

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y
Control de Calidad Químicos.



Universidad de Valladolid

**“Aplicación de diferentes metodologías de hidrólisis en
la recuperación de proteínas y carbohidratos a partir de
fangos secundarios generados en Estaciones
Depuradoras de Aguas Residuales”**

Autor: Elizabeth Cepero Rodríguez

Dirigido y tutorizado por:

Ángel Alejandro Filipigh / Silvia Bolado Rodríguez

Noviembre de 2022

C/Dr. Mergelina, s/n
47011 Valladolid
www.isp.uva.es

Índice

Resumen	3
Abstract	5
1. Introducción y Antecedentes	6
1.2. Caracterización, tratamiento y prácticas de eliminación de los fangos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales.	9
Fangos	10
1.3. Composición y clasificación de fangos secundarios generados en las EDAR.	13
1.4. Solubilización, recuperación y degradación de macrocompuestos de interés en los WAS.	15
1.5. Aplicaciones y Potencialidades de los Fangos residuales y sus derivados.	15
2. Mecanismos y tecnología para la solubilización y recuperación de proteínas a partir de fangos secundarios generados en EDAR.	18
2.1. Métodos individuales	18
Métodos Físicos.....	18
Métodos Térmicos	19
Métodos Químicos	20
Biológicos	21
2.2. Comparación de los métodos de hidrólisis.	22
3. Objetivos	24
4. Materiales y Métodos	25
4.1. Biomasa de fangos secundarios	25
4.2. Recuperación de proteínas y carbohidratos	26
4.3. Procedimiento Experimental	28
Autohidrólisis y pretratamiento secuencial de ultrasonidos	28
Hidrólisis térmica, química, e hidrólisis termo – química asistida.	29
Ensayos con Ultrasonidos (US) y Ultrasonidos asistido en medio alcalino.	29
4.4. Estimación de los rendimientos de solubilización y recuperación	30
4.5. Métodos Analíticos	30
Análisis de sólidos totales y volátiles.....	30
Análisis de nitrógeno total y proteínas	31
Análisis de carbohidratos	33
Análisis de aminoácidos totales.....	35
Análisis de ácidos húmicos	36
Determinación del tamaño de los péptidos.....	36

Análisis de lípidos	37
5. Resultados y Discusión	39
5.1. Composición inicial CRS.	39
5.2. Efecto de los tratamientos en la solubilización de Proteínas y Carbohidratos.	40
5.3. Efectos de los tratamientos en la recuperación de Proteínas. Composición de aminoácidos y tamaño de péptidos.	45
Composición de los péptidos y evaluación de los tamaños obtenidos de los mismos ...	49
5.4. Recuperación de Monosacáridos.	53
Conclusiones	56
Anexos	58
Referencias Bibliográficas	60

Resumen

La gestión y posible valorización de los fangos generados en las plantas de tratamiento de aguas residuales es un reto importante para nuestra sociedad, desde el punto de vista ambiental, pero también económico. La composición de estos fangos, en los que se acumulan los nutrientes eliminados de las aguas residuales, hacen de ellos una materia prima con un potencial interés muy importante, aplicando el concepto de economía circular. Los fangos presentan una elevada concentración de proteínas, que pueden ser empleadas como proteína industrial, biofertilizantes, bioestimulantes o como alimentación animal. Con el objetivo de recuperar la fracción proteica de estos fangos de depuradora, este trabajo compara diferentes métodos de hidrólisis para la recuperación de péptidos.

El método que mejores rendimientos de solubilización de proteínas obtuvo fue el de Ultrasonidos combinado con Hidrólisis Alcalina en las siguientes condiciones: NaOH 1M, 50°C, 1 hora, 140W, 20 kHz, 50% Amplitud, obteniendo rendimientos de solubilización de 94.4% y 97.2% correspondientes a carbohidratos y proteínas respectivamente. La solubilización de xilosa se relacionó con la liberación de proteínas, ya que esta fue superior bajo las mismas condiciones donde la solubilización de proteínas fue elevada.

El método de Ultrasonidos combinado con Hidrólisis Alcalina en condiciones de trabajo: NaOH 1M, 50°C, 1h, 140W, 20kHz, 50% Amplitud, obteniéndose el 75.1% de péptidos recuperados y en relación a la recuperación de carbohidratos, la hidrólisis que proporcionó los mejores resultados fue la Hidrólisis Ácida + Tratamiento Térmico, llegando a recuperar el 80.6% de los carbohidratos.

La Hidrólisis Alcalina combinada con Ultrasonidos proporcionó los mejores resultados en cuanto a la cantidad (73% de recuperación a 0.5M y 75% a 1M) de polipéptidos que se encuentran en la solución recuperada y con tamaños de los mismos comprendidos entre 70 y 214 kDa. Se concluye que al combinar la Hidrólisis alcalina con el método de Ultrasonidos se produce un efecto sinérgico, debido a que se aumenta los rendimientos de recuperación y se disminuyen las pérdidas de componentes debido al efecto esterilizante del medio alcalino. Los péptidos obtenidos pudieran emplearse en la industria como agentes espumantes (propiedades tensoactivas) y hormigón celular.

Las Hidrólisis Alcalinas y Alcalinas-Térmicas son recomendables para recuperar péptidos en los que existe abundancia de EAA (41%) y a su vez son elevadas las recuperaciones de péptidos de tamaños variables (recomendables para la producción de fertilizantes foliares o alimentación animal).

Abstract

The management and possible valorization of sludge generated in wastewater treatment plants is an important challenge for our society, from an environmental point of view, but also from an economic point of view. The composition of these sludges, in which the nutrients removed from the wastewater accumulate, make them a raw material with a very important potential interest, applying the concept of circular economy. The sludge has a high concentration of proteins, which can be used as industrial protein, biofertilizers, biostimulants or animal feed. With the aim of recovering the protein fraction of these sewage sludges, this work compares different hydrolysis methods for the recovery of peptides.

The method that obtained the best protein solubilization yields was Ultrasound combined with Alkaline Hydrolysis under the following conditions: NaOH 1M, 50°C, 1hour, 140W, 20 kHz, 50% Amplitude, obtaining solubilization yields of 94.4% and 97.2% corresponding to carbohydrates and proteins, respectively. Xylose solubilization was related to protein release, since this was higher under the same conditions where protein solubilization was high.

The Ultrasound method combined with Alkaline Hydrolysis under working conditions: NaOH 1M, 50°C, 1h, 140W, 20kHz, 50% Amplitude, obtained 75.1% of recovered peptides and in relation to the recovery of carbohydrates, the hydrolysis that provided the best results was Acid Hydrolysis + Heat Treatment, recovering 80.6% of carbohydrates.

Alkaline Hydrolysis combined with Ultrasound provided the best results in terms of the amount (73% recovery at 0.5M and 75% at 1M) of polypeptides found in the recovered solution and with polypeptide sizes ranging from 70 to 214 kDa. It is concluded that combining alkaline hydrolysis with the Ultrasound method produces a synergistic effect, since recovery yields are increased and component losses are reduced due to the sterilizing effect of the alkaline medium. The peptides obtained could be used in the industry as foaming agents (surfactant properties) and cellular concrete.

Alkaline and Alkaline-Thermal Hydrolysis are recommended to recover peptides in which there is an abundance of EAA (41%) and at the same time the recoveries of peptides of variable sizes are high (recommended for the production of foliar fertilizers or animal feed).

1. Introducción y Antecedentes

En la Unión Europea se producen aproximadamente 5 toneladas de residuos por persona anualmente, según datos publicados en Eurostat del año 2020. En España, estas cifras tienden a ser menores, encontrándose aproximadamente sobre los 2800 kg por persona (Figura 1.1) (Overview - Circular Economy - Eurostat; Waste Statistics - Statistics Explained). Las instituciones comunitarias trabajan en la reforma del marco legislativo para promover un cambio en el modelo de gestión de residuos actual, con un alto consumo de productos y elevada generación de residuos, por una “economía circular (EC)”, con la cual se pretende que el valor de los productos, materiales y recursos se mantengan en la economía durante el mayor tiempo posible, fomentando así, la recuperación y reutilización de residuos con el fin de conservar los recursos naturales de forma general, y los no renovables de forma particular. La valorización de un residuo de cualquier tipo consiste en encontrarle un valor añadido o aumentar el valor a determinado producto que se ha “desvalorizado”, en términos económicos pudiera ser un sinónimo de plusvalía.

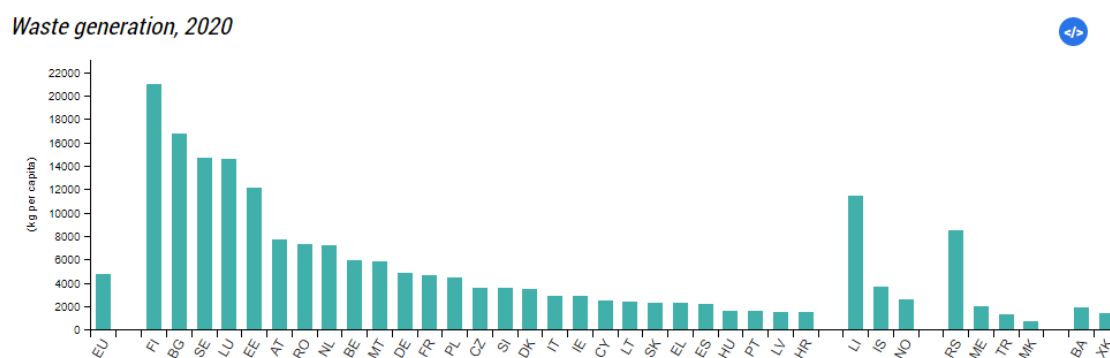


Figura 1.1: Generación de residuos per cápita en la Unión Europea, 2020.(Bianchini et al., 2016)

Estudios publicados en Eurostat, muestran la tendencia seguida entre los años 2004 hasta el 2020 de los destinos finales de los residuos generados por las estaciones municipales de tratamiento de aguas y como ha cambiado la perspectiva en los recientes años, pasando de la disposición a la recuperación de los mismos o de una parte de ellos para un fin específico, y este cambio viene asociado a los conceptos de EC.

En 2015, la Comisión Europea adoptó un ambicioso "Paquete para la Economía Circular", en el que se establece un programa concreto de acciones que esboza medidas que abarcan todo el ciclo de vida del producto: desde la producción y el consumo hasta la gestión de residuos y el mercado de materias primas secundarias.

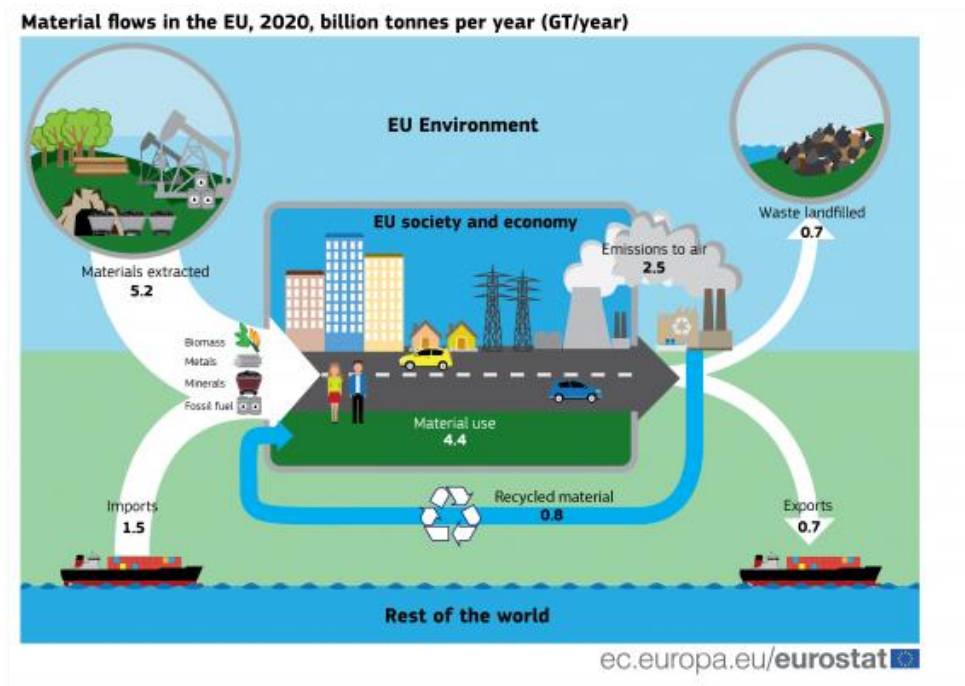


Figura 1.2: Economía circular.(Smol & Koneczna, 2021)

Las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) o Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) en Latinoamérica, surgen con el objetivo de mejorar la calidad medioambiental, pero la tendencia actual es tratar de aprovechar los residuos obtenidos de la depuración para hacer un uso más sostenible de los recursos hídricos. Estas plantas, en sus tratamientos biológicos, generan una elevada cantidad de fangos, una biomasa residual en constante crecimiento (aumento de la población y del consumo de agua dulce), con un gran potencial como fuente de materias primas y energías renovables.

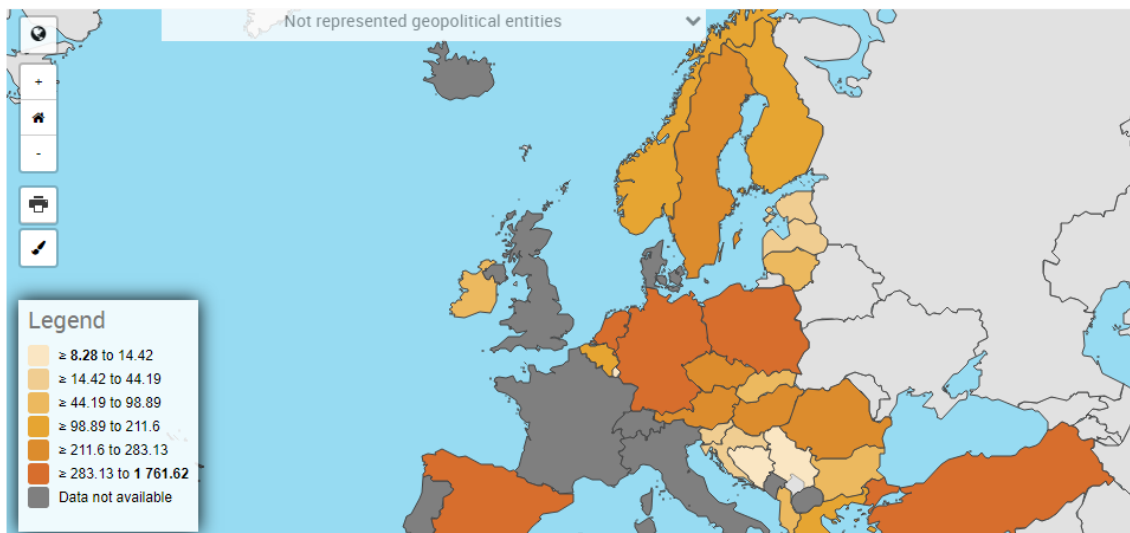


Figura 1.3: Generación de residuos provenientes del tratamiento de aguas municipales, expresados en peso seco y en kg por habitantes, 2018. (Anón. et al., 2022)

En la figura 1.3 se observa la generación de residuos que proceden de aguas municipales en el continente europeo durante el año 2018. España se encuentra entre los países que mayor cantidad de fangos genera per cápita. A consecuencia de esto, una estrategia de gestión importante radica en la valorización de los residuos que se generan en las EDAR, debido a que la gestión de los mismos representa entre el 40 y el 50% de los costes de gestión, operación y mantenimiento de las EDAR (Bagheri et al., 2023).

Los fangos residuales pueden emplearse como fuente de energía o de materias primas, de esta forma sustituyen a otras fuentes no renovables, lo que reduciría considerablemente los costes medioambientales. Al considerar los fangos como fuente de materias primas, debe tenerse en cuenta su contenido en patógenos, contaminantes orgánicos solubles y metales tóxicos. Estos contaminantes causan problemas en la salud humana y animal, por lo que deben ser eliminados o al menos reducidos hasta las concentraciones legalmente permitidas.

Como parte de las nuevas políticas ambientales, la recuperación de proteínas a partir de fuentes de bajo coste y renovables como son los fangos residuales, constituye una alternativa que contribuiría a disminuir el empleo de las materias primas con las que se producen las proteínas industriales, los fertilizantes y los alimentos animales (BIOMASA, BIOCMBUSTIBLES Y SOSTENIBILIDAD; de Gregorio, 2019; Rebolledo-Leiva et al., 2022). Es necesario desarrollar procesos de valorización de estos fangos, que permitan recuperar

las proteínas que contienen, minimizando los impactos ambientales, sociales y económicos.

1.2. Caracterización, tratamiento y prácticas de eliminación de los fangos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales.

Las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) tienen como objetivo reducir la carga de contaminantes del vertido, convertirlo en inocuo para lograr una disposición segura en el medio ambiente y obtener una corriente adecuada para el uso o reciclaje.

Para cumplir estos fines se usan distintos tipos de tratamiento dependiendo de los contaminantes que arrastre el agua y de otros factores más generales, como localización de la planta depuradora, clima, ecosistemas afectados, etc. (Fabiani et al., 1996 ; Hwang et al., 2008)

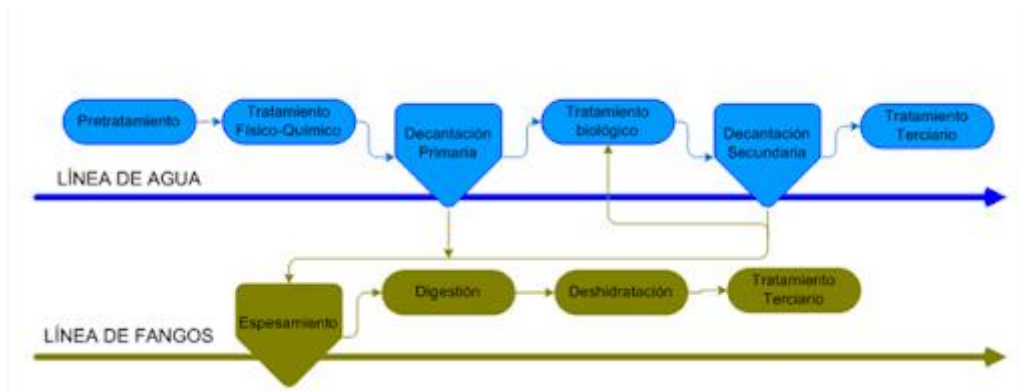


Figura 1.4: Líneas de Fangos y Aguas en una EDAR. (Collivignarelli et al., 2019)

Fangos

Los “fangos” o “lodos” son la biomasa que se genera durante el tratamiento de las aguas residuales.

