

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química.

Análisis y Control de Calidad Químicos.



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

“RECUPERACIÓN DE PÉPTIDOS Y MONOSACÁRIDOS DE FANGOS AEROBIOS GENERADOS EN PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.”

Autora: Chacón Ruiz, Saray

Dirigido y tutorizado por

Filipigh, Ángel Alejandro y Bolado Rodríguez, Silvia

2022-2023

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los fangos primarios y secundarios.	12
Tabla 2. Composición (% w/w) de la biomasa seca (en base seca sin cenizas).	22
Tabla 3. Condiciones experimentales de hidrólisis.	23
Tabla 4. Degradaciones de los carbohidratos detectados.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. EC de ciclo cerrado en una planta de tratamientos de aguas residuales urbanas.	11
Figura 2. Esquema de la línea de aguas y fangos en una planta de depuración de aguas residuales. ..	11
Figura 3. Esquema del tratamiento hidrotérmico (Xiao & Zhou, 2020).	14
Figura 4. Esquema del tratamiento (bio) químico (Xiao & Zhou, 2020).	19
Figura 5. Fango secundario (RS).	22
Figura 6. Esquema de hidrólisis química de fangos. AC: ácida, empleando HCl y ALK: alcalina, usando NaOH.	25
Figura 7. Esquema de las Hidrólisis hidrotérmicas y combinaciones.	25
Figura 8. Esquema hidrólisis enzimática.	27
Figura 9. Esquema general del proceso de valorización de fangos aerobios generados en plantas de tratamiento de aguas residuales.	28
Figura 10. Esquema y equipo experimental para la determinación de proteínas por el método NKT.	30
Figura 11. Equipo HPLC Marca: Shimadzu, modelo: LC-2050C.	32
Figura 12. Cromatogramas de los patrones de glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa.	33
Figura 13. Análisis de aminoácidos libres mediante el método de ninhidrina.	34
Figura 14. Sistema de electroforesis (SDS-PAGE) para la determinación del tamaño molecular de las proteínas recuperadas.	35
Figura 15. Rendimiento de solubilización (SY, %) de proteínas y carbohidratos en referencia a la masa de proteínas y carbohidratos presentes en la biomasa inicial (RS). Los datos se presentan como medias \pm desviaciones estándar de 4 determinaciones analíticas (ensayos de hidrólisis analizada en réplica). La desviación estándar de las medias se representa mediante líneas de intervalo verticales.	38
Figura 16. Rendimiento de recuperación de péptidos (%) en referencia al contenido de proteínas en la biomasa inicial (RS). Las barras discontinuas muestran los rendimientos de solubilización (%) de proteínas en referencia al contenido de proteína inicial. Las barras discontinuas presentan en el rendimiento de solubilización (SY, %) de proteínas respecto al contenido inicial. Los datos se proporcionan como medias \pm desviaciones estándar de 4 determinaciones analíticas (ensayos de	

hidrólisis analizado en réplica). La desviación estándar de las medias se representa mediante líneas de intervalo verticales.	44
Figura 17. Grado de hidrólisis (DH, %) y contenido de aminoácidos libres en los péptidos recuperados (RY, %) tras los diferentes tratamientos de hidrólisis aplicado a la biomasa. 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.	46
Figura 18. Tamaño de péptidos, en kDa, en las fracciones recuperadas tras los diferentes tratamientos de hidrólisis aplicado a la biomasa.	47
Figura 19. Perfil de aminoácidos de algunas fracciones líquidas.	50
Figura 20. Rendimientos de recuperación (RY %) y solubilización (SY %) de carbohidratos en referencia a la masa de carbohidratos totales en la biomasa inicial. La diferencia entre SY y RY proporciona las pérdidas de carbohidratos debido a la etapa 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.	52
Figura 21. Compuesto de degradación detectados: A) Biomasa inicial, B) HE; C) AH, D) HT+ALK. .	54

ABREVIATURAS

AGV	Ácidos orgánicos volátiles
AH	Autohidrólisis
ALK	Hidrólisis alcalina
RS	Biomasa de fangos aerobios brutos
DA	Digestión anaerobia
EAa	Aminoácidos esenciales
EDAR	Estación de depurada de aguas residuales
EH	Hidrólisis enzimática
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HT	Hidrólisis hidrotérmica
HT+ALK	Hidrólisis combinada termo-alcalina
NEAa	Aminoácidos no esenciales
NKT	Nitrógeno total Kjeldahl
PHA	Polihidroxialcanoatos
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
WAS	Fangos activos residuales - Waste actived sludge
AC	Hidrólisis ácida
HT+AC	Hidrólisis combinada termo-acida

ÍNDICE

1	Introducción.....	9
1.1	PROBLEMÁTICA ASOCIADA A LA GENERACIÓN DEL FANGO	9
1.2	FANGOS SECUNDARIOS GENERADOS EN LA EDAR.....	11
1.3	ESTRATEGIAS DE VALORIZACIÓN DE BIOMASAS RESIDUALES.....	13
1.3.1	Hidrólisis hidrotérmica	14
1.3.2	Hidrólisis química.....	15
1.3.3	Hidrólisis térmica en medio químico.....	17
1.3.4	Hidrólisis (bio) química.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1	FANGO AEROBIO de EDAR	22
3.2	METODOLOGÍA DE HIDRÓLISIS APLICADA A LA BIOMASA	22
3.2.1	Hidrólisis química.....	24
3.2.2	Hidrólisis hidrotérmica y combinado hidrotérmica-química.....	25
3.2.3	Hidrólisis enzimática y autohidrólisis	26
3.3	CÁLCULOS	27
3.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	28
3.4.1	Análisis de sólidos totales, volátiles y cenizas	28
3.4.2	Análisis de nitrógeno total y proteínas	29
3.4.1.1	Análisis de carbohidratos.....	31
3.4.3	Análisis de aminoácidos libres	33
3.4.4	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1	Solubilización de proteínas y carbohidratos	37
4.2	Recuperación de proteínas.....	42
4.3	Análisis de aminoácidos y tamaño de péptidos recuperados.....	45
4.4	Recuperación de carbohidratos.....	50
5	CONCLUSIONES.....	55
6	BIBLIOGRAFÍA.....	57

RESUMEN

Los problemas ambientales son muy graves debido a que afectan al planeta en el que vivimos. Los fangos aerobios son residuos generados durante el tratamiento biológico de las aguas residuales, formados por microorganismos que acumulan los nutrientes en forma de proteínas y carbohidratos, así mismo. Los fangos tienen, por tanto, un importante potencial de valorización, ya que sus componentes pueden extraerse y ser utilizados en diversas industrias, como parte de las estrategias de economía circular (EC). Esta investigación pretende realizar una valorización fraccional de los fangos aerobios, recuperando las proteínas como péptidos y los carbohidratos como monosacáridos.

Se estudia el uso de diferentes alternativas de hidrólisis, entre ellas, las hidrólisis químicas (alcalina con NaOH y ácida con HCl, hidrotérmica (121°C), combinadas (termoalcalina y termoácida) y bioquímicas (autohidrólisis y enzimática, bajo diferentes condiciones de operación. Se compararon los distintos métodos de hidrólisis, en términos de rendimientos de solubilización (SY) y rendimientos de recuperación (RY) de los componentes mayoritarios de esta biomasa, las proteínas y los carbohidratos. Obteniéndose el máximo RY para la hidrólisis combinada termoalcalina (NaOH 1M, 121°C, 60 min) y el máximo SY para la hidrólisis ácida (HCl 1M, 121°C, 60 min). Además, se analizó la composición de aminoácidos y el tamaño de los péptidos recuperados de la biomasa. Siendo la hidrólisis combinada termoácida la mejor técnica para la obtención de aminoácidos libres, mientras que la hidrólisis combinada termoálcali, lo es para la obtención de péptidos de péptidos de gran tamaño.

ABSTRACT

Environmental problems are very serious because they affect the planet we live on. Aerobic sludge is waste generated during the biological treatment of wastewater, formed by microorganisms that accumulate nutrients in the form of proteins and carbohydrates, as well. Sludge therefore has an important potential for recovery, since its components can be extracted and used in various industries, as part of circular economy (CE) strategies. This research aims to carry out a fractional valorization of aerobic sludge, recovering proteins as peptides and carbohydrates as monosaccharides.

The use of different hydrolysis alternatives is studied, including chemical hydrolysis (alkaline with NaOH and acid with HCl, hydrothermal (121°C), combined (thermoalkaline and thermoacid) and biochemical (autohydrolysis and enzymatic, under different operating conditions. compared the different hydrolysis methods, in terms of solubilization yields (SY) and recovery yields (RY) of the major components of this biomass, proteins and carbohydrates. Obtaining the maximum RY for the combined thermoalkaline hydrolysis (1M NaOH, 121°C, 60 min) and the maximum SY for the acid hydrolysis (1M HCl, 121°C, 60 min). Furthermore, the amino acid composition and size of the peptides recovered from the biomass were analyzed. Thermoacid combined hydrolysis is the best technique for obtaining free amino acids, while thermoalkali combined hydrolysis is the best technique for obtaining large peptides.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMÁTICA ASOCIADA A LA GENERACIÓN DEL FANGO

El aumento de la generación de fangos de las aguas residuales es un problema mundial en el contexto del crecimiento de la población y del saneamiento adecuado en las grandes estaciones de tratamiento de aguas residuales (EDAR). Esto se debe a que la creciente urbanización y la actividad industrial han llevado a un aumento significativo en la generación de aguas residuales y, por ende, de fango al tratarlas. La producción de fangos de depuradora en la Unión Europea, Estados Unidos y China oscila entre 18 y 33 millones de toneladas/año en peso seco (Ferrentino et al., 2023). Según datos del Registro Nacional de Fangos, en España, solo en 2019, se produjeron alrededor de 1,200,000 toneladas (en materia seca) de esta biomasa (INE, 2022). El coste del tratamiento asociado a su gestión y eliminación, el alto consumo energético y los impactos medioambientales asociados a los mismos suponen el mayor problema en el funcionamiento de las EDAR. Se ha estimado que la gestión de esta biomasa supone entre el 50% y 60% del coste total del funcionamiento de una EDAR (Cebrián, 2019).

La creciente preocupación por la gestión adecuada de las aguas residuales y la necesidad de promover prácticas sostenibles ha llevado a una mayor atención hacia el tratamiento y la recuperación de subproductos valiosos a partir de las EDAR. Las EDAR son instalaciones cruciales para purificar las aguas residuales antes de su descarga al medio ambiente o su reutilización para consumo, pero también generan grandes cantidades de biomasa residual (fangos) que representan una oportunidad para la obtención de compuestos bioactivos de interés industrial y biotecnológico.

Se han propuesto muchos métodos para el tratamiento de fangos procedentes de las EDAR municipales, por ejemplo, la aplicación agrícola como fertilizante, el vertido, la incineración, la digestión anaerobia (DA) y la pirólisis (Praspaliauskas & Pedišius, 2017) son los más comunes. Como los fangos de depuradora contienen nutrientes esenciales, por ejemplo, un 55% de carbono, un 15% de nitrógeno y un 3% de fósforo, pueden mejorar la calidad de los suelos tras un tratamiento adecuado (Thomsen et al., 2017). Sin embargo, el uso de esta biomasa como fertilizante agrícola crea muchos 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 (Houillon & Jolliet, 2005). El vertido de fangos se ha visto limitado por la falta de emplazamientos seguros disponibles y por la generación de lixiviados y malos olores (Kelessidis & Stasinakis, 2012). La incineración de fangos secos se ha aplicado

ampliamente ya que puede reducir significativamente el volumen de los lodos y eliminar los patógenos. La energía durante la incineración también puede recuperarse en términos de calor y electricidad (Fytili y Zabaniotou, 2008). Sin embargo, la incineración puede dar lugar a la acumulación de metales en las cenizas y a la generación de dioxinas y otros tóxicos (Gómez-Pacheco et al., 2012). En el caso de la pirólisis, el estricto requisito de un entorno exento de oxígeno y la generación de precursores de NO_x y alquitrán han obstaculizado su aplicación (Xiao et al., 2019). En el caso de la DA, la hidrólisis sigue siendo el paso limitante del proceso. Aunque se han utilizado varios métodos de hidrólisis y pre-tratamientos para incrementar la eficiencia en la etapa de hidrólisis, el aumento de la solubilización no siempre resulta en una mayor producción de biogás debido a la formación de compuestos refractarios, como son los óxidos de aluminio y los derivados de fenoles, los cuales tienen una alta resistencia y una gran estabilidad mecánica a elevadas temperaturas (Xiao & Zhou, 2020; Zhen et al., 2017). Además de la baja eficiencia de la hidrólisis, las fluctuaciones de la alimentación, la baja producción de biogás y la dificultad en la purificación del biogás también limitan su aplicación (Ferrentino et al., 2023). Por otro lado, se ha determinado que los procesos de eliminación de fangos son responsables de casi el 40% del total de las emisiones de gases de efecto invernadero de las EDAR, porcentaje que podría disminuirse si se aplicara el concepto de economía circular (EC).

En los últimos años, se ha observado un cambio radical en la visión de las EDAR municipales, siendo este cambio indicado como un "cambio de paradigma". La EDAR ya no se considera únicamente por sus funciones de protección ambiental y saneamiento, sino también como punto de partida para la explotación de potenciales residuos incluidos los fangos. En este contexto, las actuales EDAR pretenden ser sistemas autosuficientes (energética y económicamente) y funcionar como una "fábrica" (una biorrefinería) de nuevos compuestos de alto valor añadido (Pierzynski, 2015; Sommers, 1977). La Directiva Europea 2008/CE/98 (CE, 2008) propone como primera prioridad la valorización de los residuos en algunos productos útiles y que se prefiera la reutilización y el reciclaje del material a la valorización energética de los mismos. Por lo tanto, la valorización fraccionada de los fangos permitiría aprovecharlos, y minimizar el flujo de residuos finales, aplicando el concepto de (bio)-economía circular mostrado en la Figura 1 (Gherghel et al., 2019).

La aplicación del concepto de EC a la recuperación de proteínas a partir de fangos puede ayudar a evitar la producción de fangos como residuo inservible y reducir el empleo de materias primas valiosas para la producción de proteínas (Pradel & Aissani, 2019)

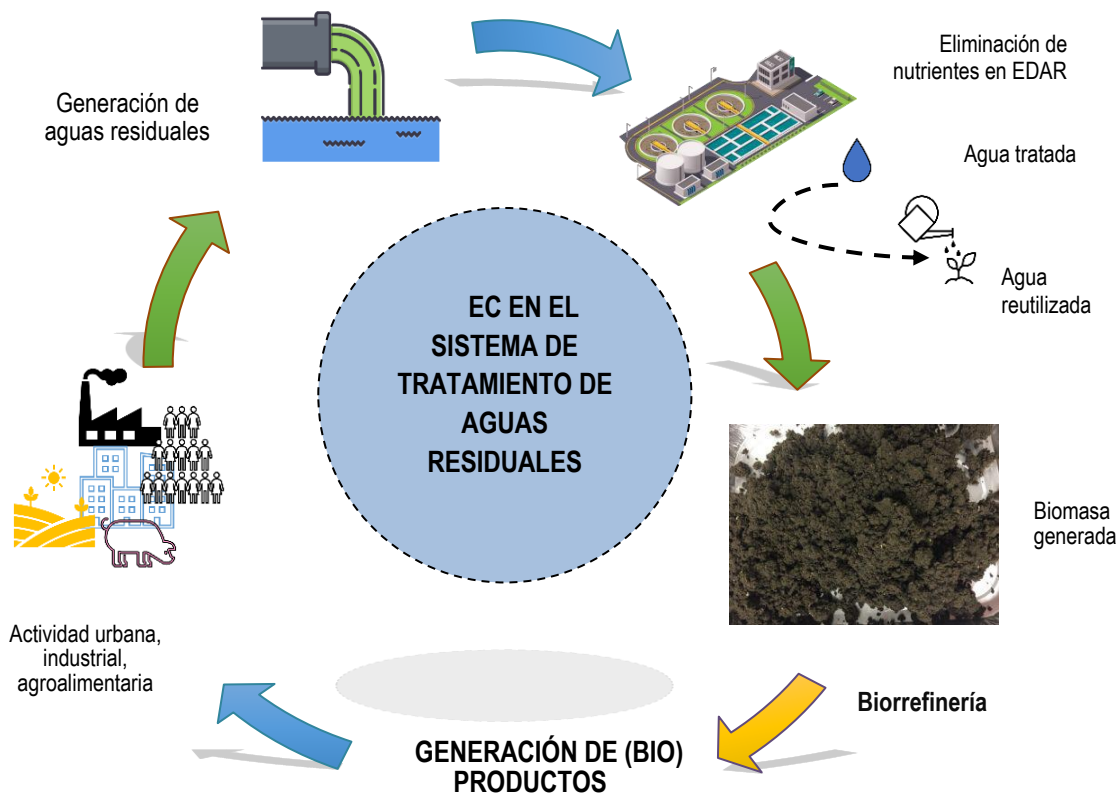


Figura 1. EC de ciclo cerrado en una planta de tratamientos de aguas residuales urbanas.

1.2 FANGOS SECUNDARIOS GENERADOS EN LA EDAR

Se denomina generalmente “fango” o “lodo de depurada” al residuo sólido o semisólido que queda tras el tratamiento de las aguas residuales en las EDAR, produciéndose mediante procesos como el de los fangos activados (WAS), el aerobio-óxico, anaerobio-anóxico-óxico, el de oxidación, entre otros.

Las tecnologías de tratamiento utilizadas en las EDAR pueden influir en las características finales de esta biomasa. Por lo tanto, el uso en una EDAR de varios procesos para el tratamiento de las aguas residuales y los fangos generados parece ser la clave para lograr la eliminación de contaminantes de estas aguas y estar en consonancia con los estrictos requisitos legislativos sobre los vertidos o la reutilización de las aguas residuales (Figura 2).

