos fue más alta cuando se aplicaron 5 minutos de ultrasonidos seguidos de hidrólisis termo-alcalina (US-

HT+ALK). Esto resultó en una alta solubilización y pérdidas moderadas (18% y 21% para 30 y 60 minutos de hidrólisis), lo que superó las recuperaciones obtenidas sin pretratamiento (50.6% y 36.5% para el método HT+ALK 0.5 M a 30 y 60 minutos).

Por último, el empleo de ultrasonidos antes de la hidrólisis también resultó en un mayor fraccionamiento de los péptidos en comparación con la hidrólisis sin pretratamiento. Esto se reflejó en una mayor diversidad de tamaños de péptidos en los experimentos con ultrasonido. En el tratamiento térmico a 121°C (HT), solo se observaron péptidos de 100 kDa a 30 y 60 minutos. Sin embargo, en el tratamiento térmico alcalino (HT+ALK), se observaron proteínas con tamaños de péptidos de 250 kDa, 130 kDa y 70 kDa. La hidrólisis biológica con proteasa (EH) produjo bandas de proteínas difusas en la parte inferior del gel, lo que indica la presencia de péptidos de baja masa, probablemente fraccionados por bacterias viables presentes en la biomasa bacteriana. Como se ha determinado en el proyecto, el empleo de ultrasonidos puede mejorar la solubilización de proteínas y péptidos, facilitando su separación y purificación posterior. Esto puede ser beneficioso en aplicaciones donde se requiere una alta pureza de péptidos, mejorando la calidad de los péptidos recuperados.

En definitiva, los resultados obtenidos en este trabajo revelan que el uso de ultrasonidos previos a la hidrólisis tiene múltiples ventajas. La estrategia de hidrólisis combinada de ultrasonido e hidrólisis alcalina + tratamiento térmico ha demostrado ser la más efectiva en la solubilización y recuperación de proteínas y carbohidratos a partir de biomasa de fangos residuales secundarios. Este enfoque, que combina ultrasonidos y condiciones alcalinas, muestra un efecto sinérgico que aumenta significativamente los rendimientos de recuperación y permite obtener péptidos de gran tamaño, lo que los hace potencialmente adecuados para aplicaciones industriales en la producción de proteínas. El uso de ultrasonidos como pretratamiento en la valorización de los fangos de depuradora es una estrategia prometedora que mejora la eficiencia de la hidrólisis, aumenta la recuperación de compuestos valiosos y reduce las pérdidas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahn, J. H., Shin, S. G., & Hwang, S. (2009). Effect of microwave irradiation on the disintegration and acidogenesis of municipal secondary sludge. *Chemical Engineering Journal*, 153(1–3), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.06.032>
2. Aljuboori, A. H. R., Idris, A., Abdullah, N., & Mohamad, R. (2013). Production and characterization of a bioflocculant produced by *Aspergillus flavus*. *Bioresource Technology*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.016>
3. Appels, L., Houtmeyers, S., Van Mechelen, F., Degreè, J., Van Impe, J., & Dewil, R. (2012). Effects of ultrasonic pre-treatment on sludge characteristics and anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 66(11), 2284–2290. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.415>
4. Assawamongkholsiri, T., Reungsang, A., & Pattra, S. (2013). Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(14), 6146–6153. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.138>
5. Balasubramanian, S., & Tyagi, R. D. (2017). Value-Added Bio-products From Sewage Sludge. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Solid Waste Management*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63664-5.00002-2>
6. Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
7. Bligh, E.G. and Dyer, W. J. (1959). *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8).
8. Bolado-Rodríguez, S., Toquero, C., Martín-Juárez, J., Travaini, R., & García-Encina, P. A. (2016). Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 201, 182–190. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.11.047>
9. Burgess, J. E., & Pletschke, B. I. (2008). Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A mini-review. *Water SA*, 34(3), 343–349. <https://doi.org/10.4314/wsa.v34i3.180627>