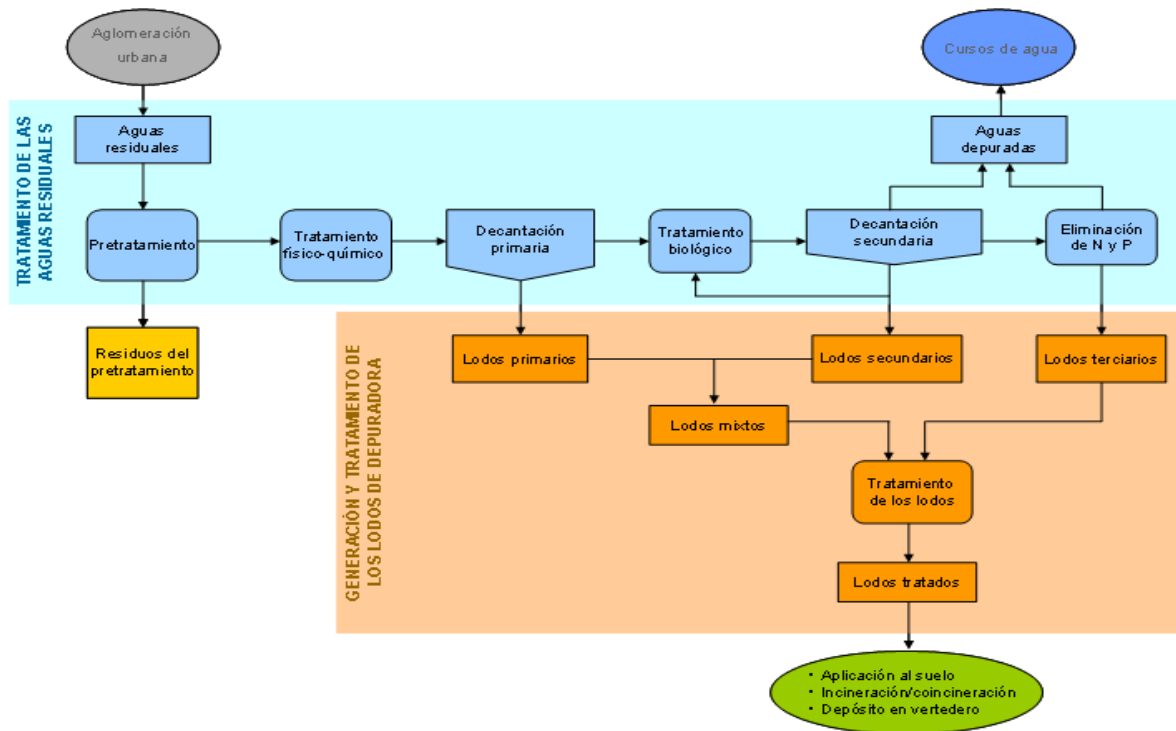


Figura 1.5: Esquema de tratamiento de aguas residuales, generación de fangos.(Fangos de Depuración de Aguas Residuales)

En las EDAR, en dependencia de los tratamientos que se apliquen se generan distintos tipos de fangos:

- Fangos primarios: se producen durante el tratamiento primario (cribado, desarenado, flotación, precipitación y sedimentación), cuando se separan los sólidos pesados, las grasas y los aceites del agua residual cruda. De forma general, los fangos primarios contienen entre un 2% y un 9% de sólidos, siendo el 90% restante, (a veces incluso el 99.5%), agua (Ahmed et al., 2021).
- Fangos Secundarios (fangos activados residuales o **WAS**): se producen durante el tratamiento biológico, cuando los microorganismos descomponen el contenido orgánico biodegradable de las aguas residuales (Sun et al., 2021). La concentración de sólidos totales está entre el 0.8 y el 3.3%, dependiendo del tipo de proceso de tratamiento biológico empleado (Gherghel et al., 2019), siendo el

resto agua. La fracción orgánica de los WAS contiene: carbono 50-55%, oxígeno 25-30%, nitrógeno 10-15%, hidrógeno 6-10%, fósforo 1-3% y azufre 0.5-1.5%.

- Fangos terciarios: se obtienen en las etapas avanzadas de tratamiento de aguas residuales, cuando se requiere la eliminación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) (Naqvi et al., 2021). De forma general los procesos de eliminación de nutrientes se realizan van aparejados con la eliminación de materia orgánica.
- Fangos químicos: se producen mediante cualquier proceso químico implementado en la EDAR, como el Proceso de Sedimentación Primaria Químicamente Asistida (CAPS). Las características cualitativas y cuantitativas de los fangos dependen del reactivo y de las dosis utilizadas. Los reactivos típicos son la cal hidratada, el cloruro férrico, el sulfato de aluminio y el quitosano. Los fangos químicos también pueden producirse por coagulación-floculación del sobrenadante de espesamiento (Shukla y Ahammad, 2023), así como el agua de recirculación tras la sedimentación/tratamiento físico-químico.

Algunas estrategias de manejo de estos fangos empleados hasta la fecha, consisten en:

- Aplicaciones agrícolas en varias formas (ya sea de forma directa o creando una mezcla con otros compuestos como minerales y/o bioproductos), como biofertilizante, biorremediador y acondicionador de suelos.
- Vertido.
- Incineración.
- Digestión anaerobia.
- Pirólisis.

En un estudio llevado a cabo por (Bagheri et al., 2023), los autores realizan una revisión de las estrategias de manejo de los fangos residuales en 50 años, este trabajo mostró como la tendencia principal es la aplicación en la tierra, aunque esta tendencia comienza a disminuir a partir del año 2009 hasta la actualidad, coincidiendo con el aumento de los estudios relacionados con la visión de los residuos como un recurso. La tendencia de recuperación de energía se ha quedado prácticamente estática en cuanto a nivel de publicaciones del año 2015 al 2019.

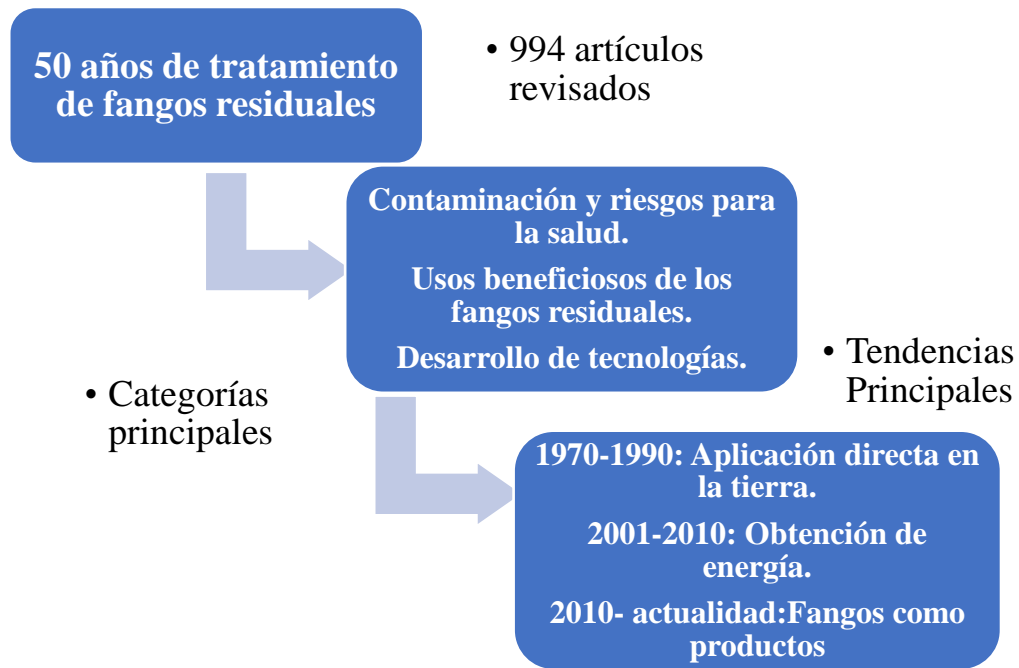


Figura 1.6: Estudios relacionados con el manejo de los fangos en los últimos 50 años. Adaptada a partir de, (Bagheri et al., 2023)

La aplicación directa de los fangos en la agricultura genera controversia entre algunos autores, ya que es conocido su potencial por la elevada composición en nutrientes esenciales como Fósforo, Nitrógeno y Potasio, pero a la vez elevada composición en metales pesados (Pb, Zn, Cu, Cr, Ni y Cd) y en microorganismos patógenos. Este tema se ha regulado con la publicación de Normas sobre las cantidades máximas de elementos perjudiciales para las plantas y los animales. En el caso de los vertidos, estos se ven afectados por la falta de espacios seguros para la disposición, debido a los malos olores que se generan y a la generación de lixiviados altamente contaminados que pueden afectar al hábitat en que se disponen y sus alrededores. Con respecto a la incineración, se conocen las ventajas asociadas a la disminución drástica del volumen de estos fangos y a la reutilización de la energía eléctrica y calorífica generada durante el proceso y las limitantes de este tratamiento estarían relacionadas a la elevada concentración de metales en las cenizas y producción de dioxinas (Baroutian et al., 2016). La pirólisis necesita un estricto ambiente sin oxígeno, por lo que se ha visto con dificultad el empleo de esta

alternativa (Chan & Wang, 2016). Al analizar la digestión anaerobia, se presentan los principales inconvenientes la complejidad relativa del proceso, los problemas de degradabilidad de los fangos y los elevados costes que suelen tener con respecto a otras alternativas.

Debido a todos los factores antes expuestos, se pretende encontrar nuevas estrategias ambientalmente amigables para el tratamiento de los fangos residuales, como parte de la Directiva Europea (Directiva (UE) 2018/ Del Parlamento Europeo y Del Consejo, de 30 de Mayo de 2018, Por La Que Se Modifica La Directiva 2008/98/CE Sobre Los Residuos) se propone la valorización de los mismos, específicamente la valorización fraccionada de los fangos secundarios, buscando minimizar los flujos de residuos y siempre en el marco de los principios de la economía circular.

1.3. Composición y clasificación de fangos secundarios generados en las EDAR.

La composición de los fangos residuales depende de su procedencia y de las operaciones que se realizan en la EDAR. De manera general, contienen materia orgánica, macro y micronutrientes, compuestos no biodegradables y potencialmente tóxicos, sales inocuas y/o potencialmente tóxicas, metales pesados, organismos patógenos tales como: virus, bacterias, protozoos, así como otros parásitos intestinales (helmintos) (Xing et al., 2022). En los fangos secundarios el contenido de nitrógeno total es mayor en comparación a los fangos primarios y esto se debe a que los fangos primarios son, en gran parte, de naturaleza inorgánica, ya que estos son generados durante los procesos de sedimentación, filtración, coagulación y flotación, mientras los fangos secundarios son fangos de tipo biológico.

La mayoría de los estudios consultados, emplean fangos secundarios como fuente de materia prima, debido a su mayor contenido en proteínas, carbohidratos, compuestos orgánicos y menor cantidad de compuestos inorgánicos y grasas lo que facilita el aislamiento de compuestos de interés, extracción y purificación, aunque para la recuperación de componentes de interés (proteínas, carbohidratos) es necesario liberarlos desde el interior de las estructuras celulares de los microorganismos presentes en el fango y de las Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS) generadas por estos microorganismos (Hui et al., 2022a; Neyens et al., 2004; H. L. Zhang et al., 2019).

En la tabla I, se muestra la composición de los WAS, según material consultado:

Tabla I: Composición de Sólidos Totales (ST), Sólidos Volátiles (SV), valores de pH, composición Macromolecular y Cenizas (ASH) de WAS (los valores están expresados en base seca).

Parámetros	Valores (% en base seca)	Referencia
Sólidos Totales	2-9%	(Collivignarelli et al., 2019)
Sólidos Volátiles	59-68%	(J. Gao, Weng, et al., 2020)
pH	6.5-8.0 unidades	(Collivignarelli et al., 2019)
Carbohidratos	7-9.7%	(Gao et al., 2020)
Lípidos	5-12%	(Gao et al., 2020)
Proteínas	33-41%	(Gao et al., 2020)
ASH	~35%	(Gao et al., 2020; Yadav et al., 2020)

1.4. Solubilización, recuperación y degradación de macrocompuestos de interés en los WAS.

Los WAS tienen una elevada composición en compuestos orgánicos, como se ha visto anteriormente, debido a la gran cantidad de microorganismos que lo componen, en su mayoría bacterias (Gram positivas y Gram negativas). Estos microorganismos contienen en el interior de las células proteínas y carbohidratos, además segregan y forman en el exterior las llamadas Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS).

El primer paso para la valorización fraccionada es lograr la ruptura de la pared celular de los microorganismos y de las EPS que componen los WAS, con el fin de provocar la solubilización de la materia orgánica en general y de las proteínas y carbohidratos en particular (Hui et al., 2022b). Los métodos que se empleen deben provocar baja degradación de los compuestos y a su vez tener un efecto esterilizante para evitar la degradación metabólica. Existen diferentes alternativas que se emplean para la disrupción celular, estas metodologías se dividen de acuerdo al fenómeno que se ponga de manifiesto, así podemos encontrar: métodos físicos, químicos y biológicos (Raheem et al., 2018). Las condiciones que se empleen en cada uno de ellos están condicionada a las características intrínsecas de la biomasa que se estudie y de los fines que se persigan, se ha reportado en la bibliografía que las estructuras que componen los WAS son más fáciles de romper que otras biomásas como las microalgas (estas tienen paredes celulares rígidas).

Para obtener elevados rendimientos de recuperación de péptidos o monosacáridos es necesario que la solubilización de los componentes respecto a la biomasa inicial sea elevada y que las degradaciones de los mismos sean bajas. Condiciones extremas pueden solubilizar elevadas cantidades de compuestos, y no siempre se traduce de forma proporcional en un aumento en la recuperación, ya que esto puede ocasionar una degradación de los componentes que posteriormente no pueden recuperarse.

1.5. Aplicaciones y Potencialidades de los Fangos residuales y sus derivados.

Los estudios consultados sugieren que los WAS pueden tener un potencial que va más allá de la aplicación agraria, debido a su elevada concentración de macrocompuestos

como proteínas y carbohidratos los cuales pueden recuperarse luego de aplicarles un tratamiento que permita la liberación de estos y su posterior extracción y purificación.

Los carbohidratos pueden recuperarse en forma de monosacáridos fermentables, producto de los procesos de ruptura celular aplicados, que se pueden utilizar para la producción de alcoholes o como medio de cultivo para producir otros compuestos, por ejemplo, los PHAs (polihidroxicanoatos) precursores de los bioplásticos (Dietrich et al., 2017; Madkour et al., 2013; Rodriguez-Perez et al., 2018).

La fracción proteica obtenida, una vez separada de los carbohidratos puede emplearse como bioestimulantes, biofertilizante, alimentación animal y como proteína industrial (agentes espumantes, espesantes, surfactantes). Para estos fines, estos hidrolizados de proteínas deben cumplir con ciertos parámetros en cuanto a su tamaño (20 kDa y 450 kDa, rango de peso ideal para el empleo como agentes espumantes, (Xiang et al., 2017b)) y composición (contenido en aminoácidos esenciales para alimentación animal). Normalmente, las aplicaciones industriales requieren la presencia de péptidos de cierto tamaño, mientras que la presencia de aminoácidos está relacionada con desarrollo de fertilizantes, o uso en alimentación animal (Enser et al., 1990; Tejada et al., 2016; Yan et al., 2022). Los rendimientos y los tamaños de los péptidos recuperados dependerán de la técnica de hidrólisis aplicada. Se conoce de algunos estudios previos consultados, que las hidrólisis ácidas solubilizan gran parte de los polisacáridos presentes en la biomasa, mientras que las hidrólisis básicas consiguen elevados rendimientos de solubilización de las proteínas, con escasa degradación de los péptidos liberados.(Martin Juárez et al., 2021a)

A partir del auge de estos recientes estudios sobre el potencial de los fangos residuales secundarios, se ha cambiado la perspectiva con respecto a las EDAR. Si antes solo se consideraban estas como planta de tratamiento d agua, y en algunos casos para producir energía, en estos se plantea como biorrefinerías. Las EDAR se plantean como sistemas autosuficientes, desde el punto de vista energético y económico, que pueden ser fuente de nuevos productos para proveer al mercado.

Por todo esto, el presente estudio pretende seleccionar diferentes metodologías y condiciones, con base en estudios realizados y publicados sobre fangos u otras biomásas crecidas en plantas de tratamiento de aguas residuales, con el fin de recuperar proteínas,

teniendo en cuenta la eficiencia del proceso de solubilización y los riesgos/beneficios de los procesos.

2. Mecanismos y tecnología para la solubilización y recuperación de proteínas a partir de fangos secundarios generados en EDAR.

En este apartado se revisarán los métodos de pretratamiento físicos, térmicos, químicos y biológicos, además de combinaciones de ellos que se emplean para provocar la disrupción celular tanto de las EPS como de los citoplasmas intracelulares.

Los estudios de (Liu et al., 2009; Vethathirri et al., 2021; Yan et al., 2022), muestran que la ruptura de la pared celular en los fangos residuales es más sencilla que en otras biomásas como son las microalgas (con una rígida pared celular), ya que en estas se necesita un tratamiento intensivo con el fin de extraer eficientemente los macrocompuestos. (Martín Juárez, 2019).

La valorización secuencial de todas las fracciones de la biomasa, requiere un estudio de las condiciones óptimas para lograr un rendimiento de recuperación elevado del compuesto de interés, pero también minimizar la posible degradación provocada por las condiciones aplicadas en el pretratamiento. Un aspecto importante a tener en cuenta es el efecto del pretratamiento en el resto de componentes de la biomasa, de cara a la valorización de las diferentes fracciones.

2.1. Métodos individuales

Métodos Físicos

Ultrasonidos: El pretratamiento por ultrasonidos provoca la disrupción de la estructura celular y de la matriz del flóculo. Dos mecanismos principales para la desintegración de los fangos y la solubilización de las proteínas están asociados al pretratamiento ultrasónico. A una frecuencia ultrasónica baja (< 100kHz) predomina el fenómeno de la cavitación, mientras que, a una frecuencia ultrasónica alta (>100kHz), pueden producirse reacciones químicas con la formación de radicales -OH y HO₂- (Martín Juárez, 2019). El aumento de la solubilización de proteínas puede atribuirse al aumento de la actividad enzimática en los fangos de depuradora inducido por la ultrasonicación (Çelebi et al., 2021; R. Zhang et al., 2021) promoviendo así los desplazamientos de las proteínas extracelulares desde las capas internas y EPS fuertemente unidas de los flóculos de fangos a las capas externas de EPS solubles y poco unidas (Lippert et al., 2018).