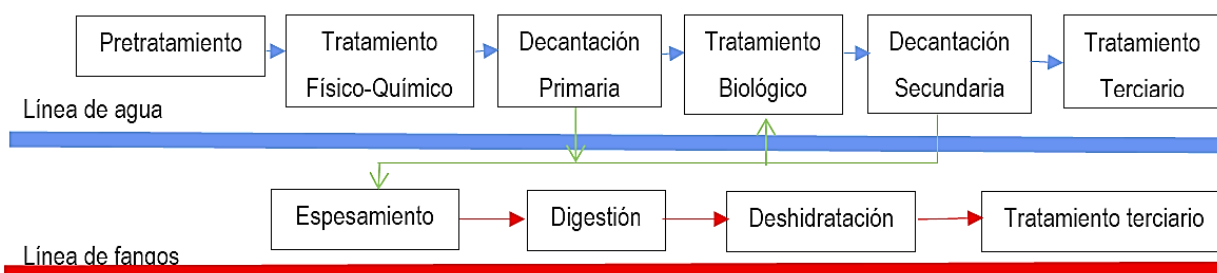


Figura 2. Esquema de la línea de aguas y fangos en una planta de depuración de aguas residuales.

Los tratamientos primarios o fisicoquímicos pueden ser el cribado, la sedimentación, la flotación, la coagulación y la filtración, por lo que se producen fangos primarios principalmente de naturaleza inorgánica. Los tratamientos secundarios o biológicos se basan en la oxidación biológica de la materia orgánica mediante procesos aeróbicos o anaerobios seguidos de nitrificación y desnitrificación, produciendo fangos secundarios o WAS de naturaleza principalmente biológica. Por último, los tratamientos terciarios o físicos como son la filtración y la desinfección generan fangos terciarios. La biomasa de fangos aerobios está constituida por materia orgánica como son las proteínas, los polisacáridos, los ácidos nucleicos y los ácidos húmicos, en la que se acumulan los nutrientes eliminados de las aguas residuales. (Xiao & Zhou, 2020).

En la Tabla 1 se presentan el promedio de las composiciones de fangos primarios y secundarios. En los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, la mayoría de los microorganismos están presentes en forma de agregados microbianos, como flóculos, biopelículas y gránulos en forma de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), una mezcla compleja de polímeros de alto peso molecular presentes tanto en el exterior de las células como en el interior de los agregados microbianos (Brown & Lester, 1980; Nielsen et al., 2002).

Tabla 1. Composición de los fangos primarios y secundarios.

Parámetros	Lodos Primarios	Lodos Secundarios
Sólidos totales o ST (%)	5-9	0.8-12
Sólidos Volátiles o SV	60-80	59-68
Nitrógeno (% ST)	1.5-4	2.4-5
Fósforo (% ST)	0.8-2.8	0.5-0.7
Fosfatos (% ST)	0-1	0.5-0.7
Celulosa (% ST)	8-15	7-9.7
Hierro (g/kg)	2-4	ND
Sílica (% ST)	15-20	ND
pH	5-8	6.5-8.0
Ácidos grasos (% ST)	7-35	5-12
Proteínas (% ST)	20-30	32-41
Alcalinidad (mg/L)	500-1500	580-1100
Ácidos Orgánicos (mg/L)	200-2000	1100-1700

ND: No detectado.

Entre los principales macrocomponentes de la biomasa de fangos secundarios o WAS, aproximadamente entre el 32%-41% del peso seco de las células bacterianas son proteínas, ya sea en forma pura o en combinación con otros compuestos tales como glicoproteínas, ramnolípidos o lipoproteínas (Réveillé et al., 2003; Shi et al., 2018). Claramente, esta biomasa

podría ser una importante fuente de péptidos útiles en múltiples aplicaciones: producción de bioestimulantes, biofertilizantes o biopesticidas para plantas en agricultura (Hussain et al., 2021; X. Liu et al., 2008). La biomasa de fangos puede añadirse a los biofertilizantes en forma de polipéptidos o aminoácidos con el fin de aumentar la eficiencia de absorción de nutrientes (N y P) (Izydorczyk et al., 2021). También se ha informado de aplicaciones como surfactantes, espumantes o emulsionantes en aplicaciones industriales (Gao et al., 2020; Yan et al., 2020). Para obtener un agente espumante utilizando proteínas obtenidas a partir de biomásas, es importante la capacidad espumante del hidrolizado no solo del contenido de proteínas, sino también del grado de hidrólisis (DH). El factor clave para la formación y estabilidad de la espuma es controlar el DH para convertir más proteínas en polipéptidos en lugar de aminoácidos (Gao et al., 2020). Por lo tanto, la composición en aminoácidos y el tamaño de los péptidos recuperados de esta biomasa son parámetros críticos que desempeñan un papel fundamental en sus propiedades tecno-funcionales. Además, estos parámetros también afectan a las etapas subsiguientes de separación y purificación, y, en última instancia, influyen en las aplicaciones finales de estos productos. (Lorenzo-Hernando et al., 2019; Rojo et al., 2021).

Por otro lado, la fracción carbohidrato puede ser utilizada para producir diversos productos de valor añadido como los PHA (polihidroxialcanoatos), que se producen por fermentación bacteriana de carbohidratos y lípidos a partir de procesos fermentativos y que son una alternativa sostenible a los plásticos derivados de hidrocarburos. Los PHA producidos por bacterias tienen propiedades similares a las de los plásticos convencional (Balasubramanian & Tyagi, 2017). 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) (Shokrkar et al., 2017; Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2018).

1.3 ESTRATEGIAS DE VALORIZACIÓN DE BIOMASAS RESIDUALES

La eficacia de la recuperación de proteínas depende del tipo de hidrólisis y las condiciones de operación, Posteriormente será necesaria una separación adecuada y, en función de su aplicación, una purificación. Este apartado resume la información hallada en la literatura sobre la recuperación de proteínas a partir de biomásas residuales generadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales incluyendo el mecanismo principal, la eficiencia en la solubilización de proteínas y los posibles beneficios/desventajas.

Para la recuperación de las proteínas, es necesaria la interrupción tanto de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) como de los materiales intracelulares (citoplasma) para liberar proteínas solubles en el líquido (Nielsen et al., 2002). Se han aplicado métodos de tratamiento físicos, térmicos, químicos, biológicos y varias combinaciones de diferentes métodos de hidrólisis con el objetivo de solubilizar los principales componentes, proteínas y carbohidratos, contenidos en biomazas generadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales.

1.3.1 Hidrólisis hidrotérmica

El mecanismo de la hidrólisis térmica (HT) para la solubilización componentes de biomazas residuales consiste en exponer la biomasa a una temperatura elevada durante el tiempo suficiente para promover la reacción de hidrólisis química y solubilizar las biomoléculas más grandes tanto para los fangos aeróbicos como para los anaerobios (Cho et al., 2013; J. Gao et al., 2021; Xu et al., 2014) o en biomazas hemi- y lignocelulósica (Bolado-Rodríguez et al., 2016; Martín-Juárez et al., 2019; Rojo et al., 2023). La interrupción de la pared celular, ruptura de la pared celular debido a la acumulación de presión interna por el calentamiento, con la posterior hidrólisis de sus componentes, se conoce en la literatura como tratamiento con autoclave, tratamiento hidrotérmico o explosión de vapor (Nitsos et al., 2020; Lorente et al., 2018). Debido a este doble efecto, el método puede clasificarse como físico y químico. A temperaturas bajas (inferiores a 100 °C), en las que las reacciones hidrolíticas de los componentes de la pared celular aún no se ven favorecidas, la ruptura debida a la acumulación de presión interna es el mecanismo predominante (McMillan et al., 2013).

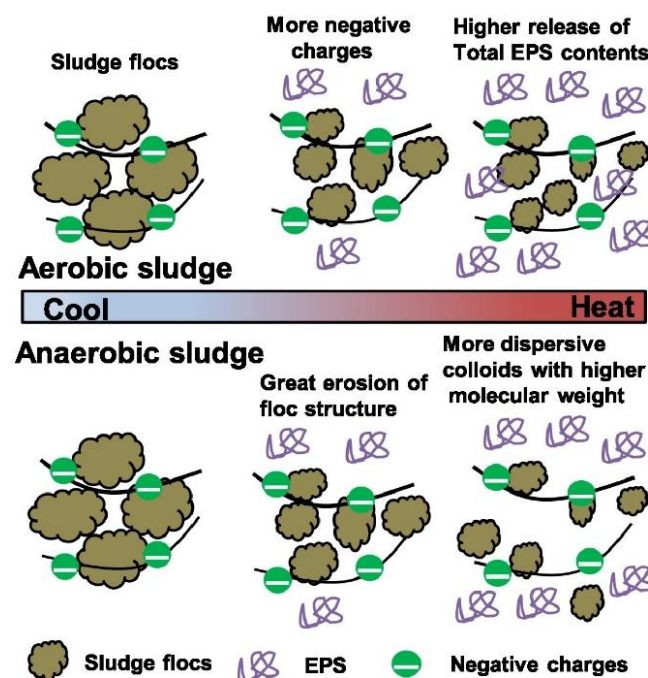


Figura 3. Esquema del tratamiento hidrotérmico (Xiao & Zhou, 2020).

Se pueden utilizar diferentes tipos de métodos de HT, a bajas (<100°C) o altas (>100°C) temperaturas para desintegrar los flóculos del lodo y liberar proteínas. Xue et al. (2015) informaron de los efectos de la hidrólisis térmica a bajas (60°C-90°C) y altas (120°C-180°C) temperatura en la solubilización de la materia orgánica y la DA de lodos con alto contenido en sólidos (16%). Sus resultados mostraron que la hidrólisis térmica mejoró la concentración de proteínas y carbohidratos solubles en todas las condiciones, alcanzándose concentraciones de proteína soluble de 30.000 mg/L a 180 °C durante 180 minutos. Un tratamiento a alta temperatura (130-190 °C) suele ir acompañado de una alta presión (6-8 bar). De esta manera, se puede conseguir una mayor solubilización de las proteínas, aunque a menudo es necesario un enorme consumo de energía, un estricto control operativo y unos costes elevados.

Las altas temperaturas pueden aumentar la cantidad de sustratos accesibles y favorecer la solubilización de la materia orgánica, principalmente las proteínas y los carbohidratos (Bi et al., 2014; Xu et al., 2014). No obstante, una temperatura superior a 150 °C podría inducir la producción de orgánicos solubles recalcitrantes o intermedios tóxicos-inhibitorios (Wilson & Novak, 2009). Lu et al. (2018) trataron muestras de fango a 172 °C, y descubrieron que los compuestos no biodegradables similares a los esteroides y los aromáticos, por ejemplo, benzenoides, flavonoides, piridinas y sus derivados, también pueden aparecer a esta alta temperatura. Yan et al. (2013) investigaron los efectos del tratamiento térmico suave (50-120 °C) en la solubilización de los fangos y la liberación de proteínas. Los resultados indicaron que la concentración de proteína soluble mostraba una tendencia creciente a medida que aumentaba la temperatura, alcanzándose la máxima proteína liberada de 3000 mg/L a 120 °C. García et al. (2017) recuperaron proteínas a partir de los fangos por vía hidrotérmica y observaron una concentración máxima de proteína de 7.2 g/L después de un tratamiento hidrotérmico durante 87 min. Además de la mejora en la solubilización de proteínas, el tratamiento térmico también mostró una mejora en la destrucción de patógenos y en la deshidratación de los fangos, así como en la eliminación de micro-contaminantes, por ejemplo, hormonas esteroideas (Xiao & Zhou, 2020). Los datos publicados se refieren a solubilización, pero apenas existe información sobre la degradación de los compuestos solubilizados a estas temperaturas.

1.3.2 Hidrólisis química

La hidrólisis alcalina es uno de los métodos de hidrólisis química más utilizados para la recuperación de proteínas a partir de biomásas generadas en aguas residuales como biomasa algal (Rojo et al., 2023) y fangos aerobios y anaerobios (Xiang et al., 2017; Xu et al., 2014). También es ampliamente utilizada en el tratamiento de biomásas lignocelulósica (Bolado-

Rodríguez et al., 2016). Generalmente, se suelen emplear el hidróxido de sodio (NaOH), el hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) (Czechowski & Marcinkowski, 2006) y el hidróxido de potasio (KOH) como compuestos alcalinos en este tipo de hidrólisis. Los álcalis pueden inducir la solubilización de las proteínas de la membrana, la saponificación de los lípidos de la membrana e inducir daño en las células microbianas (Mendonca et al., 1994). Se ha informado que el Ca(OH)₂ es menos eficaz que el NaOH en la solubilización de proteínas, ya que el catión bivalente (Ca²⁺) puede conectar la célula con el EPS y provocar la refluotación de los polímeros orgánicos disueltos (Li et al., 2008). Sin embargo, se demostró su superioridad en términos de bajo coste, fácil almacenamiento, lenta solubilización para un largo tiempo de reacción y buena deshidratación de fangos. 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 (Li et al., 2014; Rani et al., 2012). Sin embargo, una desventaja significativa de la hidrólisis alcalina está relacionada con las sales irrecuperables, y las altas concentraciones de sal residual que presentan un gran desafío para el postratamiento de los fangos restantes después de la solubilización de proteínas (Xiao & Zhou, 2020).

La hidrólisis alcalina puede dirigirse a la hidrólisis de enlaces éster y enlaces de hidrógeno entre los componentes polisacáridos y no polisacáridos de la pared celular microbiana (Nitsos et al., 2020; Rojo, Filipigh, et al., 2023). A baja temperatura, la hidrólisis alcalina puede inducir un hinchamiento de la pared celular y una mejora de los rendimientos de extracción de proteínas (Phong et al., 2018). Mientras que, a temperaturas más altas, los enlaces glucósidos intramoleculares también se ven afectados, conduciendo a la hidrólisis de la pared celular y los carbohidratos intracelulares. Rojo et al. (2023) reportaron un incremento en los rendimientos de solubilización de proteínas de un 36.1% al 55% cuando una biomasa de microalgas-bacterias generadas en aguas residuales de purines fue tratada mediante hidrólisis alcalina (NaOH, 2M, 60 min) a 40°C y 50°C. Por otro lado, Hui et al. (2022) reportaron rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos (SY) de 60.72% y 40% a partir de fangos activados liofilizados (20 g/L) después de hidrólisis alcalina a pH 3 y 70°C durante 9 horas.

La hidrólisis ácida (AC) también se ha utilizado para solubilizar los fangos para la liberación de proteínas y polisacáridos en procesos de DA. Por ejemplo, Devlin et al. (2011) informaron que, tras un pretratamiento ácido a pH 1 (HCl), la producción de biogás se incrementó hasta un 15% respecto al fango sin tratar (249 mL/g DQO) debido a un incremento en la solubilización de proteína del 88% y de carbohidratos del 90%. Sin embargo,

normalmente se informó que la hidrólisis ácida era menos eficaz que la hidrólisis alcalina para hidrolizar las células de biomasa en fangos activados residuales (Liu et al., 2008). El ácido sulfúrico es el más utilizado para la hidrólisis ácida debido a su bajo coste y eficacia, pero por su efecto oxidante podría degradar los compuestos liberados. También se han probado otros ácidos, como el ácido nítrico y el ácido clorhídrico. El ácido nítrico se ha descartado ya que se ha observado una reducción significativa del rendimiento a mayores concentraciones de ácido (Nitsos et al., 2020). Esto es probablemente el resultado de la acción oxidativa del ácido nítrico que degradaría las moléculas liberadas. Se ha informado que el tratamiento ácido es más favorable para la obtención de carbohidratos que el tratamiento alcalino (Martin Juárez et al., 2021; Martín-Juárez et al., 2019; Rojo, Filipigh, et al., 2023).

El ácido clorhídrico dio resultados superiores de sacarificación en comparación con el ácido sulfúrico y el ácido nítrico en concentraciones que van de 0.2 M a 2 M, en la hidrólisis de la biomasa de *H. tetrachotoma* para la producción de bioetanol (Kassim & Bhattacharya, 2016). Por otro lado, Rojo et al., (2023) consiguieron un rendimiento de solubilización de carbohidratos de hasta un 65% a 40°C empleando HCl 2M. Sin embargo, bajo las mismas condiciones los rendimientos de solubilización de proteínas a partir de consorcio de microalgas-bacterias fueron solo del 19%. Martin Juárez et al. (2021), trabajando con biomasa microalgal cultivada en aguas residuales de purines con alta carga bacteriana, obtuvieron una relación proteínas/carbohidratos solubilizados de 0.77 tras hidrólisis ácida con HCl 2M (60 min, 121°C) mientras que esta relación disminuyó a 0.66 cuando la hidrólisis ácida se realizó con HCl 0.5 M en las mismas condiciones.

A este respecto, el tratamiento con ácidos diluidos suele ser más eficaz en la liberación de polisacáridos, mientras que el tratamiento con álcalis puede inducir el hinchamiento de la pared celular microbiana con la consiguiente solubilización simultánea de proteínas y carbohidratos y la eliminación de sustancias incrustantes (celulosa, hemicelulosa y lignina) presentes en la biomasa de fangos (Chishti et al., 1992). Si bien, debido a la naturaleza agresiva de los ácidos, se requiere una cuidadosa optimización de las condiciones de hidrólisis para evitar la degradación de las moléculas extraídas, especialmente las proteínas, antioxidantes y pigmentos (Khanra et al., 2018; Rojo et al., 2023).

1.3.3 Hidrólisis térmica en medio químico

El tratamiento de biomasa con soluciones diluidas de ácidos inorgánicos o bases a altas temperaturas (>100°C) puede considerarse una variante de tratamiento hidrotérmico. La velocidad de las reacciones hidrolíticas a temperaturas elevadas en agua se ven potenciadas

por la adición de un catalizador ácido o básico (Nitsos et al., 2020). Se pueden conseguir altos rendimientos de carbohidratos, lípidos y proteínas a temperaturas más bajas y tiempos de reacción más cortos (inferiores a 60 minutos). La concentración de ácido empleada suele estar entre el 1 y el 5 % y se han registrado temperaturas entre 110 °C y 150 °C. Por otro lado, una diferencia fundamental entre el tratamiento hidrotérmico ácido o básico se refiere a las condiciones operativas. La combinación de los tratamientos térmico y alcalino está especialmente adaptada para temperaturas más bajas (por debajo de 120 °C) y un tiempo de tratamiento más largo (Cho et al., 2013). Este método se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de biomasa lignocelulósica (Bolado-Rodríguez et al., 2016).

