

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**ESTUDIO DEL PRETRATAMIENTO DE  
HIDROLIZADOS DE BIOMASA RESIDUAL  
COMO MEDIO DE FERMENTACIÓN**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**ANDRÉS ASLA VÁZQUEZ**

**JULIO, 2022**



# TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
1. INTRODUCCIÓN .....	8
2. CONSIDERACIONES BÁSICAS .....	11
2.1. CONCEPTOS CLAVE .....	11
2.2 CONTEXTUALIZACIÓN TEÓRICA .....	13
2.2.1 Residuos utilizados .....	13
2.2.2. Tratamientos hidrotérmicos .....	14
2.2.3. El catabolismo de las <i>Zymomonas Mobilis</i> .....	15
2.2.4. La fermentación de <i>Zymomonas Mobilis</i> .....	16
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	19
3.1. PREPARACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISIS TÉRMICA	19
3.2 REALIZACIÓN DE LAS FERMENTACIONES .....	21
3.2.1 Inoculación y puesta en marcha. Esterilidad.....	21
3.2.2 Toma de muestras y procesado .....	22
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	23
3.3.1 Determinación de carbohidratos .....	23
3.3.2 Determinación de azúcares reductores.....	23
3.3.3 Determinación de proteínas y ácidos húmicos.....	24
3.3.4 Determinación de compuestos fenólicos.....	25

3.3.3 Análisis de los resultados: densidad óptica, crecimiento en placa, cromatografía.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
4.1. CALIBRADOS DE LOS MÉTODOS .....	28
4.1.1 Métodos espectrofotométricos .....	28
4.1.2 HPLC .....	29
4.2. RESULTADOS DE LAS HIDRÓLISIS TÉRMICAS .....	30
4.2.1 Estudio de la influencia de la temperatura .....	30
4.2.2 Estudio de la suplementación con residuo de manzana .....	36
4.3. Fermentación.....	41
4.3.1 Crecimiento celular .....	41
4.3.2 Análisis de la composición .....	43
5. CONCLUSIONES .....	49
6. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	50
7. BIBLIOGRAFÍA .....	51
APÉNDICE: RECTAS DE CALIBRADO .....	55
A.1. Métodos espectrofotométricos .....	55
A.2. Cromatografía líquida de alta resolución .....	59

## RESUMEN

Los lodos de depuradora con una alta carga orgánica fueron procesados mediante un tratamiento de hidrólisis térmica, con el objetivo de solubilizar sus componentes para así obtener un medio fermentable a la vez que se consigue la reducción de la carga de sólidos. Para optimizar las condiciones del residuo de cara a la fermentación posterior, se estudió la influencia de la temperatura y la duración del tratamiento, así como la adición de residuo de manzana para aumentar la concentración de carbohidratos y azúcares reductores. Además, se buscó minimizar la creación de compuestos fenólicos y otros posibles inhibidores de la fermentación. Así, se obtuvo una concentración de  $28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de azúcares reductores al tratar la mezcla de 70% lodo y 30% de residuo de manzana durante 45 minutos a una temperatura de  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ , mientras que los compuestos fenólicos apenas superaron los  $0,71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

El lodo tratado hidrotérmicamente, que se encuentra esterilizado, fue inoculado con la bacteria *Zymomonas Mobilis*, y fermentado durante 72 h para obtener la curva completa de crecimiento celular. Asimismo, se estudió la producción de etanol y la evolución del contenido de azúcares, ácidos grasos volátiles y otros compuestos de interés.

El lodo fermentando presentó una reducción de la materia orgánica del 92%, obteniéndose una concentración final de etanol de  $11,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , lo que implica un rendimiento de  $0,415 \text{ g etanol /g azúcar consumido}$ .

## ABSTRACT

Activated sludge with a high organic load was solubilized through thermal hydrolysis in order to solubilize its components, thus obtaining a fermentable medium together with a solid fraction reduction. In order to optimize the properties of the treated waste before being fermented, the effect of temperature, treatment time as well as the addition of apple wastes was studied with the aim of increasing the concentration of carbohydrates and reducing sugars. Besides, it was also important the minimization of fermentation inhibitors. Thus, 28 g·L<sup>-1</sup> of reducing sugars were obtained after treating a mixture of 70% sludge and 30% apple waste for 45 minutes at 150 °C, while phenolic compounds only reached 0,71 g·L<sup>-1</sup>.

The sludge hydrothermally treated and sterilized was inoculated with the bacteria *Zymomonas Mobilis*, and fermented for 72 h in order to obtain the microbial growth curve. Additionally, ethanol production and the evolution of interest compounds, such as sugars or volatile fatty acids, were also studied.

The fermented sludge allowed to reduce the organic matter content in 92%, achieving a final ethanol concentration of 11,9 g·L<sup>-1</sup>, which implies a yield of 0,415 g ethanol/g sugar consumed.

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología de las <i>Zymomonas Mobilis</i> (Palamae et al., 2020). .....	10
Figura 2. Ruta catabólica principal de las <i>Zymomonas Mobilis</i> (Kalnenieks et al., 2020). .....	16
Figura 3. Absorbancia frente a concentración para los patrones de glucosa. ....	29
Figura 4. Evolución de la concentración de carbohidratos frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana. ....	31
Figura 5. Evolución de la concentración de azúcares reductores frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.....	32
Figura 6. Evolución de la concentración de compuestos fenólicos frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.....	32
Figura 7. pH frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.....	33
Figura 8. Concentración de ácidos húmicos frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana. ....	33
Figura 9. Concentración de proteínas frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana. ....	34
Figura 10. Concentración de fructosa frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana. ....	35
Figura 11. Concentración de glucosa frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana. ....	36

Figura 12. Número de unidades formadoras de colonias frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento.....	42
Figura 13. Densidad óptica frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento. ....	42
Figura 14. Concentración de etanol frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento. ....	43
Figura 15. Concentración de glucosa, normalizada, frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento. Concentración de glucosa inicial: 7,70 g· L <sup>-1</sup> . ....	44
Figura 16. Concentración de fructosa frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento. Concentración de fructosa inicial: 22,28 g· L <sup>-1</sup> . ....	44
Figura 17. Concentración de acetaldehído frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento. ....	46
Figura 18. Concentración de ácido acético frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento. ....	46
Figura 19. Concentración de ácido pirúvico frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento. ....	47
Figura 20. Concentración de ácido málico frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento. ....	48
Figura A1. Absorbancia frente a concentración para el calibrado de azúcares reductores. ....	55
Figura A2. Absorbancia frente a concentración para el calibrado de proteínas.....	57
Figura A3. Absorbancia frente a concentración para el calibrado de ácidos húmicos.....	58
Figura A4. Absorbancia frente a concentración para el calibrado de compuestos fenólicos.....	59
Figura A5. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de glucosa.....	60
Figura A6. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de fructosa. ....	61
Figura A7. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de etanol. ....	62
Figura A8. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de acetaldehído. ....	63

Figura A9. Área del picofrente a la concentración para el calibrado de ácido acético.  
.....63

Figura A10. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de ácido láctico.  
.....64

Figura A11. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de ácido málico.  
.....65

Figura A12. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de ácido pirúvico.  
.....66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de operación y composición de los tratamientos hidrotérmicos realizados. ....	20
Tabla 2. Porcentajes (%) de inóculo añadido, y volúmenes de inóculo y de medio hidrolizado añadidos a cada fermentación. ....	22
Tabla 3. Concentraciones, absorbancias medidas y sus valores medios para los patrones de glucosa. ....	28
Tabla 4. Pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de determinación lineal de las rectas de calibrado. ....	29
Tabla 5. Concentraciones de carbohidratos totales para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana. ....	37
Tabla 6. Concentraciones de azúcares reductores para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana. ....	37
Tabla 7. Concentraciones de compuestos fenólicos para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana. ....	38
Tabla 8. pH para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana. ....	38
Tabla 9. Concentración de ácidos húmicos para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana. ....	39
Tabla 10. Concentración de proteínas para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana. ....	39
Tabla 11. Concentración de fructosa para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana. ....	40
Tabla 12. Concentración de glucosa para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana. ....	40
Tabla 13. % de inóculo añadido a cada experimento, con sus concentraciones de glucosa y fructosa iniciales y de etanol finales; y el rendimiento etanol/azúcar. ....	45

Tabla A1. Concentración y absorbancias medidas y medias para el calibrado de azúcares reductores. ....	55
Tabla A2. Concentración y absorbancias medidas, medias y totales para el calibrado de proteínas. ....	56
Tabla A3. Concentración y absorbancias medidas, medias y ciegas para el calibrado de proteínas. ....	56
Tabla A4. Concentración y absorbancias finales para el calibrado de proteínas. ....	56
Tabla A5. Concentración y absorbancias medidas, medias y totales para el calibrado de ácidos húmicos. ....	57
Tabla A6. Concentración y absorbancias medidas, medias y ciegas para el calibrado de ácidos húmicos. ....	57
Tabla A7. Concentración y absorbancias finales para el calibrado de ácidos húmicos. ....	58
Tabla A8. Concentración y absorbancias medidas y medias para el calibrado de compuestos fenólicos. ....	58
Tabla A9. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado de glucosa. ....	59
Tabla A10. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado de fructosa. ....	60
Tabla A11. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado de etanol. ....	61
Tabla A12. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado de acetaldehído. ....	62
Tabla A13. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado del ácido acético. ....	64
Tabla A14. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado del ácido láctico. ....	64
Tabla A15. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado del ácido málico. ....	65
Tabla A16. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado del ácido pirúvico. ....	66

# 1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento y eliminación de lodos de depuradora resulta un grave problema que se intensificará en los próximos años con el aumento de la población y los crecientes problemas ambientales. Como referencia, solo en nuestro país se genera más de un millón de toneladas anuales de lodos de depuradora (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015); se trata de un dato en base seca, con lo que en realidad el volumen producido es mucho mayor. Según el Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos citado anteriormente, la mayor parte de estos lodos se tratan actualmente mediante métodos biológicos, que procesan los lodos con la ayuda de microorganismos que digieren la materia orgánica predominante en estos residuos. No obstante, los rendimientos de estos procesos no son demasiado altos, obteniéndose habitualmente, en las digestiones anaerobias, biogás que contiene valores cercanos al 40% en CO<sub>2</sub> (Aghel *et al.*, 2022). Si bien también se consigue la deshidratación de los lodos, estabilizándolos así para su disposición en vertederos (Instituto Tecnológico de Canarias, 2005).