Métodos Térmicos

El mecanismo del pretratamiento térmico para la solubilización de proteínas de los fangos consiste en exponer los fangos a una temperatura elevada durante el tiempo suficiente para promover la reacción química y solubilizar las biomoléculas más grandes tanto para los fangos aeróbicos como para los anaeróbicos (J. Park et al., 2022). Se pueden utilizar diferentes tipos de métodos de pretratamiento térmico, como los pretratamientos térmicos suaves o a baja temperatura (menos de 90°C) e hipertérmicos (mayor de 100°C), para desintegrar los flóculos de lodo y liberar proteínas (J. Gao et al., 2022). (Xiang et al., 2017b) optimizaron las condiciones para la extracción de proteínas, empleando un tiempo de 2 horas, pH 12 y temperaturas de 130°C, de esta forma obtuvieron un rendimiento de recuperación de proteínas del 69%, en este trabajo los mayores rendimientos de recuperación se obtuvieron a temperaturas superiores a 100°C empleadas en tiempos prolongados, por lo que fueron consideradas condiciones extremas para los WAS. Actualmente, el pretratamiento térmico a baja temperatura con temperatura inferiores a 90 °C ha ganado popularidad, por ejemplo, la solubilización de proteínas a 60 °C durante 3h, donde combinan bajas temperaturas y tiempos prolongados y han obtenido una solubilización elevada de materia orgánica (Bougrier et al., 2008; Catallo y Comeaux, 2008; Li et al., 2008). (Liew et al., 2022) realizó un estudio sobre la incidencia de la temperatura y el tiempo en el proceso de desintegración de los WAS, los rangos fueron: temperaturas comprendidas entre 30°C y 90°C y tiempos entre 1 y 16 horas. Estos autores encontraron que el tiempo no tuvo relevancia, sin embargo, encontraron que la temperatura que reportaba la mayor solubilización de compuestos fue 90°C, aunque no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados a 90°C y los correspondientes a 75°C. (Yu et al., 2013) investigaron los efectos del pretratamiento térmico medio (100-120 °C) (3h) 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 a 120°C. Además de la mejora en la solubilización de proteínas, el pretratamiento térmico también mostró una mejora en la destrucción de patógenos y en la deshidratabilidad de los fangos, así como en la eliminación de micro contaminantes, por ejemplo, hormonas esteroideas (Abbott et al., 2021)

Métodos Químicos

En las hidrólisis químicas de forma general, se conoce, que los factores que ejercen efecto sobre los rendimientos de solubilización y recuperación: son el tipo de agente químico, la concentración del mismo, el tiempo de hidrólisis, la temperatura empleada y la concentración de la biomasa.(Martín Juárez, 2019)

El método de hidrólisis alcalina es una de las metodologías químicas más empleadas para la liberación de proteínas de los fangos. Los compuestos alcalinos como el hidróxido de sodio (NaOH) el hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y el hidróxido de potasio (KOH) se utilizan de forma general. Los álcalis pueden inducir la solubilización de las proteínas de la membrana, la saponificación de los lípidos de la membrana y el daño de la célula microbiana (Mancuso et al., 2019). Sin embargo, una desventaja significativa del pretratamiento alcalino está relacionada con las sales irre recuperables. Las altas concentraciones de sal residual plantan un gran desafío para el postratamiento de los fangos restantes después de la solubilización de proteínas (Li et al., 2008). La proteína recuperada con el pretratamiento alcalino también puede no ser adecuada para su aplicación en la industria alimentaria debido, por ejemplo, a la racemización de los residuos de aminoácidos. A pesar de estas desventajas, los pretratamientos alcalinos muestran ventajas con respecto a otros métodos, como el bajo coste de los mismos, elevada solubilización de proteínas, eliminación de microorganismos patógenos, y facilidad de realizar un escalado industrial.

La hidrólisis ácida también se ha utilizado para solubilizar los fangos para la liberación de proteínas y carbohidratos. En el estudio realizado por (Martín Juárez et al., 2021b) en biomasa de microalgas generadas en aguas residuales de purines, la hidrólisis ácida con (HCl 2M) a temperatura 121°C, tiempo de 1h, proporcionó elevados rendimientos de solubilización con respecto a todos los componentes de la biomasa. El trabajo muestra, además, el efecto de la concentración del ácido: usando HCl a 0.5M se solubilizaron el 70% de los carbohidratos y el 50% de las proteínas y al aumentar la concentración a HCl 2 M este rendimiento llegó hasta el 98%, de los carbohidratos y el 76% de las proteínas,

del total de carbohidratos solubilizados a 2M, logran recuperar el 81% de los mismos en forma de monosacáridos fermentables.

Biológicos

Los pretratamientos biológico-enzimáticos incluyen la posibilidad de aplicar enzimas comerciales, que pueden seleccionarse en función del tipo de enzima y la cantidad requerida. También es posible utilizar un microorganismo productor de enzimas que libere enzimas hidrolíticas durante la etapa de hidrólisis. Por último, como también se muestra en este trabajo, es posible utilizar la actividad enzimática inherente a los fangos secundarios.

La metodología de autohidrólisis es una hidrólisis biológica-enzimática que consiste en someter los fangos secundarios a una temperatura de 55 °C. Estas condiciones permiten a los microorganismos del lodo secundario liberar las enzimas hidrolíticas contenidas en su propio sistema metabólico, lo que finalmente conduce a la hidrólisis del lodo secundario (Nabarlatz et al., 2010; Neumann et al., 2017; Song y Feng, 2011).

Las diferentes alternativas de hidrólisis y disrupción celular reportadas hasta la fecha tienen ventajas y desventajas asociadas, las más comunes están relacionadas con los altos costos de operación y/o la alta complejidad de la implementación. EL método de autohidrólisis utiliza los efectos sinérgicos producidos por la temperatura aplicada y las enzimas hidrolíticas liberadas, obteniendo así un pretratamiento con un proceso de operación simple y bajo requerimiento de una fuente de energía externa.

Métodos Combinados

Estos métodos constituyen una alternativa de pretratamiento que se basa en crear un efecto sinérgico que permita disminuir los costes asociados al gasto de energía, reactivos y/o enzimas, además de favorecer el aumento en el rendimiento de solubilización. La elección de los métodos a emplear depende de la materia prima y de los objetivos que se pretendan alcanzar.

Los métodos químicos de hidrólisis son los más empleados para combinar con otros o bien, para emplearlos en métodos secuenciales, debido a la eficiencia que muestran. Las combinaciones más estudiadas son las químicas-térmicas, a medias y altas temperaturas, y tiempos cortos y prolongados, de forma tal que se consigan diferentes grados de severidad.

La hidrólisis alcalina resulta especialmente eficaz cuando se combina simultáneamente con el pretratamiento térmico (Neyens et al., 2004) . Se ha informado de que el método termoquímico (121°C, 1h) combinado mejora la solubilización de las proteínas. Por ejemplo, Cho et al. (2013) informaron de que la proteína liberada después del tratamiento combinado termo-alcalino (NaOH 1M, 121°C, 1h) era 2.4 veces mayor que la de los fangos no tratados y 2.1 veces mayor que con el pretratamiento alcalino solo. (Hui et al., 2022b, 2022a) informaron de que el combinado termo-alcalino puede mejorar la concentración de proteína bruta en un 60.2-61.6%. (Xiang et al., 2017a), establece en sus trabajos que las condiciones óptimas para la extracción de proteínas son: pH entre 12 y 13, ajustado con NaOH 10M, temperatura entre 100°C y 140°C y tiempos comprendidos entre 1.5h y 4 h.

(N. D. Park et al., 2012) combinaron el método de los tratamientos ultrasónico y alcalino, encontrando que la proteína soluble se incrementó cuando el tratamiento ultrasónico se estableció sobre los 28 kHz a pH 12 después de un pretratamiento en medio alcalino de 1 hora. El pretratamiento combinado ultrasónico-alcalino (NaOH, 1 M) mostró un efecto sinérgico en la solubilización de proteínas de los fangos, ya que el método ultrasónico desintegraba los flóculos de fangos y el pretratamiento alcalino posterior dañaba las células microbianas mediante la solubilización de las proteínas de membrana y la saponificación de los lípidos de membrana.

2.2. Comparación de los métodos de hidrólisis.

Es un reto comparar todos los métodos debido a la escasa información sobre la estimación de costes, la variabilidad de las propiedades de los fangos y las escalas de operación, etc. (Xiao et al., 2017) intentaron comparar los beneficios energéticos y económicos de los pretratamientos ultrasónicos, alcalinos y térmicos para la solubilización de proteínas de los WAS. En este trabajo, la proteína tipo tirosina con tamaño molecular inferior a 20 kDa predominó en varias muestras de fangos pretratados por métodos ultrasónicos, térmicos y alcalinos.

Comparando varios métodos para la solubilización de proteínas de los fangos, los métodos físicos, por ejemplo, la ultrasonicación, las microondas y la molienda, generalmente mostraron bajos costos operativos y un fácil control, sin embargo, se debe tener en cuenta la alta demanda de energía (Bozkurt y Apul, 2020) , (Lippert et al., 2018; Park et al., 2012) El método térmico puede eliminar eficazmente el olor y los patógenos

mientras solubiliza la proteína del lodo, sin embargo, se necesita una alta demanda de energía y costo de capital. Además, se puede liberar amoníaco durante el pretratamiento térmico. El método químico, en particular, el pretratamiento alcalino, es eficaz para desintegrar los flóculos de fangos y es fácil de manejar con un dispositivo sencillo; sin embargo, hay que tener en cuenta el coste químico y la corrosión asociada a la adición de ácidos y álcalis. Además, existe el riesgo de que los materiales celulares liberados se mineralicen cuando se utilizan oxidantes. La aplicación del método biológico suele ser limitada debido a la lentitud de la puesta en marcha, las condiciones de tratamiento suaves y la dificultad de ampliación (Yin et al., 2016) . Cabe destacar que los diferentes métodos de pretratamiento aplicados pueden destruir/cambiar el peso molecular de la proteína, la conformación, etc.

Como estrategia de valorización de los fangos secundarios se pretende obtener mediante técnicas de hidrólisis péptidos de tamaño suficiente para que sus propiedades funcionales permitan su uso en aplicaciones industriales. Otra alternativa es escoger métodos de hidrólisis que liberen, sin degradar, porcentajes elevados de aminoácidos de los fangos, para su uso como fertilizantes o en alimentación animal. Debido al origen de estos fangos, los péptidos o aminoácidos liberados no pueden usarse para consumo humano. Los métodos de hidrólisis deben escogerse en el sentido de maximizar los rendimientos de solubilización de los compuestos en relación a la concentración inicial de los mismos, y a su vez, las condiciones que se empleen minimicen la degradación de las proteínas y los carbohidratos, lográndose elevados rendimientos de recuperación.

3. Objetivos

Las tareas realizadas giraron en torno a los objetivos del proyecto de investigación PROPHACTION, financiado en la convocatoria Retos 2020 del MICINN. El proyecto incluye el estudio de diferentes pretratamientos e hidrólisis para la valorización de lodos secundarios aerobios generados en la EDAR de Valladolid.

El objetivo general de este trabajo, en el marco del proyecto global, es comparar procesos de hidrólisis para la valorización de la fracción mayoritaria y más valiosa de los lodos secundarios aerobios, la fracción proteica, evaluando también el efecto de los procesos sobre la fracción carbohidrato. El estudio se realizó teniendo en cuenta la recuperación de las proteínas en forma de péptidos y aminoácidos, y de los hidratos de carbono como monosacáridos fermentables.

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en la liberación y recuperación de los macrocomponentes de interés presentes en la biomasa, se trazaron los siguientes objetivos específicos:

- Comparar las solubilizaciones de los macrocomponentes contenidos en la biomasa tras la aplicación de diferentes métodos de hidrólisis.
- Analizar y cuantificar la degradación de los componentes solubilizados y, por tanto, su recuperación mediante balance de materia para diferentes alternativas de valorización.
- Evaluar el tamaño y la calidad de los péptidos recuperados, así como su composición en aminoácidos.

4. Materiales y Métodos

4.1. *Biomasa de fangos secundarios*

Se empleó una biomasa de fangos secundarios generados en la EDAR urbana de Valladolid, España. La biomasa (Raw Sludge, RS de ahora en adelante) se tomó después de la unidad de sedimentación secundaria de la EDAR. El contenido de humedad y el pH del RS fue del 98% y 6.8 respectivamente. El RS se concentró y separó por centrifugación (10 000 rpm, 15 minutos, empleando una Legend RT+, Thermo Scientific, USA.), usando tubos de centrífuga PPCO de 250 mL de capacidad, posteriormente fueron homogenizadas y almacenadas a una temperatura de 4°C hasta su posterior utilización (no más de 48 horas, de forma que fueran fangos frescos), mientras que la fracción líquida fue filtrada con filtros de membrana de 0.2 μm , y luego este filtrado se utilizó como medio de suspensión (al analizarla no se detectaron lípidos, proteínas, carbohidratos, compuestos húmicos). La humedad de la fracción sólida obtenida tras la centrifugación fue del 88.3%, siendo los sólidos totales del 11.7% y los volátiles el 76.9% de los totales.

La composición macromolecular de los fangos crudos centrifugados (CRS, por sus siglas en inglés), fue la siguiente: 35.2 % de proteínas, 13.2 % de carbohidratos (compuestos por 10.5 % de glucosa, 2.7 % de xilosa, 0.9 % de arabinosa y 1.1 % de celobiosa), 8.9 % de lípidos, 11.7 % de ácidos húmicos (los porcentajes están expresados en base seca).

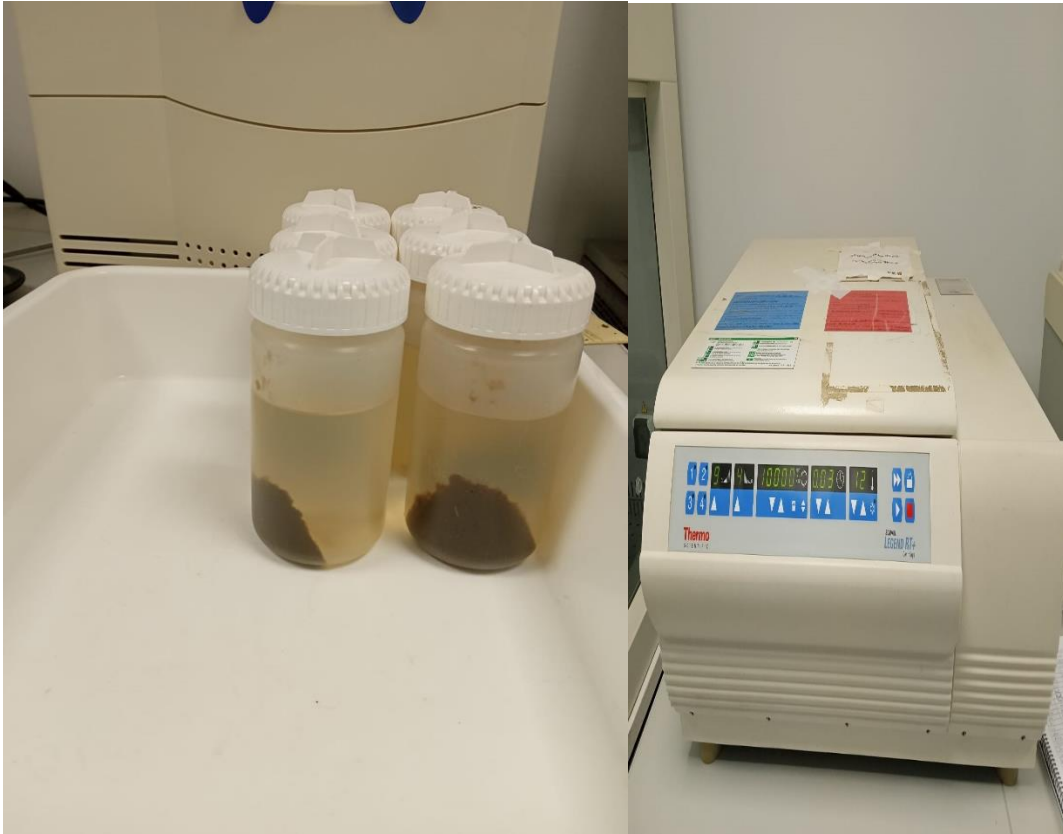


Figura 4.1: Equipamiento empleado para la preparación de la biomasa inicial.

4.2. *Recuperación de proteínas y carbohidratos*

Se compararon varios métodos para la solubilización de proteínas y carbohidratos y la recuperación de péptidos y monosacáridos de la biomasa CRS. Estudios anteriores sobre la solubilización de proteínas a partir de biomasa algal cultivada en aguas residuales de purines (Lorenzo-Hernando et al., 2019; Martín Juárez et al., 2016) y biomasa de WAS (J. Gao, Wang, et al., 2020; J. Gao, Weng, et al., 2020; Hui et al., 2022b, 2022a; Li et al., 2008) han utilizado condiciones suaves para preservar la estructura del producto deseado. Como alternativa de tratamiento suave, tratando de recuperar péptidos de tamaño considerable, se eligió la autohidrólisis. Tanto el tratamiento hidrotérmico como la hidrólisis química pueden tener un posible efecto esterilizador e impedir la degradación metabólica de los productos liberados, lo cual es de gran interés en la valorización de biomásas con alto contenido bacteriano (Martín Juárez et al., 2021c; Neyens et al., 2004). Por otro lado, la ultrasonificación es un método de pretratamiento con una eficacia moderada, sin embargo, puede combinarse fácilmente con otros métodos, como la hidrólisis alcalina, para aumentar la capacidad de disrupción celular en condiciones de operación moderadas, ejerciendo un efecto sinérgico en la solubilización de los

macrocomponentes (Yan et al., 2022) . En este estudio, se aplicó el método biológico (autohidrólisis), hidrotérmico (HT), químico (adición de álcalis y ácidos) y físico (ultrasonidos), así como su combinación (extracción ultrasonidos+autohidrólisis, hidrotérmica + química y alcalina asistida con ultrasonidos).

Con base en estos estudios previos, se escogieron las condiciones de operación que se muestran en la Tabla II, tratando de aplicar menor severidad que en los métodos empleados por el grupo de investigación en otras biomásas más resistentes como las microalgas. Las paredes celulares de las bacterias presentes en los fangos son menos resistentes que las de las microalgas crecidas en ambientes tan adversos como los de los fotobiorreactores de tratamiento de aguas residuales.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado para este estudio, trabajando con 50 mL de suspensión de biomasa CRS de una concentración del 3.7 % (m/m en base a la masa seca)(Malhotra y Garg, 2020). Con el fin de comparar diferentes pretratamientos, la mayoría de los experimentos se llevaron a cabo a 50°C durante 180 minutos, excepto aquellos en los que se pretendía comprobar el efecto de la temperatura que se realizaron a 121°C durante 60 minutos. La aplicación de temperaturas superiores a 120°C durante tiempos superiores a 60 min podría inducir la producción de intermedios orgánicos solubles recalcitrantes o tóxicos inhibidores (Xing et al., 2022). Después de cada tratamiento, el hidrolizado se centrifugó a 10 000 rpm y 4°C durante 10 min para separar las fracciones líquida y sólida. Se analizaron los sólidos totales y volátiles, y nitrógeno total en ambas fracciones para comprobar los balances de masas. Se determinaron los perfiles de aminoácidos en CRS para calcular la relación N/Proteína y luego en las fracciones líquidas de los hidrolizados para evaluar su calidad, en esta fracción también se determinó la composición de monosacáridos con el objetivo de evaluar la degradación de los mismos. Todos los reactivos y estándares utilizados en este trabajo (HCl, NaOH, glucosa, xilosa, celobiosa, arabinosa, metanol, cloroformo, ácido sulfúrico, ácido húmico), con una pureza superior al 95% o de grado reactivo, fueron adquiridos en Sigma Aldrich (España) y Panreac Applichem (España).

Tabla II: Pretratamientos y condiciones aplicadas.