Se ha informado de que el método termoquímico combinado mejora la solubilización de las proteínas en numerosas biomásas residuales (Bolado-Rodríguez et al., 2016; Cho et al., 2013; J. Gao et al., 2021; Rojo et al., 2023; Xu et al., 2014). Por ejemplo, Cho et al., (2013) informaron que las proteínas y los carbohidratos solubilizados después de la hidrólisis combinada termo-alcalina (NaOH 4N, 100°C, 60 min) era 2.4 y 5.1 veces mayores que la de los fangos no tratados (1 g/L y 0.14 g/L de proteínas y carbohidratos) y 2.1 y 4.1 veces mayores que utilizando únicamente la hidrólisis alcalina (2.10 y 0.58 g/L) a pH 12 a 60°C y 60 min. Liu et al. (2008) obtuvieron un 68% más de ácidos grasos volátiles (AGV) con tratamiento termo-alcalino (HT+ALK) (pH 12, 90°C, 2h) que con los lodos sin tratar tras 252 h de fermentación. La proteína soluble (61.6%) fue la principal fuente de producción de AGV. Assawamongkholsiri et al. (2013) emplearon fangos activados (10% ST) procedentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera como sustrato para la producción de hidrógeno mediante cultivos anaerobios mixtos en un proceso de fermentación. El tratamiento combinado térmico-ácido (0.5% (p/v) HCl, 110 °C, 6 h) resultó en la DQO soluble (sCOD) más alta de 1785.6 mg/L, pero con recuperaciones de péptidos y monosacáridos reducidas, 8.1 y 38.5 mg/L, respectivamente. Martín Juárez et al. (2021) informaron de una solubilización del 98.2%, 75.5 % y 55.5 % en carbohidratos, proteínas y lípidos a partir de biomasa basada en microalgas de *Scenedesmaceae* crecidas en un fotobiorreactor de tratamiento de aguas residuales de purines tras un tratamiento ácido con HCl 2M a 121°C y 60 min. Sin embargo, las solubilizaciones disminuyeron hasta un 71%, 47.3% y 28.2% empleando HCl 0.5 M en las mismas condiciones. Por otro lado, Rojo et al., (2023) trabajando con consorcio de microalgas-bacterias informaron que en la hidrólisis alcalina (NaOH, 2M, 60 min), el aumento de la temperatura mejoró la solubilización de la proteína de 36.1% a 40°C a 54.1% a 60°C y el rendimiento máximo (\approx 90%) a 120°C. La hidrólisis ácida (HCl, 2M, 60 min) dio lugar a las solubilizaciones proteicas más bajas, con

valores en torno al 19% a 60°C y a 40°C, mientras que a 120°C la solubilización de las proteínas se vio incrementada hasta un 75%.

1.3.4 Hidrólisis (bio) química

La hidrólisis biológica (hidrólisis enzimática o microbiana) se ha considerado un método atractivo para solubilizar los lodos en comparación con los métodos químicos o físicos. Las suaves condiciones de operación de este método evitan la degradación de los componentes solubilizados incrementándose, en muchos casos, los rendimientos de recuperación y la selectividad con un bajo consumo energético. La hidrólisis se puede conseguir añadiendo enzimas (hidrólisis enzimática. EH) o induciendo la actividad enzimática inherente a los microorganismos que forman parte de la biomasa bacteriana (autohidrólisis, AH). El tratamiento enzimático puede ser aún más específico para la obtención de un metabolito de interés. Dado que, en la biomasa de fangos aerobios, aproximadamente el 37% son proteínas, resulta lógico que el empleo de proteasas sea una buena estrategia para la recuperación de este componente. Varios estudios han informado de la eficiencia del método enzimático en la obtención de productos de altos valor añadido como son las proteínas y los carbohidratos. Por ejemplo, Rojo et al. (2021) consiguieron hasta un 38.5% de carbohidratos y un 32.7% de proteínas solubilizadas a partir de biomasa algal generada en fotobiorreactores que trataba aguas residuales porcinas tras 5h de hidrólisis enzimáticas empleando la enzima comercial Protamex. Además, informaron de la presencia de polipéptidos con tamaños de hasta 135 kDa mientras que utilizando Alcalasa 2.5 L el tamaño de los péptidos fueron inferiores a 10 kDa. En este sentido, emplear Protamex sería una buena estrategia para la obtención de proteínas con propiedades tecno-funcionales. Sin embargo, una desventaja del empleo de enzimas es su elevado coste, y es necesario optimizar la combinación de enzimas y la dosis enzima:sustrato para conseguir altas recuperaciones.

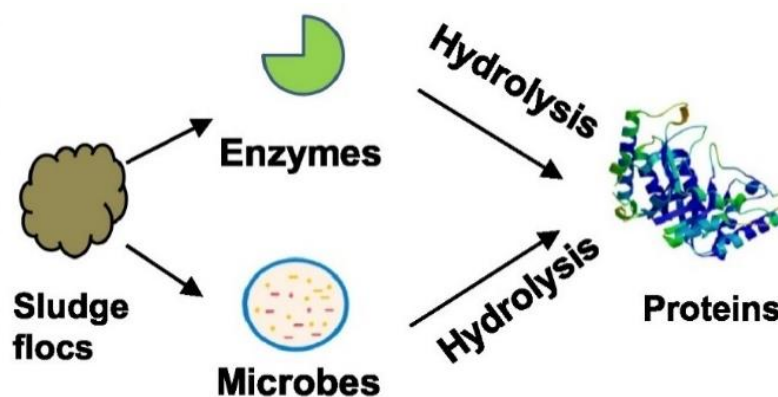


Figura 4. Esquema del tratamiento (bio) químico (Xiao & Zhou, 2020).

Por otro lado, la autohidrólisis es un tratamiento biológico-enzimático que consiste en someter a las biomasas con alto contenido bacteriano bajo condiciones que permitan a los microorganismos del fango liberar las enzimas hidrolíticas contenidas en su propio sistema metabólico, lo que en última instancia conduce a la solubilización de la biomasa. Las enzimas hidrolíticas de los lodos activados pueden localizarse en la fase soluble o en el flóculo de lodo. El tratamiento por autohidrólisis utiliza efectos sinérgicos producidos por la temperatura (35 o 55°C) y el pH aplicado (4.5o 6.5), y las enzimas hidrolíticas liberadas, obteniendo así un tratamiento con un proceso de operación simple y bajo requerimiento de una fuente de energía externa. Carvajal et al. (2013) hallaron que el tratamiento por autohidrólisis a 55°C y 12 h, en condiciones de alta concentración de sólidos (8%) y ambiente microaeróbico, aumentó en un 40% la solubilización de la materia orgánica, mejoró la productividad de metano en un 23% y se produjo una mejora general de la fluidez de los fangos.

2 OBJETIVOS

El objetivo global del presente Trabajo Fin de Máster es comparar diferentes métodos de hidrólisis para la valorización fraccional de fangos secundarios generadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales. La investigación se centra en la recuperación de la fracción mayoritaria y de mayor valor de esta biomasa, la proteica, pero también evaluando la influencia de los diferentes parámetros de hidrólisis en la fracción de carbohidratos.

El estudio pretende comparar la solubilización de proteínas y carbohidratos, pero también las pérdidas de los componentes liberados en cada uno de los métodos y condiciones de hidrólisis. Se determinarán, por tanto, los rendimientos finales de recuperación de proteínas en forma de péptidos, y de carbohidratos como monosacáridos, evaluando el efecto de cada hidrólisis en la composición y tamaño de los péptidos recuperados.

Explícitamente, empleando como sustrato fango secundario de plantas de tratamiento de aguas residuales, se persiguen los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las solubilizaciones de proteínas y carbohidratos obtenidas mediante diferentes tipos de métodos de hidrólisis: ácido, alcalino, hidrotérmico, autohidrólisis, enzimático, termo-ácido y termo-alcalino, bajo diferentes severidades de las condiciones de operación.
- Conocer las pérdidas por degradación de las proteínas y carbohidratos solubilizados en cada uno de los métodos y condiciones de operación ensayados.
- Comparar las recuperaciones de proteínas como péptidos y de carbohidratos como monosacáridos en cada uno de los métodos y condiciones de operación ensayados.
- Establecer el posible efecto del tipo y condiciones de la hidrólisis en la composición y tamaño de los péptidos recuperados.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 FANGO AEROBIO DE EDAR

La biomasa de fangos crudos 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 para reducir el contenido de humedad del 99.3% al 93.3%. La fracción sólida procedente de centrifugación (RS) fue homogeneizada, obteniéndose 25.4 ± 0.2 g de cenizas, siendo su composición química (en base seca libre de ceniza) la expuesta en la Tabla 2. El RS se almacenó a $4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ para trabajar con lodo fresco en los experimentos de hidrólisis y evitar cualquier actividad biológica (Malhotra & Garg, 2020).



Figura 5. Fango secundario (RS).

Tabla 2. Composición (%w/w) de la biomasa seca (en base seca sin cenizas).

Composición (g/100g)	
Proteínas	47.9 ± 2.5
Carbohidratos	20.4 ± 0.8
Glucosa	17.4 ± 0.6
Xilosa	2.5 ± 0.2
Celobiosa	1.7 ± 0.1
Arabinosa	< 1
Lípidos	10.3 ± 1.1
Ácido húmico	9.6 ± 0.6

3.2 METODOLOGÍA DE HIDRÓLISIS APLICADA A LA BIOMASA

Se compararon diferentes métodos para la solubilización de proteínas y carbohidratos y la recuperación de péptidos y monosacáridos de la biomasa de RS (Tabla 3). Las condiciones de hidrólisis se seleccionaron de acuerdo con la experiencia previa del grupo de valorización

de biomasa con biomasa algal procedente de aguas residuales (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 la etapa de hidrólisis de fangos en la DA donde el aspecto frecuentemente evaluado es la producción de biogás (Carvajal et al., 2013; Chiu et al., 1997; H. Li et al., 2013; Tian et al., 2016; Zhen et al., 2017) y las escasas referencias sobre la solubilización de macrocomponentes a partir de biomasa de fangos aerobios (Hui et al., 2022; Hwang et al., 2008; Y. Liu et al., 2009; Yan et al., 2020).

Para evaluar la contribución de cada tratamiento individual a la solubilización y recuperación de macrocomponentes en la hidrólisis de métodos combinados, se llevaron a cabo experimentos de tratamiento individual en todas las condiciones de operación.

Tabla 3. Condiciones experimentales de hidrólisis.

Hidrólisis	Reactivo	Concentración (M)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
HIDROTÉRMICO (HT)	Agua	-	121	30
		60		
ALCALINO (ALK)	NaOH	0.5	50	180
		1		
		0.5	50	60
		1		
HIDROTÉRMICO + ALCALINO (HT+ALK)	NaOH	0.5	121	30
		1		
		0.5	121	60
		1 M		
ACIDO (AC)	HCl	0.5	50	180
		1		
HIDROTÉRMICO + ÁCIDO (HT+AC)	HCl	0.5	121	60
		1		
AUTOHIDRÓLISIS (AH)	Agua	pH 6.5	50	180
				60
ENZIMÁTICO (EH)	Protamex	0.5%	50	180
		1%		

Para este estudio, todos los experimentos se realizaron por duplicado empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL utilizando un volumen útil de 150 mL de suspensión de biomasa RS con una concentración al 4% (g/g en base seca) a fin de mejorar la fluidez de los fangos centrifugados (Carvajal et al., 2013; Liu et al., 2008). Para comparar los diferentes métodos de hidrólisis, la mayoría de los experimentos se realizaron a 50°C durante 60 y 180 min,

excepto los experimentos en condiciones más severas que evalúan el efecto de la temperatura, 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.

Tanto las fracciones sólidas (FS) como las líquidas (FL) fueron pesadas tras los diferentes métodos de hidrólisis aplicado. Se analizó el contenido en sólidos totales (ST) y volátiles (SV), nitrógeno total y carbohidratos en la fracción sólida a fin de evaluar el rendimiento de solubilización de los componentes. Para evaluar los rendimientos de recuperación se analizaron los péptidos y la composición en monosacáridos sobre la FL. Además, a mayores, se analizaron la cantidad de aminoácidos libres, el perfil de aminoácidos de algunos experimentos y el tamaño de los péptidos recuperados en todos los ensayos. Todos los análisis e hidrólisis se realizaron por duplicado. Todos los reactivos y estándares utilizados en este estudio (HCl, NaOH, glucosa, xilosa, celobiosa, arabinosa, metanol, cloroformo, ácido sulfúrico, ácido húmico, ninhidrina), con una pureza superior al 95% o grado reactivo fueron adquiridos a Sigma Aldrich (España) y Panreac Applichem (España).²

3.2.1 Hidrólisis química

Para la hidrólisis química, se añadieron al RS volúmenes adecuados de solución de NaOH y HCl trabajando con matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen útil de 150 mL para obtener una suspensión con una concentración al 4% (g sólido seco/100 g suspensión). Se seleccionó ácido clorhídrico (HCl) como reactivo ácido para evitar la degradación oxidativa de los componentes liberados en comparación con el ácido nítrico o sulfúrico mientras el hidróxido de sodio (NaOH) fue seleccionado como el reactivo básico ya que es el más utilizado para la recuperación de proteínas a partir de biomásas generadas en aguas residuales como microalgas (Rojo et al., 2023). Los ensayos con NaOH han mostrado mejores efectos de solubilización de fangos aerobios (Xiang et al., 2017; Xu et al., 2014) en comparación con otros álcalis como el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o KOH, tal y como se indicó en la sección 1.3.2.

Dado que la pared microbiana de los flóculos de fangos es bastante débil (Liu & Fang, 2002; Sommers, 1977) en comparación con otras biomásas 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 NaOH y HCl para 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) para el ensayo

alcalino (ALK). Sin embargo, para el ensayo ácido (AC), orientado a la liberación de carbohidratos, el ensayo se realizó solamente a 180 min (Rojo et al., 2023).

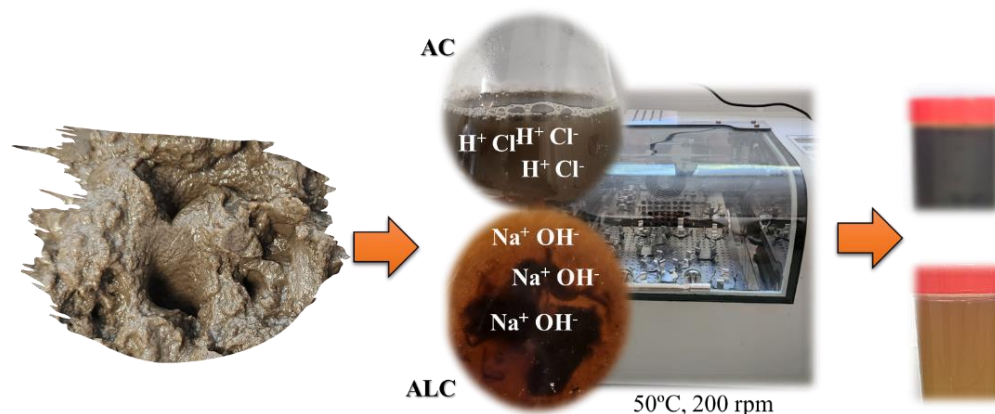


Figura 6. Esquema de hidrólisis química de fangos. AC: ácida, empleando HCl y ALK: alcalina, usando NaOH.

3.2.2 Hidrólisis hidrotérmica y combinado hidrotérmica-química

La combinación de altas temperaturas (121°C) como método hidrotérmico (HT) y medios ácidos (AC) o alcalinos (ALK) 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; Pham et al., 2021), microalgas (Martin Juárez et al., 2021; Martín-Juárez et al., 2019; Rojo et al., 2023) y biomasa lignocelulósica (Bolado-Rodríguez et al., 2016). Además, ha mostrado un efecto esterilizante en biomazas con alto contenido bacteriano, que puede ser de gran interés para evitar la degradación metabólica de los productos liberados (Fuentes et al., 2016; Martin Juárez et al., 2021). Las severas condiciones de este tratamiento han evitado la presencia de bacterias viables en los hidrolizados que podrían degradar los componentes solubilizados y competir con los microorganismos de fermentación en las posteriores etapas de valorización (Fuentes et al., 2016; Martin Juárez et al., 2021).

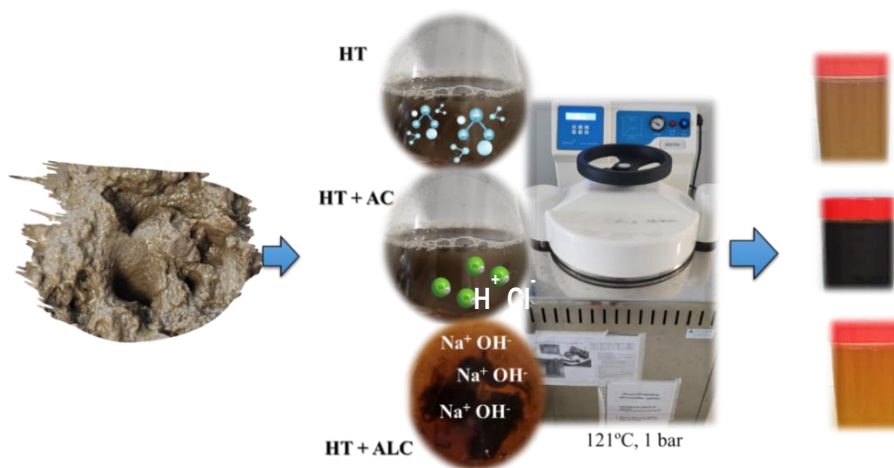


Figura 7. Esquema de las Hidrólisis hidrotérmicas y combinaciones.

Experimentalmente, para la HT, se llevó a cabo una suspensión acuosa de RS al 4% en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen útil de 150 mL a pH 6.5 y se mantuvieron en autoclave a 121°C durante 60 min (Bolado-Rodríguez et al., 2016) y 30 min (Chen et al., 2019). Para la combinación simultánea de hidrólisis química e hidrotérmica la biomasa de RS al 4% en las mismas condiciones descritas para el ensayo HT fue expuesta a 121 °C en autoclave empleando una suspensión alcalina con NaOH (dando lugar a la hidrólisis combinada HT+ALK) o ácida con HCl (dando lugar a la hidrólisis combinada HT+AC) bajo las mismas condiciones de hidrólisis química individual (0.5 M y 1 M) durante 30 y 60 min para HT+ALK (Rojo et al., 2023) y 60 min para HT+AC (Pham et al., 2021).

3.2.3 Hidrólisis enzimática y autohidrólisis

Se decidió utilizar dos tipos de métodos biológicos (Autohidrólisis, AH e Hidrólisis enzimática, EH). Por un lado, el uso de enzimas comerciales como las proteasas han sido ampliamente utilizadas en la recuperación de proteínas debido a su alta selectividad, aunque el alto coste de la enzima limita a veces su aplicabilidad (Phong et al., 2018; Rojo et al., 2021). Sin embargo, la AH, como método biológico, sencillo y barato, permite 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 EH se llevó a cabo empleando la enzima comercial Protamex (Novozyme A/S, Denmark) a dos concentraciones 0.5% y 1% (g/gRS) (Rojo et al., 2021) empleando agua destilada como disolvente a la temperatura y pH óptimos de la enzima (50 °C y 6.5) empleando un agitador rotatorio (Comecta-Ivymen, Spain) a 200 rpm durante 180 minutos. La enzima Protamex es una mezcla de endo y exo-proteasa (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).