10. Capodaglio, A. G., & Olsson, G. (2019). Energy Issues in Sustainable Urban Wastewater Management: Use, Demand Reduction and Recovery in the Urban Water Cycle. *Sustainability* 2020, Vol. 12, Page 266, 12(1), 266. <https://doi.org/10.3390/SU12010266>
11. Carvajal, A., Peña, M., & Pérez-Elvira, S. (2013). Autohydrolysis pretreatment of secondary sludge for anaerobic digestion. *Biochemical Engineering Journal*, 75, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.002>
12. Ceconet, D., & Capodaglio, A. G. (2022). Sewage Sludge Biorefinery for Circular Economy. *Sustainability*, 14(22), 14841. <https://doi.org/10.3390/su142214841>
13. Chen, S., Dong, B., Dai, X., Wang, H., Li, N., & Yang, D. (2019). Effects of thermal hydrolysis on the metabolism of amino acids in sewage sludge in anaerobic digestion. *Waste Management*, 88, 309–318. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2019.03.060>
14. Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q., & Gu, G. (2007). Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research*, 41(3), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.030>
15. Chishti, S. S., Nazrul Hasnain, S., & Altaf Khan, M. (1992). Studies on the recovery of sludge protein. *Water Research*, 26(2), 241–248. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(92\)90224-R](https://doi.org/10.1016/0043-1354(92)90224-R)
16. Chiu, Y. C., Chang, C. N., Lin, J. G., & Huang, S. J. (1997). Alkaline and ultrasonic pretreatment of sludge before anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 36(11), 155–162. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00681-1](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00681-1)
17. Chng, L. M., Lee, K. T., & Chan, D. J. C. (2017). Synergistic effect of pretreatment and fermentation process on carbohydrate-rich *Scenedesmus dimorphus* for bioethanol production. *Energy Conversion and Management*, 141, 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.10.026>
18. Devlin, D. C., Esteves, S. R. R., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2011). The effect of acid pretreatment on the anaerobic digestion and dewatering of waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 102(5), 4076–4082. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.12.043>
19. D'Hondt, E., Martín-Juárez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K., & Bastiaens, L. (2017). Cell disruption technologies. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, 133–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>

20. Urban Waste Water directive. Council Directive (91/271/EEC), 34 Official J. Eur. Commun. L (1991).
21. Feng, X., Lei, H., Deng, J., Yu, Q., & Li, H. (2009). Physical and chemical characteristics of waste activated sludge treated ultrasonically. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.03.012>
22. Foladori, P., Andreottola, G., & Zigliio, G. (2010). *Sludge Reduction Technologies in Wastewater Treatment Plants*. 380. <https://iwaponline.com/ebooks/book-pdf/613422/wio9781780401706.pdf>
23. Fuentes, J. L., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-Del-Valle, M., & Vílchez, C. (2016). Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine Drugs*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/md14050100>
24. Gao, N., Kamran, K., Quan, C., & Williams, P. T. (2020). Thermochemical conversion of sewage sludge: A critical review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 79, 100843. <https://doi.org/10.1016/J.PECS.2020.100843>
25. García, M., Urrea, J. L., Collado, S., Oulego, P., & Díaz, M. (2017). Protein recovery from solubilized sludge by hydrothermal treatments. *Waste Management*, 67, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.051>
26. Gherghel, A., Teodosiu, C., & De Gisi, S. (2019). A review on wastewater sludge valorisation and its challenges in the context of circular economy. *Journal of Cleaner Production*, 228, 244–263. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.240>
27. Grobelak, A., Grosser, A., Kacprzak, M., & Kamizela, T. (2019). Sewage sludge processing and management in small and medium-sized municipal wastewater treatment plant-new technical solution. *Journal of Environmental Management*, 234, 90–96. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2018.12.111>
28. Hui, W., Zhou, J., & Jin, R. (2022). Proteins recovery from waste activated sludge by thermal alkaline treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(2), 107311. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107311>
29. Hwang, J., Zhang, L., Seo, S., Lee, Y. W., & Jahng, D. (2008). Protein recovery from excess sludge for its use as animal feed. *Bioresource Technology*, 99(18), 8949–8954. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.001>