Método de hidrólisis	Condiciones	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Autohidrólisis (AH)	pH 4.5	180	50
	pH 6.5	180	50
Ultrasonidos + Autohidrólisis (US-AH)	20 kHz, 140 W, 50%	20	50
	pH 4.5	180	50
	pH 6.5	180	50
Térmica (HT)	pH 6.5	60	121
Alcalino (ALK 0,5M)	NaOH 0.5 M	180	50
Alcalino (ALK 1M)	NaOH 1 M	180	50
Térmica + Alcalino (HT+ALK)	NaOH 0.5 M	60	121
	NaOH 1 M	60	121
Acido (AC 0.5M)	HCl 0.5M	180	50
Acido (AC 1M)	HCl 1 M	180	50
Térmica + Acido (HT+AC 0.5M)	HCl 0.5M	60	121
Térmica + Acido (HT+AC 1M)	HCl 1 M	60	121
Ultrasonidos (US-C)	20 kHz, 140 W, 50%	60	50
Ultrasonidos + Alcalino (US+ALK 0.5M)	20 kHz, 140 W, 50% + NaOH 0.5 M	60	50
Ultrasonidos + Alcalino (US+ALK 1M)	20 kHz, 140 W, 50% + NaOH 1 M	60	50

4.3. Procedimiento Experimental

Autohidrólisis y pretratamiento secuencial de ultrasonidos

La autohidrólisis (AH) se llevó a cabo utilizando un agitador rotatorio (Comecta-Ivymen, España) a una temperatura constante de 50°C y una agitación de 250 rpm durante un tiempo de reacción de 180 min (incluyendo el tiempo de calentamiento inicial). Se emplearon dos niveles de pH (4.5 y 6), correspondientes a las condiciones óptimas para las enzimas celulasa y proteasa, que se esperaba pudieran estar presentes en el propio fango (Rojo et al., 2021). Se utilizó NaOH y HCl 6 N para ajustar el pH para evitar la variación de la concentración de biomasa. Estas condiciones operativas, que favorecen la actividad de las enzimas hidrolíticas contenidas en el WAS, fueron seleccionadas según los trabajos de Burgess y Pletschke, (2008) y Carvajal et al., (2013).

Se realizaron experimentos de pretratamiento secuencial por ultrasonidos y autohidrólisis (US-AH) tratando de aumentar la disrupción celular. La suspensión de biomasa al 3.7% (m/m) fue pretratada aplicando ultrasonidos (UIP1000hd, 20 kHz, 50% de amplitud, 140 W, Hielscher Ultrasound Technology, Alemania) utilizando un reactor con camisa de acero que permitía la circulación de agua fría para mantener la temperatura de reacción a 50°C durante 20 min. Tras el pretratamiento con ultrasonidos, la suspensión se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se llevaron a cabo experimentos de autohidrólisis a pH 4.5 y 6, de acuerdo con la descripción de los experimentos de AH anteriores.

Hidrólisis térmica, química, e hidrólisis termo – química asistida.

Para la hidrólisis térmica (HT), se preparó una suspensión de CRS en agua (pH 6.5) y se trató en autoclave a 121°C durante 60 minutos. Para la hidrólisis química, se añadieron volúmenes adecuados de solución de NaOH y HCl (de la concentración seleccionada) a una masa conocida de CRS para obtener la concentración de biomasa de la suspensión al 3.7%. Debido a la menor rigidez de las paredes celulares de los flóculos de los fangos en comparación a las microalgas, se escogieron concentraciones de agentes químicos inferiores a las empleadas en el grupo con microalgas. Se utilizaron dos niveles de concentración para cada reactivo (0.5 M y 1 M) (Chen et al., 2007; Martín Juárez et al., 2021b). Los ensayos se realizaron en un agitador rotatorio a 250 rpm y 50°C con un tiempo de hidrólisis de 180 minutos.

En este estudio también se evaluó la combinación simultánea de hidrólisis química y térmica. La biomasa fue expuesta a 121°C con NaOH y HCl en las mismas condiciones que las descritas en los experimentos de hidrólisis química (0.5 M y 1 M) en autoclave, pero ahora sólo durante 60 minutos (Martín Juárez et al., 2021).

Ensayos con Ultrasonidos (US) y Ultrasonidos asistido en medio alcalino.

El tratamiento ultrasónico se ha empleado como proceso de pretratamiento para mejorar el proceso de digestión anaeróbica de los fangos, debido a las fuerzas de cizallamiento mecánicas, que rompen las paredes celulares, lo que trae aparejado un aumento en los rendimientos de solubilización y recuperación de macrocomponentes.

Los ensayos US+ALK se realizaron con ultrasonidos de baja frecuencia a 20 kHz, potencia de 140 W y tiempos de 1 hora con NaOH (0.5 M y 1 M) como medio de reacción. La temperatura se controló utilizando un reactor con camisa de acero haciendo circular agua fría para mantener la temperatura a 50°C.

4.4. Estimación de los rendimientos de solubilización y recuperación

Para evaluar la solubilización (Ec.1) y el rendimiento de recuperación (Ec.2) de los componentes contenidos en la biomasa y, por tanto, las pérdidas relacionadas con la degradación de cada componente evaluado (Ec.3), se definieron los siguientes parámetros:

$$\text{Rendimiento de solubilización (\%)} = \left(\frac{\text{g componente en RB} - \text{g componente en PRS}}{\text{g componente en RB}} \right) 100 \quad \text{Ec.1}$$

$$\text{Rendimiento de recuperación (\%)} = \left(\frac{\text{g componente en PRL}}{\text{g componente en RB}} \right) 100 \quad \text{Ec.2}$$

$$\text{Pérdida componente i (\%)} = \left(1 - \left(\frac{\text{g componente en PRL}}{\text{g componente en RB} - \text{g componente en PRS}} \right) \right) 100 \quad \text{Ec.3}$$

Donde: PR (pretratamiento), RB (Masa seca inicial), PRS (Fracción sólida separada después de los pretratamientos) y PRL (Fracción líquida separada después de los pretratamientos).

Las diferencias significativas entre los rendimientos medios de solubilización y recuperación obtenidos por los diferentes niveles de severidad en los experimentos de hidrólisis (tabla I), se determinaron mediante la prueba de Rangos Múltiples de Duncan (considerando un nivel de confianza del 95%). Todos los datos fueron analizados empleando el software Statgraphics Centurion 19.0.

4.5. Métodos Analíticos

Análisis de sólidos totales y volátiles

Para comprobar los balances de materia se determinaron los sólidos totales y volátiles (material calcinable formado principalmente por materia inorgánica y orgánica) tanto de la biomasa inicial previa a la hidrólisis como de las fracciones sólidas obtenidas tras el proceso de hidrólisis.

Para la determinación del contenido de humedad se llevó a cabo un análisis de sólidos totales, secando 2 g de biomasa a 105°C hasta peso constante. Mediante calcinación de la biomasa a 550°C durante 24 h se determinó el contenido de sólidos volátiles. (PNT-16-01 Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente)

Análisis de nitrógeno total y proteínas

El método que más se utiliza para la determinación de nitrógeno en fangos residuales es el método Kjeldahl, ya que es un método que determina nitrógeno orgánico y el amonio.

Este es un método donde en presencia de ácido sulfúrico concentrado y un catalizador Kjeldahl, el nitrógeno, al igual que el amoníaco libre y las sales de amonio se convierten en sulfato de amonio, la materia orgánica se oxida a dióxido de carbono y agua por ebullición con ácido sulfúrico, mientras este último se reduce a dióxido de azufre. De esta forma el nitrógeno se convierte en sulfato de amonio, el cual luego de la alcalinización, se convierte en amoníaco (Baird et al., 2017).

El contenido en proteínas de la biomasa inicial CRS y de la fracción sólida tras los tratamientos aplicados, se calcula aplicando la relación Proteína/Nitrógeno de 4.0 calculado a partir del perfil de aminoácidos obtenido para el CRS. (Templeton & Laurens, 2015; Tomé et al.)

Experimentalmente el método Kjeldahl se llevó a cabo añadiendo 0.2 g de muestra sólida en un tubo digestor junto con 6 mL de H_2SO_4 98% y una pastilla de catalizador Kjeldahl (0.3% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Los tubos se colocaron en el digestor y se llevó a cabo una digestión durante 3 horas mediante una rampa de temperatura (150, 270 y 370°C). Finalizada la digestión se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 1h.



Figuras 4.2A, 4.2B y 4.2C: Equipo digestor A, equipo de Destilación B y valoración de la muestra.

Una vez que las muestras estaban digeridas (apariencia transparente) y enfriadas se pasó a la unidad de destilación (KjeFlex K-360), recogiendo el destilado sobre un exceso de ácido bórico. Una vez concluido el destilado, se valora con ácido sulfúrico 0.1 N hasta que en la muestra se observe el cambio de color de verde a violeta lo que indica que en este momento se ha alcanzado el punto final de la valoración.

A partir del volumen de ácido sulfúrico gastado y su concentración se puede determinar la cantidad de nitrógeno presente en la muestra según las ecuaciones indicadas:

$$\text{mg N/kg} = (N \cdot V) \cdot 14000/g$$

$$\%N = (N \cdot V) \cdot 14/10 \cdot g$$

Donde:

N: normalidad del ácido sulfúrico empleado

V: volumen de ácido sulfúrico consumido en la valoración

g: gramos de muestra real empleada.

Para la fase líquida se sigue el mismo procedimiento sustituyendo los 0.2 g de muestra sólida por 2 mL de muestra líquida.

Finalmente, para calcular el porcentaje de proteína basta con multiplicar el % de nitrógeno calculado por un factor de 4 obtenido previamente a partir del perfil de aminoácidos de la biomasa inicial.

Análisis de carbohidratos

Los carbohidratos son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas y están compuestos por una o varias unidades de monosacáridos. Todos los carbohidratos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos siendo esta hidrólisis favorecida con el aumento de la temperatura. El contenido de carbohidratos de la biomasa inicial y de las fracciones sólida se determinó como monosacáridos totales utilizando un procedimiento del NREL descrito por (Martín-Juárez et al., 2019) que consiste en la hidrólisis ácida de los carbohidratos presente en la biomasa y posterior cuantificación de los monosacáridos generados mediante HPLC.

En primer lugar, se sometieron 300 mg de biomasa húmeda a una hidrólisis ácida concentrada durante 1 hora añadiendo 3 mL de H₂SO₄ al 72% en peso a 35°C. A continuación, se añadieron 84 mL de agua destilada para diluir la concentración del ácido al 4% en peso y las muestras se sometieron a 121°C durante 1h en autoclave. Después se separaron las fracciones sólidas y líquida y, finalmente, la fracción líquida resultante se filtró con filtros de membrana de nylon de 0.22 µm para determinar el contenido de monosacáridos mediante HPLC-IR.

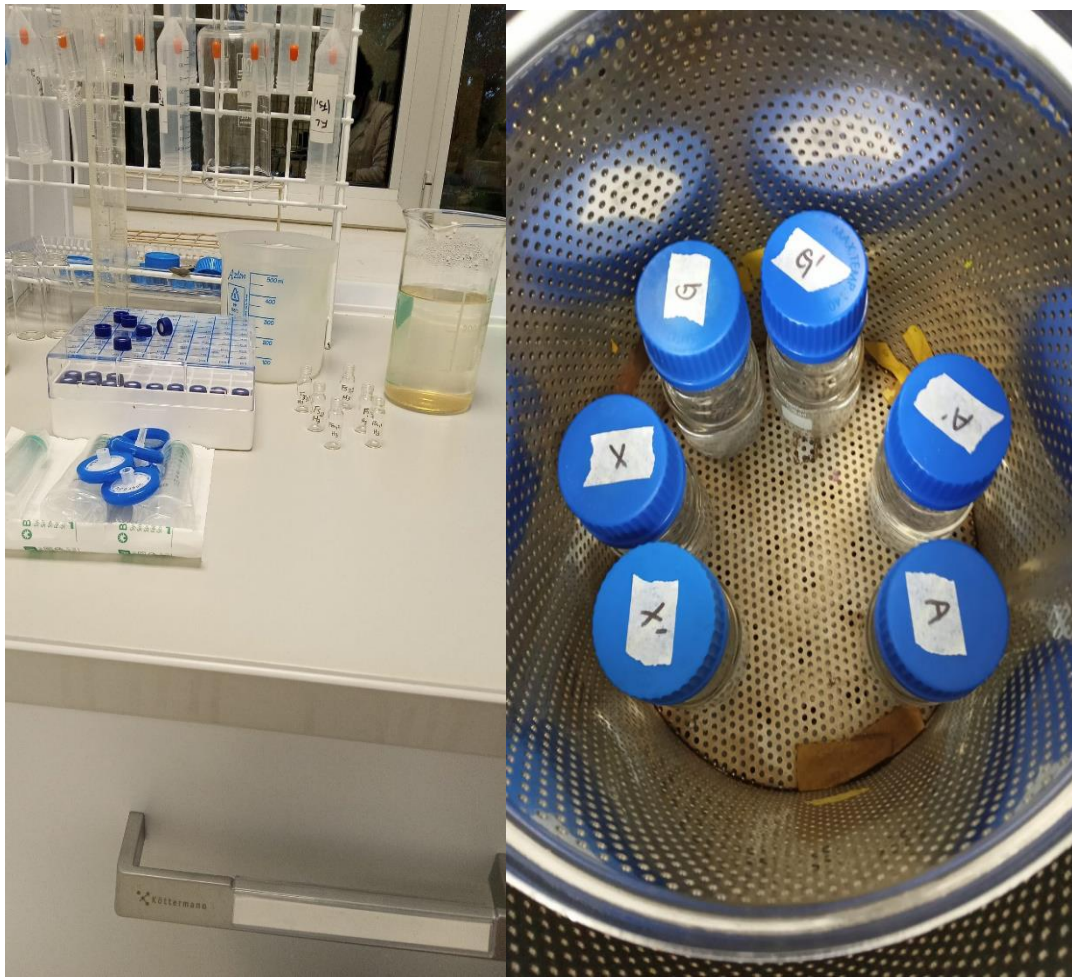


Figura 4.3: Equipamiento empleado para la cuantificación de carbohidratos.

Los principales monosacáridos se cuantificaron en las fracciones líquidas (obtenidas tras los experimentos de hidrólisis aplicadas y las fracciones líquidas procedentes de la hidrólisis ácida de los sólidos), utilizando una columna de exclusión iónica Aminex HPX-87H (Bio-RAD) (300 x 7.8 mm, 9 μ m tamaño de partícula, rango de pH 1-3) instalada en un módulo de separación Shimadzu LC. Se utilizó un detector de índice de refracción (Waters 2414) para cuantificar la concentración de monosacáridos obtenidas en las fracciones líquidas (las fracciones líquidas de las hidrólisis y las fracciones líquidas de la hidrólisis ácida de los sólidos). Se empleó como fase móvil una solución acuosa 25 mM de H₂SO₄ a un flujo de 0.6 mL/min y a 50°C.

Para la cuantificación se utilizaron estándares individuales externos de glucosa, xilosa, celobiosa y arabinosa disponibles comercialmente con una pureza > 95% en concentración de 0.5 mg/mL a 2 mg/mL. Adicionalmente se calcularon los factores de corrección debido a la posible degradación producida durante la hidrólisis ácida de cada de los monosacáridos, para el cálculo final del contenido de carbohidratos, se sometieron

al mismo tratamiento de hidrólisis ácida con H₂SO₄ a las muestras comerciales de glucosa, arabinosa, celobiosa y xilosa. Finalmente, el contenido de carbohidratos se calculó como la suma de todos los monosacáridos (glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa).

El calibrado de monosacáridos que se realizó con multipatrón, así como la degradación de los mismos, este resultado se encuentra en los Anexos.

El porcentaje de carbohidratos se obtiene según las ecuaciones siguientes:

$$\text{Azúcar (mg/ml)} = \frac{\text{Área} - \text{Pendiente}}{\text{Ordenada}}$$

$$\begin{aligned} \text{Azúcar (mg)} &= \frac{\text{Azúcar (mg/L)} \cdot 87 \text{ mL}}{\text{Factor}} \rightarrow \% \text{Azúcar} \\ &= \frac{\text{mg Azúcar/mg biomasa}}{10} \end{aligned}$$

$$\% \text{CH} = \sum \% \text{Azúcar}$$

Análisis de aminoácidos totales.

Se determinó el perfil de aminoácidos totales de la biomasa inicial y de las fracciones líquidas para obtener la composición de aminoácidos según los estándares analíticos internos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI-UVa) descrito por (Rojo et al., 2021a). Las muestras se hidrolizaron con HCl 6 N en atmósfera inerte. A continuación, se eliminó el medio ácido utilizando N₂ hasta sequedad. Las muestras se volvieron a suspender en HCl 0.1M y la solución final se filtró con filtros de membrana de nylon de 0.22 μm. Las muestras se sometieron a una derivatización previa a la columna con ortoftalaldehído (OPA) y cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC). El análisis se realizó por HPLC utilizando una columna Zorbax Eclipse AAA de 4.6 × 150 mm y 3.5 μm, con fases móviles A (Buffer NaH₂PO₄-H₂O pH 7.8) y B (Acetonitrilo:metanol:milliQ 45:45:10), y un detector UV.

Análisis de ácidos húmicos

La determinación de los ácidos húmicos se llevó a cabo por el método de gravimetría adaptado de los protocolos de extracción alcalina y precipitación ácida descritos por: (Javanshah y Saidi, 2016) basado en la solubilización que presentan estos compuestos en medio fuertemente alcalino y posterior precipitación a pH ácido, estos análisis se realizaron en la biomasa inicial y en las muestras obtenidas posterior a las hidrólisis. Experimentalmente los ácidos húmicos se obtuvieron tratando la biomasa con NaOH 0.5 M en proporción 1:15 (w/v) (x2). Se agitó mecánicamente durante 30 minutos a 500 rpm y se centrifugó a 10 000rpm x 10 minutos. El líquido sobrenadante se pasa a un tubo falcón y el sólido residual se vuelve a someter a una extracción con NaOH 0.5M hasta obtener un sobrenadante líquido transparente. Una vez obtenido el extracto líquido con NaOH se adiciona HCl 6 N hasta pH 2 y se deja en reposo durante 24 h para conseguir una completa precipitación de los ácidos húmicos. Estos se separan del líquido sobrenadante por centrifugación y se secan en una estufa durante 2h a 50°C. Finalmente, el precipitado resultante es pesado. El % de ácidos húmicos en la biomasa inicial se obtuvo como:

$$\% \text{ Ácidos húmicos } \left(\frac{W}{W} \right) = \frac{m_{\text{humicos+tubo}} - m_{\text{tubo}}}{m_{\text{fango seco}}} \cdot 100$$

Determinación del tamaño de los péptidos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-Page)

Las fracciones líquidas resultantes de las hidrólisis se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-page) según el método descrito por (Rojo et al., 2021a). La electroforesis SDS-page con Tris-Glicina se realizó utilizando una unidad de electroforesis Mini-PROTEAN (laboratorios Bio-Rad, EE.UU.) y un gel Mini-PROTEAN 10-20% Tris-Glicina Precast (laboratorios Bio-Rad, EE.UU.). La separación de proteínas se realizó según las instrucciones del fabricante. Las muestras de las fracciones líquidas (20 µL) se mezclaron con 20 µL de una solución compuesta por Laemmli y 50 mM de reactivo de Cleland (DTT, ditiotretol) y se calentaron a 100 °C durante 5 min. A continuación, se cargaron 30 µL en los geles prefabricados de la unidad de electroforesis llenos de running buffer 1x Tris/Glicina/SDS (25 mM de Tris, 192 mM de tricina y 0.1% de SDS, pH 8.3). Las condiciones de funcionamiento se ajustaron a una

tensión constante de 200 V. La corriente eléctrica inicial fue de 60 mA y la final de 30 mA. Se utilizó el marcador de proteínas VI (10-245 kDa) prestained (Panreac AppliChem) como marcador molecular con un rango de tamaño de proteínas de 10 - 250 kDa para identificar los tamaños moleculares obtenidos se llevó a cabo una recta de calibración según el R_f (distancia de migración de la proteína/distancia de migración del estándar). Anexos.