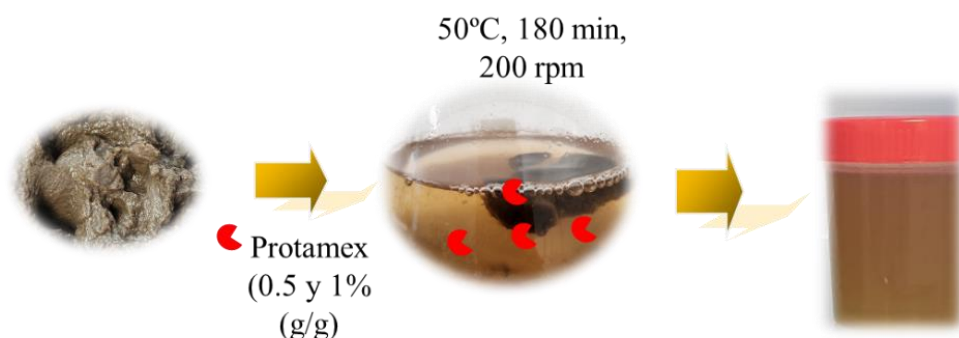


Figura 8. Esquema hidrólisis enzimática.

Por otro lado, las AH se realizaron utilizando un agitador rotatorio (Comecta-Ivymen, España) a temperatura, agitación y pH constantes (50°C, 200 rpm y 6.5) durante 60 y 180 min, incluyendo el tiempo de calentamiento inicial correspondientes a las condiciones óptimas de las proteasas (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

Se definieron los siguientes parámetros para evaluar los rendimientos de solubilización (Ec.1), rendimientos de recuperación (Ec.2) de los componentes contenidos en la biomasa y, por tanto, las pérdidas de componentes (Ec.3) por los tratamientos aplicados.

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

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

$$\mathbf{CL\ (\%)} = \left(1 - \frac{\text{g componente en FL}_{\text{DH}} + \text{g componente en FS}_{\text{DH}}}{\text{g componente en biomasa inicial RS}} \right) \times 100 \quad \mathbf{Ec. 3}$$

donde SY es el rendimiento de solubilización (%), RY es el rendimiento de recuperación (%), CL son las pérdidas de componentes (%), "componente" se refiere a proteínas/péptidos y carbohidratos/monosacáridos en gramos (g) en la FS y en la FL, después del tratamiento de hidrólisis (DH) o en la biomasa de fango inicial (RS). Un esquema de la experimentación aplicada se muestra en la Figura 9.

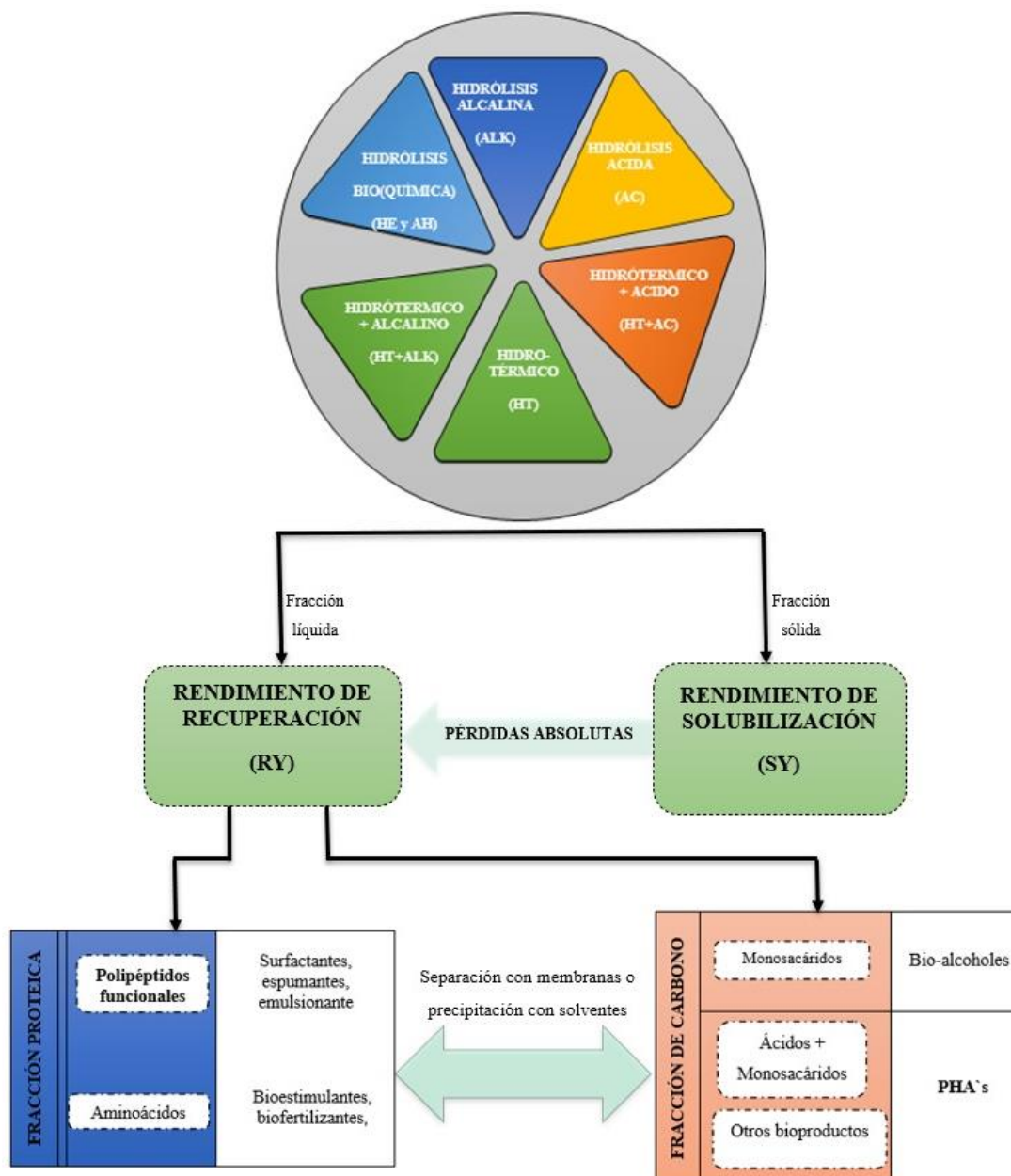


Figura 9. Esquema general del proceso de valorización de fangos aerobios generados en plantas de tratamiento de aguas residuales.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 Análisis de sólidos totales, volátiles y cenizas

Se analizó el contenido de ST, de SV y de cenizas, tanto en la biomasa inicial (RS) como en las FS después del tratamiento de hidrólisis según el método estándar (Van Wychen & Laurens, 2016), excepto los ST en las hidrólisis químicas.

Para la determinación del contenido de humedad se llevó a cabo un análisis de ST. Se calcinaron previamente los crisoles en un horno de mufla a 550 °C durante 30 min y se

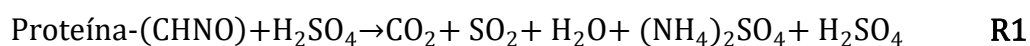
conservaron en la estufa a 105 °C hasta su utilización cuando se enfriarán a un desecador a temperatura ambiente.

Después se introducirán los crisoles con las muestras en la estufa a 105 °C hasta peso constante, aproximadamente 24 h. Se volverán a enfriar a temperatura ambiente dentro de los desecadores y obtendremos el valor de los ST por diferencia de pesada. Por último, los crisoles con las muestras serán introducidos en el horno mufla 550°C durante 24 h, donde la muestra se calcina. A continuación, se enfriarán progresivamente, primero en la estufa y, posteriormente, en el desecador. Cuando alcanzan la temperatura ambiente, se determina el contenido de SV por diferencia de pesada.

3.4.2 Análisis de nitrógeno total y proteínas

El contenido de nitrógeno orgánico en las FS, en las FL y en la RS se determinó de acuerdo con el método del Nitrógeno Total Kjeldahl (NKT) según el método estándar (USEPA, 2001). El método NKT consta de tres etapas: digestión, destilación y valoración (Figura 10):

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, una pastilla de catalizador Kjeldahl (0.3% CuSO₄·5H₂O) junto a unas bolitas de vidrio. La digestión se realizó mediante una rampa de temperatura de 15 min (150 °C), 45 min (270 °C) y 120 min (370 °C) haciendo que las muestras ebulleran, convirtiendo el nitrógeno orgánico (procedente de las proteínas) en ion amonio (**R1**). Durante el proceso, es importante vigilar que en el interior de los tubos de digestión no se formen espumas negras, ya que habría que detener el proceso porque se estaría produciendo una contaminación cruzada. Tras finalizar la digestión, se dejó enfriar los tubos a temperatura ambiente durante 20 min, hasta que las muestras se tornaron transparentes.



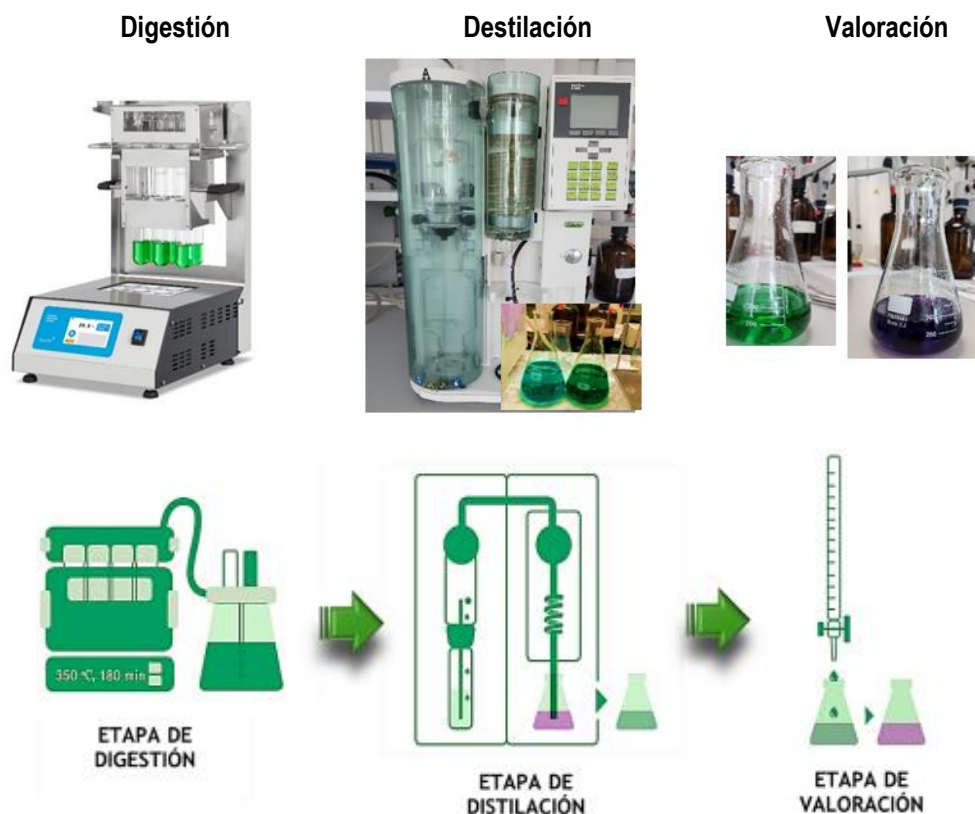
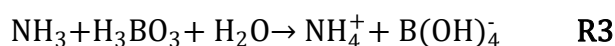
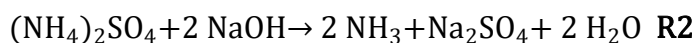


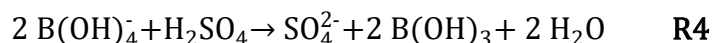
Figura 10. Esquema y equipo experimental para la determinación de proteínas por el método NKT.

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, provocando que el nitrógeno se desprenda en forma de amoníaco (**R2**). El amoníaco se recoge sobre un Erlenmeyer que contiene una disolución en exceso de ácido bórico al 4% junto con una mezcla de indicador mixto (indicador 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, para cuantificar el nitrógeno amoniacal de las muestras. A partir de la cantidad de ion borato que se encuentra en disolución, el cual es equivalente al nitrógeno de la muestra, 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.



A partir del volumen utilizado de ácido sulfúrico y su normalidad se puede calcular la cantidad de nitrógeno presente en la muestra, y con ella saber la cantidad de proteínas que contienen a partir de un factor Nitrógeno a Proteína de 4 obtenido a partir del perfil de aminoácidos de la biomasa inicial de acuerdo con Templeton & Laurens (2015).

1.1.1. Análisis de carbohidratos

Los carbohidratos, que son polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas, están compuestos por una o varias unidades de monosacáridos. En presencia de 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 RS, en las FS y en las FL 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 utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-Vis acoplado a un detector de índice de refracción (HPLC-RID).

En primer lugar, a la biomasa inicial, así como a las FS obtenidas tras los tratamientos de hidrólisis se les aplica una AC concentrada (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 60 min, a la vez que se agitaban los tubos cada 5-10 minutos para favorecer la solubilización. Tras esta primera digestión se añadió 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 FS de las FL. Finalmente, la FL resultante de la hidrólisis del sólido se filtró con filtros de membrana de nylon de 0.22 µm en viales de 1.5 mL.



Figura 11. Equipo HPLC Marca: Shimadzu, modelo: LC-2050C.

Tabla 4. Degradaciones de los carbohidratos detectados.

Monosacárido	F. Degradación
Glucosa	1.05
Xilosa	1.04
Arabinosa	1.04
Celobiosa	0.72

Los principales monosacáridos se cuantificaron en las FL (las obtenidas tras los experimentos de hidrólisis aplicada y las procedentes de la AC 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. 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) a un flujo 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 AC de los monosacáridos, se aplicó el tratamiento de AC utilizando H₂SO₄ a los estándares de glucosa, arabinosa, celobiosa y xilosa, para calcular los factores de corrección necesarios (Tabla 4). En última instancia, el cálculo del contenido de carbohidratos se efectuó sumando las cantidades de todos los monosacáridos (glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa).

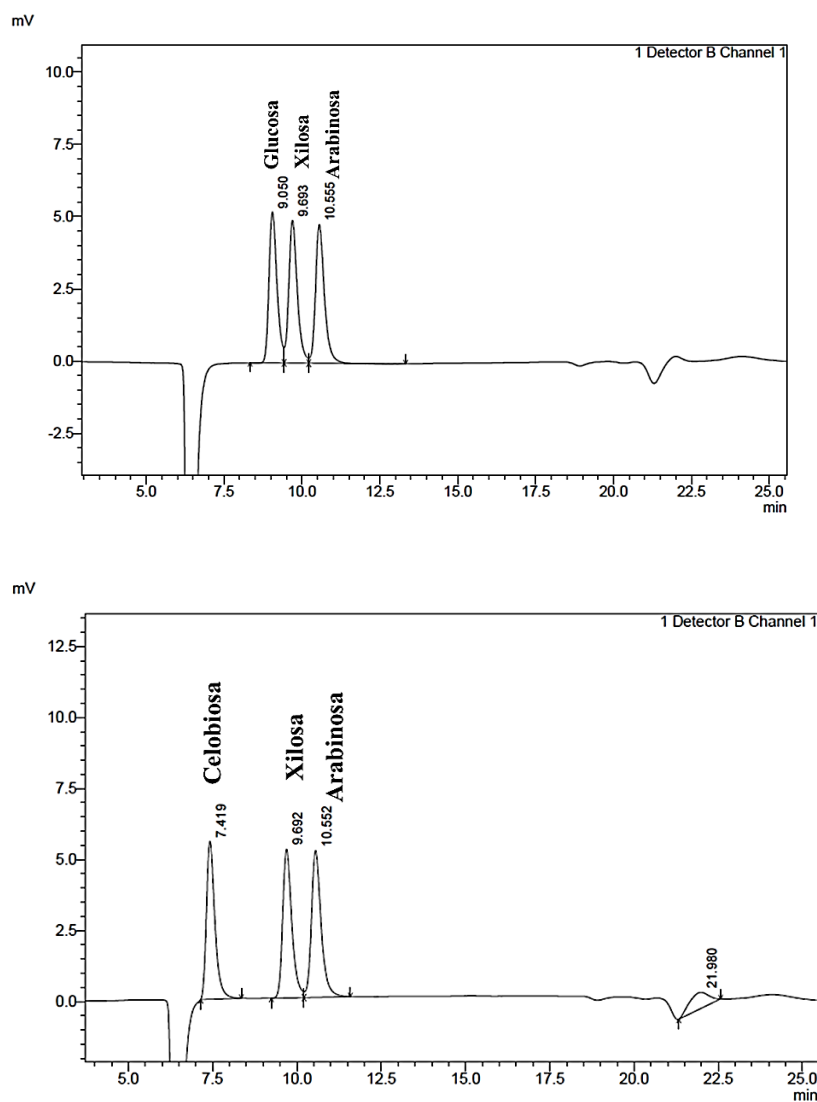


Figura 12. Cromatogramas de los patrones de glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosia.

3.4.3 Análisis de aminoácidos libres

Los aminoácidos libres en las FL se determinaron mediante el método de reacción de la ninhidrina, empleando el hidrato de tricetohidrindeno (Sigma-Aldrich). Este reacciona solo con aquellos aminoácidos que tengan un grupo amino libre, dando lugar a la formación de amoniaco y de anhídrido carbónico, por reducción del reactivo (ninhidrina) a hidrindantina. Esta última reacciona a su vez con el amoniaco y con otra molécula de ninhidrina, generando un compuesto de adición doble que presenta una coloración azul-púrpura, a excepción de la prolina, la cual muestra una coloración amarillenta debido a que el grupo amino en esta amina se encuentra sustituido. El derivado coloreado alcanza su máxima de absorción en torno a los 570 nm. Esta reacción tiene lugar en condiciones de calor y a un rango de pH comprendidos entre 4 y 8.