30. Izydorczyk, G., Mikula, K., Skrzypczak, D., Trzaska, K., Moustakas, K., Witek-Krowiak, A., & Chojnacka, K. (2021). Agricultural and non-agricultural directions of bio-based sewage sludge valorization by chemical conditioning. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(35), 47725–47740. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15293-4>
31. Jadon, N., Sharma, H. K., Guruaribam, N., & Chauhan, A. K. S. (2022). *Recent scenario of agricultural contaminants on water resources*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85378-1.00012-x>
32. Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Paniwnyk, L., & Herceg, Z. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 121(1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.08.012>
33. Kim, D. H., Jeong, E., Oh, S. E., & Shin, H. S. (2010). Combined (alkaline+ultrasonic) pretreatment effect on sewage sludge disintegration. *Water Research*, 44(10), 3093–3100. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.032>
34. Kim, D. J., & Youn, Y. (2011). Characteristics of sludge hydrolysis by ultrasound and thermal pretreatment at low temperature. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(9), 1876–1881. <https://doi.org/10.1007/s11814-011-0055-z>
35. Kim, J., Park, C., Kim, T. H., Lee, M., Kim, S., Kim, S. W., & Lee, J. (2003). Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(3), 271–275. <https://doi.org/10.1263/jbb.95.271>
36. Lehne, G., Müller, A., & Schwedes, J. (2001). Mechanical disintegration of sewage sludge. *Water Science and Technology*, 43(1), 19–26. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0005>
37. Li, H., Zou, S., Li, C., & Jin, Y. (2013). Alkaline post-treatment for improved sludge anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 140, 187–191. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.04.093>
38. Li, Y., Cui, J., Zhang, G., Liu, Z., Guan, H., Hwang, H., Aker, W. G., & Wang, P. (2016). Optimization study on the hydrogen peroxide pretreatment and production of bioethanol from seaweed *Ulva prolifera* biomass. *Bioresource Technology*, 214, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.090>
39. Liu, H., & Fang, H. H. P. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*, 95(3), 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00025-1)

40. Liu, H., Wang, J., Liu, X., Fu, B., Chen, J., & Yu, H. Q. (2012). Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: Effect of pH. *Water Research*, 46(3), 799–807. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.11.047>
41. Liu, X., Liu, H., Chen, J., Du, G., & Chen, J. (2008). Enhancement of solubilization and acidification of waste activated sludge by pretreatment. *Waste Management*, 28(12), 2614–2622. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.02.001>
42. Liu, Y., Kong, S., Li, Y., & Zeng, H. (2009). Novel technology for sewage sludge utilization: Preparation of amino acids chelated trace elements (AACTE) fertilizer. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1–3), 1159–1167. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.123>
43. Lorenzo-Hernando, A., Ruiz-Vegas, J., Vega-Alegre, M., & Bolado-Rodríguez, S. (2019). Recovery of proteins from biomass grown in pig manure microalgae-based treatment plants by alkaline hydrolysis and acidic precipitation. *Bioresource Technology*, 273(November 2018), 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.068>
44. Malhotra, M., & Garg, A. (2020). Proteins Recovery from Hydrothermally Treated, Diluted, and Centrifuged Sewage Sludge Samples. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*, 24(4), 04020039. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)hz.2153-5515.0000542](https://doi.org/10.1061/(asce)hz.2153-5515.0000542)
45. Martín Juárez, J., Lorenzo Hernando, A., Muñoz Torre, R., Blanco Lanza, S., & Bolado Rodríguez, S. (2016). Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, 218, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.087>
46. Martín Juárez, J., Martínez-Páramo, S., Maté-González, M., García Encina, P. A., Muñoz Torre, R., & Bolado Rodríguez, S. (2021). Evaluation of pretreatments for solubilisation of components and recovery of fermentable monosaccharides from microalgae biomass grown in piggery wastewater. *Chemosphere*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129330>
47. Martín-Juárez, J., Vega-Alegre, M., Riol-Pastor, E., Muñoz-Torre, R., & Bolado-Rodríguez, S. (2019). Optimisation of the production of fermentable monosaccharides from algal biomass grown in photobioreactors treating wastewater. *Bioresource Technology*, 281(December 2018), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.082>
48. Michalska, J., Turek-Szytow, J., Dudło, A., & Surmacz-Górska, J. (2022). Characterization of humic substances recovered from the sewage sludge and validity of their removal from this waste. *EFB Bioeconomy Journal*, 2, 100026. <https://doi.org/10.1016/J.BIOECO.2022.100026>