Las bandas de proteínas se fijaron durante 30 minutos con una solución fijadora (40% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético), seguida de tinción (0.1% p/p de Coomassie Blue R-250, 40% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético) durante 24 horas en un agitador orbital. Por último, los geles se destiñeron con una solución (destaining solution) compuesta por 400 mL metanol, 100 mL de ácido acético y 500 mL de agua.

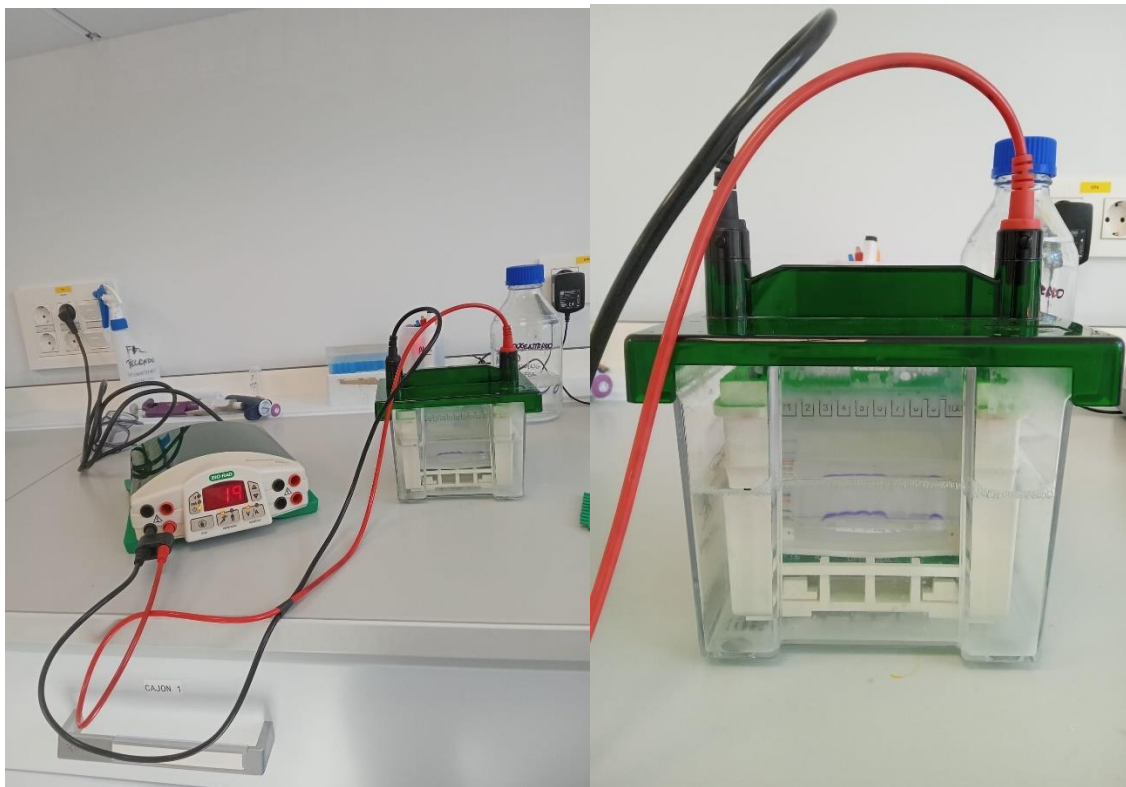


Figura 4.4: Equipamiento empleado en la determinación del tamaño de los péptidos.

Análisis de lípidos

La determinación de lípidos totales (en la biomasa inicial) se llevó a cabo según el método de extracción con cloroformo-metanol propuesto por Bligh y Dyer según (Lee et al., 2020). Se mezcló 1 g de fango con 20 mL de extractante compuesto por una mezcla de cloroformo: metanol 2:1 v/v y se sometió a incubación a 60 °C durante 1 h. A

continuación, la mezcla se colocó en una centrífuga durante 15 min a 10.000 rpm y la fase extractante se transfirió a un vial de vidrio previamente seco y pesado. Tras evaporar el disolvente a 60 °C, se pesó el vial. El contenido de lípidos se obtuvo según:

$$\% \text{ Lípidos } \left(\frac{W}{W} \right) = \frac{m_{\text{lípidos+tubo}} - m_{\text{tubo}}}{m_{\text{fangos seco}}} \cdot 100$$

5. Resultados y Discusión

5.1. Composición inicial CRS.

En la Figura 5.1 se muestra la composición inicial de la biomasa de fangos secundarios centrifugada en cenizas (ASH, en inglés), Ácidos húmicos, Xilosa, Glucosa, Carbohidratos, Lípidos y Proteínas, todos ellos en por ciento y expresados en base seca.

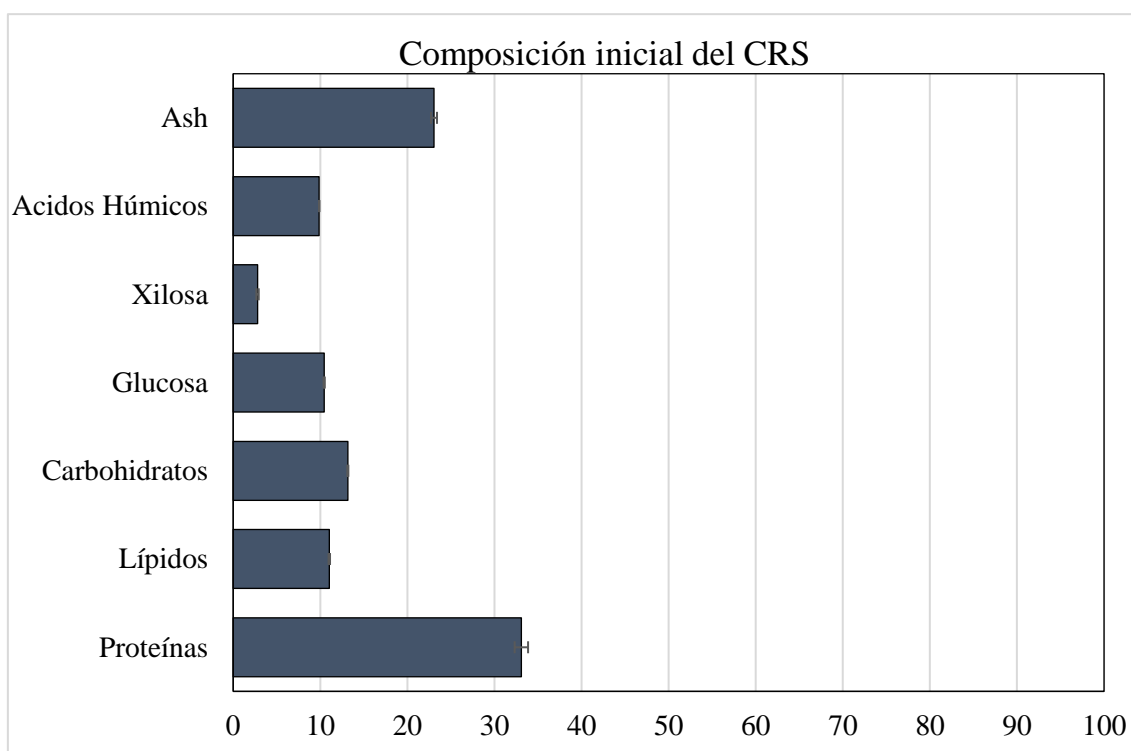


Figura 5.1: Composición inicial de la biomasa expresado como el promedio de las tres muestras analizadas, los resultados se expresan en % y en base seca.

En términos generales, estos fangos están compuestos por un 23.1% de compuestos inorgánicos y 76.9% de materia orgánica, de la cual se han identificado como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos húmicos el 67.2% del total de esta, siendo el resto otros compuestos, como pueden ser ácidos grasos volátiles, entre otros. Se observa que dentro de la materia orgánica las proteínas fueron las macromoléculas más abundantes, debido a su presencia en las células de los microorganismos que componen el WAS y en las EPS.

La composición de estos fangos se encuentra en concordancia a lo reportado en la literatura para este tipo de biomasa, (Xiang et al., 2017b), obtiene un 33.3 ± 0.6 con respecto a las proteínas (en base seca),(N. Gao et al., 2020), realiza un estudio sobre las composiciones de los fangos (primarios y secundarios)(en base seca), Obtuvieron unas composiciones de los fangos WAS de: carbohidratos 7-9.5%; proteínas 33-41%; grasas 5-12%; y un pH comprendido entre 6.5 y 8.0 y se consideraron adecuados para valorización. Los fangos que se han empleado en este trabajo, se hallan en el rango de composición de otros reportados en la literatura y que fueron considerados adecuados para su valorización fraccionada.

5.2. Efecto de los tratamientos en la solubilización de Proteínas y Carbohidratos.

Los resultados que se observan en la figura 5.2, muestran las solubilizaciones de carbohidratos y proteínas obtenidas en cada experimento de hidrólisis con respecto a la composición inicial.

Los mayores rendimientos de solubilización para proteínas y carbohidratos, se obtuvieron con el método combinado US+ALK, (NaOH 1M, 1h, 50°C, 20kHz, 140W, 50%Amplitud) donde se logra solubilizar más del 94% de los carbohidratos y más del 97% de las proteínas. Hui et al., 2022a, también aplicaron US + ALK para extraer proteínas a partir de WAS, pero en condiciones más suaves. Ellos trabajaron a pH 12 ajustado con NaOH 10 M, 60°C y duración de ultrasonidos de 24 minutos, logrando aumentar la solubilización de las proteínas y el rendimiento de extracción de las mismas hasta en un 81.4%. El mismo método combinado, pero con NaOH 0.5M proporcionó resultados de solubilización muy similares 95.2% de proteínas y 91.23% de carbohidratos, por lo que se puede concluir que en este caso la concentración del álcali no es relevante en la solubilización de proteínas y carbohidratos. (Tian et al., 2018) en su trabajo, obtuvieron también que un aumento en la concentración de NaOH no se traduce en un aumento de la solubilización de la materia orgánica en general, y además demostraron el efecto sinérgico que se produce al combinar ALK (0.05M) con US (140W, 20kHz, 9 min, 80% Amplitud), debido al aumento en el rendimiento de solubilización en comparación a lo obtenido bajo las mismas condiciones, pero en los métodos individuales.

En orden decrecientes de solubilización de proteínas le sigue otro método combinado HT+ALK a concentraciones de 1M NaOH, 121°C y 1h, con el cual se logran solubilizar aproximadamente el 96% de las proteínas iniciales, pero sólo el 70% de los carbohidratos iniciales. Nuevamente el mismo método combinado, usando NaOH, a 0.5M, proporcionó solubilizaciones muy similares, 94.7% de proteínas y 71.0% de carbohidratos, por lo que se aprecia que la concentración del álcali no afecta los rendimientos de solubilización de carbohidratos y proteínas, en el rango estudiado. Sin embargo, si para NaOH 1M, comparamos los resultados a 121°C y 1h con los de 50°C durante 3h, obtenemos que las solubilizaciones disminuyen 1.37 veces para los carbohidratos y 1.27 para las proteínas. Otra vez, la concentración de NaOH tiene escasa influencia en los rendimientos de solubilización.

El método HT+AC (1M HCl, 1h, 121°C) proporcionó elevados rendimientos de solubilización de carbohidratos 94.1%, similares a los de US+ALK (no existen diferencias significativas entre los dos métodos), pero menores rendimientos de solubilización de proteínas (70.5%) en comparación con HT+ALK y US+ALK.

En los trabajos de (Martin Juárez et al., 2021b), realizados en biomasa de microalgas cultivadas en aguas residuales, se muestra que la concentración del HCl es un factor importante para la solubilización de carbohidratos, en este caso se emplearon condiciones semejantes de trabajo (0.5M y 2M de HCl, 1 h y 121°C). Obtuvieron un aumento en los rendimientos de solubilización de carbohidratos al pasar de 0.5 a 2M (71% a 98%). Adicionalmente mostraron la selectividad del método ácido para solubilizar carbohidratos con respecto al método alcalino el cual es más selectivo a la solubilización de proteínas.

En este trabajo no se trabajó con HCl 2M debido a las diferencias en las estructuras de las células que componen las microalgas (mayor rigidez debido a las condiciones extremas que soportan) y los fangos. El rendimiento de solubilización de carbohidratos aumentó 1.15 veces al aumentar la concentración del ácido de 0.5 a 1M, bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempos, sin embargo, el rendimiento de solubilización aumentó 1.60 veces, al mantener la concentración (1M) y variar la temperatura de 50°C a 121°C, a pesar de la reducción del tiempo de 3h a 1h. Por lo que se podría plantear la hipótesis que en los WAS las concentraciones estudiadas de los agentes químicos no parecen tener efecto en los rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos, mientras que las temperaturas y el tiempo empleado sí.

La metodología HT+AC (HCl 0.5M) (de los métodos ácidos fue el de mayor solubilización 72.5%) tuvo un rendimiento proteico de solubilización 1.40 veces inferior al obtenido en US+ALK (NaOH 1M), 1.37 con respecto a US+ALK (NaOH 0.5M) y 1.38 veces inferior en comparación con el método HT+ALK (NaOH 1M). Al comparar este (HT+AC) (HCl 0.5M) con AC 0.5M, se obtiene que la concentración no afecta los rendimientos de solubilización de proteínas.

El resto de los métodos empleados, tienen menor rendimiento de solubilización de carbohidratos y proteínas, siendo consecuente con la bibliografía, que le atribuyen los menores rendimientos a los métodos físicos y biológicos de forma individual. (Babu et al., 2021; Safi et al., 2014).

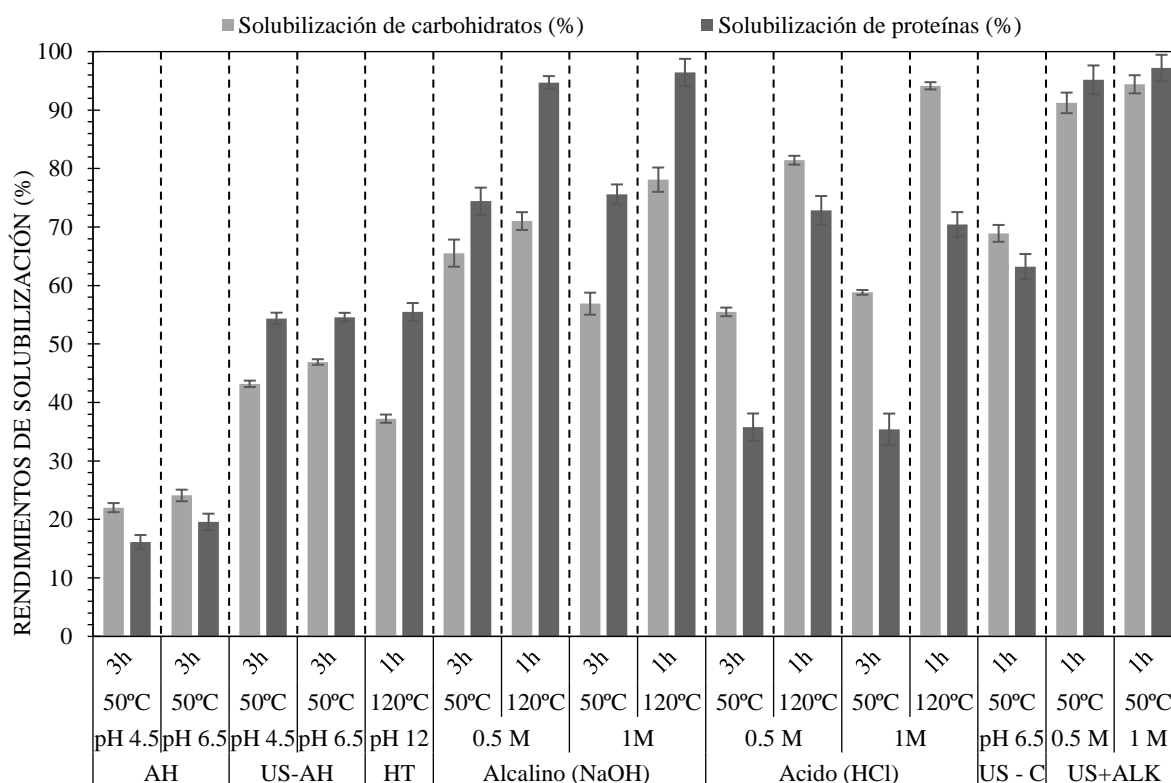


Figura 5.2: Rendimientos de solubilización en % de carbohidratos y proteínas, en los métodos de hidrólisis aplicados a la biomasa (3.7% w/w) respecto a la cantidad inicial de carbohidratos y proteínas en CRS. Tratamiento **Bio-enzimático**: Autohidrólisis (AH): pH 6.5; pH 4.5; 50°C; 3h. **Tratamiento térmico** (HT): 121°C; 1h. **Hidrólisis alcalina y térmico-alcalino asistido**: NaOH (0.5M y 1M) a 50°C 3h y NaOH (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Hidrólisis ácida y térmico-ácido asistido**: HCl (0.5M y 1M) 50°C, 3h y HCl (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Método físico**: Ultrasonidos (US-C, 20kHz, 140 W, 50% Amplitud, pH 6.5); **Ultrasonido Alcalino Asistido** (US+ALK): NaOH (0.5M y 1M), 50°C, 1h. Los resultados se expresaron como medias \pm desviaciones estándar de 2 determinaciones analíticas.

El porcentaje solubilizado de los dos monosacáridos mayoritarios en el fango se presenta en la Figura 5.3.

Se puede observar que el comportamiento de los rendimientos de solubilización sigue un comportamiento similar al realizado para los carbohidratos de forma general, siendo el método US+ALK a NaOH 1M el de mayor rendimiento de solubilización de xilosa, mientras que el método HT+AC a 1M es el mayor rendimiento de glucosa obtiene.