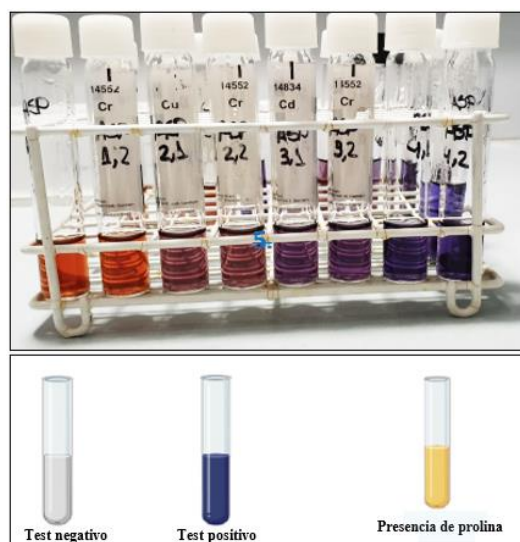
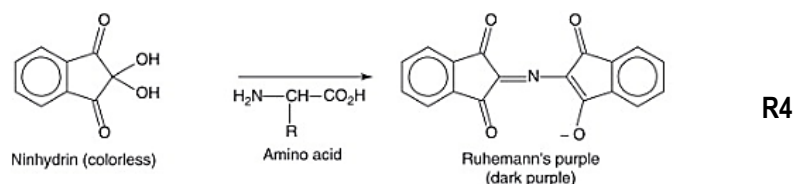


Figura 13. Análisis de aminoácidos libres mediante el método de ninhidrina.



Se procedió experimentalmente siguiendo el protocolo descrito por el fabricante Sigma-Aldrich: se tomaron 2 mL de cada muestra y se añadió 1 mL de ninhidrina bajo atmósfera inerte de nitrógeno. Dicha atmósfera, se estableció mediante la introducción de nitrógeno a través de un tubo dentro del reactivo mientras este se encontraba abierto. La mezcla contenida en el tubo se agitó, posteriormente, se incubó durante 10 minutos a 100°C y, por último, se enfrió a temperatura ambiente. Para concluir, se incorporaron 5 mL de etanol al 95% en cada tubo y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. La cuantificación se realizó mediante una recta de calibrado de ácido glutámico (aminoácido mayoritario en la biomasa RS) preparada diariamente (Friedman, 2004; Trigueros et al., 2021).

El porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados, el grado de hidrólisis (DH), se evaluó según lo propuesto por Adler-Nissen et al., (1983) descrito en detalle en Trigueros et al. (2021) de acuerdo con la Ec. 4.

$$DH (\%) = \frac{H}{H_{TOT}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 4}$$

donde “H” es el número de enlaces peptídicos equivalentes hidrolizados, expresado como m_{eq} glutámico/g proteína y H_{TOT} es la cantidad total de milimoles de aminoácidos individuales por gramo en la proteína no hidrolizada que puede evaluarse a partir del perfil de aminoácidos.

La determinación del perfil de aminoácidos de la biomasa inicial se llevó a cabo según los estándares analíticos internos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI-UVa) según el método de Moore & Stein (1948). La muestra se hidroliza con HCl 6 N. A continuación, se elimina el medio ácido utilizando una corriente de N₂ hasta sequedad. Las muestras se resuspenden nuevamente en HCl 0.1 N y la solución se filtra empleando filtros de nylon de 0.22 µm. Las muestras se someten a una derivatización pre-columna con ortoftalaldehído (OPA) y cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo (FMOC). La determinación se llevó a cabo utilizando un equipo de HPLC con detector UV empleando una columna Zorbax Eclipse AAA (4.6 x 150 mm, 3.5 µm). La fase móvil estaba constituida por un gradiente de NaH₂PO₄-H₂O a pH 7.8 y (ACN-MeOH-H₂O) en proporción 45:45:10.

3.4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El peso molecular, en kDa, de las proteínas recuperadas se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (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 (Bio-Rad, EE.UU.) y un gel Mini-PROTEAN 10-20% Tris-Glicina-SDS (Bio-Rad, EE.UU.). La separación de proteínas se llevó a cabo según las especificaciones del fabricante (BIORAD). Las muestras de las FL (20 µL) se mezclaron con 20 µL de una solución compuesta por Laemmli y 50 mM de reactivo de Cleland (DTT, ditiotretitol) y se calentaron a 100 °C durante 5 minutos.

Posteriormente, se cargaron 30 µL en los geles pre-fabricados de la unidad de electroforesis llenos de running buffer 1x Tris/Glicina/SDS (25 mM de Tris, 192 mM de glicina 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.

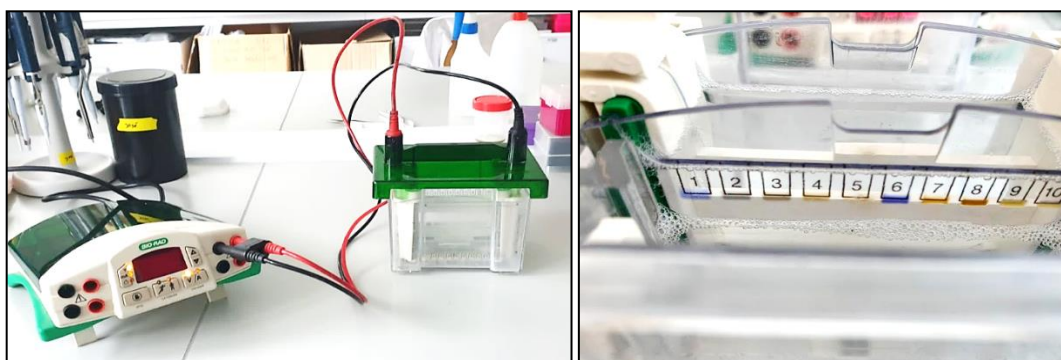


Figura 14. Sistema de electroforesis (SDS-PAGE) para la determinación del tamaño molecular de las proteínas recuperadas.

Tras la electroforesis 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% en peso de Coomassie Blue R-250, 40% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético) durante 1 h. Para finalizar, los geles se destiñen con una solución compuesta por metanol: ácido acético: agua en proporción 40:10:50 (v/v).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS

La Figura 15 muestra los rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos obtenidos tras los diferentes métodos de hidrólisis aplicados a la biomasa de fangos aerobios en referencia a la masa de proteínas y carbohidratos inicial (RS) calculados a partir de la Ec. 1.

Los resultados muestran una clara tendencia en cuanto a la solubilización de los dos principales componentes de la biomasa, las proteínas y los carbohidratos, durante la hidrólisis química: los mayores rendimientos de solubilización de proteínas se obtuvieron para aquellos métodos de base alcalina siendo el máximo rendimiento de proteínas del 92.6% para la combinación termo-alcalina (HT+ALK) a 121 °C con NaOH 1 M tras 60 min mientras que, en el caso de los carbohidratos, las condiciones más severas (HCl 1 M, 121°C, 60 min) dieron lugar a la máxima solubilización del 94.2%. Esta tendencia ya fue reportada anteriormente por Martín Juárez et al. (2021) comparando diferentes tratamientos de hidrólisis, incluida la ALK y AC empleando biomasa algal cultivada en aguas residuales. En dicho trabajo, la ALK a 120 °C durante 60 min proporcionó la mayor solubilización de proteínas (hasta un 90%) mientras que la AC logró la mayor solubilización de carbohidratos (hasta un 98%). Sin embargo, ellos emplearon una concentración de reactivo 2 M debido a que la biomasa algal presenta una resistente pared celular.

Los reactivos básicos pueden hidrolizar de enlaces éster y enlaces de hidrógeno entre los componentes polisacáridos y no polisacáridos de la pared celular microbiana, especialmente a bajas temperaturas (Nitsos et al., 2020; Rojo et al., 2023). A baja temperatura la base puede inducir un hinchamiento de la pared celular y una mejora de los rendimientos de extracción de proteínas (Phong et al., 2018). En este sentido, incluso la ALK, como tratamiento único a 50 °C, produjo una notable solubilización de proteínas. A baja concentración de álcali (0.5 M de NaOH) el tiempo de hidrólisis tuvo una importante influencia en la solubilización de las proteínas con incrementos del 31.6% al 53.5% cuando el tiempo de hidrólisis se vio incrementado de 60 a 180 min.

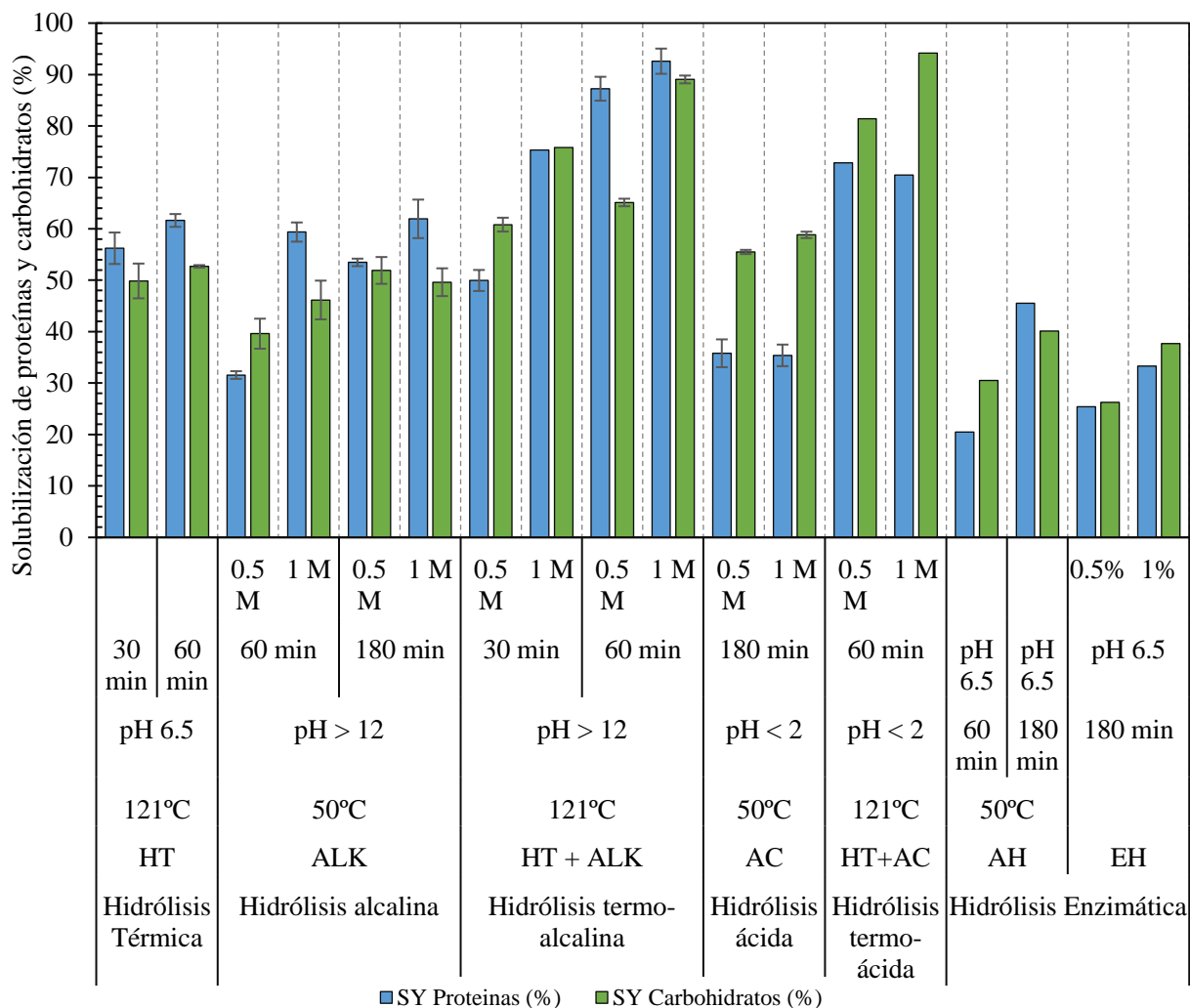


Figura 15. Rendimiento de solubilización (SY, %) de proteínas y carbohidratos en referencia a la masa de proteínas y carbohidratos presentes en la biomasa inicial (RS). Los datos se presentan como medias \pm desviaciones estándar de 4 determinaciones analíticas (ensayos de hidrólisis analizada en réplica). La desviación estándar de las medias se representa mediante líneas de intervalo verticales.

Por otro lado, a alta concentración de álcali (1 M), la influencia del tiempo de hidrólisis fue mucho más moderados con un incremento de apenas el 4% en la solubilización de las proteínas. Para la fracción de carbohidratos, el mayor rendimiento de solubilización (51.9%) se encontró para el ensayo con menor concentración de álcali. Hui et al. (2022) reportaron rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos de 60.72% y 40% a partir de fangos activados liofilizados después de hidrólisis alcalina a pH 13 y 70 °C, pero tras 9h de hidrólisis a partir de 20g/L. En la biomasa de fangos, las proteínas y los carbohidratos son los principales constituyentes del EPS y las condiciones alcalinas provocan disociación y repulsión entre los grupos ácidos cargados negativamente del EPS, aumentando la solubilidad de proteínas y carbohidratos (Liu & Fang, 2002).

Las altas temperaturas pueden aumentar la cantidad de sustrato accesible solubilizando biomoléculas más grandes, como las proteínas, tanto en fangos aerobios como anaerobios (Song et al., 2019). El ALK es particularmente eficaz cuando se combina con el método HT (Neyens et al., 2004). En este sentido, tanto la adición de álcali como la temperatura tuvieron una influencia notable en la solubilización de las proteínas y, en menor medida, en los carbohidratos. Esta misma tendencia ha sido reportada por otros autores a partir de biomasa algal (Martin Juárez et al., 2021; Rojo et al., 2023), fangos aerobios (Kim et al., 2003; Tan et al., 2012; Xu et al., 2014) y biomasa lignocelulósica (Bolado-Rodríguez et al., 2016). Por un lado, un incremento de la temperatura de 50 °C a 121 °C permitió solubilizar el mismo porcentaje ($\approx 75.3\%$ y $\approx 75.8\%$) de las proteínas y carbohidratos contenidos en la biomasa inicial reduciendo el tiempo de hidrólisis de 180 min a 30 min y, tras 60 min a 121 °C se llegó a solubilizar prácticamente la totalidad de las proteínas (92.6%) y una parte importante de los carbohidratos (89%).

Por otro lado, el calentamiento en ausencia de álcali (HT) condujo a una solubilización de proteínas y carbohidratos de solo el 61.6% y 52.7% (prácticamente idénticas a las obtenidas con ALK tras 180 min), tras 60 min a 121°C, rendimientos muy inferiores a los 87.2% y 92.6% de proteínas solubilizadas con HT+ALK tras 60 minutos a la misma temperatura, pero en medio alcalino (NaOH 0.5 y 1 M). Una tendencia similar se observó en la fracción de carbohidratos, sin adición de álcali, la solubilización de carbohidratos fue solo de un 52.7% tras 60 min de hidrólisis a 121°C, prácticamente un 1% y un 6% inferior al conseguido con ALK 0.5 y 1 M tras 180 min y 50 °C mientras que bajo condiciones combinadas (HT+ALK) la solubilización se vio incrementada hasta un 75% en 30 min de hidrólisis y hasta un 89% en 60 min. Durante el tratamiento HT+ALK, el pH de las muestras de fangos aumentaría y la superficie bacteriana se cargaría cada vez más negativamente. Como resultado, se pueden desorber más EPS de los flóculos de fango debido a la alta repulsión electrostática (Katsiris y Kouzeli-Katsiri, 1987). Además, a valores de pH extremadamente altos (> 11), puede producirse la lisis celular al no poder mantener una presión de turgencia adecuada (Kim et al., 2003; Tan et al., 2012). Mahdy et al. (2014) informaron de un rendimiento de solubilización de carbohidratos del 43.5% (NaOH 5%, 50 °C, 48h) y del 36% (KOH 2%, 120 °C, 120 min) para las microalgas *Scenedesmus* sp y *Tetraselmis suecica* crecidas en medio sintético. Rojo et al. (2023), compararon tratamientos alcalinos (NaOH 2M, 60 min) de biomasa algal crecida en agua residual, observando también un aumento de la solubilización de proteínas con la temperatura de 36.1% a 40 °C a 54.1% a 60°C y a 90% a 120 °C.

Los escasos resultados publicados hasta la fecha sobre la combinación de temperatura y tratamiento alcalino en biomasa de fangos aerobios se han obtenido en condiciones más suaves (Hui et al., 2022; Liu et al., 2008). Por ejemplo, Cho et al., (2013) informaron que las proteínas y los carbohidratos solubilizados después de la hidrólisis combinada termo-alcalina (NaOH 4N, 100 °C, 60 min) era 2.4 y 5.1 veces mayores que la de los fangos no tratados (1 g/L y 0.14 g/L de proteínas y carbohidratos) y 2.1 y 4.1 veces mayores que utilizando únicamente la hidrólisis alcalina (2.10 y 0.58 g/L) a pH 12 a 60 °C y 60 min. Liu et al., (2008) obtuvieron un 68% más de AGV con tratamiento HT+ALK (pH 12, 90 °C, 120 min) que con los lodos sin tratar tras 252 h de fermentación. La proteína soluble (61.6%) fue la principal fuente de producción de AGV. Desafortunadamente, este estudio no proporcionó datos sobre la fracción de carbohidratos.

En cuanto al tratamiento ácido, las condiciones combinadas de AC y HT (HCl a 121 °C y 60 min) proporcionaron altos rendimientos de solubilización de carbohidratos (94.2% HCl 1 M y 81.4% HCl 0.5 M), pero menores rendimientos de solubilización de proteínas (\approx 71.7%). Tendencia similar, pero con menores rendimientos de solubilización se encontró en los experimentos de AC individual (HCl, 180 min a 50 °C). La adición de HCl incrementó los rendimientos de solubilización de carbohidratos en un 35% (0.5 M) y 44% (1 M) mientras que para las proteínas los incrementos en los rendimientos de solubilización fueron más moderados (entre un 12% y un 15%) en comparación a la hidrólisis térmica (HT) sin adición de ácido a pH 6.5 y 60 min. En este sentido, las condiciones de hidrólisis ácida solubilizan preferentemente la fracción de carbohidratos en comparación con los experimentos en condiciones alcalinas. Esta tendencia también se observó en lodos anaerobios y aerobios (Assawamongkhol Siri et al., 2013; J. Gao et al., 2020) y consorcios de microalgas-bacterias procedentes de aguas residuales porcinas (Martín Juárez et al., 2021; Rojo et al., 2023) bajo condiciones ácidas y alcalinas. Martín Juárez et al. (2021) reportaron relaciones de rendimientos de solubilización proteína/carbohidrato de 0.77 y 1.52 después de 60 min de AC y ALK con HCl y NaOH a 121 °C. A este respecto, el tratamiento AC diluido suele ser más eficaz en la liberación de polisacáridos debido a una asociación más débil con los flóculos de lodo en comparación con las proteínas (Wilson & Novak, 2009) mientras que el tratamiento ALK puede inducir el hinchamiento de la pared celular microbiana con la consiguiente solubilización simultánea de proteínas y carbohidratos (Rojo et al., 2023).