49. Moore, S., & Stein, W. H. (1948). PARTITION CHROMATOGRAPHY OF AMINO ACIDS ON STARCH. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 49(2), 265–278. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1948.TB35255.X>
50. Neyens, E., Baeyens, J., Weemaes, M., & De Heyder, B. (2003). Hot acid hydrolysis as a potential treatment of thickened sewage sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 98(1–3), 275–293. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00002-5)
51. Nielsen, P. H., Thomsen, T. R., & Nielsen, J. L. (2002). *Bacterial composition of activated sludge for floc and sludge properties - importance*. 71–78.
52. Nitsos, C., Filali, R., Taidi, B., & Lemaire, J. (2020). Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. *Biotechnology Advances*, 45(October), 107650. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107650>
53. Passos, F., Carretero, J., & Ferrer, I. (2015). Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 279, 667–672. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2015.05.065>
54. Pham, V. T., Guan, C. Y., Han, P. C., Matsagar, B. M., Wu, K. C. W., Ahamad, T., Chang, C. Y., & Yu, C. P. (2021). Acid-catalyzed hydrothermal treatment of sewage sludge: effects of reaction temperature and acid concentration on the production of hydrolysis by-products. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01495-w>
55. Phong, W. N., Show, P. L., Le, C. F., Tao, Y., Chang, J. S., & Ling, T. C. (2018). Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. *Biochemical Engineering Journal*, 135, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.002>
56. Praspaliauskas, M., & Pedišius, N. (2017). A review of sludge characteristics in Lithuania's wastewater treatment plants and perspectives of its usage in thermal processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67, 899–907. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.09.041>
57. Rojo, E. M., Filipigh, A. A., & Bolado, S. (2023). Assisted-enzymatic hydrolysis vs chemical hydrolysis for fractional valorization of microalgae biomass. *Process Safety and Environmental Protection*, 174, 276–285. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2023.03.067>
58. Rojo, E. M., Piedra, I., González, A. M., Vega, M., & Bolado, S. (2021). Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass

- by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 335, 125256. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125256>
59. Shahbazi, K., Marzi, M., & Tabakhian, S. (2019). The comparative evaluation of humic acid determining methods in humic-based commercial fertilizers. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(12), 1720–1732. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1575511>
60. Shokrkar, H., Ebrahimi, S., & Zamani, M. (2017). Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. *Fuel*, 200(July), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.03.090>
61. Sivaramakrishnan, R., & Incharoensakdi, A. (2018). Utilization of microalgae feedstock for concomitant production of bioethanol and biodiesel. *Fuel*, 217, 458–466. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2017.12.119>
62. Sommers, L. E. (1977). Chemical Composition of Sewage Sludges and Analysis of Their Potential Use as Fertilizers. *Journal of Environmental Quality*, 6(2), 225–232. <https://doi.org/10.2134/jeq1977.00472425000600020026x>
63. Tan, R., Miyanaga, K., Uy, D., & Tanji, Y. (2012). Effect of heat-alkaline treatment as a pretreatment method on volatile fatty acid production and protein degradation in excess sludge, pure proteins and pure cultures. *Bioresource Technology*, 118, 390–398. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.05.064>
64. Templeton, D. W., & Laurens, L. M. L. (2015). Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel. *Algal Research*, 11, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.013>
65. Thomsen, T. P., Sárossy, Z., Ahrenfeldt, J., Henriksen, U. B., Frandsen, F. J., & Müller-Stöver, D. S. (2017). Changes imposed by pyrolysis, thermal gasification and incineration on composition and phosphorus fertilizer quality of municipal sewage sludge. *Journal of Environmental Management*, 198, 308–318. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2017.04.072>
66. Tian, X., Trzcinski, A. P., Lin, L. L., & Ng, W. J. (2016). Enhancing sewage sludge anaerobic “re-digestion” with combinations of ultrasonic, ozone and alkaline treatments. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(4), 4801–4807. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.10.032>