Por tanto, actualmente los métodos biológicos como los mencionados se centran en el aprovechamiento de la materia orgánica de manera eficaz, no solo estabilizando los lodos, sino pudiendo transformar dicha materia orgánica en energía o compuestos de interés. Si tradicionalmente se buscaba optimizar el balance energético del proceso incinerando los lodos para obtener energía, ahora se intenta mejorar aún más dicho balance; por ejemplo, produciendo combustibles (como el biogás en la digestión anaerobia) que permitan reducir la dependencia actual de fuentes no renovables. Esta es la dirección principal a la que apunta el Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos, elaborado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en 2015, que se ha citado en el párrafo anterior. En este proyecto, se evaluará una opción de este tipo: la producción de bioetanol a partir de la fermentación del lodo hidrolizado con bacterias. Cabe destacar en este punto el interés de este producto, dados sus múltiples usos en la industria y en la vida diaria: disolvente, reactivo, anticongelante y aditivo alimentario, entre otros usos (Stellman, 1998).

Seguidamente, se comentará el interés de los tratamientos hidrotérmicos, tales como la oxidación húmeda y la hidrólisis térmica, para mejorar las propiedades de los lodos de cara a su revalorización. A continuación, se hará hincapié en la posible fermentación de estos lodos

tratados hidrotérmicamente para producir un compuesto de interés, junto con la reducción de la materia orgánica principal contaminante de este tipo de residuos (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009).

Se han realizado diversos estudios con respecto a los tratamientos hidrotérmicos, que se expondrán en la sección siguiente relativa a las consideraciones básicas. En ellos, se ha podido comprobar la viabilidad de los mismos, llegándose a conseguir la solubilización de una gran parte de los compuestos de interés que contiene el lodo, como son los carbohidratos, proteínas, lípidos, etc. Estos compuestos se reducen de sus formas moleculares más complejas a sus componentes primarios (como, por ejemplo, de proteínas a aminoácidos, o de carbohidratos a monosacáridos) (Urrea *et al.*, 2014).

Por otro lado, las propiedades físicas del residuo también se ven afectadas como resultado de estas transformaciones: los sólidos y flóculos característicos de los fangos activos se descomponen, reduciéndose ampliamente su carga y, por tanto, su viscosidad (Urrea *et al.*, 2015). Asimismo, resulta en una mejora de la manejabilidad y facilidad de separación del agua del efluente de manera similar a lo que ocurre con otros tratamientos de estabilización del lodo, tal y como indica Suárez Iglesias *et al.* (2017) en su revisión, hay una considerable reducción de sólidos en suspensión asociada a estos tratamientos.

En lo relativo a las bacterias, cabe indicar que solo tienen acceso a los nutrientes que necesitan cuando estos se encuentran disueltos en el medio de crecimiento, de ahí el interés en el pretratamiento elegido. Se ha seleccionado para este estudio un tipo de bacterias ampliamente conocidas por su capacidad de producir etanol en sus fermentaciones, se trata de la especie *Zymomonas mobilis*. Estas bacterias gram-negativas, de carácter acidófilo, son perfectas por esta última condición para su prevalencia en los ambientes ácidos que proveerán tanto los lodos procesados como el residuo de manzana que complementarían el aporte de nutrientes al medio (Uldis, 2020). En la Figura 1, podemos observar su morfología, en la que se distinguen unos característicos bacilos cuyo tamaño oscila entre 2 y 6  $\mu\text{m}$  de largo, y que se agrupan en parejas (diplobacilos) o pequeñas cadenas.



Figura 1 Morfología de las *Zymomonas Mobilis* (Palamae et al., 2020).

Además, esta especie es capaz de resistir hasta un 16% de contenido en etanol en el medio de crecimiento (Mateusz *et al.*, 2018), esto unido a las características anteriores la convierte en una candidata ideal para el proceso.

En definitiva, se trata de una pareja de tratamientos que juntos apuntan a complementarse de manera idónea para convertir un residuo costoso y difícil de gestión en otro mucho más manejable y que permita obtener compuestos de valor añadido.

Por tanto, el objetivo general del presente trabajo es la revalorización de lodos depuradora para la obtención bioetanol por vía fermentativa empleando *Zymomonas mobilis*. Para ello, serán necesarios los siguientes objetivos específicos: i) estudiar el efecto de las condiciones de operación del tratamiento hidrotérmico a fin de obtener un medio fermentable, ii) minimizar la formación de compuestos inhibidores de la fermentación y iii) evaluar el efecto de la adición de otros residuos (de tipo alimentario) a fin de incrementar la producción de bioetanol.

## 2. CONSIDERACIONES BÁSICAS

### 2.1. CONCEPTOS CLAVE

**Lodos de depuradora:** residuo líquido, con un alto contenido en carga orgánica y en sólidos suspendidos, además de otros posibles contaminantes en menor medida, generado en las plantas de tratamiento de aguas residuales, tanto de urbanas como industriales (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009).

**Tecnologías hidrotérmicas:** Aquellos tratamientos térmicos consistentes en la aplicación de altas temperaturas y presiones en un medio/efluente acuoso, con el objetivo de que sus componentes orgánicos reaccionen para transformarse en otros compuestos de más interés. Entre los más habituales están la *Hidrólisis Térmica* y la *Oxidación Húmeda*. La diferencia entre ambos reside en la atmósfera utilizada en el proceso, siendo inerte (nitrógeno) en el primero de los casos y oxidativa (habitualmente oxígeno) en el segundo de ellos (Suárez Iglesias *et al.*, 2017).

**Azúcares reductores:** Son glúcidos químicamente activos, que actúan como reductores gracias a un grupo carboxilo característico en las reacciones metabólicas. En la práctica, son los sacáridos que servirán de sustrato a los microorganismos que degradaran el lodo hidrolizado para formar los compuestos de interés (Berg *et al.*, 2007).

**Inhibidores:** Sustancias que impiden el crecimiento de las poblaciones bacterianas, al influir en las condiciones del medio de manera negativa, por ejemplo, un pH poco adecuado, o sustancias que interfieren en las vías metabólicas alterándolas o bloqueándolas (Berg *et al.*, 2007).

***Zymomonas Mobilis*:** Bacterias gram-negativas, de crecimiento anaerobio facultativo. Pertenecientes a la clase de las  $\alpha$ -proteo bacterias, se caracterizan en la industria de los bioprocesos por su gran capacidad para producir etanol, y resistirlo en el medio sin inhibir su crecimiento (Kalnenieks *et al.*, 2020).

**Cultivo bacteriano:** Procedimiento según el cual se favorece el desarrollo de una pequeña población de bacterias, mediante el uso de un medio propicio y el aporte de los

nutrientes necesarios, para obtener una multiplicación de las mismas y, por tanto, una mayor cantidad de ellas para el uso pertinente en cada caso (Berg et, al, 2007).

**Crecimiento en placa:** Método de cultivo bacteriano en el que el medio es un sólido que se dispone en una placa de Petri. Habitualmente compuesto de agar, puede contener diversas sustancias (un antibiótico, por ejemplo) que controlen qué tipo de organismo concreto se desarrolle. Se emplea para obtener colonias aisladas para su reproducción posterior, o la identificación y/o cuantificación de especies concretas en muestras desconocidas (Berg et, al, 2007).

**Precultivo:** Proceso previo a una fermentación, según el cual un pequeño número de colonias de un microorganismo (sólidas) se introducen en un medio favorable, en cuanto a nutrientes y pH, para su crecimiento a fin de que las bacterias se desarrollen adecuadamente y luego se puedan inocular en un medio más desfavorable (Díaz, 2021).

**Inoculación:** Técnica en la que se introduce una cantidad establecida del precultivo en el medio fermentativo, para iniciar la reacción buscada. El medio final estará previamente esterilizado para evitar contaminaciones con otras especies no deseadas (Díaz, 2021).

**Densidad óptica:** Método de cuantificación de microorganismos, basado en la obstrucción del paso de la luz que provoca la presencia de dichos microorganismos en una muestra a priori clara, en la que la turbidez indica la presencia de estos (Díaz, 2021).

### **Fases de crecimiento de las bacterias** (Díaz, 2021)

**Fase lag o de latencia:** Al introducir un microorganismo en un medio, no comenzará a reproducirse inmediatamente puesto que debe primero afianzarse y acostumbrarse a las condiciones en las que se encuentra, esta fase inicial se caracteriza, por tanto, por permanecer prácticamente constante el número de especímenes, pero por tener una gran actividad metabólica.