Por otro lado, los métodos bioquímicos fueron menos eficaces que los químicos en la solubilización de los carbohidratos y las proteínas. Como puede observarse en la Figura 15, los rendimientos de solubilización de proteínas se encontraron entre un 25.4% y un 33.3%

mientras que las de carbohidratos fueron ligeramente superiores, aunque no significativamente diferentes (26.3% y 37%, respectivamente) cuando la EH se llevó a cabo con la enzima comercial Protamex en concentración creciente de 0.5% al 1% tras 180 min de incubación. Incluso incrementando el tiempo de incubación a 240 min y la dosis de enzima hasta un 4%, Gao et al. (2020) informaron de un rendimiento de solubilización del 35% de proteínas a partir de fangos aerobios espesados utilizando una proteasa alcalina (AOBOX, 6500 U/g) mientras que Rojo et al. (2023) alcanzaron un rendimiento del 19.8% y 38% de proteínas y carbohidratos de biomasa algal-bacterial tras 60 min a 50 °C con la enzima Protamex (1:100). Los bajos rendimientos de solubilización de proteínas a partir de biomasa algal mediante hidrólisis enzimática han sido reportados previamente. Martín Juárez et al. (2021) realizaron una EH con Celluclast 1.5 L y Novozyme 188 a biomasa algal-bacteriana (Scenedesmaceae) cultivada en purín de cerdo obteniendo una solubilización proteica de alrededor del 10%, mientras que Rojo et al. (2021) realizaron una EH con Protamex a una biomasa algal con alto contenido bacteriano, logrando un \approx 25% de solubilización de proteínas y carbohidratos tras 300 min de incubación mientras que en la biomasa algal pura (sin bacterias) la solubilización fue de hasta un 40% de proteínas y 20% de carbohidratos. Asimismo, Sedighi et al. (2019) obtuvieron bajos rendimientos de solubilización de proteínas (20%) tras tratar cultivos puros de *Spirulina platensis* en medio sintético con serin-proteasa. Rojo et al. (2023) estudiaron la posibilidad de utilizar una combinación enzimática de proteasa+celulasa mediante un coctel enzimático comercial de Protamex + Celluclast para obtener un rendimiento de solubilización de proteínas y carbohidratos del 32.8% y 38.4%, respectivamente, a partir de biomasa algal-bacteria. Probablemente, la adición de Celluclast en ese trabajo no incrementó la solubilización de carbohidratos puesto que la enzima proteasa ya proporcionaba una extracción de carbohidratos superior (38.9%) a la celulasa sola. La presencia de la enzima Celluclast también podría promover otro tipo de reacciones que habrían reducido la actividad de la celulasa para la hidrólisis y extracción de carbohidratos. Por otro lado, Gao et al. (2020) solo observa un ligero incremento del 35.8% al 43% en la solubilización de proteínas cuando la hidrólisis enzimática se realizó combinando dos proteasas comerciales (AOBOX), proteasa neutra (6500 U/g) y alcalina (12160 U/g), en una ratio 1:3 a 55 °C y 240 min a partir de fangos aerobios (0.64 g VSS/g TSS) procedentes de EDAR.

Estos resultados de hidrólisis con enzimas fueron bajos y resultan costosos, por lo que en este trabajo se propone usar la AH estableciendo condiciones que permitan a los microorganismos que forman parte de la biomasa liberar las enzimas hidrolíticas contenidas

en su propio sistema metabólico. En este sentido, la AH logró solubilizar hasta 45.5% de proteínas y 40.1% de carbohidratos tras 180 min de incubación a pH 6.5 y 50 °C. Incluso sólo con 60 min de incubación las solubilizaciones fueron un 5% inferior que la obtenida con la enzima Protamex a 50 °C y 180 min, resultando la AH, como un método biológico, sencillo y barato que podría utilizarse a expensas de las costosas enzimas comerciales. Sería necesario, sin embargo, investigar pretratamientos que consigan aumentar los rendimientos de solubilización. Chen et al. (2007) reportaron menores solubilizaciones de proteínas y carbohidratos (alrededor del 4%) por AH a pH 4, 21°C y 48 h de incubación a partir de lodos residuales activados generados en EDAR. Carvajal et al. (2013), trabajando con fangos aerobios con una alta concentración de sólidos (8% ST) a 55°C y en condiciones microaeróbicas, incrementaron la solubilización de la materia orgánica en un 40% mejorando la productividad de metano hasta un 23% debido, principalmente, a la mayor solubilización de proteínas (32%) y carbohidratos (14%). En este trabajo, la agitación fue un reto al principio del experimento, ya que se produjo un aumento concomitante de la viscosidad debido al alto contenido de sólidos.

4.2 RECUPERACIÓN DE PÉPTIDOS

Comparando la solubilidad de nitrógeno obtenida de la FS y su recuperación en la FL (todo ello determinado mediante el método del nitrógeno total Kjeldahl), se calcularon pérdidas inferiores al 10% con una recuperación casi completa de N tras el proceso en todos los experimentos a excepción del tratamiento AC donde las pérdidas de N fueron considerables (\approx 28%). La cantidad de N aportada por la enzima se consideró despreciable para estos cálculos, ya que la relación enzima/sustrato es muy baja. En la Figura 16, se muestran los resultados de los rendimientos de recuperación de proteínas con referencia a la cantidad inicial de proteínas en la biomasa inicial (RS). La diferencia entre las proteínas solubilizadas (SY) y los aminoácidos recuperados (RY) proporcionó información sobre las pérdidas de proteínas causadas por la severidad de la hidrólisis o por el metabolismo activo de las bacterias presente en la biomasa (Liu et al., 2008; Martín Juárez et al., 2021). En este contexto, Liu et al. (2012) describen que el valor de pH tuvo un impacto significativo en la producción de AGV y sobre la biodiversidad y la comunidad bacteriana en reactores con fangos secundarios como sustrato a 35.5°C y 12h de incubación. Cuando el pH se redujo de 12.0 a 7.0 y finalmente a 3.0, los géneros bacterianos dominantes y el porcentaje del total de microorganismos cambiaron de *Granulicatella* sp (65%), a *Clostridium* sp (28%) y *Bacillus* sp (71%), respectivamente, los cuales juegan un papel importante en la degradación de polipéptidos y aminoácidos vía fermentación.

Las pérdidas de proteínas dependieron claramente del tipo de hidrólisis realizada. Los experimentos ALK, que dieron lugar a la mayor solubilización de proteínas (75.3% y 92.6%) bajo las condiciones más severas (HT+ALK, NaOH 1 M) dieron lugar a pérdidas del 11% de las proteínas. 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. Esta misma tendencia se observó para el ensayo ALK a 180 min, donde no se encontró una influencia de la dosis de álcali sobre las pérdidas ($\approx 10\%$) dando lugar a una recuperación del 55.7% para aquel experimento (NaOH 1M) que presentó mayor solubilización. Aunque un alto porcentaje de la proteína solubilizada se degradó (11%) en la hidrólisis bajo condiciones más suaves (ALK, NaOH 0.5 M, 60 min) la baja recuperación de péptidos en este tipo de tratamiento se debe a la baja solubilización de las proteínas (Fuentes et al., 2016).

Estos resultados fueron diferentes a los esperados, ya que a medida que disminuía la severidad de la hidrólisis se esperaba que la degradación también disminuyera incrementando la recuperación, pero en realidad esto no ocurrió. De hecho, el tratamiento HT sin adición de álcali proporcionó pérdidas inferiores al 5% alcanzando la máxima recuperación (58.3%) tras 60 min. Es posible que, incluso a altas concentraciones de álcali los microorganismos patógenos presentes en la biomasa puedan consumir los productos solubilizados. La reducción de las pérdidas obtenida combinando el tratamiento ALK con el HT puede deberse a su efecto esterilizante en la biomasa de acuerdo con lo descrito por Martín Juárez et al. (2021). Rojo et al. (2023), informaron de una recuperación de péptidos a partir de biomasa algal generadas en corrientes residuales de purines con un alto contenido bacteriano con hidrólisis alcalina a 120°C y 2 M de NaOH a 60 min del 81%. Este rendimiento fue mucho mayor que a otras temperaturas (46.1% para 60°C y 26.8% para 40°C).

En los tratamientos ácidos se observaron altas pérdidas de proteínas, que se vieron incrementadas con la severidad del tratamiento desde un 17% para el tratamiento AC suave a 50°C y 180 min hasta un 28.5% para el tratamiento AC más severo a 121°C y 60 min (HT+AC). En ambos casos, al igual que en los rendimientos de solubilización, no se encontraron diferencias en la recuperación de proteínas con la concentración de ácido utilizada dando lugar a rendimientos de recuperación promedios del 18% para AC y 43.9% para HT+AC. Rojo et al. (2023) también informaron de altas pérdidas ($\approx 14\%$) de proteínas tras una hidrólisis termo-ácida a 121°C, 60 min, 2 M HCl con un alto porcentaje de proteínas degradadas también a bajas temperaturas (71% y 66% a 40°C y 60°C respectivamente). Estas pérdidas llevaron a recuperaciones de péptidos muy bajas a 40°C y 60°C (alrededor del 6%),

mientras que a 120°C se alcanzó una alta recuperación del 61.5%. De acuerdo con varios autores, muchas proteínas son degradadas a formas más simples como el ion amonio bajo condiciones ácidas. Por otro lado, las pérdidas por degradación obtenidas se pueden deber, posiblemente, a la desnaturalización de las proteínas liberadas por la combinación de altas temperaturas y bajos pH, además, la presencia de altas concentraciones de glucosa (un azúcar reductor) pueden originar degradación a través de la reacción de Millard (Neyens et al., 2004). Estas elevadas pérdidas del tratamiento ácido concuerdan con las pérdidas previamente indicadas en el balance de materia al nitrógeno total.

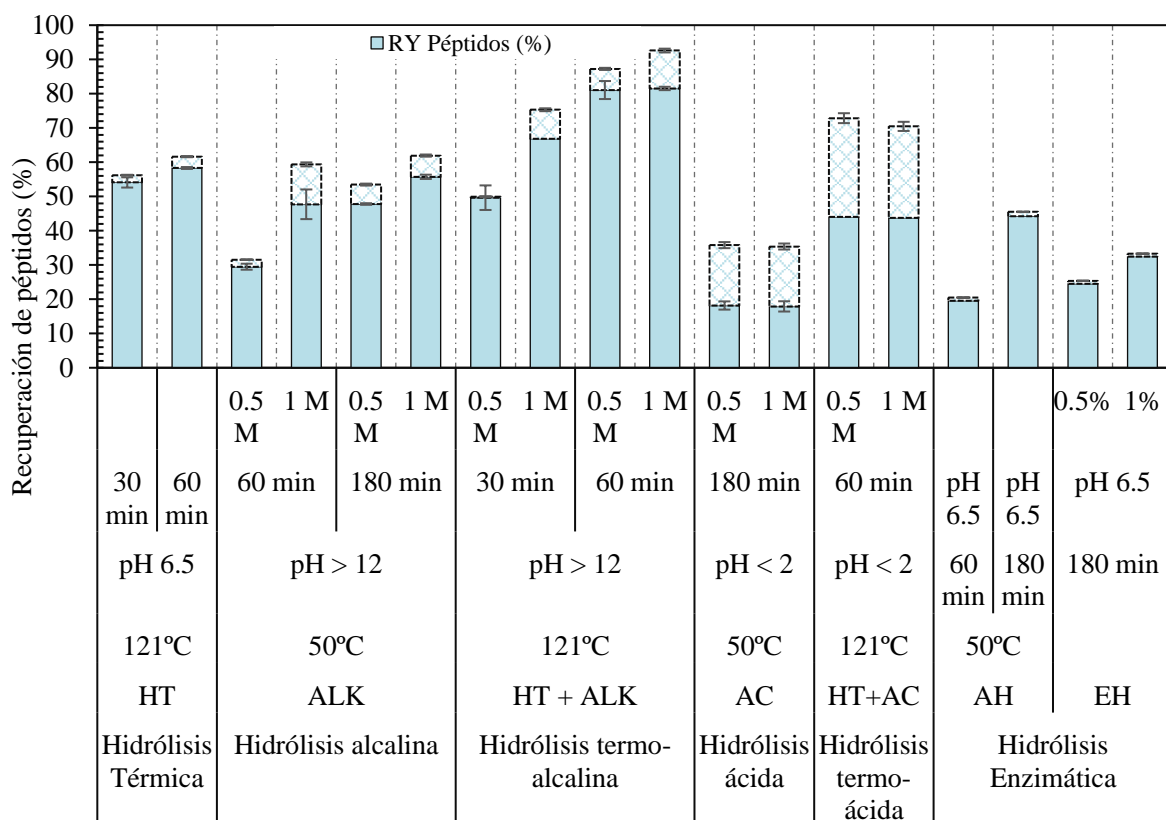


Figura 16. Rendimiento de recuperación de péptidos (%) en referencia al contenido de proteínas en la biomasa inicial (RS). Las barras discontinuas muestran los rendimientos de solubilización (%) de proteínas en referencia al contenido de proteína inicial. Las barras discontinuas presentan en el rendimiento de solubilización (SY, %) de proteínas respecto al contenido inicial. Los datos se proporcionan como medias \pm desviaciones estándar de 4 determinaciones analíticas (ensayos de hidrólisis analizado en réplica). La desviación estándar de las medias se representa mediante líneas de intervalo verticales.

Para los experimentos en condiciones biológicas, AH y EH, las pérdidas se encontraron por debajo del 2%. El incremento de la concentración de enzima de 0.5% a 1% permitió incrementar las recuperaciones de un 24.5% a un 32.4% manteniendo las pérdidas en el mismo nivel. Por otro lado, la AH logró recuperar hasta un 44.5% de las proteínas debido a la combinación de una mayor solubilización y menores pérdidas. Rojo et al. (2023) también encontraron bajas pérdidas en la hidrólisis con Protamex (1%, 180 min, 50°C) del 0.2% con una recuperación de hasta un 20% de proteínas a partir de biomasa algal generada en *Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y Control de Calidad Químicos* 44

fotobiorreactores que trataban aguas residuales agrícolas. En este punto ha de tenerse en cuenta que el cálculo de pérdidas está basado en el contenido de proteínas de la biomasa inicial, lógicamente, las pérdidas resultan menores para tratamientos con bajos rendimientos de solubilización de proteínas.

4.3 ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS Y TAMAÑO DE PÉPTIDOS RECUPERADOS

La determinación de aminoácidos libres se llevó a cabo en la FL a través del análisis de ninhidrina, obteniendo un resultado positivo en todos los tipos de hidrólisis. La Figura 17 muestra la relación de aminoácidos libres (Aa libres) respecto al contenido de proteínas totales recuperadas en la FL. En líneas, además, se muestra el grado de hidrólisis (DH) respecto a la proteína sin hidrolizar. Por otro lado, el tamaño, en kDa, de los péptidos recuperados se encuentran en la Figura 18. Según el DH, los hidrolizados de proteínas pueden dividirse en varias mezclas de aminoácidos y péptidos de diversos tamaños (Vorob'ev, 2013). Existen dos aplicaciones principales para estos tipos de hidrolizados. Una aplicación es la producción de agentes espumantes y emulsionantes que requieren un mayor contenido de polipéptidos (Enser et al., 1990). La otra aplicación es la producción de piensos o fertilizantes líquidos de rápida liberación, que requieren un mayor contenido de aminoácidos (Hwang et al., 2008). Trabajos previos coinciden con los obtenidos en este estudio, al concluir que el tratamiento con HT+ALK produce fertilizantes de mayor calidad a partir de fangos aerobios que el hidrotérmico individual (Tang et al., 2022).

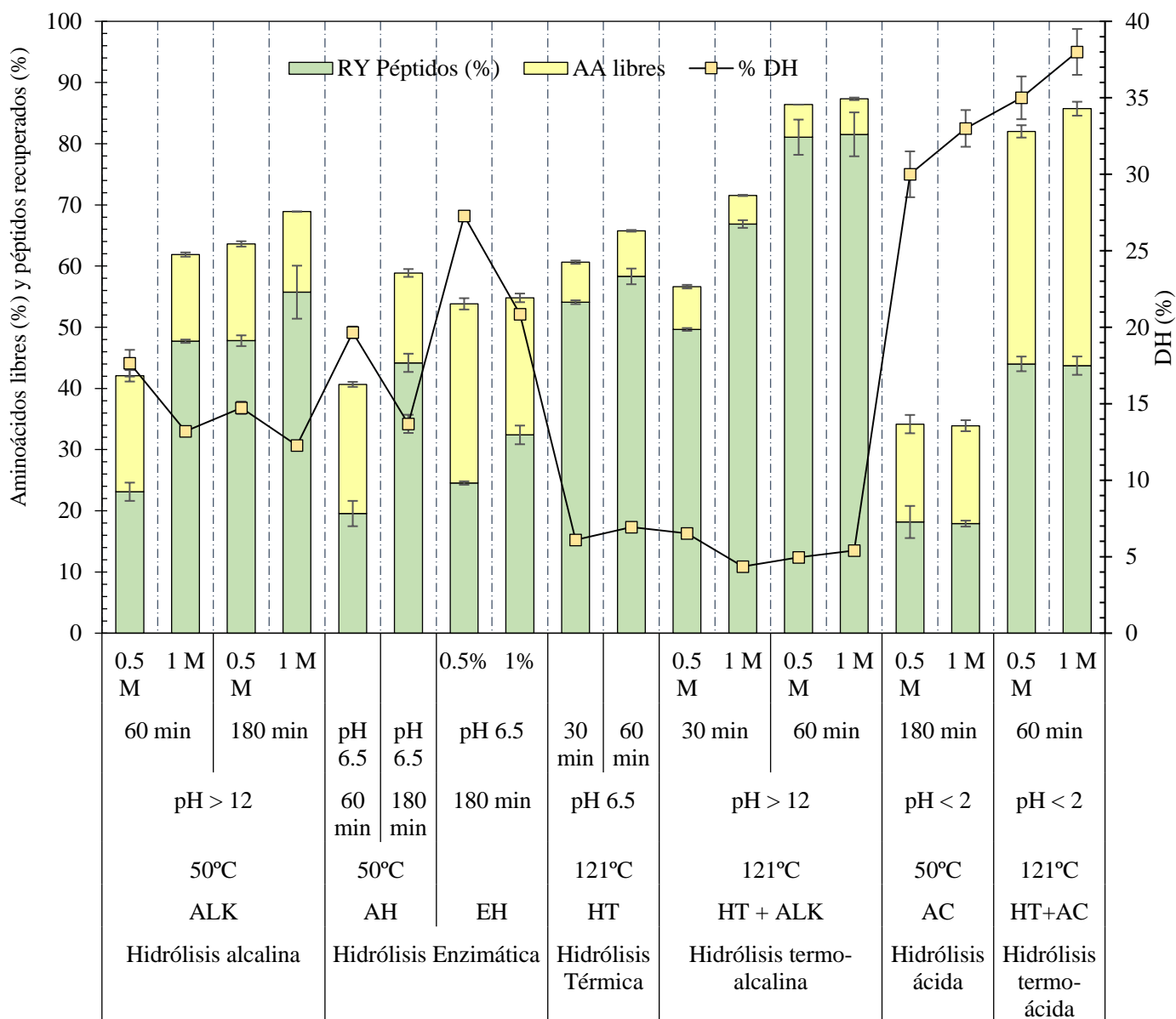


Figura 17. Grado de hidrólisis (DH, %) y contenido de aminoácidos libres en los péptidos recuperados (RY, %) tras los diferentes tratamientos de hidrólisis aplicado a la biomasa. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de 4 determinaciones analíticas (etapa de hidrólisis analizada en réplica). Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.