Es importante destacar que se observan casos en los que las solubilizaciones entre esta pentosa y la hexosa no es semejante, estos casos son los tratamientos con álcalis y los que se asisten con ultrasonidos, en ellos puede verse que se solubiliza más xilosa que glucosa siguiendo el mismo patrón que la solubilización de proteínas, antes analizada. En los tratamientos ácidos el monosacárido de mayor solubilización es la glucosa. Este hecho puede estar condicionado por la existencia de glucoproteínas, las cuales se conocen que son abundantes en las células de algunos animales y que proveen estabilidad a la unidad celular, dentro de los monosacáridos que pueden formar las glucoproteínas se encuentran la β -D-Glucosa y la Xilosa, en estos WAS, todo indica que la xilosa está unida a cadenas de proteínas y se libera al medio bajo las mismas condiciones que aumentan la liberación de proteínas, es por ello que se explica que en el método US+ALK a 1M se obtengan las mayores solubilizaciones de xilosa y proteínas.

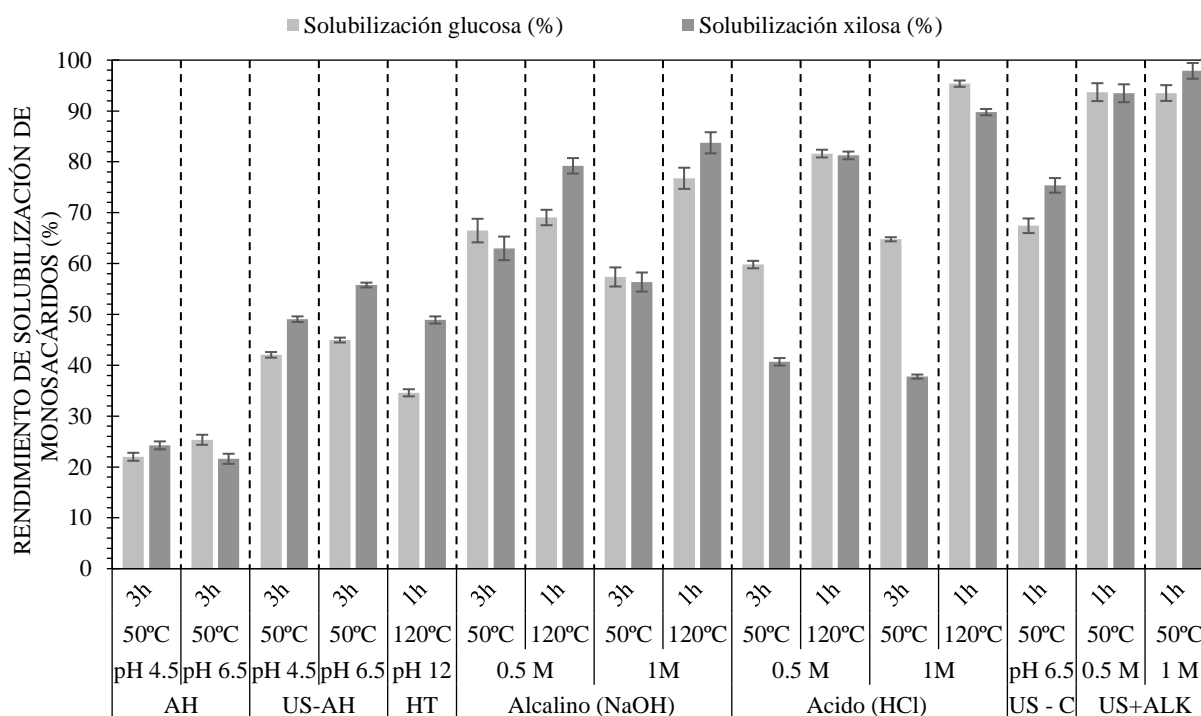


Figura 5.3: Rendimientos de solubilización en % de monosacáridos, posterior a los métodos de hidrólisis aplicadas a la biomasa (3.7% w/w) respecto a la cantidad inicial de glucosa y xilosa en CRS. Tratamiento **Bio-enzimático**: Autohidrólisis (AH): pH 6.5; pH 4.5; 50°C; 3h. **Tratamiento térmico** (HT): 121°C; 1h. **Hidrólisis alcalina y térmico-alcalino asistido**: NaOH (0.5M y 1M) a 50°C 3h y NaOH (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Hidrólisis ácida y térmico-ácido asistido**: HCl (0.5M y 1M) 50°C, 3h y HCl (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Método físico**: Ultrasonidos (US-C, 20kHz, 140 W, 50% Amplitud, pH 6.5); **Ultrasonido Alcalino Asistido** (US+ALK): NaOH (0.5M y 1M), 50°C, 1h. Los resultados se expresaron como medias \pm desviaciones estándar de 2 determinaciones analíticas.

De forma general los métodos se evaluaron teniendo en cuenta los balances de materia, y se obtuvo que el método que mayor solubilización con respecto a la composición inicial de SV (95.2%), ST (89.5%) y ASH (74.1%) fue el US+ALK a 1M, solo se obtuvieron balances negativos para el experimento ALK a 0.5M y esto puede estar relacionado con la formación de sales durante el tratamiento con álcalis.

5.3. Efectos de los tratamientos en la recuperación de Proteínas. Composición de aminoácidos y tamaño de péptidos.

El rendimiento de recuperación de los macrocompuestos de interés viene dado por dos factores contrapuestos, el rendimiento de solubilización conseguido en el pretratamiento, y las pérdidas por degradación de los componentes solubilizados. En general, un aumento en la severidad del pretratamiento aumenta el rendimiento de solubilización, pero puede suponer una mayor degradación de los compuestos de interés, debido a las condiciones de operación aplicadas. Por otra parte, los compuestos liberados pueden ser también degradados por los microorganismos presentes en la biomasa, así, pretratamientos severos, con un efecto esterilizante pueden también resultar en pérdidas por degradación.

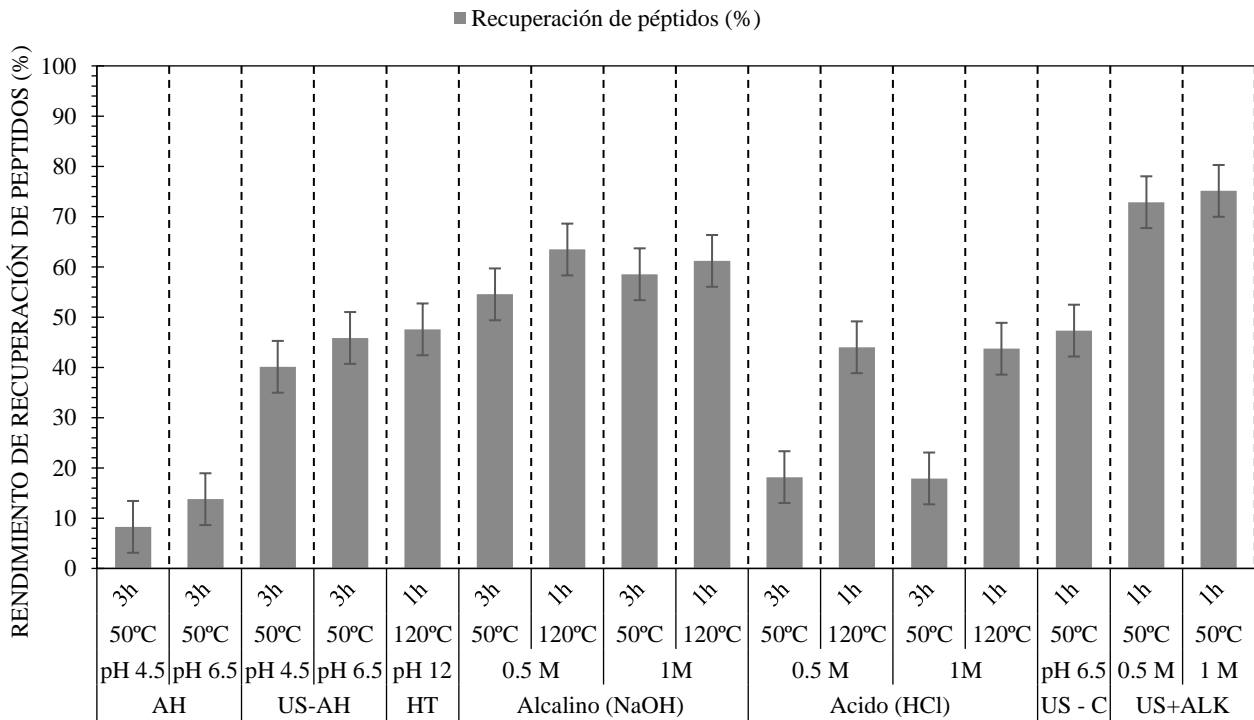


Figura 5.4: Rendimientos de recuperación (%) de péptidos en referencia a las fracciones líquidas tras los tratamientos de hidrólisis aplicados (3.7% w/w). Tratamiento **Bio-enzimático**: Autohidrólisis (AH): pH 6.5; pH 4.5; 50°C; 3h. **Tratamiento térmico** (HT): 121°C; 1h. **Hidrólisis alcalina y térmico-alcalino asistido**: NaOH (0.5M y 1M) a 50°C 3h y NaOH (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Hidrólisis ácida y térmico-ácido asistido**: HCl (0.5M y 1M) 50°C, 3h y HCl (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Método físico**: Ultrasonidos (US-C, 20kHz, 140 W, 50% Amplitud, pH 6.5);

Ultrasonido Alcalino Asistido (US+ALK): NaOH (0.5M y 1M), 50°C, 1h. Los resultados se expresaron como medias \pm desviaciones estándar de 2 determinaciones analíticas.

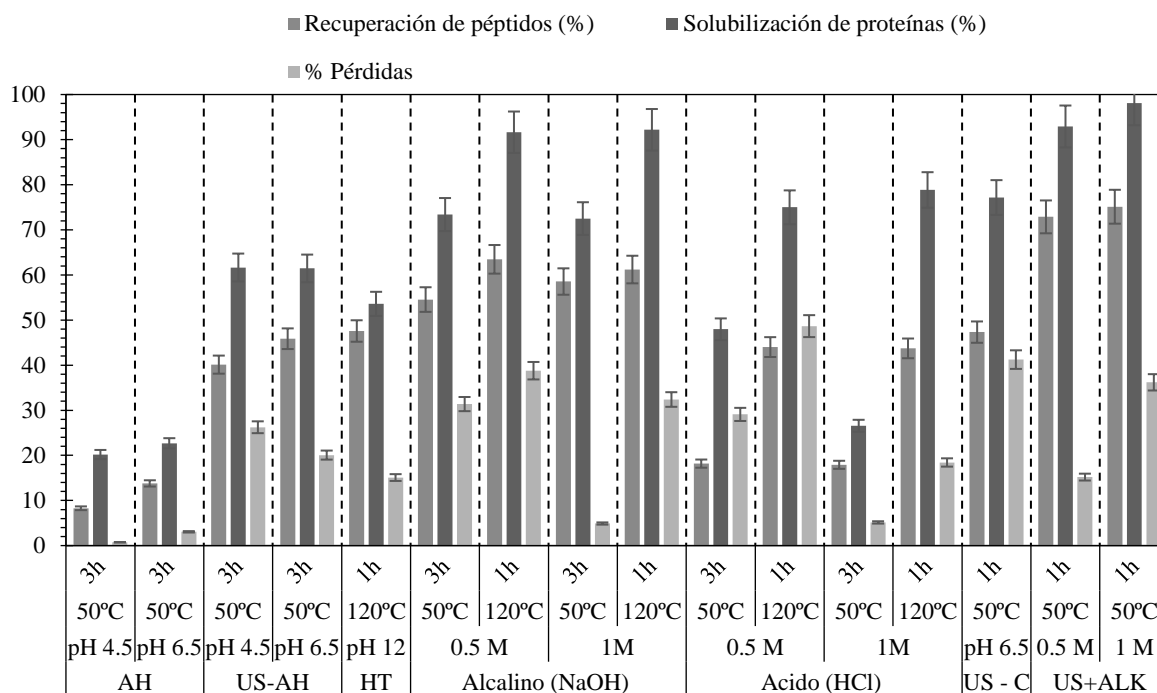


Figura 5.5: Rendimientos de recuperación (%) de péptidos, solubilización de proteínas % y pérdida de componente % (3.7% w/w). Tratamiento **Bio-enzimático**: Autohidrólisis (AH): pH 6.5; pH 4.5; 50°C; 3h. **Tratamiento térmico** (HT): 121°C; 1h. **Hidrólisis alcalina y térmico-alcalino asistido**: NaOH (0.5M y 1M) a 50°C 3h y NaOH (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Hidrólisis ácida y térmico-ácido asistido**: HCl (0.5M y 1M) 50°C, 3h y HCl (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Método físico**: Ultrasonidos (US-C, 20kHz, 140 W, 50% Amplitud, pH 6.5); **Ultrasonido Alcalino Asistido (US+ALK)**: NaOH (0.5M y 1M), 50°C, 1h. Los resultados se expresan como \pm la media de dos mediciones analíticas.

En la Figura 5.4 se muestran los rendimientos de recuperación de péptidos a partir de la fracción proteica de los fangos, en las fases líquidas resultantes de las hidrólisis y en la figura 5.5 se muestran las pérdidas de componente en comparación a la solubilización de proteínas y recuperación de péptidos.

Los resultados que se muestran en la figura 5.4 muestran que el método US+ALK (1M NaOH, 50°C, 1h, 140 W, 20 kHz, 50% Amplitud), es el que ofrece los mejores rendimientos de recuperación, con un rendimiento superior al 75%, le sigue el mismo método a 0.5M logrando recuperar el 73% de los péptidos. En el estudio de (J. Gao et al., 2021) se obtienen rendimientos de recuperación de proteínas del 81,4%, empleando las

condiciones de pH 12, ajustado con NaOH 10M, potencia 20kHz, variando el tiempo empleado para el ultrasonido (24 min), además los autores demostraron que este método mejora la deshidratación de los fangos lo que favorece los tratamientos posteriores. (Martín Juárez et al., 2019), obtuvieron mejoras significativas en el rendimiento proteico de recuperación al aumentar el tiempo de ultrasonidos de 5 minutos (479W) a 21 minutos (115W). Este método US+ALK (a 0.5M y 1M de NaOH), logró recuperar 1.6 veces más péptidos en comparación con el método US-C, a su vez fue 1.2 veces más eficiente que HT+ALK, sin embargo, al analizar las diferencias en los rendimientos proteicos de recuperación entre los tratamientos HT+ALK y ALK, se observa que solo existen diferencias significativas al variar la temperatura del proceso, y no cuando se varían las concentraciones. La misma tendencia siguen los tratamientos HT+AC y AC, ya que no se aprecian aumentos considerables de recuperación de proteínas al aumentar las concentraciones bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los métodos ácidos, en cualquiera de sus variantes no tuvieron elevados rendimientos de recuperación siendo estos inferiores, en todos los casos, al 45%.

Al analizar la figura 5.5, se observa que el método US+ALK a 1M es el de mayor solubilización de proteínas lo que se tradujo en un elevado rendimiento de recuperación de péptidos, sin embargo, sus pérdidas son más elevadas que su similar a 0.5M, aunque no existen diferencias considerables entre lo obtenido con cada uno de los métodos respecto a las solubilizaciones y las recuperaciones, sí las hay entre las pérdidas de componente ya que con 0.5M hay aproximadamente un 40% menos de pérdida de componente con respecto a lo obtenido a 1M.

Los métodos HT+ALK y ALK tienen bajas recuperaciones si el patrón de comparación es US+ALK 1M, sin embargo, las pérdidas son bajas (al igual que en HT+AC y AC a 1M), lo que indica el efecto esterilizante que se ha producido por la combinación del álcali y las elevadas temperaturas. En un estudio realizado sobre biomasa de microalgas cultivadas en aguas residuales realizado por el grupo de investigación, obtuvieron que el efecto esterilizante se produjo en los métodos HT+AC y HT+ALK, ambos a 2M, 121°C, 1h, debido a que no encontraron ADN bacteriano en las muestras hidrolizadas producto de la total desintegración de las estructuras bacterianas y le atribuyen las pérdidas a la ocurrencia de reacciones químicas secundarias que pueden establecerse como las reacciones de Maillard (Martín Juárez et al., 2016; Rojo et al., 2021b). Estas reacciones son complejas y afectan en mayor medida los tratamientos básicos siendo el pH, las

elevadas temperaturas y la elevada composición en monosacáridos factores importantes para que estas ocurran (Yang et al., 2022a, 2022b), estas afectan la calidad y cantidad de las proteínas que se logran recuperar, por lo que es un elemento importante a tener en cuenta en el momento de aplicar los tratamientos.

De forma general el método US+ALK a 1M fue el que mejores rendimientos de recuperación ofreció. Las pérdidas más bajas se obtuvieron con US+ALK a 0.5M. Con el empleo de la combinación de Ultrasonidos con Álcalis se consigue: aumentar la liberación de las proteínas al medio, disminuir las degradaciones que se producen cuando no se logra destruir las estructuras bacterianas y se consumen los productos de la solubilización como acción de los microorganismos para mantener su integridad y se disminuyen las reacciones paralelas debido al empleo de temperaturas inferiores.

Composición de los péptidos y evaluación de los tamaños obtenidos de los mismos.

El perfil de Aminoácidos del CRS inicial, así como el de las fracciones líquidas obtenidas tras los tratamientos de hidrólisis y pretratamientos, se muestran en la Tabla III.

El método US+ALK (1M NaOH, 50°C, 1h), es en el que se recuperaron mayor cantidad de péptidos de tamaños considerables, comprendidos en los rangos de 70 a 214 kDa, lo cual está relacionado con que este método fue el de mayor rendimiento de recuperación de péptidos, además según su perfil de AA este se compuso por un 40% de EAA y un 60% de NeAA

En orden decreciente de tamaño de péptidos obtenidos, le siguen los métodos HT-ALK y ALK, obteniéndose los tamaños más considerables con el método HT+ALK (1M, 1h, 121°C), al compararlos con los obtenidos a la misma concentración, pero diferentes temperaturas y tiempos, se aprecia que no existen diferencias significativas en el tamaño de los péptidos recuperados, y al igual que los tratamientos US+ALK estos fueron más abundantes en NeAA que en AA.

Se comprueba además que las hidrólisis ácidas, en cualquiera de sus variantes, no reporta péptidos, por lo que cabe esperar que todas las fracciones proteicas recuperadas se encuentren en forma de aminoácidos. Esto demuestra el grado alto de hidrólisis que se obtuvo con los tratamientos ácidos, que provocó una degradación de las proteínas. (En la tabla III no se ofrecen los datos de AA libres, debido a que en el marco del desarrollo de este trabajo no se analizaron, en desarrollos posteriores de la investigación por parte del grupo de trabajo se profundizará en esta área)

Los tratamientos AH, US+AH y HT, recuperaron péptidos de bajo tamaño, en todos los casos, el perfil de AA fue predominante en EAA, lo que es favorable en el diseño de fertilizantes, sin embargo, estos métodos no logran obtener un rendimiento de solubilización o recuperación de proteínas considerables.

El tamaño de los polipéptidos recuperados proporciona las propiedades funcionales necesarias para su aplicación industrial (20kDa a 450 kDa), favoreciendo por ejemplo la formación de espumas. Estos resultados muestran que estos péptidos recuperados tras los métodos de hidrólisis US+ALK (NaOH 0.5M y 1M, 50°C, 1h, 140W, 20 kHz, 50% Amplitud), HT+ALK (1M, 121°C, 1h) puedan ser considerados por sus cantidad y calidad, como adhesivo para madera, agente extintor de incendios, agente espumante del hormigón e inhibidor de la corrosión, etc.(Hui et al., 2022d).