**Fase de crecimiento exponencial:** Etapa en el desarrollo de las bacterias, que se da tras la adaptación inicial al medio, en la que al contarse con una gran disponibilidad de nutrientes, la reproducción y multiplicación está altamente promocionada y el número de organismos crece rápidamente (de manera exponencial).

**Fase estacionaria:** Momento en el que se equilibra la demanda y la disponibilidad de nutrientes en la fermentación, disminuyendo significativamente el crecimiento y manteniéndose constante la concentración de individuos.

**Fase de muerte celular:** Última etapa, caracterizada por el descenso en la densidad celular dada la escasez de nutrientes y la alta carga bacteriana presente en el medio.

## 2.2 CONTEXTUALIZACIÓN TEÓRICA

### 2.2.1 Residuos utilizados

Se emplearán dos residuos en este proyecto como materias primas que serán previamente tratadas hidrotérmicamente y luego sometidas a un proceso de fermentación con la bacteria *Zymomonas Mobilis*. Dichos residuos serán, un lodo activado de depuradora, y residuo de manzana.

Ya se ha mencionado en la introducción de este trabajo la problemática nacional asociada al gran volumen de lodos generado, y como se realizan esfuerzos gubernamentales para establecer directrices de reaprovechamiento de este tipo de residuos (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015). De igual manera es conocida la gran cantidad de residuos asociados a la industria hortofrutícola en España, donde un 10% de la producción inicial de estos alimentos se desecha solamente en la selección inicial tras la recolección (Conesa, 2018).

Los lodos de depuradora son el resultado de llevar a cabo procesos biológicos de digestión aerobia que permiten espesar la fracción sólida de los mismos. Mediante la aireación de estos lodos, se consigue que un consorcio de microorganismos digiera parte de la materia orgánica presente en el agua a tratar, para a continuación decantar el efluente separando el agua tratada de los sólidos que posteriormente serán espesados para su gestión (Baird y Cann, 2013).

Los lodos utilizados en este trabajo son similares a los usados en otros estudios realizados por el grupo de investigación, , tales como Urrea *et al.* (2018). Al caracterizar este residuo, se observó que la concentración en nutrientes orgánicos que pudieran servir como base para una fermentación alcohólica podría no ser adecuada dado su bajo contenido en carbohidratos: los valores máximos durante el tratamiento alcanzan entre 3 y 4 g·L<sup>-1</sup> cuando

se trató por oxidación húmeda a 160 °C y 40bar. Con lo cual, tal y como se confirmó en los ensayos realizados para este trabajo, este medio sin suplementar podría ser fermentable con *Zymomonas mobilis* pero la producción de etanol sería baja.

Es aquí donde cobra relevancia el residuo de manzana. Se trata de una opción que no deja de lado la economía circular, al tratarse de nuevo de materia desechada de otra industria. Y, sobre todo, contiene exactamente los compuestos necesarios para realizar la fermentación alcohólica: azúcares reductores y, en concreto, tanto glucosa como fructosa. Hecke *et al.* (2006) estudiaron el contenido en azúcares, y otros compuestos, de diversas clases de manzana. En general, los valores oscilan entre los 125 y los 150 g·L<sup>-1</sup> de azúcares reductores totales. Además presenta una importante cantidad del disacárido sacarosa, el cual está precisamente formado por una molécula de glucosa y otra de fructosa, que se espera genere los correspondientes monosacáridos durante el tratamiento hidrotérmico realizado.

### **2.2.2. Tratamientos hidrotérmicos**

Existe una amplia bibliografía al respecto de las tecnologías hidrotérmicas que ocupan este trabajo. Servirán como referencia y punto de partida a los estudios realizados, para ajustar los parámetros necesarios en las primeras pruebas que se lleven a cabo.

Comenzando con los tratamientos hidrotérmicos, Suárez Iglesias *et al.* (2017) desglosan ampliamente diferentes ensayos de este tipo, indicando datos específicos sobre a qué temperaturas, presiones y, en general, las condiciones de operación en las que se suelen realizar estos ensayos. En esta extensa revisión, se observan rangos de temperatura muy amplios, siempre superando los 100 °C y llegando hasta los 400 °C en función de las necesidades específicas de cada caso. Igualmente, para el caso de las presiones, habitualmente superiores a la atmosférica, pueden realizarse desde alrededor de 3 bares hasta más de 300. Estos rangos son tan amplios debido a la gran versatilidad de los tratamientos. Pueden realizarse o no en condiciones supercríticas, lo cual es una práctica común. Ello implicará elevados costes de operación en ese caso, pero las ventajas son amplias. El agua en condiciones supercríticas varía ampliamente sus propiedades: por ejemplo, su polaridad baja sustancialmente, permitiendo así una solubilización mucho mayor de los componentes orgánicos. En este trabajo, además, se detallan las transformaciones que tienen lugar durante los tratamientos. Así, los carbohidratos complejos se solubilizan y terminan dando azúcares simples y digeribles por los microorganismos. Por otro lado, las proteínas también se depolimerizan.

Se destaca también el estudio de Urrea *et al.* (2018), en el que se describe un estudio que sigue un procedimiento similar, trabajando a 40 bar y 160 °C, mientras que en este trabajo se fijan las condiciones de presión y se varía la temperatura entre 130 °C y 170 °C. Los resultados obtenidos por Urrea *et al.* (2017) mostraron que se solubiliza la mayor parte de la materia orgánica, destacándose un dato interesante de cara a una posible fermentación posterior: la concentración de biopolímeros en disolución aumenta considerablemente, obteniendo más de 7 g·L<sup>-1</sup> de proteínas y hasta 3 g·L<sup>-1</sup> de carbohidratos, partiendo de apenas 181 mg·L<sup>-1</sup> y 82 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Asimismo, el estudio de Urrea *et al.* 2015 se centró en la variación de la reología y el contenido en sólidos de lodos espesados como los empleados en este trabajo. Se destaca la obtención de un residuo del que el agua se puede separar con mucha más facilidad, reduciéndose ampliamente la fracción de sólidos, a la vez que la viscosidad aparente se reduce en casi dos órdenes de magnitud.

### **2.2.3. El catabolismo de las *Zymomonas Mobilis***

En la Figura 2, situada en la página posterior, puede observarse la principal ruta de obtención de energía por parte de *Zymomonas Mobilis*. Se emplea para ilustrar algunos de los componentes que se estudiarán durante las fermentaciones, así como para contextualizar el proceso que tiene lugar. En la parte superior de la imagen se observa como estos microorganismos parten de la glucosa y de la fructosa para producir energía. En el otro extremo está el etanol, el compuesto de interés a producir. Además de analizar la presencia de estos compuestos, la búsqueda de otros intermedios, como por ejemplo ácidos orgánicos (o sus formas ionizadas: fumarato, malato, etc.) resulta extremadamente útil para identificar si realmente se está siguiendo esta vía metabólica y los microorganismos están actuando como se espera de ellos.

Se deduce fácilmente de donde procede la necesidad de la adición del residuo de manzana. Su aporte en azúcares fermentables, en concreto fructosa y glucosa, resulta muy necesario ante la baja concentración en el lodo de partida.