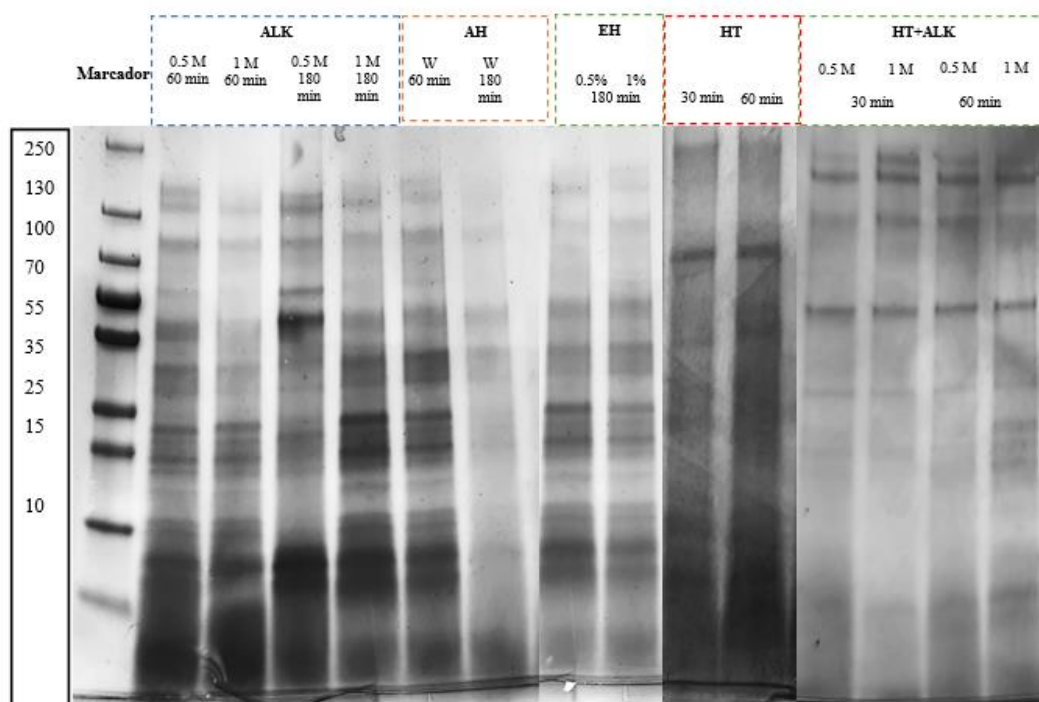


Figura 18. Tamaño de péptidos, en kDa, en las fracciones recuperadas tras los diferentes tratamientos de hidrólisis aplicado a la biomasa

Los resultados mostraron notable diferencia en el tamaño de los péptidos recuperados entre experimentos. Por un lado, la AH, en cualquiera de sus combinaciones, no dio lugar a bandas de péptidos en el gel de electroforesis por lo que las proteínas recuperadas estuvieron principalmente en forma de péptidos de muy pequeño tamaño o bien en forma de aminoácidos libres.

Para el resto de los experimentos, tanto en medio básico como en los hidrolizados enzimáticos se obtuvieron diferentes bandas de proteínas. Bajo hidrólisis alcalina en las condiciones más severas (HT+ALK) que proporcionaron los mayores rendimientos de recuperación ($\approx 81.5\%$), se observó que prácticamente tanto el tiempo como la alcalinidad de la hidrólisis no influyeron en el tamaño de los péptidos recuperados con DH situados aproximadamente en el 20%. Se observaron, generalmente, tamaños de proteínas entre los 130-250 kDa, y entre 25-55 kDa, el contenido en aminoácidos libres varió entre el 20% y 17% tras 30 y 60 min de hidrólisis a concentraciones creciente entre 0.5 M y 1 M. Mientras que, en la hidrólisis alcalina, bajo las condiciones más suave (ALK), se observó que el tiempo de hidrólisis de 60 a 180 min si dio lugar a un incremento en el DH de 18% al 30%, dando lugar a un mayor fraccionamiento de los péptidos. De hecho, las bandas de proteínas entre 55 y 130 kDa no se observaron en las condiciones de 1 M y 180 min. Por otro lado, parece que el medio alcalino ayuda a recuperar las proteínas con alto peso molecular, a diferencia del

tratamiento HT a 121°C sin adición de álcali donde solo se observaron 2 bandas de 100 kDa a 30 y 60 min.

En cuanto a los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis (bio)- química, a pesar de que el DH se mantuvo por debajo del 10%, no se observaron prácticamente bandas identificables para el tratamiento AH a 180 min. Por otro lado, los hidrolizados de EH con la proteasa, mostraron 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 15kDa y 70kDa. 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 Martín Juárez et al. (2021), bacterias viables presentes en este tipo de biomasa bacteriana hidrolizaron las proteínas solubilizadas a fin de mantener la estabilidad de la colonia. Rojo et al. (2023) tras una hidrólisis enzimática con Protamex (1%, 50°C, 180 min) de biomasa algal-bacterial, obtuvieron péptidos con tamaños moleculares de alrededor de 11 kDa, 63 kDa, 75 kDa y 135 kDa.

En comparación con la HT+AC, la HT+ALK fue más ventajosa para controlar la hidrólisis de proteínas. Para obtener aminoácidos, la combinación HT+AC fue claramente más ventajosa. Por lo tanto, podría emplearse tratamiento termo-ácido si la proteína recuperada se aplica a la producción de piensos Hwang et al. (2008) o fertilizantes líquidos, pero debe emplearse HT+AC, cuando se requieran propiedades surfactantes de la proteína extraída.

Finalmente, la Figura 19 muestra el perfil de aminoácidos de algunas FL seleccionadas de acuerdo con sus rendimientos de recuperación, así como el perfil de aminoácidos de la biomasa inicial (RS). Los porcentajes de aminoácidos liberados en las FL se refieren a la masa total de aminoácidos. Además, en línea discontinua y continua, se muestran los porcentajes de aminoácidos esenciales (Eaa) y no esenciales (NEaa), respectivamente.

La biomasa inicial (RS) 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 16%. La relación entre los aminoácidos esenciales y los no esenciales (Eaa/NEaa) en la biomasa bruta fue de un 74.7%. Los Eaa predominantes en los RS 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). Sin embargo, eran similares a las de otras biomásas residuales. Por ejemplo, Rojo et al. (2021) informaron de que los principales aminoácidos de un consorcio de microalgas/bacterias basado en *S. almeriensis* cultivado en aguas residuales porcinas eran también ácido glutámico (13.9%), ácido aspártico (10.5%), alanina (9.7%) y leucina (8.9%) con una relación Eaa/Neaa \approx 40%. Chen et al. (2019) informaron de resultados similares para lodos deshidratados con 13.8% de ácido glutámico, 8.8% de ácido aspártico, 8.2% de alanina y 9.5% de leucina, pero una relación Eaa/Neaa de 80%.

Dependiendo de las condiciones de tratamiento aplicadas a la biomasa, los perfiles de aminoácidos en los hidrolizados cambiaron. Todos los aminoácidos, excepto el triptófano, se encontraron en la FL tras la hidrólisis. El tratamiento con mayor recuperación de péptidos, HT+ALK 1 M, dio una relación Eaa/Neaa de 86.5%, siendo los aminoácidos más abundantes el ácido aspártico y glutámico (\approx 11%), la alanina (10.1%) y los aminoácidos esenciales leucina (8.8%), lisina (6.6%) y valina (5.9%). Cuando HT+ALK se llevó a cabo con 0.5M de NaOH el ratio de Eaa/Neaa solo disminuyó hasta un 81.9%, principalmente relacionado con una mayor presencia de ácido aspártico y glutámico (\approx 12%).

Por otra parte, a bajas temperaturas (ALK), se recuperaron principalmente los Neaa en un 59% y 56% para las dos concentraciones (0.5 M y 1 M), respectivamente, tras 180 min de hidrólisis. Nuevamente, la alta concentración de álcali incrementó las ratios de Eaa/Neaa de 68.9% al 77% siendo los aminoácidos preferentes el ácido glutámico y ácido aspártico (\approx 16%), alanina (\approx 14.1%) para la hidrólisis con NaOH 0.5 M, mientras que con 1 M se encontraron preferentemente los aminoácidos esenciales leucina (9.6%) y arginina (6%). La HT combinada con ALK no solo permite recuperar altos porcentajes de proteínas, sino que, además, las proteínas recuperadas contienen cantidades sustanciales de los Eaa, incluso, sin adición de álcali (HT) el ratio Eaa/Neaa solo fue de un 72%, que podrían jugar un papel importante en aplicaciones como bio-estimulantes o bio-fertilizantes para plantas en agricultura (Izydorczyk et al., 2021; Rojo, et al., 2023) o, incluso, como aditivo en pienso de animales (Ahn et al., 2009; Hwang et al., 2008). Finalmente, para las hidrólisis biológicas, se encontraron altos contenidos de Neaa, 68% para la AH y 64.1% para la EH.

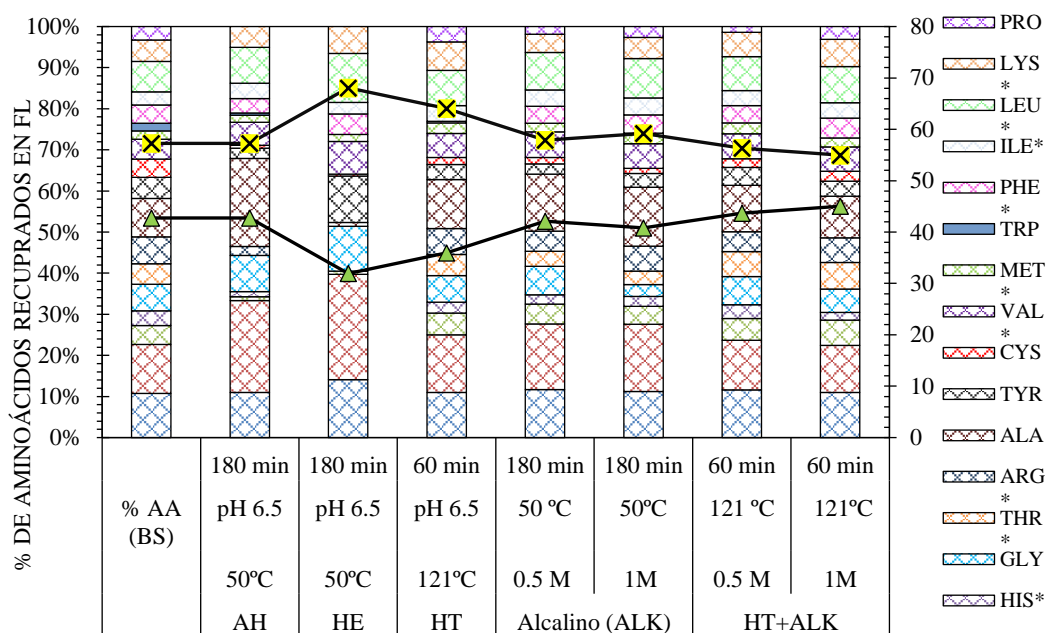


Figura 19. Perfil de aminoácidos de algunas fracciones líquidas.

4.4 RECUPERACIÓN DE MONOSACÁRIDOS

La figura 20 muestra el rendimiento de recuperación de monosacáridos obtenidos tras los diferentes métodos de hidrólisis aplicado a la biomasa. Además, las barras discontinuas muestran el rendimiento de solubilización de carbohidratos que da idea de las pérdidas de carbohidratos generados durante los diferentes métodos de hidrólisis.

Se observa que la mayor recuperación de carbohidratos se corresponde a su vez con la técnica en la que hubo mayor solubilización de estos. Esta técnica es la HT + AC con HCl 1 M, dando unos valores muy elevados de 88.2 de recuperación y de $94.2 \pm$ de solubilización. Con la HT + AC pero con HCl 0.5 M también se obtuvieron valores altos, tanto de recuperación como de solubilización de carbohidratos, siendo de 78.5 y 81.4, respectivamente. Estos resultados coinciden con los de Martín-Juárez et al. (2019) con biomasa algal, que demostraron que los tratamientos ácidos proporcionan una elevada recuperación de carbohidratos en forma de monosacáridos, especialmente a temperaturas elevadas (HT+AC). El efecto positivo de combinar tratamientos químicos y térmicos también había sido previamente demostrado con biomasa algal (Martín-Juárez et al. (2021), Martín-Juárez et al. (2019) y Rojo et al. (2023)). Este efecto puede deberse a que las altas temperaturas pueden aumentar la cantidad de sustrato accesible, lo cual favorece la solubilización de la materia orgánica. En contraposición a lo que ocurría con las proteínas, el medio ácido bajo condiciones más severas favoreció significativamente la recuperación de carbohidratos, mientras que las condiciones alcalinas bajo suaves condiciones fueron más favorables. Bajo condiciones de hidrólisis alcalina, se observó un mayor rendimiento de recuperación de

Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y Control de Calidad Químicos 50

carbohidratos para el método HT+ALK 0.5 M a 30 min, con un rendimiento máximo del 50.6%. Los elevados factores de pérdidas de carbohidratos, entre un 44% y 53% en los métodos de HT+ALK a mayor concentración de NaOH (1M) pusieron en peligro los altos rendimientos de solubilización que presentaron estos métodos. Martín Juárez et al., (2021) también obtuvieron altos factores de pérdidas (en torno al 70%) para el tratamiento ALK (NaOH, 121°C, 2M) y la combinación alcalino-peróxido a partir de biomasa algal. Rojo et al. (2023), trabajando con consorcios de microalgas-bacterias cultivadas en aguas residuales porcinas, reportaron importantes pérdidas de glucosa (83.3% y 61%) tras hidrólisis ALK y HT+ALK (NaOH, 2 M, 120 y 60°C). 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).

Por otra parte, las recuperaciones de carbohidratos más bajas, con valores inferiores al 15%, se obtuvieron para las hidrólisis biológicas, tanto las AH como las EH, y para la HT a 30 minutos, esto puede deberse a que la enzima que se utiliza es Protamex y, por tanto, no resulta adecuada para extraer carbohidratos. También cabe destacar, que todos los valores de recuperación de carbohidratos son inferiores a los valores de solubilización de estos.

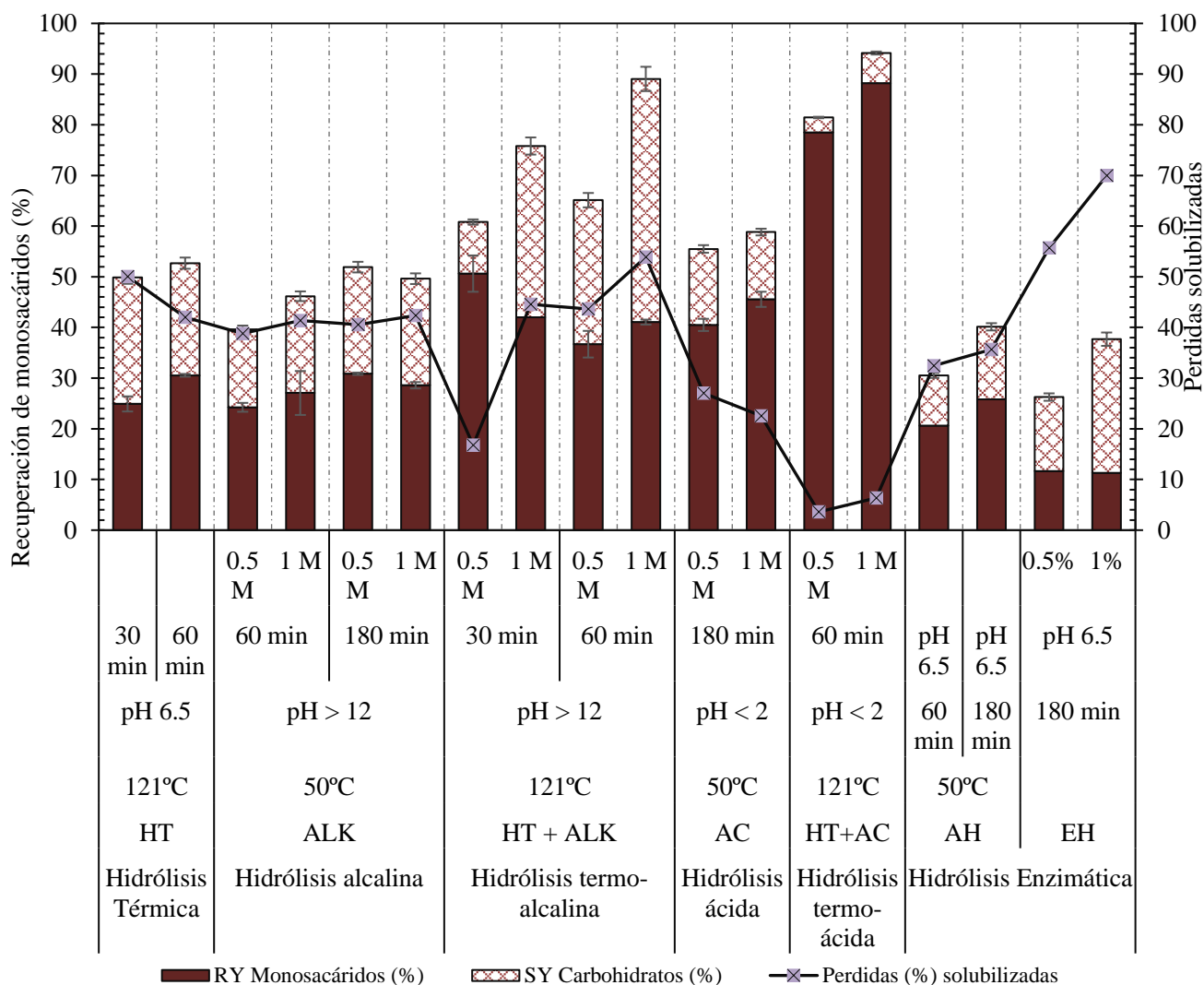


Figura 20. Rendimientos de recuperación (RY %) y solubilización (SY %) de carbohidratos en referencia a la masa de carbohidratos totales en la biomasa inicial. La diferencia entre SY y RY proporciona las pérdidas de carbohidratos debido a la etapa de hidrólisis. Los resultados se expresan como la media \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.