Tabla III: Tamaño y composición de péptidos determinada en las fracciones líquidas obtenidas en los experimentos de hidrólisis según metodología aplicada.

Aminoácidos (AA)		AH		AH + US		HT	Alcalino (NaOH)				Acido (HCl)				US + ALK		
		pH 4.5	pH 6.5	pH 4.5	pH 6.5	pH 12	0.5 M		1M		0.5 M		1M		pH 6.5	0.5 M	1 M
		50°C	50°C	50°C	50°C	121°C	50 °C	121 °C	50° C	121°C	50°C	121°C	50°C	121°C	50°C	50°C	50° C
	% AA CR S	3h	3h	3h	3h	1h	3h	1h	3h	1h	3h	1h	3h	1h	1h	1h	1h
ASP	37.3	8.5	7.3	11.1	12.1	14.0	13.3	13.9	13.7	14.9	9.7	17.4	5.9	17.2	11.1	20.9	12.9
GLU	41.0	13.5	12.4	13.9	14.0	12.5	13.6	14.8	13.9	15.5	14.8	15.8	11.2	16.5	12.3	12.4	13.9
SER	16.7	2.1	2.2	4.4	5.0	5.2	4.8	1.8	4.8	1.8	4.3	6.5	2.8	8.0	4.5	2.9	2.8
HIS*	8.9	1.4	1.7	2.9	2.6	2.3	2.5	2.4	2.7	1.8	2.5	7.8	2.1	3.9	2.0	1.4	2.1
GLY	21.6	9.2	9.9	6.7	7.0	6.8	7.0	10.3	7.3	10.9	6.1	6.3	3.5	5.1	7.1	7.1	3.2
THR*	14.8	4.3	2.2	6.0	6.4	5.7	4.0	0.9	3.8	0.8	5.0	6.7	3.1	8.2	6.6	1.9	2.7
ARG*	15.6	3.5	3.0	2.4	1.9	4.7	4.5	0.8	3.8	0.4	4.0	5.2	7.7	3.9	1.2	2.3	3.0
ALA	41.0	8.5	8.2	11.3	11.0	8.9	9.6	10.8	9.9	11.6	10.4	4.2	7.3	0.9	10.4	9.9	10.0
TYR	10.5	1.4	1.7	4.2	4.4	3.9	3.8	4.3	4.1	4.4	3.2	2.5	30.9	5.4	3.5	4.6	4.8
CYS	7.7	2.8	3.4	2.1	2.5	2.3	1.8	2.8	2.1	2.9	4.3	5.2	1.0	3.1	5.6	4.9	6.0
VAL*	18.6	11.4	10.3	7.2	7.3	5.5	5.6	6.3	5.8	5.8	5.7	3.4	3.5	3.7	6.8	5.6	6.3
MET*	7.2	4.3	3.9	2.6	2.8	2.6	3.0	3.2	3.1	3.3	3.2	4.4	6.6	4.1	2.5	2.4	2.9
TRP	13.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHE*	13.9	3.5	3.9	3.9	4.1	4.2	4.5	4.7	4.4	4.4	2.8	3.3	1.4	5.4	4.5	4.2	4.8
ILE*	7.2	6.4	6.0	4.6	4.7	3.4	3.8	3.1	3.8	2.2	3.6	3.8	2.1	4.4	4.1	3.6	4.3
LEU*	26.9	10.6	10.3	8.6	8.7	7.6	8.3	8.9	8.4	8.6	6.8	4.1	4.2	2.4	8.1	7.5	8.8
LYS*	19.9	6.4	6.4	4.2	3.5	6.0	5.9	6.8	6.1	6.9	7.5	2.5	5.6	3.7	4.8	4.1	5.0
PRO	8.2	2.1	7.3	3.8	2.0	4.3	4.0	4.3	2.5	3.8	5.7	0.3	0.3	3.6	4.8	4.3	6.7
Eaa (%)		51.7	47.6	42.5	42.0	42.0	42.0	37.1	41.7	34.1	41.4	41.4	36.6	40.0	40.6	32.9	39.7

NEaa (%)	48.2	52.4	57.4	57.9	57.9	57.9	62.9	58.3	65.8	58.6	58.5	63.3	60.0	59.3	67.0	60.2
Eaa/Neaa	1.1	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.7	0.5	0.7	0.7	0.5	0.6	0.6	0.5	0.7
HPB/TAA	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.5	0.3	0.3	0.3	0.4
Tamaños de péptidos (kDa)	< 20	90-20	80-10	80-10	80-7	<86	<93	<106	<156	-	-	-	-	<68	<100	214-70

Asp: Ácido aspártico; Glu: ácido glutámico; Ser: Serina; His: Histidina; Gly:Glicina; THR: threonina; Arg: Arginina; Ala: Alanina; Tyr: Tirosina; Cys: Cisteína; Val: Valina; Met: Metionina; TRP: Triptófano; Phe: Fenilalanina; Ile: Isoleucina; Lys: Lisina; Pro: Prolina. * Aminoácidos esenciales (Eaa); NEaa: Aminoácidos no esenciales; HPB: Aminoácidos hidrofóbicos; TAA: Total Aminoácidos;

Todo lo contrario, ocurre si lo que se desea es la reutilización de los péptidos recuperados como fertilizante foliar o como alimentación animal, en este caso, se prefieren soluciones con elevada cantidad de péptidos de menor tamaño, y con una composición de los mismos elevada en AA esenciales para el crecimiento y maduración de las plantas, por lo que en este caso se pudieran escoger las metodologías ALK (0.5M y 1M, 50°C, 3h) y HT+ALK (0.5M y 1M, 1h, 121°C)

5.4. Recuperación de Monosacáridos.

En la figura 5.7, 5.8 y 5.9 se muestran los porcentajes de recuperación de carbohidratos como monosacáridos fermentables, de solubilización, recuperación y pérdidas de glucosa y xilosa respectivamente

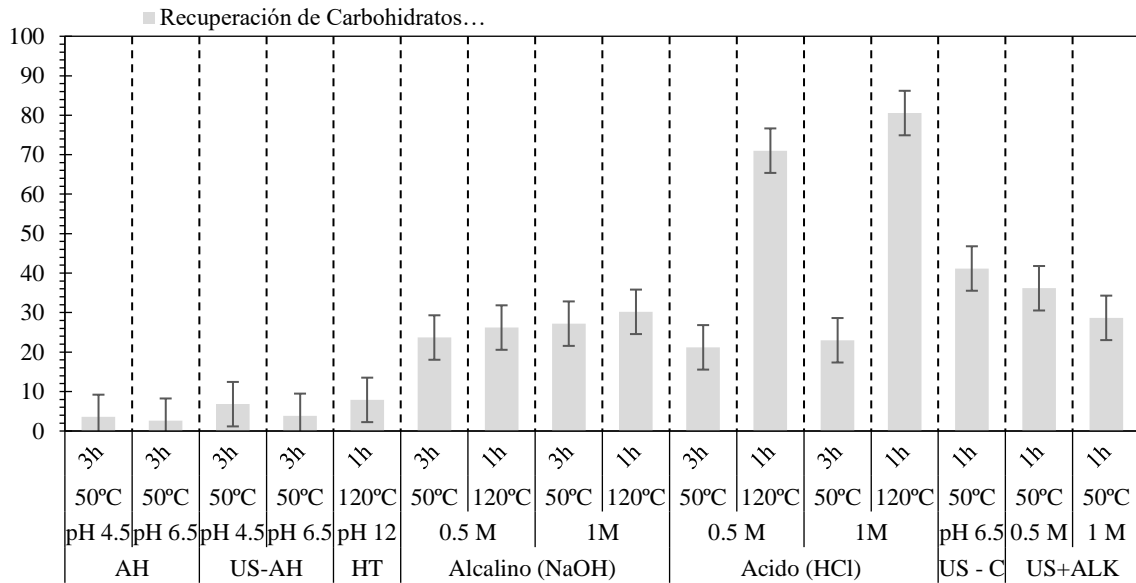


Figura 5.7: Rendimientos de recuperación % de monosacáridos en referencia a la fracción líquida obtenida tras los tratamientos y rendimientos de solubilización % en referencia a la concentración inicial de carbohidratos en la biomasa centrifugada (CRS) tras los tratamientos de hidrólisis aplicados (3.7% w/w). Tratamiento **Bio-enzimático**: Autohidrólisis (AH): pH 6.5; pH 4.5; 50°C; 3h. **Tratamiento térmico** (HT): 121°C; 1h. **Hidrólisis alcalina y térmico-alcalino asistido**: NaOH (0.5M y 1M) a 50°C 3h y NaOH (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Hidrólisis ácida y térmico-ácido asistido**: HCl (0.5M y 1M) 50°C, 3h y HCl (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Método físico**: Ultrasonidos (US-C, 20kHz, 140 W, 50% Amplitud, pH 6.5); **Ultrasonido Alcalino Asistido** (US+ALK): NaOH (0.5M y 1M), expresados como \pm la media de dos mediciones analíticas.

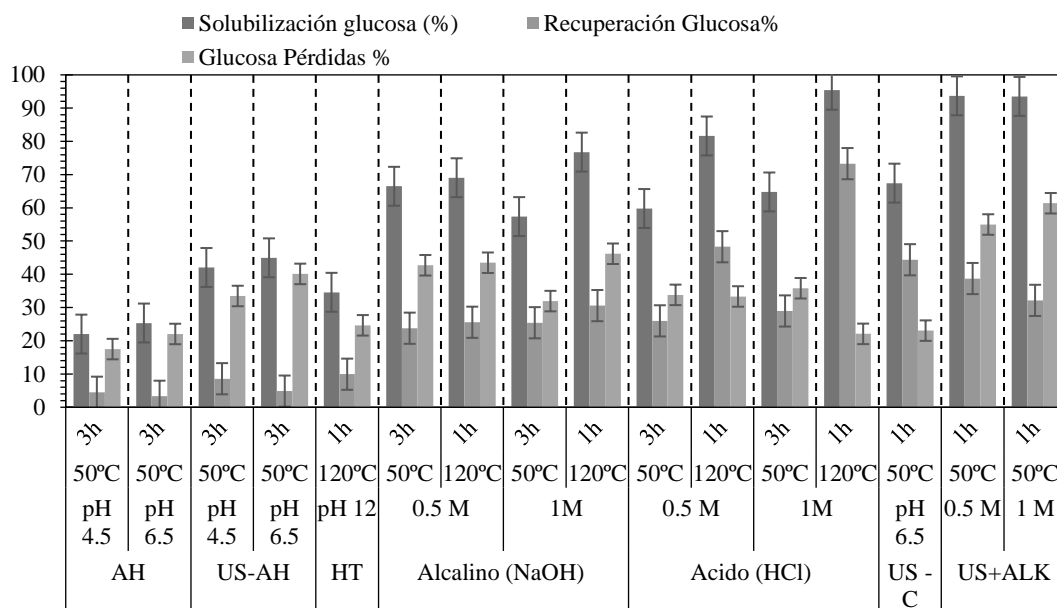


Figura 5.8: Rendimientos de solubilización, recuperación % y pérdidas de glucosa (3.7% w/w). Tratamiento **Bio-enzimático**: Autohidrólisis (AH): pH 6.5; pH 4.5; 50°C; 3h. **Tratamiento térmico** (HT): 121°C; 1h. **Hidrólisis alcalina y térmico-alcalino asistido**: NaOH (0.5M y 1M) a 50°C 3h y NaOH (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Hidrólisis ácida y térmico-ácido asistido**: HCl (0.5M y 1M) 50°C, 3h y HCl (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Método físico**: Ultrasonidos (US-C, 20kHz, 140 W, 50% Amplitud, pH 6.5); **Ultrasonido Alcalino Asistido** (US+ALK): NaOH (0.5M y 1M), expresados como \pm la media de dos mediciones analíticas.

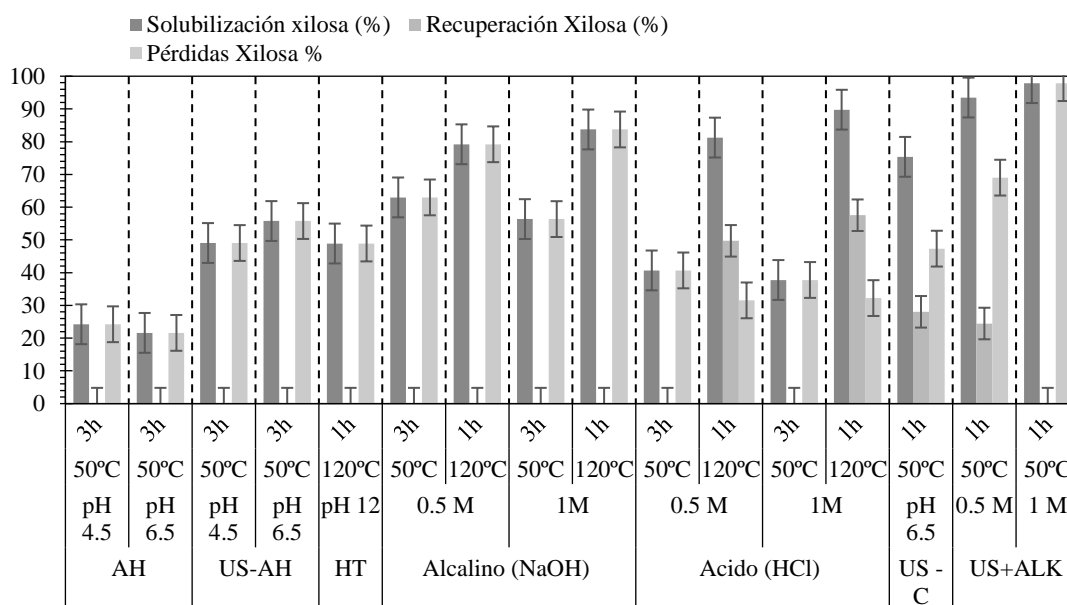


Figura 5.9: Rendimientos de solubilización, recuperación % y pérdidas de glucosa (3.7% w/w). Tratamiento **Bio-enzimático**: Autohidrólisis (AH): pH 6.5; pH 4.5; 50°C; 3h. **Tratamiento térmico** (HT): 121°C; 1h. **Hidrólisis alcalina y térmico-alcalino asistido**: NaOH (0.5M y 1M) a

50°C 3h y NaOH (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Hidrólisis ácida y térmico-ácido asistido:** HCl (0.5M y 1M) 50°C, 3h y HCl (0.5M y 1M), 121°C, 1h. **Método físico:** Ultrasonidos (US-C, 20kHz, 140 W, 50% Amplitud, pH 6.5); **Ultrasonido Alcalino Asistido** (US+ALK): NaOH (0.5M y 1M), expresados como \pm la media de dos mediciones analíticas.

Se analizaron las concentraciones de los monosacáridos más abundantes (glucosa y xilosa) recuperados en las fracciones líquidas tras los pretratamientos aplicados a la biomasa para evaluar las posibles alternativas de valorización de los carbohidratos.

Según (Martín-Juárez et al., 2019), las condiciones óptimas para lograr una elevada recuperación de monosacáridos fermentables a partir de biomasa algal cultivada en aguas residuales, son HCl 2M y 120°C de temperatura, demostrando que los factores que tienen efecto en el rendimiento de recuperación de los mismos, serían el tipo de agente químico, la concentración y la temperatura. En este trabajo, y teniendo en cuenta las diferencias en las características de la biomasa, el factor que está relacionado con el aumento de recuperación de monosacáridos fermentables son el tiempo empleado y la temperatura para ambos monosacáridos. La recuperación de glucosa y xilosa sigue un comportamiento similar a lo expuesto en el acápite de solubilización de carbohidratos, donde se observó que los tratamientos ácidos eran más efectivos que los básicos y los físicos individuales para el caso de la hexosa, sin embargo esta figura muestra que también la recuperación de xilosa parece estar ligada a la de péptidos, viéndose favorecida por el empleo de ultrasonido y pudiendo arribar a una hipótesis de que la pentosa debe estar formando glucoproteínas en las estructuras celulares que actúan como adhesión celular dentro de los flóculos de los WAS, por lo que con el empleo de métodos que sean selectivos a la liberación y posterior recuperación de péptidos, también se van a obtener monosacáridos fermentables en forma de xilosa.

Conclusiones

En la liberación efectiva de macrocompuestos a partir de biomasa procedente de fangos residuales secundarios, el método de hidrólisis de mayor eficiencia fue el método de Ultrasonidos combinado con Hidrólisis Alcalina en las siguientes condiciones: NaOH 1M, 50°C, 1hora, 140W, 20 kHz, 50% Amplitud, obteniendo rendimientos de solubilización de 94.4% y 97.2% correspondientes a carbohidratos y proteínas respectivamente. La solubilización de xilosa se relacionó con la liberación de proteínas, ya que esta fue superior bajo las mismas condiciones donde la solubilización de proteínas fue elevada.

Relativo al rendimiento de recuperación de proteínas el método más efectivo fue el método de Ultrasonidos combinado con Hidrólisis Alcalina en las siguientes condiciones NaOH 1M, 50°C, 1h, 140W, 20kHz, 50% Amplitud, obteniéndose el 75.1% de péptidos recuperados, siendo este 1.4 veces más eficiente que la Hidrólisis Alcalina de forma individual a la misma concentración y 5.4 que el método de Ultrasonidos por sí solo. Respecto a la recuperación de carbohidratos, la hidrólisis que proporcionó los mejores resultados fue la Hidrólisis Acida + Tratamiento Térmico, llegando a recuperar el 80.6% de los carbohidratos.

Se recuperaron péptidos de tamaños variables, entre 7kDa y 214 kDa, siendo el método de Ultrasonidos combinado con Hidrólisis Alcalina el que proporciona péptidos con tamaños entre 70 kDa y 214 kDa.

La hidrólisis US+ALK proporcionó los mejores resultados en cuanto a la cantidad (73% de recuperación a 0.5M y 75% a 1M) de polipéptidos que se encuentran en la solución recuperada. Con el empleo de esta metodología se produce un efecto sinérgico al combinar ALK con US, debido a que se aumenta los rendimientos de recuperación y se disminuyen las pérdidas de componentes debido al efecto esterilizante del medio alcalino, se disminuyen los efectos asociados a la corrosión de la instrumentación producto del empleo de elevadas concentraciones de álcalis y la ocurrencia de reacciones paralelas. Los péptidos obtenidos pudieran emplearse en la industria como agentes espumantes (propiedades tensoactivas) y hormigón celular.

Las Hidrólisis Alcalinas y Alcalinas-Térmicas son recomendables para recuperar péptidos en los que existe abundancia de EAA (41%) y a su vez son elevadas las recuperaciones de péptidos de tamaños variables (recomendables para la producción de fertilizantes foliares o alimentación animal).

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los principales resultados obtenidos.