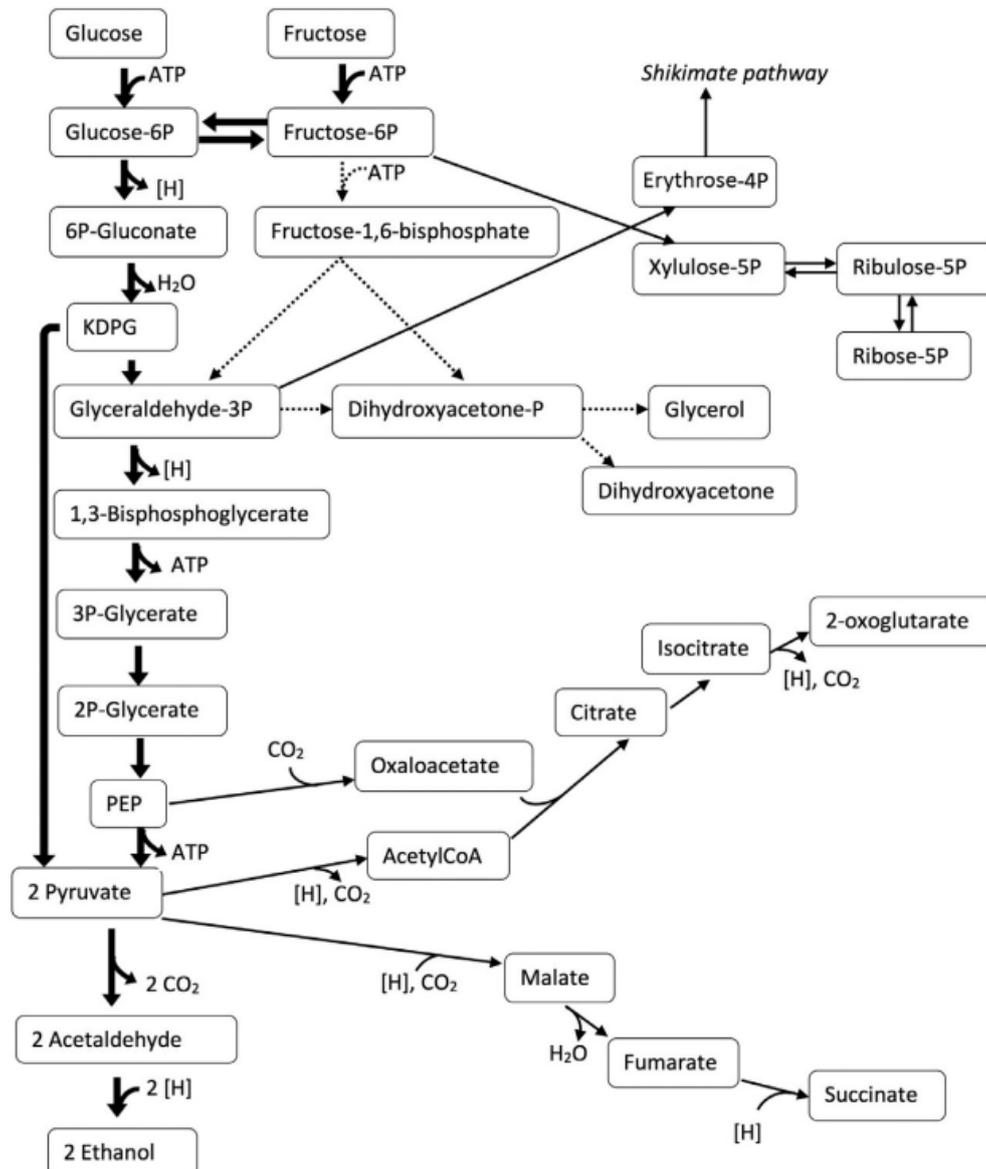


Figura 2. Ruta catabólica principal de las *Zymomonas Mobilis* (Kalnieks et al., 2020).

## 2.2.4. La fermentación de *Zymomonas Mobilis*

Se dispone de diferentes estudios de fermentación con *Zymomonas mobilis*, centrados en su mayoría en la producción de etanol, como es el caso de este trabajo, ya que estas bacterias destacan por su capacidad de producir este compuesto y su mayor resistencia a la inhibición, como se ha comentado anteriormente. Estos son los aspectos principales a tener en cuenta, y sobre los que se pone el foco en los artículos que se consultaron y se comentan a continuación.

La inhibición por producto puede ser un gran problema, en especial cuando dicho producto, el etanol, resulta tóxico para muchos microorganismos. Mateusz *et al.* (2018) llegaron a la conclusión de que la bacteria *Zymomonas mobilis* es más resistente al etanol gracias a la presencia en su superficie externa de un polisacárido basado en la galactosa. El 86% de esta barrera estaría formada por el biopolímero, que se relacionaría con el medio con procesos de solvatación con el etanol presente. Gracias a este proceso los microorganismos llegan a soportar hasta un 16% de etanol en el medio.

Lee y Huang (2000) estudiaron la fermentación de fructosa y glucosa, los azúcares mayormente presentes en el medio de fermentación usado en este trabajo, a pH=5, 30 °C, y con un 10% de inóculo en el medio inicial. Así, obtuvieron cantidades muy similares de etanol a distintas relaciones en masa de fructosa:glucosa, alcanzándose en todos los casos rendimientos entre 0,4 y 0,45 g etanol/g glucosa. La formación de biomasa se redujo de manera lineal a medida que se aumentaba la proporción de fructosa, y este fenómeno fue acompañado de un incremento en la concentración de sorbitol (un polialcohol procedente de la descomposición de azúcares). En cualquier caso, la cantidad de etanol obtenida fue bastante parecida en todos los casos, siempre en torno a 50 g·L<sup>-1</sup> para una concentración inicial de azúcares de 120 g·L<sup>-1</sup>, lo cual representa en concordancia un rendimiento aproximado de 0,416 g etanol/g glucosa. Por tanto, se extrae de cara a este trabajo que el perfil de azúcares reductores resulta menos relevante que la cantidad total de los mismos, ya que las variaciones en rendimiento no son muy elevadas en este estudio, ni en otros que se comentarán a continuación.

Cazetta *et al.* (2007) obtuvieron rendimientos similares, entre 0,32 y 0,40 g etanol/g glucosa, fermentando melaza con concentraciones iniciales de azúcares reductores entre 80 y 250 g·L<sup>-1</sup>. De aquí, se puede deducir que la concentración inicial tuvo un ligero efecto en el rendimiento, siendo capaces las bacterias de procesar el azúcar y producir cantidades proporcionales de alcohol, dado que la concentración de células inicial es la misma para todos los experimentos: 0,2 g·L<sup>-1</sup>. Dado que trabajan con unas concentraciones máximas de melaza de hasta 270 g·L<sup>-1</sup>, y el descenso en el rendimiento no es muy acusado (0,29 g etanol/g glucosa en el ensayo realizado a dicha concentración inicial), la inhibición por sustrato parece mínima. Por tanto, uno se considera un problema que pueda encontrarse en los experimentos realizados en este proyecto, ya que las concentraciones de azúcares iniciales son mucho más bajas.

Por último, resulta interesante destacar un artículo en el que se comparan fermentaciones similares entre sí con la diferencia de operar o no en condiciones estériles. Si bien en este proyecto se trabajará con esterilidad, resulta interesante saber en qué medida podría repercutir en el proceso. Tao *et al.* (2003) ensayan diversas variables (pH, autoclavado o filtrado esterilizante, en diversas combinaciones) pero todas las fermentaciones fueron realizadas con un 10% de inóculo al inicio, y a 37 °C de temperatura. Cabe destacar que el rendimiento permanece constante para  $\text{pH} \leq 5$ ; solo descendiendo en condiciones no estériles para pH superiores, de lo que se deduce que, a pH más ácidos y óptimos para las *Zymomonas*, no hubo otras especies que logran competir con ellas. En el caso de los ensayos autoclavados, se observó una cierta reducción en la concentración de azúcares ( $\approx 4,93\%$ ) debido a las reacciones de Maillard en el medio, lo cual redujo a su vez la producción de etanol, aunque el rendimiento obtenido fue constante. Para el pH óptimo de 4,5, también se observó que el proceso se ralentizaba ligeramente, llegándose a la misma cantidad de alcohol producida en menos tiempo en condiciones no estériles, además de quedar una menor cantidad de azúcar residual en estos últimos casos. Los autores concluyen en base a este par de resultados que la causa es probablemente la disminución de las fuentes de nitrógeno durante el proceso térmico de esterilización.

Se deduce de este último trabajo que la bacteria *Zymomonas mobilis* tiene una cierta resistencia ante competidores, sobre todo en condiciones ventajosas para ella como pueda ser el pH. Sin embargo, estos ensayos han sido realizados simplemente con agua corriente, mientras que en el caso de este proyecto los lodos residuales no han sido tratados previamente, de manera que se puede esperar una mayor y mucho más variada población bacteriana en el medio inicial. Si bien en el tratamiento hidrotérmico esta microbiota se inactivará dadas las condiciones de presión y temperatura empleadas por lo que el grado de esterilización podría ser comparable al del artículo.

## 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 3.1. PREPARACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISIS TÉRMICA

Los lodos utilizados provienen de una depuradora de aguas municipales de Asturias. Tras su análisis, y en base a los estudios anteriores llevados a cabo por el grupo de investigación, su utilización para las fermentaciones no resulta adecuada al no contar con la cantidad idónea de carbohidratos para que las bacterias pudieran usarlos como sustrato. Debido a ello, se explorará en este trabajo el efecto de la suplementación de los lodos con residuo de manzana.

Aunque los lodos presentan unas características adecuadas para ser introducidos en un reactor y correctamente agitados, no ocurre lo mismo con el residuo de manzana. Por ello, es necesario su procesamiento antes del tratamiento hidrotérmico.

Para obtener este residuo de manzana, se dejaron madurar las manzanas una semana a temperatura ambiente tras su compra, y a continuación, se introdujeron cuatro días en una estufa a 35 °C, para acelerar su degradación y obtener manzanas que no son aptas para la venta y consumo, similares a un residuo hortofrutícola habitual. A continuación, los corazones de las frutas fueron desechados y el resto de la materia fue triturada para homogeneizarla y poder mezclarla con los lodos usados.

El contenido de azúcares (totales y reductores), proteínas, ácidos húmicos y compuestos fenólicos fue estudiado para los residuos de partida tanto manzanas como lodo, y determinado durante el tratamiento hidrotérmico para conocer su evolución.

En base a los estudios realizados previamente relativos a tratamientos hidrotérmicos, cabe indicar que la variable más importante de este proceso es la temperatura (Suárez Iglesias *et al.*, 2017): de ella depende en gran medida el grado de solubilización de los componentes que contienen tanto el lodo como el residuo de manzana utilizado. Si no se elige correctamente, no se conseguirán los nutrientes suficientes para la fermentación posterior. Si es demasiado

baja, la solubilización de componentes no será adecuada; sin embargo, si es demasiado alta estos componentes podrían degradarse y generar compuestos inhibidores de la fermentación.

De la misma manera, podría ocurrir que incluso ajustando la temperatura el lodo, este no sea capaz de proveer la cantidad necesaria de azúcares para la degradación bacteriana, por ello se ensayarán también diversas composiciones, variándose el porcentaje de residuo de manzana añadido respecto al lodo utilizado.