Se obtuvieron rendimientos de recuperación de monosacáridos especialmente bajos a partir de HT (27.7%), ALK (25.7%), EH (11.5 %) y AH (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 EH (81.7%) con una recuperación de monosacáridos tan baja como el 1%. Además, se reportaron cantidades importantes de subproductos como ácido acético, ácido fórmico, metanol, ácido succínico, y ácido butírico en los hidrolizados formadas

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.

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) útiles para producir compuestos valiosos por fermentación bacteriana. Estudios del grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo han demostrado recientemente la utilidad de los hidrolizados de microalgas-bacterias como sustrato para el crecimiento de *Paraccocus denitrificans*. Esta bacteria, en medios con déficit de nitrógeno, acumula polihidroxicanoatos, compuestos base 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 pueden dar una idea de algunos compuestos de degradación que no estaban presentes inicialmente en la biomasa RS (Figura 21 A).

Algunos de los componentes de degradación que se detectora son el ácido láctico (13.4 min), ácido fórmico (14.7 min), ácido acético (15.9), ácido butírico (23 min), ácido levulínico (18.6 min) y metanol (19.4 min).

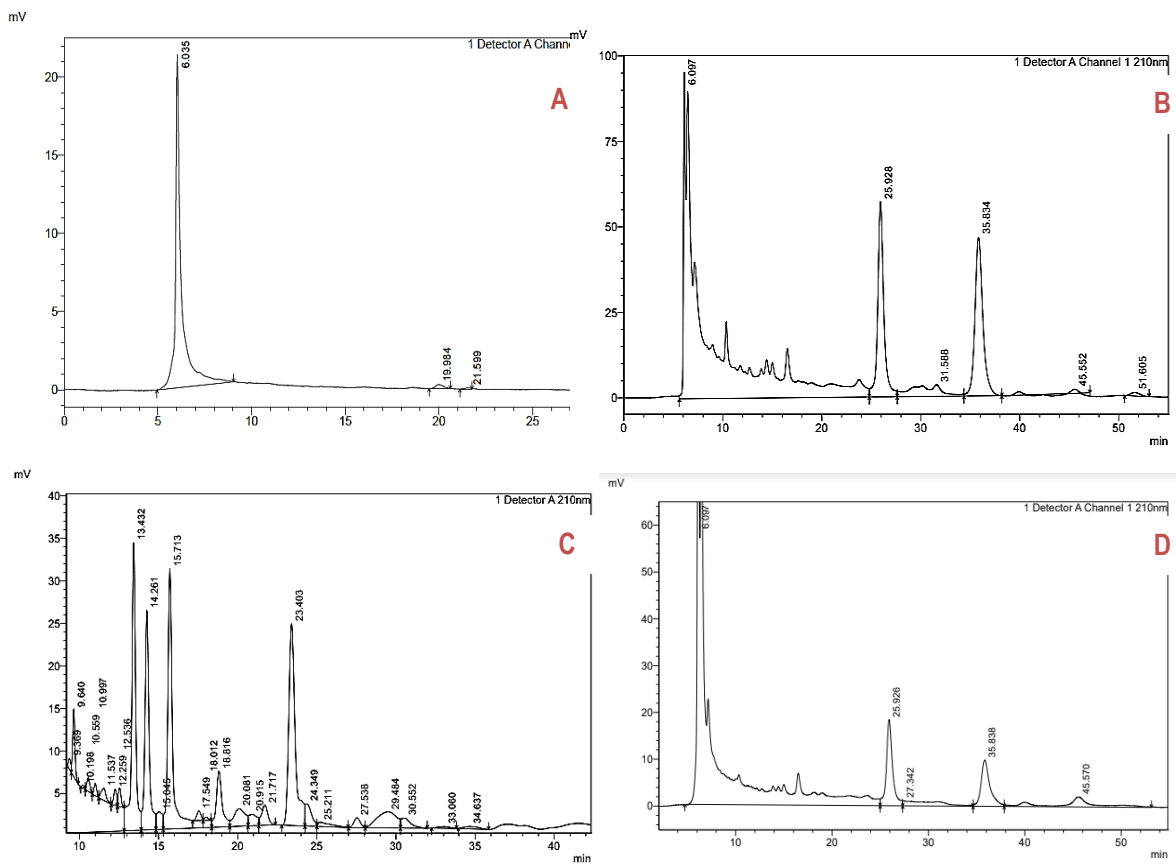


Figura 21. Compuesto de degradación detectados: A) Biomasa inicial, B) EH; C) AH, D) HT+ALK.

5 CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que mientras el máximo rendimiento de proteínas (92.6%) se obtuvo para el tratamiento HT+ALK (NaOH 1M, 121°C, 60 min), la máxima solubilización de carbohidratos (94.2%) se consiguió con el tratamiento AC (HCl 1M 121°C, 60 min). Por otro lado, tanto para el rendimiento de proteínas como para la solubilización de carbohidratos, se concluye que el proceso combinado HT+ALK da mejores resultados que utilizando las técnicas simples ALK o HT. Dentro de los métodos bioquímicos los resultados para el rendimiento de proteínas y la solubilización de carbohidratos fueron muy bajos, aunque el AH fue ligeramente mejor que el EH.

En la solubilidad de nitrógeno mediante NKT se percibieron pérdidas bajas, inferiores al 10%, excepto para la AC (28%).

Las pérdidas por degradación de proteínas dependen del tipo de hidrólisis realizado. Para el HT+ALK se obtuvieron pérdidas del 11%. Además, se demostró que la concentración de álcali no influye en las pérdidas ni en el tratamiento combinado ni en el ALK simple. Asimismo, las pérdidas de proteínas en la HT+AC y la AC tampoco dependen de la concentración de ácido utilizado durante la hidrólisis. Siendo las pérdidas de proteínas mayores en la HT+AC (121°C, 60 min) que en la AC (50°C, 180 min). Mientras que para las hidrólisis biológicas las pérdidas de proteínas fueron prácticamente despreciables (2%). Cabe destacar, que en la EH se observa un aumento en la recuperación de proteínas al aumentar el porcentaje de enzimas, manteniéndose el nivel de pérdidas. En comparación, la recuperación de proteínas es mayor en la AH que en la EH.

Se detectaron aminoácidos libres en las FL a través del análisis de ninhidrina en todos los tipos de hidrólisis utilizados.

Con respecto al tamaño de los péptidos, se observó que la AC no presentó ninguna banda en el gel de electroforesis, es decir, que con esta técnica se obtuvieron proteínas con un peso molecular < 10 kDa o aminoácidos libres. En la HT+ALK se comprobó que la concentración de álcali y el tiempo de hidrólisis no influyen en el tamaño de los péptidos recuperados, los cuales son de tamaño medio y alto (DH 20%). Mientras que, para la ALK, el DH si aumenta con respecto al tiempo de hidrólisis, aumentando así el fraccionamiento de los péptidos. Dentro de las hidrólisis biológicas, la AH no muestra bandas de interés, mientras que la EH, aunque presenta bandas difusas, también presenta bandas interesantes con un tamaño de 15 a 70 kDa y <10 kDa. Cabe destacar que, la HT+ALK es mejor que la HT+AC para controlar la hidrólisis de proteínas en la fase de polipéptidos, por lo que se puede utilizar para generar agentes

espumantes. Sin embargo, la HT+AC es mejor que la HT+ALK para la obtención de aminoácidos libres, por lo que se puede utilizar para producir piensos o fertilizantes líquidos.

Por otro lado, los perfiles de aminoácidos también cambiaron según el hidrolizado empleado. Además, todos los aminoácidos se encontraron en la FL, excepto el triptófano. Tanto para la HT+ALK como para la ALK se observó un aumento en la relación Eaa/Neaa al aumentar la concentración de NaOH. Además, para la HT+ALK se observó un aumento en la recuperación de péptidos con cantidades sustanciales de Eaa.

Para las hidrólisis biológicas, se observó un alto contenido de Neaa y una baja recuperación de carbohidratos (<15%).

Por último, la mayor recuperación de carbohidratos coincidió con la mayor solubilización de los mismos, obtenidos para el método HT+AC.

Con todo ello, se puede concluir que los distintos métodos de hidrólisis contemplados en este trabajo, unos son buenos para la obtención de péptidos y otros son mejores para la recuperación de carbohidratos y aminoácidos libres, y dependiendo del uso que se le quiera dar a la biomasa tratada, será mejor utilizar una técnica u otra.

6 BIBLIOGRAFÍA

Adler-Nissen, J., Eriksen, S., & Olsen, H. S. (1983). Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 32(3–4), 411–423. <https://doi.org/10.1007/BF01091198/METRICS>

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>

Appels, L., Houtmeyers, S., Van Mechelen, F., Degrève, 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>

Assawamongkholisiri, 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>

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>

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>

Bi, W., Li, Y., & Hu, Y. (2014). Recovery of phosphorus and nitrogen from alkaline hydrolysis supernatant of excess sludge by magnesium ammonium phosphate. *Bioresource Technology*, 166, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.04.092>

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>

Brown, M. J., & Lester, J. N. (1980). Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(2), 179–185. <https://doi.org/10.1128/AEM.40.2.179-185.1980>

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>

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>

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>

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)

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)

Cho, H. U., Park, S. K., Ha, J. H., & Park, J. M. (2013). An innovative sewage sludge reduction by using a combined mesophilic anaerobic and thermophilic aerobic process with thermal-alkaline treatment and sludge recirculation. *Journal of Environmental Management*, 129, 274–282. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2013.07.009>

Czechowski, F., & Marcinkowski, T. (2006). Sewage sludge stabilisation with calcium hydroxide: Effect on physicochemical properties and molecular composition. *Water Research*, 40(9), 1895–1905. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2006.02.023>

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. *Bioresour Technol*, 102(5), 4076–4082. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.12.043>

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>

Ferrentino, R., Langone, M., Fiori, L., & Andreottola, G. (2023). Full-Scale Sewage Sludge Reduction Technologies: A Review with a Focus on Energy Consumption. In *Water (Switzerland)* (Vol. 15, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/w15040615>

Friedman, M. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385–406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>

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>

Gao, J., Wang, Q., Yan, Y., Li, Z., & Weng, W. (2021). Protein extraction from excess sludge by thermal-acid pretreatment. *Desalination and Water Treatment*, 209, 48–57. <https://doi.org/10.5004/dwt.2021.26486>

Gao, J., Weng, W., Yan, Y., Wang, Y., & Wang, Q. (2020). Comparison of protein extraction methods from excess activated sludge. *Chemosphere*, 249, 126107. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126107>

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>

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>

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>

Houillon, G., & Jolliet, O. (2005). Life cycle assessment of processes for the treatment of wastewater urban sludge: energy and global warming analysis. *Journal of Cleaner Production*, 13(3), 287–299. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2004.02.022>

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>

Hussain, F., Shah, S. Z., Ahmad, H., Abubshait, S. A., Abubshait, H. A., Laref, A., Manikandan, A., Kusuma, H. S., & Iqbal, M. (2021). Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A

review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137(November 2020), 110603. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110603>

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>

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>

Kassim, M. A., & Bhattacharya, S. (2016). Dilute alkaline pretreatment for reducing sugar production from *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. biomass. *Process Biochemistry*, 51(11), 1757–1766. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.027>

Kelessidis, A., & Stasinakis, A. S. (2012). Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Management*, 32(6), 1186–1195. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2012.01.012>

Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., & Bhowmick, T. K. (2018). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 110, 60–84. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002>

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>

Li, H., Jin, C., Zhang, Z., O'Hara, I., & Mundree, S. (2017). Environmental and economic life cycle assessment of energy recovery from sewage sludge through different anaerobic digestion pathways. *Energy*, 126, 649–657. <https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2017.03.068>

Li, H., Jin, Y., Mahar, R. B., Wang, Z., & Nie, Y. (2008). Effects and model of alkaline waste activated sludge treatment. *Bioresource Technology*, 99(11), 5140–5144. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.019>

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>

Li, X. L., Peng, Y. Z., Ren, N. Q., Li, B. K., Chai, T. Z., & Zhang, L. (2014). Effect of temperature on short chain fatty acids (SCFAs) accumulation and microbiological transformation in sludge alkaline fermentation with Ca(OH)₂ adjustment. *Water Research*, *61*, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.030>

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>

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)

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>

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>

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>

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>

Lu, D., Sun, F., & Zhou, Y. (2018). Insights into anaerobic transformation of key dissolved organic matters produced by thermal hydrolysis sludge pretreatment. *Bioresource Technology*, *266*, 60–67. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.06.059>

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)

Markis, F., Baudez, J. C., Parthasarathy, R., Slatter, P., & Eshtiaghi, N. (2014). Rheological characterisation of primary and secondary sludge: Impact of solids concentration. *Chemical Engineering Journal*, 253, 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.085>

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>

Martin 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 piggy wastewater. *Chemosphere*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129330>

Martínez Cebrián, N. (2019). *Consumo de energía para la depuración de agua en España*. <https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/41898>

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>

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>

Neyens, E., Baeyens, J., Dewil, R., & De Heyder, B. (2004). Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. *Journal of Hazardous Materials*, 106(2–3), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2003.11.014>

Nielsen, P. H., Thomsen, T. R., & Nielsen, J. L. (2002). *Bacterial composition of activated sludge for floc and sludge properties - importance*. 71–78.

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>

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>

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>

Pierzynski, G. M. (2015). Plant nutrient aspects of sewage sludge. *Sewage Sludge: Land Utilization and the Environment*, 21–25. <https://doi.org/10.2134/1994.sewagesludge.c4>

Pradel, M., & Aissani, L. (2019). Environmental impacts of phosphorus recovery from a “product” Life Cycle Assessment perspective: Allocating burdens of wastewater treatment in the production of sludge-based phosphate fertilizers. *Science of The Total Environment*, *656*, 55–69. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.356>

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>

Réveill , V., Mansuy, L., Jard ,  ., & Garnier-Sillam,  . (2003). Characterisation of sewage sludge-derived organic matter: Lipids and humic acids. *Organic Geochemistry*, *34*(4), 615–627. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(02\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(02)00216-4)

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>

Rojo, E. M., Molinos-Senante, M., Filipigh, A. A., Lafarga, T., Fernández, F. G. A., & Bolado, S. (2023). Agricultural products from algal biomass grown in piggery wastewater: A techno-economic analysis. *Science of The Total Environment*, *887*, 164159. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.164159>

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>

Shi, S., Xu, G., Yu, H., & Zhang, Z. (2018). Strategies of valorization of sludge from wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(4), 936–944. <https://doi.org/10.1002/jctb.5548>

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>

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>

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>

Song, X., Shi, Z., Li, X., Wang, X., & Ren, Y. (2019). Fate of proteins of waste activated sludge during thermal alkali pretreatment in terms of sludge protein recovery. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 13(2). <https://doi.org/10.1007/s11783-019-1114-7>

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>

Tang, Y., Xie, H., Sun, J., Li, X., Zhang, Y., & Dai, X. (2022). Alkaline thermal hydrolysis of sewage sludge to produce high-quality liquid fertilizer rich in nitrogen-containing plant-growth-promoting nutrients and biostimulants. *Water Research*, 211, 118036. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2021.118036>

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>

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>

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>

Trigueros, E., Sanz, M. T., Filipigh, A., Beltrán, S., & Riaño, P. (2021). Enzymatic hydrolysis of the industrial solid residue of red seaweed after agar extraction: Extracts characterization and modelling. *Food and Bioprocess Technology*, 126, 356–366. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2021.01.014>

Uma Rani, R., Kaliappan, S., Adish Kumar, S., & Rajesh Banu, J. (2012). Combined treatment of alkaline and disperser for improving solubilization and anaerobic biodegradability of dairy waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 126, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.027>

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.

Van Wychen, S., & Laurens, L. M. L. (2016). Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Technical Report NREL/TP-5100-60957 Nationala Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 303(December), 275–3000. <http://www.osti.gov/servlets/purl/1118077/>

Wilson, C. A., & Novak, J. T. (2009). Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. *Water Research*, 43(18), 4489–4498. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.022>

Wychen, S. Van, & Laurens, L. M. L. (2013). *Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised)*. www.nrel.gov/publications.

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>

Xiao, B., Liu, Y., Luo, M., Yang, T., Guo, X., & Yi, H. (2019). Evaluation of the secondary structures of protein in the extracellular polymeric substances extracted from activated sludge by

different methods. *Journal of Environmental Sciences*, 80, 128–136.
<https://doi.org/10.1016/J.JES.2018.12.003>

Xiao, K., & Zhou, Y. (2020a). Protein recovery from sludge: A review. *Journal of Cleaner Production*, 249. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119373>

Xiao, K., & Zhou, Y. (2020b). Protein recovery from sludge: A review. *Journal of Cleaner Production*, 249, 119373. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119373>

Xiao, K., & Zhou, Y. (2020c). Protein recovery from sludge: A review. *Journal of Cleaner Production*, 249, 119373. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.119373>

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>

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>

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>

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>

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)

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>

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>