67. Tian, X., Wang, C., Trzcinski, A. P., Lin, L., & Ng, W. J. (2015). Insights on the solubilization products after combined alkaline and ultrasonic pre-treatment of sewage sludge. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 29, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.07.024>
68. Tyagi, V. K., & Lo, S. L. (2013). Sludge: A waste or renewable source for energy and resources recovery? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 25(71), 708–728. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.029>
69. USEPA. (2001). 1687: Total Kjeldahl Nitrogen in Water and Biosolids by Automated Colorimetry with Preliminary Distillation / Digestion DRAFT January 2001 U . S . Environmental Protection Agency Office of Water Office of Science and Technology Engineering and Analy. Sw-846, January.
70. Wang, X., Li, Y., Liu, J., Ren, N. Q., & Qu, J. (2016). Augmentation of protein-derived acetic acid production by heat-alkaline-induced changes in protein structure and conformation. *Water Research*, 88, 595–603. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.055>
71. Wei, L., Zhu, F., Li, Q., Xue, C., Xia, X., Yu, H., Zhao, Q., Jiang, J., & Bai, S. (2020a). Development, current state and future trends of sludge management in China: Based on exploratory data and CO₂-equivalent emissions analysis. *Environment International*, 144, 106093. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106093>
72. Wei, L., Zhu, F., Li, Q., Xue, C., Xia, X., Yu, H., Zhao, Q., Jiang, J., & Bai, S. (2020b). Development, current state and future trends of sludge management in China: Based on exploratory data and CO₂-equivalent emissions analysis. *Environment International*, 144, 106093. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106093>
73. Wychen, S. Van, & Laurens, L. M. L. (2013). *Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised)*. www.nrel.gov/publications.
74. Xiang, Y., Xiang, Y., & Wang, L. (2017). Disintegration of waste activated sludge by a combined treatment of alkaline-modified eggshell and ultrasonic radiation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(2), 1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.02.034>
75. Xiao, K., & Zhou, Y. (2020). Protein recovery from sludge: A review. *Journal of Cleaner Production*, 249, 119373. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119373>
76. Xu, J., Wang, X., Liu, X., Xia, J., Zhang, T., & Xiong, P. (2016). Enzymatic in situ saccharification of lignocellulosic biomass in ionic liquids using an ionic liquid-tolerant

cellulases. *Biomass and Bioenergy*, 93, 180–186.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.07.019>

77. Xu, J., Yuan, H., Lin, J., & Yuan, wenxiang. (2014). Evaluation of thermal, thermal-alkaline, alkaline and electrochemical pretreatments on sludge to enhance anaerobic biogas production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(5), 2531–2536. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2014.05.029>
78. Yan, Y., Chen, H., Xu, W., He, Q., & Zhou, Q. (2013). Enhancement of biochemical methane potential from excess sludge with low organic content by mild thermal pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 70, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.10.011>
79. Yan, Y., Qin, L., Gao, J., Nan, R., & Gao, J. (2020). Protein extraction and sludge dewatering performance of ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of excess sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(15), 18317–18328. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08208-2>
80. YU, G., HE, P., SHAO, L., & ZHU, Y. (2009). Enzyme extraction by ultrasound from sludge flocs. *Journal of Environmental Sciences*, 21(2), 204–210. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62252-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62252-4)
81. Zhang, B., Li, W., Guo, Y., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., Lens, P. N. L., & Tay, J. H. (2020). Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118(October 2019), 109563. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109563>
82. Zhen, G., Lu, X., Kato, H., Zhao, Y., & Li, Y. Y. (2017). Overview of pretreatment strategies for enhancing sewage sludge disintegration and subsequent anaerobic digestion: Current advances, full-scale application and future perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69, 559–577. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.11.187>