Métodos	Solubilización proteínas %	Recuperación Péptidos %	Tamaño Péptidos (kDa)	%EAA	Solubilización Carbohidratos %	Recuperación xilosa %	Relación Glucosa/Xilosa recuperada
US+ALK 1M NaOH	98.1	75.1	70-214	39.7	94.4	0.0	1.0
US+ALK 0.5M NaOH	92.9	73.0	<100	32.9	91.2	24.7	1.0
HT+ALK 1M NaOH	92.2	61.2	<156	35.0	78.1	0.0	0.9
HT+AC 1M HCl	78.8	43.7	ND	40.0	94.1	57.7	1.1

Anexos

Tabla I: Calibrado Monosacáridos

CALIBRADO MONOSACÁRIDOS (HPLC Waters)				
Monosacárido	Recta	Pendiente	Ordenada	R ²
GLUCOSA	$y=216388x-1034,3$	216388	-1034,3	0,9999
XILOSA	$y=211088x-396,38$	211088	-396,38	0,9999
ARABINOSA	$y=215083x-1124,1$	215083	-1124,1	0,9998
CELOBIOSA	$y=220549x-987,65$	220549	-987,65	1

Tabla II: Factor de degradación.

FACTOR DEGRADACIÓN	
Monosacárido	Factor
GLUCOSA	1,05
XILOSA	1,04
ARABINOSA	1,04
CELOBIOSA	0,72

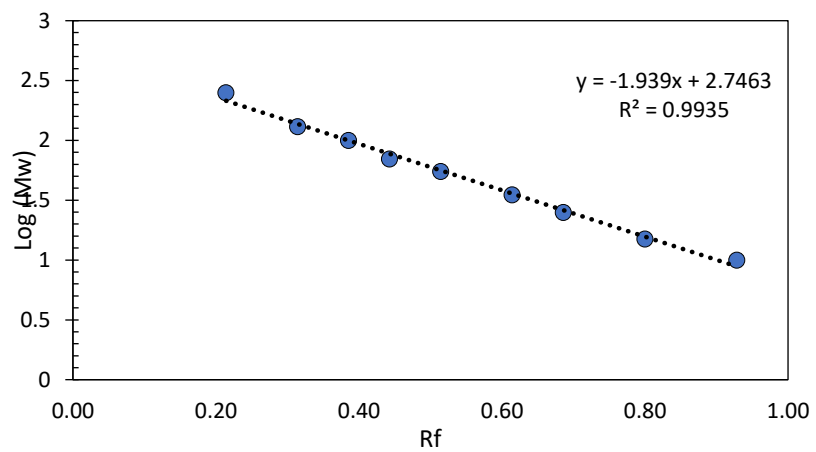


Figura 1A: Calibrado según Rf (distancia de migración de la proteína/ distancia de migración del estándar)

Referencias Bibliográficas

- Abbott, T., Kor-Bicakci, G., & Eskicioglu, C. (2021). Examination of single-stage anaerobic and anoxic/aerobic and dual-stage anaerobic-anoxic/aerobic digestion to remove pharmaceuticals from municipal biosolids. *Science of The Total Environment*, 791, 148237. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.148237>
- Ahmed, B., Tyagi, V. K., Aboudi, K., Naseem, A., Álvarez-Gallego, C. J., Fernández-Güelfo, L. A., Kazmi, A. A., & Romero-García, L. I. (2021). Thermally enhanced solubilization and anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Chemosphere*, 282, 131136. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131136>
- Babu, R., Capannelli, G., & Comite, A. (2021). Effect of Different Pretreatments on Sludge Solubilization and Estimation of Bioenergy Potential. *Processes 2021, Vol. 9, Page 1382*, 9(8), 1382. <https://doi.org/10.3390/PR9081382>
- Bagheri, M., Bauer, T., Burgman, L. E., & Wetterlund, E. (2023). Fifty years of sewage sludge management research: Mapping researchers' motivations and concerns. *Journal of Environmental Management*, 325, 116412. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2022.116412>
- Baroutian, S., Gapes, D. J., Sarmah, A. K., Farid, M. M., & Young, B. R. (2016). Formation and degradation of valuable intermediate products during wet oxidation of municipal sludge. *Bioresource Technology*, 205, 280–285. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.01.039>
- Bianchini, A., Pellegrini, M., Sacconi, C., & Bonfiglioli, L. (2016). Sewage sludge management in Europe: a critical analysis of data quality. *Int. J. Environment and Waste Management*, 18(3), 226–238. <https://doi.org/10.1504/IJEW.2016.10001645>
- BIOMASA, BIOCMBUSTIBLES Y SOSTENIBILIDAD. (n.d.).
- Bougrier, C., Delgenès, J. P., & Carrère, H. (2008). Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion. *Chemical Engineering Journal*, 139(2), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.07.099>
- Bozkurt, Y. C., & Apul, O. G. (2020). Critical review for microwave pretreatment of waste-activated sludge prior to anaerobic digestion. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 14, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.COESH.2019.10.003>
- Catallo, W. J., & Comeaux, J. L. (2008). Reductive hydrothermal treatment of sewage sludge. *Waste Management, ISSN-e 0956-053X, N.º. 11, 2008, Págs. 2213-2219*, 28(11), 2213–2219. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2007.10.005>
- Çelebi, E. B., Aksoy, A., & Sanin, F. D. (2021). Maximizing the energy potential of urban sludge treatment: An experimental study and a scenario-based energy analysis focusing on anaerobic digestion with ultrasound pretreatment and sludge combustion. *Energy*, 221, 119876. <https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2021.119876>
- Chan, W. P., & Wang, J. Y. (2016). Comparison study on thermal degradation behaviours and product distributions for various types of sludge by using TG-FTIR and fixed bed pyrolysis.

- Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 121, 177–189.
<https://doi.org/10.1016/J.JAAP.2016.07.019>
- Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q., & Gu, G. (2007). Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research*, 41(3), 683–689.
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2006.07.030>
- Collivignarelli, M. C., Canato, M., Abbà, A., & Carnevale Miino, M. (2019). Biosolids: What are the different types of reuse? *Journal of Cleaner Production*, 238, 117844.
<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.117844>
- Cristina, G., Camelin, E., Ottone, C., Fraterrigo Garofalo, S., Jorquera, L., Castro, M., Fino, D., Schiappacasse, M. C., & Tommasi, T. (2020). Recovery of humic acids from anaerobic sewage sludge: Extraction, characterization and encapsulation in alginate beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 277–285.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.097>
- de Gregorio, M. (2019). *Biomasa en España. Generación de valor añadido y análisis prospectivo*.
- Dietrich, K., Dumont, M. J., del Rio, L. F., & Orsat, V. (2017). Producing PHAs in the bioeconomy – Towards a sustainable bioplastic. *Sustainable Production and Consumption*, 9, 58–70.
<https://doi.org/10.1016/j.spc.2016.09.001>
- Directiva (UE) 2018/ del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, por la que se modifica la Directiva 2008/98/CE sobre los residuos.* (n.d.).
- Enser, M., Bloomberg, G. B., Brock, C., & Clark, D. C. (1990). De novo design and structure-activity relationships of peptide emulsifiers and foaming agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 12(2), 118–124. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(90\)90063-G](https://doi.org/10.1016/0141-8130(90)90063-G)
- Fabiani, C., Pizzichini, M., Spadoni, M., & Zeddita, G. (1996). Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse. *Desalination*, 105(1–2), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0011-9164\(96\)00050-1](https://doi.org/10.1016/0011-9164(96)00050-1)
- Gao, J., Li, L., Yuan, S., Chen, S., & Dong, B. (2022). The neglected effects of polysaccharide transformation on sludge humification during anaerobic digestion with thermal hydrolysis pretreatment. *Water Research*, 226, 119249.
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2022.119249>
- Gao, J., Wang, Y., Yan, Y., & Li, Z. (2021). Ultrasonic-alkali method for synergistic breakdown of excess sludge for protein extraction. *Journal of Cleaner Production*, 295, 126288.
<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.126288>
- Gao, J., Wang, Y., Yan, Y., Li, Z., & Chen, M. (2020). Protein extraction from excess sludge by alkali-thermal hydrolysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(8), 8628–8637. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-07188-2/TABLES/3>
- Gao, J., Weng, W., Yan, Y., Wang, Y., & Wang, Q. (2020). Comparison of protein extraction methods from excess activated sludge. *Chemosphere*, 249.
<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>
- 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>
- Hui, W., Zhou, J., & Jin, R. (2022a). 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>
- Hui, W., Zhou, J., & Jin, R. (2022b). 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>
- Hui, W., Zhou, J., & Jin, R. (2022c). 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>
- Hui, W., Zhou, J., & Jin, R. (2022d). 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>
- 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>
- Javanshah, A., & Saidi, A. (2016). Determination of Humic Acid by Spectrophotometric Analysis in the Soils. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)*, 7, 19–23.
- Lee, J., Choi, O. K., Oh, D., Lee, K., Park, Y., & Kim, D. (2020). Stimulation of lipid extraction efficiency from sewage sludge for biodiesel production through hydrothermal pretreatment. *Energies*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/en13236392>
- 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>
- Liew, C. S., Raksasat, R., Rawindran, H., Kiatkittipong, W., Lim, J. W., Leong, W. H., Lam, M. K., Mohamad, M., Cheng, Y. W., & Chong, C. C. (2022). Hydrolysis kinetics for solubilizing waste activated sludge at low temperature thermal treatment derived from multivariate non-linear model. *Chemosphere*, 292, 133478. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.133478>
- Lippert, T., Bandelin, J., Musch, A., Drewes, J. E., & Koch, K. (2018). Energy-positive sewage sludge pre-treatment with a novel ultrasonic flatbed reactor at low energy input. *Bioresource Technology*, 264, 298–305. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.05.073>
- 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>
- Lodos de depuración de aguas residuales*. (n.d.). Retrieved November 14, 2022, from <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora/>
- 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, 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.068>
- Madkour, M. H., Heinrich, D., Alghamdi, M. A., Shabbaj, I. I., & Steinbüchel, A. (2013). PHA recovery from biomass. *Biomacromolecules*, 14(9), 2963–2972. <https://doi.org/10.1021/BM4010244>
- 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)
- Mancuso, G., Langone, M., Andreottola, G., & Bruni, L. (2019). Effects of hydrodynamic cavitation, low-level thermal and low-level alkaline pre-treatments on sludge solubilisation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59, 104750. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2019.104750>
- Martín Juárez, J. (2019). *Recovery of carbohydrate fraction from microalgal biomass grown in wastewater treatment photobioreactors: a biorefinery approach* [Universidad de Valladolid]. <https://doi.org/10.35376/10324/40130>
- 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>
- Martín Juárez, J., Martínez-Páramo, S., Maté-González, M., García Encina, P. A., Muñoz Torre, R., & Bolado Rodríguez, S. (2021a). Evaluation of pretreatments for solubilisation of components and recovery of fermentable monosaccharides from microalgae biomass grown in piggery wastewater. *Chemosphere*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129330>
- Martín Juárez, J., Martínez-Páramo, S., Maté-González, M., García Encina, P. A., Muñoz Torre, R., & Bolado Rodríguez, S. (2021b). Evaluation of pretreatments for solubilisation of components and recovery of fermentable monosaccharides from microalgae biomass grown in piggery wastewater. *Chemosphere*, 268, 129330. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.129330>
- Martín Juárez, J., Martínez-Páramo, S., Maté-González, M., García Encina, P. A., Muñoz Torre, R., & Bolado Rodríguez, S. (2021c). Evaluation of pretreatments for solubilisation of components and recovery of fermentable monosaccharides from microalgae biomass grown in piggery wastewater. *Chemosphere*, 268, 129330. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.129330>

- 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*, 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.082>
- Nabarlantz, D., Vondrysova, J., Jenicek, P., Stüber, F., Font, J., Fortuny, A., Fabregat, A., & Bengoa, C. (2010). Hydrolytic enzymes in activated sludge: Extraction of protease and lipase by stirring and ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, *17*(5), 923–931. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.02.006>
- Naqvi, S. R., Tariq, R., Shahbaz, M., Naqvi, M., Aslam, M., Khan, Z., Mackey, H., McKay, G., & Al-Ansari, T. (2021). Recent developments on sewage sludge pyrolysis and its kinetics: Resources recovery, thermogravimetric platforms, and innovative prospects. *Computers & Chemical Engineering*, *150*, 107325. <https://doi.org/10.1016/J.COMPCHEMENG.2021.107325>
- Neumann, P., González, Z., & Vidal, G. (2017). Sequential ultrasound and low-temperature thermal pretreatment: Process optimization and influence on sewage sludge solubilization, enzyme activity and anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, *234*, 178–187. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.03.029>
- 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>
- Overview - Circular economy - Eurostat. (n.d.). Retrieved November 14, 2022, from <https://ec.europa.eu/eurostat/web/circular-economy>
- Park, J., Cayetano, R. D. A., Kim, G. B., Jo, Y., Kwon, Y., Lei, Z., & Kim, S. H. (2022). Sludge disintegration and anaerobic digestion enhancement by alkaline-thermal pretreatment: Economic evaluation and microbial population analysis. *Bioresource Technology*, *346*, 126594. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126594>
- Park, N. D., Helle, S. S., & Thring, R. W. (2012). Combined alkaline and ultrasound pretreatment of thickened pulp mill waste activated sludge for improved anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, *46*, 750–756. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2012.05.014>
- Raheem, A., Sikarwar, V. S., He, J., Dastyar, W., Dionysiou, D. D., Wang, W., & Zhao, M. (2018). Opportunities and challenges in sustainable treatment and resource reuse of sewage sludge: A review. *Chemical Engineering Journal*, *337*, 616–641. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2017.12.149>
- Rebolledo-Leiva, R., Moreira, M. T., & González-García, S. (2022). Environmental assessment of the production of itaconic acid from wheat straw under a biorefinery approach. *Bioresource Technology*, *345*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126481>
- Rodríguez-Perez, S., Serrano, A., Pantión, A. A., & Alonso-Fariñas, B. (2018). Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *Journal of Environmental Management*, *205*, 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>
- Rojo, E. M., Piedra, I., González, A. M., Vega, M., & Bolado, S. (2021a). Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria

- biomass by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 335(May).
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125256>
- Royo, E. M., Piedra, I., González, A. M., Vega, M., & Bolado, S. (2021b). Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 335.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125256>
- Safi, C., Charton, M., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments. *Algal Research*, 3(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.017>
- Shukla, R., & Ahammad, S. Z. (2023). Performance assessment of a modified trickling filter and conventional activated sludge process along with tertiary treatment in removing emerging pollutants from urban sewage. *Science of The Total Environment*, 858, 159833. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.159833>
- Smol, M., & Koneczna, R. (2021). Economic Indicators in Water and Wastewater Sector Contributing to a Circular Economy (CE). *Resources 2021, Vol. 10, Page 129, 10(12)*, 129. <https://doi.org/10.3390/RESOURCES10120129>
- song, G. J.-, & feng, X. Y.-. (2011). Review of Enzymatic Sludge Hydrolysis. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 02(05). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000130>
- Statistics | Eurostat. (n.d.). Retrieved November 20, 2022, from https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/env_wasmun/default/bar?lang=en
- Sun, C., Guo, L., Zheng, Y., Yu, D., Jin, C., Zhao, Y., Yao, Z., Gao, M., & She, Z. (2021). The hydrolysis and reduction of mixing primary sludge and secondary sludge with thermophilic bacteria pretreatment. *Process Safety and Environmental Protection*, 156, 288–294. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2021.10.026>
- Tejada, M., Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Franco-Andreu, L., Benítez, C., & Parrado, J. (2016). Use of biofertilizers obtained from sewage sludges on maize yield. *European Journal of Agronomy*, 78, 13–19. <https://doi.org/10.1016/J.EJA.2016.04.014>
- 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>
- Tian, X., Ng, W. J., & Trzcinski, A. P. (2018). Optimizing the synergistic effect of sodium hydroxide/ultrasound pre-treatment of sludge. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 432–440. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2018.07.005>
- Tomé, D., Cordella, C., Dib, O., & Péron, C. (n.d.). *NitrogeN aNd proteiN coNteNt measuremeNt aNd NitrogeN to proteiN coNversioN factors for dairy aNd soy proteiN-based foods: a systematic review aNd modellinG aNalysis*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- Vethathirri, R. S., Santillan, E., & Wuertz, S. (2021). Microbial community-based protein production from wastewater for animal feed applications. *Bioresource Technology*, 341, 125723. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125723>
- Waste statistics - Statistics Explained. (n.d.). Retrieved November 14, 2022, from https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Waste_statistics

- Xiang, Y., Xiang, Y., & Wang, L. (2017a). 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>
- Xiang, Y., Xiang, Y., & Wang, L. (2017b). Kinetics of activated sludge protein extraction by thermal alkaline treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(6), 5352–5357. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2017.09.062>
- Xiao, K., Chen, Y., Jiang, X., Seow, W. Y., He, C., Yin, Y., & Zhou, Y. (2017). Comparison of different treatment methods for protein solubilisation from waste activated sludge. *Water Research*, 122, 492–502. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.024>
- Xing, Y., Huang, X., Wang, H., & Yu, J. (2022). Insight in the mechanism of alkali treatment methods effecting dewatered sludge fermentation from microbial characteristics. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(6), 108861. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2022.108861>
- Yadav, B., Chavan, S., Atmakuri, A., Tyagi, R. D., & Drogui, P. (2020). A review on recovery of proteins from industrial wastewaters with special emphasis on PHA production process: Sustainable circular bioeconomy process development. *Bioresource Technology*, 317, 124006. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.124006>
- Yan, Y., Zhang, Y., Gao, J., Qin, L., Liu, F., Zeng, W., & Wan, J. (2022). Intracellular and extracellular sources, transformation process and resource recovery value of proteins extracted from wastewater treatment sludge via alkaline thermal hydrolysis and enzymatic hydrolysis. *Science of The Total Environment*, 852, 158512. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.158512>
- Yang, N., Yang, S., & Zheng, X. (2022a). Inhibition of Maillard reaction during alkaline thermal hydrolysis of sludge. *Science of the Total Environment*, 814. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.152497>
- Yang, N., Yang, S., & Zheng, X. (2022b). Inhibition of Maillard reaction during alkaline thermal hydrolysis of sludge. *Science of The Total Environment*, 814, 152497. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.152497>
- Yin, Y., Liu, Y. J., Meng, S. J., Kiran, E. U., & Liu, Y. (2016). Enzymatic pretreatment of activated sludge, food waste and their mixture for enhanced bioenergy recovery and waste volume reduction via anaerobic digestion. *Applied Energy*, 179, 1131–1137. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2016.07.083>
- Yu, J., Zheng, M., Tao, T., Zuo, J., & Wang, K. (2013). Waste activated sludge treatment based on temperature staged and biologically phased anaerobic digestion system. *Journal of Environmental Sciences*, 25(10), 2056–2064. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60266-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60266-6)
- Zhang, H. L., Jiang, W. L., Liu, R., Zhou, Y., & Zhang, Y. (2019). Organic degradation and extracellular products of pure oxygen aerated activated sludge under different F/M conditions. *Bioresource Technology*, 279, 189–194. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.01.130>

Zhang, R., Mao, Y., & Meng, L. (2021). Excess sludge cell lysis by ultrasound combined with ozone. *Separation and Purification Technology*, 276, 119359.
<https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2021.119359>