Antes de iniciar los experimentos de hidrólisis térmica se homogeneiza la mezcla lodo/residuo de manzana a introducir en el reactor, agitándolo con una hélice motorizada a 750 rpm durante 20 minutos. Este paso es vital para asegurar una distribución uniforme del residuo de manzana en el lodo, en el caso de los experimentos que presenten ambos compuestos. También se realiza una última mezcla manual en el recipiente, antes de introducirlo al reactor, para evitar la sedimentación parcial de la mezcla. En la Tabla 1, se presentan las condiciones de operación (presión y temperatura) y composición de los ensayos realizados.

*Tabla 1. Condiciones de operación y composición de los tratamientos hidrotérmicos realizados.*

<b>Experimento</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Presión (bar)</b>	<b>Volumen de lodo (% en volumen) (ml (%))</b>	<b>Volumen de manzana residual (% en volumen) (ml (%))</b>
<b>1</b>	170	40	490 (70%)	210 (30%)
<b>2</b>	150	40	490 (70%)	210 (30%)
<b>3</b>	130	40	490 (70%)	210 (30%)
<b>4</b>	150	40	700 (100%)	-
<b>5</b>	150	40	-	700 (100%)

Los experimentos de hidrólisis térmica fueron realizados en un reactor de 1 litro, que fue llenado hasta un 70% de su capacidad por razones de seguridad. Además, el sistema cuenta con un agitador de hélice que permite mantener la homogeneidad en el interior, el cual funcionó a una velocidad de 500 rpm durante todo momento; un humidificador de 2 litros de capacidad para acondicionar la corriente de nitrógeno a las condiciones de presión y temperatura del experimento, y que se fijó en 1200 mL/min; una manta térmica para realizar los experimentos a diferentes temperaturas (entre 130 y 170 °C); una válvula reguladora de la presión, para mantener esta variable en el valor deseado, acompañada de un manómetro para conocer su valor en tiempo real. Asimismo, el equipo dispone de un controlador PID (proporcional-

integral-diferencial) para fijar y controlar los valores de la temperatura, tanto del reactor como del humidificador, así como la presión, el caudal de nitrógeno y la agitación empleados.

Para conocer la evolución del tratamiento, se tomaron muestras de aproximadamente 20 mL a diferentes tiempos: en el inicio de la operación, a los 15 minutos, y sucesivamente a los 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 minutos, lo que se corresponde con un total de 5 horas de tratamiento.

Por último, se centrifugaron las muestras durante 20 minutos a 12000 rpm, y se separó el sobrenadante del resto de sólidos de la muestra. Dicho sobrenadante se empleó como medio de fermentación y para su caracterización en lo relativo a azúcares totales, reductores y proteínas.

## **3.2 REALIZACIÓN DE LAS FERMENTACIONES**

### **3.2.1 Inoculación y puesta en marcha. Esterilidad.**

El primer paso para realizar la fermentación consistió en preparar el precultivo. Para ello, se cuenta con colonias de *Zymomonas Mobilis* CECT 560 (obtenida de la colección española de cultivos tipo) aisladas en placas de agar. Se recoge con un asa de siembra un pequeño número de colonias y se introducen en 100 mL de medio líquido de crecimiento idóneo para esta bacteria, autoclavado previamente, que se compone de extracto de levadura ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y glucosa ( $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Pasadas 24 h a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (temperatura ideal para el crecimiento de la bacteria *Zymomonas Mobilis*), una vez que las bacterias se encuentran en fase de crecimiento exponencial, este precultivo (10% v/v) se inocula en los recipientes de 100 mL donde se realiza la fermentación de la mezcla de lodo y residuo de manzana tratado hidrotérmicamente.

En estas etapas, resulta vital mantener la esterilidad siempre que se manipulen los fermentadores, por lo que se trabajó siempre en una campana de flujo laminar. Todos los materiales utilizados fueron autoclavados durante 20 minutos a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  en presencia de vapor de agua e introducidos en la campana de flujo laminar para garantizar su esterilidad. Previamente a la utilización de dicha campana se limpiaron las superficies con etanol y se irradió con luz ultravioleta durante al menos 15 minutos. Se tomaron muestras a diferentes tiempos entre 0 y 72 h a fin de seguir el proceso de fermentación. .

Para comenzar los experimentos fermentativos, basta con mezclar el inóculo con la mezcla de residuos hidrolizados, momento que se considera el inicio del experimento. En este trabajo, se estudia la influencia del porcentaje de inóculo añadido a fin de analizar su efecto en la producción etanol. Para ello, se han elegido para los ensayos los porcentajes de 5%, 10% y 20% (v/v) de inóculo. Dado que los experimentos se llevan a cabo en volúmenes de 100 mL, las cantidades añadidas para los experimentos son las mostradas en la Tabla 2. Estos se realizan también por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Una vez más, los fermentadores se mantendrán durante el ensayo a 30 °C en un incubador con agitación orbital (a 50 rpm).

Tabla 2. Porcentajes (%) de inóculo añadido, y volúmenes de inóculo y de medio hidrolizado añadidos a cada fermentación.

Inóculo añadido (%)	Volumen de inóculo (ml)	Volumen de residuos tratado (ml)
5	5	95
10	10	90
20	20	80

Tal y como se ha indicado previamente, la esterilidad es vital en este tipo de operaciones. Las adiciones de los componentes a los diversos fermentadores usados, así como la toma de muestra, se llevarán a cabo con material esterilizado y siempre en una campana de flujo laminar.

### 3.2.2 Toma de muestras y procesado

Las muestras han de ser del mínimo volumen necesario para realizar las determinaciones analíticas, ya que no es adecuado retirar más del 10% del volumen inicial para no alterar las condiciones del experimento.

Con una micropipeta esterilizada (así como la punta utilizada), se retira 1 mL a cada uno de los fermentadores, y se guardan en un tubo de microcentrífuga, también estéril. A continuación, las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 10 000 rpm para separar los sólidos del medio líquido. En el medio líquido (sobrenadante), se encuentran los componentes de interés: el etanol producido por las bacterias, así como los nutrientes no metabolizados. La fracción sólida se corresponde con los microorganismos.

En primer lugar, el sobrenadante se pasa a un vial diferente donde se almacena a 4 °C antes de proceder al análisis tanto de los nutrientes consumidos como del etanol generado. Después, se añade la misma cantidad de cloruro sódico al 0.7% (p/v) estéril al tubo original que contiene las células. Agitando el tubo en un vórtex se resuspenden las mismas, listas para el estudio del desarrollo microbiano.

## **3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **3.3.1 Determinación de carbohidratos**

Dubois *et al.* (1956) describe un método utilizado en gran cantidad de publicaciones científicas. Apenas con dos reactivos de sencilla preparación se obtiene una respuesta colorimétrica proporcional al contenido en carbohidratos de la muestra. Estos reactivos son una disolución de fenol al 5% en volumen, y ácido sulfúrico al 96% (se vende comercialmente con estas características).

El procedimiento es el siguiente: A 1 mL de muestra se le añade primero 0,5 ml de la disolución fenólica, y a continuación, 2,5 ml del ácido sulfúrico concentrado. Tras mezclar bien los reactivos, se deja reposar la muestra a temperatura ambiente 15 minutos, y a continuación, se mantiene otros 15 minutos en un baño de agua a 50 °C. Por último, se lee la absorbancia (ABS), medida en un espectrofotómetro a 492 nm de longitud de onda.

Los patrones para determinar la recta de calibrado se preparan con D-glucosa del 99% entre 0 y 100 ppm, y se tratan de la misma manera que a una muestra a determinar.

### **3.3.2 Determinación de azúcares reductores**

El método utilizado para analizar este subgrupo de sacáridos, englobado en el anteriormente estudiado, se conoce como método DNS, debido al uso del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Este compuesto oxida los azúcares reductores, lo cual se traduce en una coloración de la muestra, de manera proporcional a la concentración del analito. Este método fue descrito inicialmente por Sumner y Graham (1921).

El reactivo de DNS se prepara disolviéndolo hasta un 1% en peso, junto a otros reactivos. Para preparar 100 mL del reactivo, se disuelve 1 gramo del ácido en 20 o 30 ml de disolución de hidróxido de sodio 0.2 M (preparada previamente). A continuación, se añaden

30 g de tartato de sodio y potasio, previamente disueltos en 50 ml de agua destilada. Se diluye la mezcla hasta 100 mL. Se deja en agitación durante 12 h para la disolución total de los componentes.

Para realizar el análisis basta con añadir 0,5 ml del reactivo a 0,5 ml de muestra, y calentarla la mezcla en un baño a 95 °C durante 5 minutos. Después hay que enfriar las muestras durante 5 minutos en un baño de hielo. Seguidamente, se añaden 5 mL de agua destilada y se mide la absorbancia a 540 nm.

Los patrones para realizar el calibrado se preparan con D-glucosa del 99% entre 0 y 1000 ppm, y se tratan de la misma manera que a una muestra a determinar..

### **3.3.3 Determinación de proteínas y ácidos húmicos**

El método, conjunto para la determinación de contenido proteico y ácidos húmicos, es tomado de Lowry *et al.* (1951) con algunas modificaciones al original. Estas modificaciones se basan en los estudios de Frølund *et al.* (1995) sobre las interferencias de los segundos compuestos mencionados respecto a los primeros.

Se parte de tres disoluciones, una de carbonato de sodio al 2% en peso e hidróxido de sodio 0,1 M (disolución A); otra de sulfato de cobre pentahidratado al 1% en peso (disolución B1); y por último tartato de sodio y potasio al 2% (disolución B2). Estas disoluciones se mezclan entre sí en diferentes proporciones (de ahí que se empleen abreviaturas) para obtener los dos reactivos preparados que se usarán junto al de Folin-Ciocalteu (comprado comercialmente) y que se diluye 1:2 (v/v) en agua destilada para su uso, que debe realizarse el mismo día de la preparación.

A partir de estas disoluciones, se preparan las finales utilizadas en el método. La disolución C1 se utiliza para determinar las proteínas, y se consigue combinando en una proporción volumétrica de 100:1:1 los reactivos A, B1 y B2 respectivamente. La disolución C2 se prepara de igual manera, pero sustituyendo el reactivo B1 por agua destilada.

El método es sencillo, y se explicará para la determinación conjunta tanto de las proteínas como de los ácidos húmicos. A 1 mL de muestra se le añaden 5 mL del preparado C1, y paralelamente se repite el proceso, pero con el reactivo C2. Estas mezclas se dejan reposar a oscuras durante 15 minutos antes de añadirles 0,3 ml del reactivo de Folin diluido y dejar

reposar otros 30 minutos a oscuras. Se miden las absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 580 nm. De la primera de ellas se obtiene la denominada “absorbancia total”, este término deriva exclusivamente de la definición de la segunda absorbancia como “ciega” a los efectos del sulfato de cobre (debido a la ausencia de este en favor de agua destilada). Una vez obtenidos ambos datos, se obtienen unas absorbancias finales que son las utilizadas en los calibrados y determinaciones pertinentes, mediante las siguientes fórmulas:

$$ABS_{proteinas} = 1,25 \cdot (ABS_{total} - ABS_{ciega}) \quad [1]$$

$$ABS_{ácidos\ húmicos} = ABS_{ciega} - 0,2 \cdot ABS_{proteinas} \quad [2]$$

Se emplea albúmina de suero bovino (BSA) y ácido húmico como patrones para las proteínas y ácidos húmicos, respectivamente. En ambos casos, se preparan estándares con concentración entre 0 y 500 ppm.

### 3.3.4 Determinación de compuestos fenólicos

El método de Folin y Ciocalteu (1927) se ha convertido en un estándar con el paso de los años para la determinación de compuestos fenólicos.

Es un método sencillo que requiere dos reactivos para realizar las determinaciones: una disolución de  $\text{NaCO}_3$  al 6% en peso y el reactivo Folin-Ciocalteu que se diluye 1:10 (v/v) partiendo del comercial.

Se comienza con 400  $\mu\text{L}$  (microlitros) de la disolución problema. A esta se le añaden 3 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y se deja reposar durante 5 minutos en ausencia de luz, en un baño termostatzado a 22 °C. A continuación, se añaden 3 mL de la disolución de  $\text{NaCO}_3$  y se devuelve la mezcla al baño durante otros 90 minutos. Finalmente se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 725 nm.

Los patrones para la determinación de la recta de calibrado se preparan disolviendo ácido gálico entre 0 y 100 ppm.

### **3.3.3 Análisis de los resultados: densidad óptica, crecimiento en placa, cromatografía.**

En el título de este apartado se mencionan tres herramientas de análisis. Las dos primeras servirán para cuantificar en cada muestra tomada de las fermentaciones, la cantidad de células de *Zymomonas mobilis* presentes en dicho momento, y así poder analizar su avance con el tiempo. La tercera de estas herramientas: la cromatografía líquida de alta eficiencia o resolución (HPLC) permitirá evaluar el contenido de etanol, glucosa y fructosa presentes.

Dado que se resuspenden las células en el mismo volumen de cloruro sódico al 0.7% (p/v) que había de medio fermentativo, la concentración de estas permanece constante. Esto resulta muy importante para poder cuantificar ahora las poblaciones de manera correcta.

En las medidas de densidad óptica se observa la oposición al paso de la luz por la turbidez que provocan las células, y la turbidez es exclusiva de las mismas, ya que se encuentran ahora en un medio transparente como es el cloruro sódico. Al medir la absorbancia en un espectrofotómetro, esta es, por tanto, proporcional a la cantidad de células existente en la muestra. Esto sirve como una doble comprobación de que el crecimiento en placa se está realizando correctamente.

Para realizar dicho crecimiento en placa, es necesario diluir la población bacteriana, de lo contrario crecerían demasiadas células como para poder contar las colonias aisladas individualmente. Para ello, se realizan las denominadas “diluciones en serie”, consistentes en ir diluyendo 1:10 (v/v) sucesivamente la muestra que contiene las células. Para ello, se toman 100  $\mu$ L del tubo de microcentrífuga y se pasan a otro tubo que contiene 900  $\mu$ L de agua destilada. Repitiendo el proceso con el nuevo tubo se irán consiguiendo diluciones consecutivas:  $10^0$  (1),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , etc. Para que un conteo en placa sea válido, el número de colonias individuales contenidas en la placa debe ser de entre 30 y 300. Por tanto, es complicado a priori elegir la dilución correcta para obtener datos efectivos. Por ello, para cada muestra se realizarán siembras a tres diluciones diferentes, entre  $10^{-3}$  y  $10^{-6}$ , tendiendo hacia las muestras más diluidas a medida que nos aproximamos a los tiempos en los que se espera una mayor concentración celular.

De esta manera, comparando los datos de crecimiento en placa con las medidas de la densidad óptica, se comprueba que los puntos experimentales obtenidos sean adecuados, y así

poder conocer la curva de crecimiento bacteriano, y otros datos de interés como el tiempo óptimo de fermentación para maximizar la producción de etanol, conocer el periodo de latencia de las células, comparar rendimientos y, en definitiva, optimizar el bioproceso en cuestión.

Por último, la cromatografía líquida es el método analítico del que obtendremos más información, ya que permite analizar una muestra para determinar los componentes orgánicos de interés tras fermentación: el etanol producido, la glucosa y la fructosa restantes, así como los ácidos orgánicos que se vayan formando o los derivados de las vías metabólicas de las bacterias. En el cromatógrafo, la fase móvil consistió en una disolución 0,45 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y el tiempo de elución fue de una hora, para asegurar que todos los compuestos de interés aparecen en el cromatograma final. Se emplea un detector de matriz de diodos UV que permite medir simultáneamente las señales de salida a 3 longitudes de onda diferentes, para hallar la óptima y mejorar la resolución de la medición de esta manera.

Para realizar el análisis fue necesaria una dilución de las muestras de 1:10 (v/v), en agua desionizada. Además, estas se pasan por un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,45 µm, para eliminar los posibles sólidos presentes que podrían obstruir la columna del cromatógrafo. Una vez procesadas, las muestras se almacenan en viales de cromatografía de 1 ml, refrigeradas a 4 °C a la espera del análisis para evitar la degradación de las mismas. El volumen de inyección final a la columna es de 20 µL.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CALIBRADOS DE LOS MÉTODOS

#### 4.1.1 Métodos espectrofotométricos

Como se ha explicado anteriormente, este tipo de métodos consiste en la práctica en comparar la señal que genera el equipo al introducir la muestra, con señales correspondientes a composiciones conocidas (patrones). Esta práctica forma parte del procedimiento habitual para estos ensayos, y al estar tan extendida, tan solo se incluirá en este apartado uno de los calibrados de forma detallada, a modo de ejemplo. El resto de los mismos puede consultarse en el apéndice 1, situado al final de la memoria.

Para obtener la recta de calibrado de la concentración de carbohidratos totales, se utilizan patrones de D-glucosa, la concentración máxima que permite un buen rango de valores manteniendo la linealidad es de 100 ppm (0,1 g·L<sup>-1</sup>). Por tanto, basta con disolver 0,01 g en 100 mL de agua destilada para obtener una cantidad suficiente de disolución madre a partir de la cual producir patrones a distintas concentraciones. Usando 1 mL de la madre se obtiene el punto de 100 ppm, diluyendo 0,1 mL de esta con 0,9 mL de agua destilada se obtiene el punto a 10 ppm, y así sucesivamente. En la Tabla 3, se presentan los valores de absorbancia obtenidos para cada patrón. La representación gráfica de estos valores junto a la recta de regresión lineal obtenida se muestra en la Figura 3.

Tabla 3. Concentraciones, absorbancias medidas y sus valores medios para los patrones de glucosa.

Concentración (ppm)	ABS <sub>1</sub> (UA)	ABS <sub>2</sub> (UA)	ABS <sub>3</sub> (UA)	ABS <sub>media</sub> (UA)
10	0,093	-	0,099	0,096
30	0,158	0,168	0,138	0,155
50	0,311	0,330	0,342	0,328
70	0,482	0,494	0,503	0,493
90	0,590	0,654	0,621	0,622
100	0,712	0,692	0,695	0,700

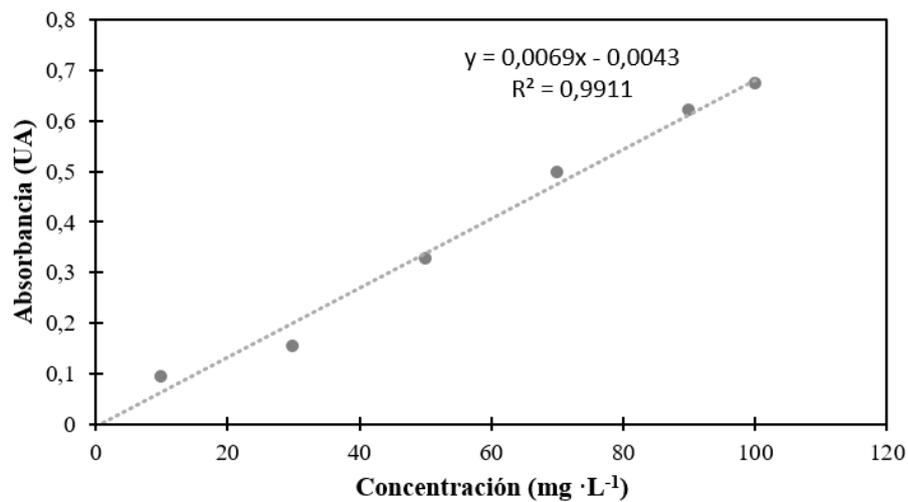


Figura 3. Absorbancia frente a concentración para los patrones de glucosa.

Con esta recta de calibrado se calcularán los valores de concentración de carbohidratos de las muestras, despejando su valor de la ecuación tras introducir el valor de absorbancia obtenido con la media de tres valores medidos.

A continuación, en la Tabla 4, se resumen los resultados obtenidos para los calibrados realizados, siendo  $a$  la pendiente de cada recta,  $b$  la ordenada en el origen, y  $R^2$  el coeficiente de linealidad de los valores reales frente al ajuste lineal realizado.

Tabla 4. Pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de determinación lineal de las rectas de calibrado.

	$a$ (UA · L · mg <sup>-1</sup> )	$b$ (UA)	$R^2$
<b>Carbohidratos totales</b>	0,0069	-0,0043	0,991
<b>Azúcares reductores</b>	0,0005	-0,0112	0,994
<b>Proteínas</b>	0,0011	0,0157	0,991
<b>Ácidos húmicos</b>	0,0011	0,0061	0,999
<b>Compuestos fenólicos</b>	0,0053	0,0059	0,998

#### 4.1.2 HPLC

En el caso de los calibrados para las pruebas de cromatografía líquida de alta resolución, el procedimiento para la obtención de las rectas es igual para todos los compuestos. Simplemente se preparan, en agua desionizada, disoluciones de las concentraciones deseadas. El rango seleccionado es entre 0 a 4000 ppm (dado que se mantiene la linealidad).

Los patrones deben ser filtrados con filtros de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  al igual que las muestras para evitar la posible inclusión de partículas que obstruyan la columna cromatográfica.

Basta con integrar las señales de salida del cromatógrafo para relacionar linealmente el área de cada pico con la concentración original. Los calibrados también se presentan en el apéndice 1.

## **4.2. RESULTADOS DE LAS HIDRÓLISIS TÉRMICAS**

### **4.2.1 Estudio de la influencia de la temperatura**

La variación de las temperaturas entre 130 °C y 170 °C permite observar la influencia de esta en la cinética del proceso. En un cambio de 40 °C pueden apreciarse grandes cambios entre experimentos: a mayor temperatura se solubilizarán antes los azúcares, pero también pueden acabar degradándose. De ahí que puede alcanzarse o no una mayor concentración de carbohidratos en el medio, pero si esta mejora va acompañada de la formación de inhibidores, no resultaría adecuado. También debe tenerse en cuenta el aspecto económico, puesto que una diferencia tan considerable de temperatura implica también una variación grande en los costes del proceso, a la hora de implementarlo a escala industrial.

A continuación, se presentan los resultados de forma comparativa, juntando en cada figura, para cada aspecto estudiado, los experimentos a las tres temperaturas indicadas para poder observar fácilmente la influencia de la variable estudiada.

#### ***4.2.1.1. Análisis espectrofotométricos de la solubilización de nutrientes***

El efecto de la temperatura en la formación de carbohidratos es más acusado durante los primeros 30 minutos de reacción, comenzando a disminuir su valor de manera significativa a partir de dicho tiempo, tal y como se observa en la Figura 4. Además, como era de esperar se obtuvieron menores solubilizaciones a temperaturas más bajas. Así, a 130 °C, se alcanzó una concentración máxima de 67,7  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a los 30 min, mientras que para 170 °C, dicha concentración fue un 29% superior para ese mismo tiempo. Por otro lado, a tiempos largos de reacción

(300 minutos), la concentración de carbohidratos resultó a menor a 170 °C ( $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) que a 130 °C ( $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), a consecuencia de su degradación.

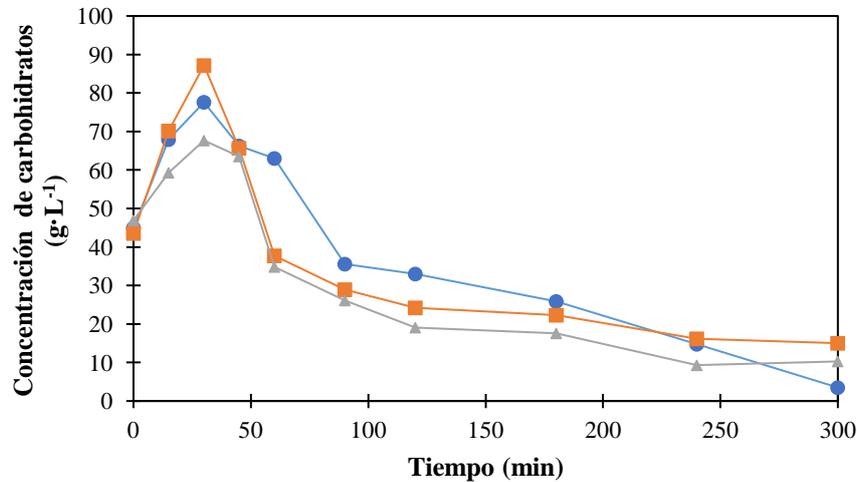


Figura 4. Evolución de la concentración de carbohidratos frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.

Los resultados obtenidos para los azúcares reductores, representados en la Figura 5, siguen la tendencia anterior, siendo más acusada su generación durante los primeros 30-45 minutos. Nuevamente, se obtuvieron menores solubilizaciones a temperaturas más bajas, alcanzándose la máxima concentración ( $21,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a los 45 min a 130 °C, mientras que para 170 °C, el máximo ( $29 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se obtuvo a los 30 minutos. Con relación a la máxima cantidad de azúcares totales (carbohidratos), los reductores suponen alrededor de un 32% independientemente de la temperatura empleada. Estos datos ponen de manifiesto la cantidad de sustrato disponible para la fermentación posterior, ya que indica la concentración total de azúcares simples susceptibles de ser degradados. Se espera un perfil de sacáridos que encaje con las rutas metabólicas mostradas en la contextualización teórica, con elevadas concentraciones de glucosa y fructosa. En el próximo epígrafe estos datos se complementarán con un desglose mediante el estudio en HPLC de las mismas muestras.

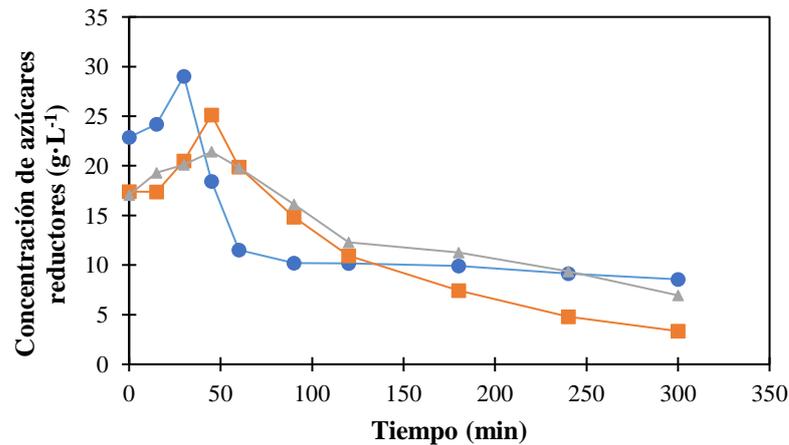


Figura 5. Evolución de la concentración de azúcares reductores frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.

En lo relativo a los compuestos fenólicos siguen una evolución diferente a la de los azúcares tanto totales como reductores, ya que estos se degradan parcialmente y de forma menos acusada después de solubilizarse. Su determinación nos permite conocer la cantidad de un tipo de compuestos inhibidores de la fermentación. A la vista de la Figura 6, cabe indicar que para las tres temperaturas se alcanza el máximo tras 60 minutos, pasado el cual tiende a estabilizarse la concentración, salvo para 170 °C en el que se produce una degradación del 56% tras 300 min de reacción. Los datos obtenidos resultan adecuados, ya que en los tiempos a los que se produce la cantidad máxima de carbohidratos y azúcares reductores solubilizados (30-45 minutos), los valores se sitúan por debajo de 1 g·L<sup>-1</sup>.

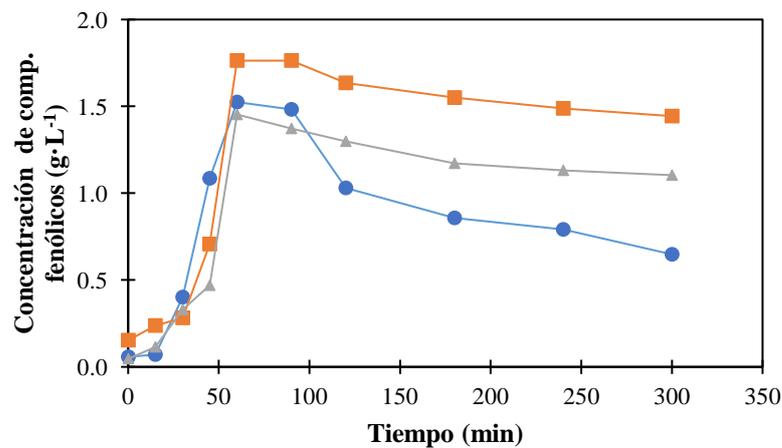


Figura 6. Evolución de la concentración de compuestos fenólicos frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.

El pH, cuya evolución se puede observar en la Figura 7, apenas varía durante los experimentos. Como consecuencia de la solubilización de los diversos componentes orgánicos, se intensifica el carácter ligeramente ácido del medio inicial, posiblemente debido a la degradación de algunos de los compuestos solubilizados en favor de ácidos orgánicos.

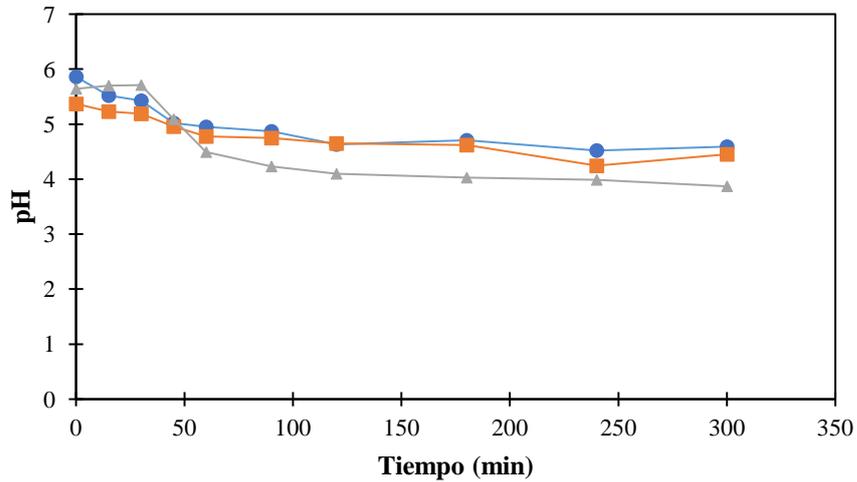


Figura 7. pH frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.

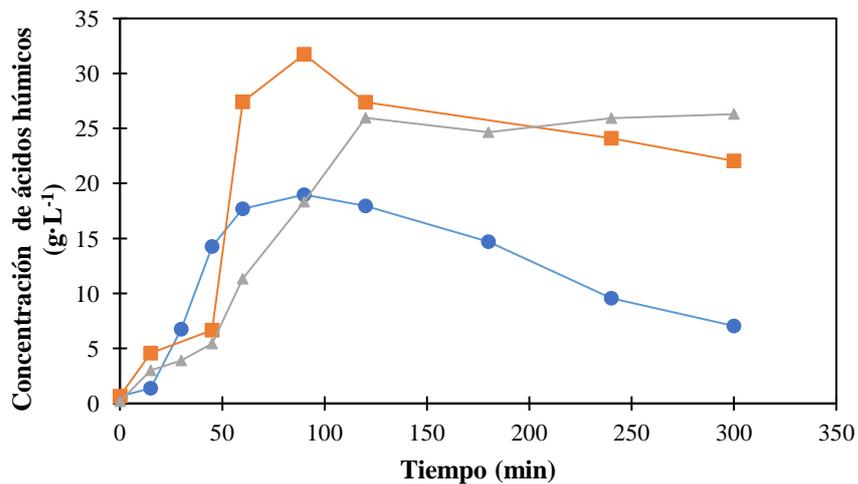


Figura 8. Concentración de ácidos húmicos frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.

A la vista de los resultados, los ácidos húmicos son los compuestos donde parece que se observan más diferencias, en cuanto a sus dinámicas y tendencias, entre las tres temperaturas

(Figura 8). Así, se alcanzó una mayor degradación de los compuestos a medida que aumenta la temperatura, viéndose un claro descenso de la concentración para tiempos largos de reacción (240-300 minutos) a 170 °C mientras que a 130 °C, los valores permanecen constantes después de llegar al máximo tras 120 minutos de reacción. Además, se observó que el máximo se desplazaba en el tiempo en función de la temperatura, alcanzándose antes para temperatura más elevadas. Desde el punto de vista de la fermentación, son las sustancias de menor interés, ya que no son fácilmente asimilables por muchos microorganismos. No obstante, el comportamiento de los ácidos húmicos en este tipo de tratamientos si puede resultar de interés de cara a otro tipo de aplicaciones posteriores para el hidrolizado.

En la Figura 9, se muestra la evolución de las proteínas con el tiempo. La tendencia que presenta es similar a la de los compuestos fenólicos o ácidos húmicos a temperaturas bajas (130-150 °C). El valor máximo se alcanzó a los 60 min, comenzando a decrecer la concentración ligeramente a partir de ese tiempo, lo que implica la existencia de procesos degradativos. Estos procesos parecen ser más o menos independientes de la temperatura en este rango de las mismas. Así, a 170 °C la concentración de proteínas disminuyó un 17,0% para 300 minutos de reacción, mientras que para 130 °C se redujo un 16,7%. A la vista de los resultados, se espera que la concentración resulte suficiente para realizar la fermentación correctamente, ya que en los precultivos de *Zymomonas mobilis* se utilizan 5 g·L<sup>-1</sup> de levadura, siendo esta la principal fuente de péptidos para los microorganismos y tras estos tratamientos los valores obtenidos fueron similares o ligeramente superiores.

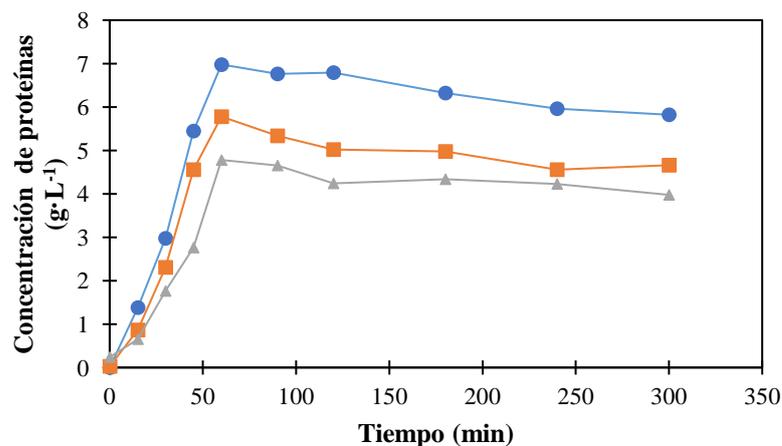


Figura 9. Concentración de proteínas frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.

#### 4.2.1.2 Análisis cromatográfico del perfil de azúcares

Los azúcares presentes en las muestras analizadas fueron principalmente fructosa y glucosa. Hecke *et al.* (2006) estudiaron la composición en azúcares (y otros compuestos) de múltiples variedades de manzana. Para todas ellas, principalmente encontraron fructosa, sacarosa (un disacárido formado por fructosa y glucosa) y glucosa. De ahí que lo más probable es que la sacarosa se divida en sus dos componentes principales. Esto se confirma en la sección 4.2.2.2 en la que se comentan los resultados de hidrólisis únicamente de residuo de manzana.

Las tendencias observadas fueron similares entre la fructosa y la glucosa, tal y como se puede observar en las Figuras 10 y 11, respectivamente. La solubilización ocurre rápidamente durante los primeros 15-30 minutos de reacción, siendo ligeramente más rápida para la fructosa que para la glucosa (la cual aumenta en un 20%, aproximadamente, durante los primeros 45 minutos). A partir de ahí, la degradación comienza a ser acusada, aunque resulta menor a menores temperaturas. Dicha degradación es más intensa para la fructosa que para la glucosa. Así, tras 120 min a 130 °C todavía queda una concentración de glucosa de 4,7 g·L<sup>-1</sup> partiendo de un máximo de 8,5 g·L<sup>-1</sup> (reducción del 44,7%), mientras que para la fructosa el valor resultó ser 6,5 g·L<sup>-1</sup>, siendo el máximo 28,4 g·L<sup>-1</sup> (reducción del 77,1%).

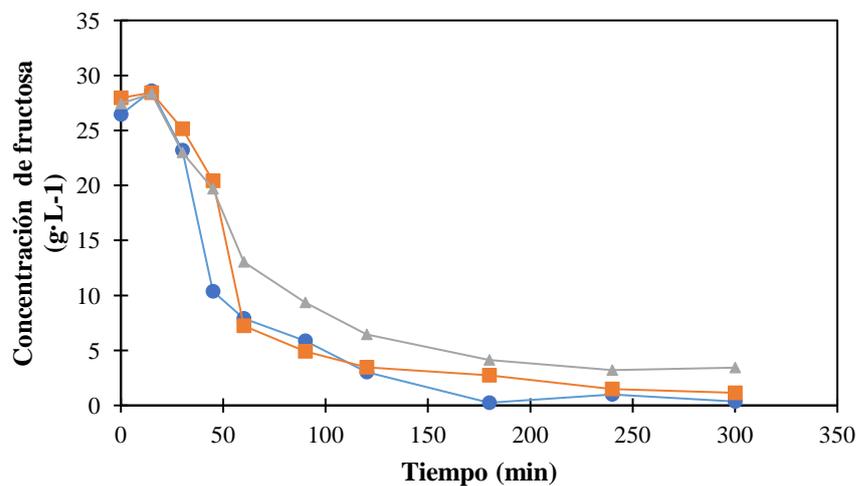


Figura 10. Concentración de fructosa frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C (▲), 150 °C (■) y 170 °C (●), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.

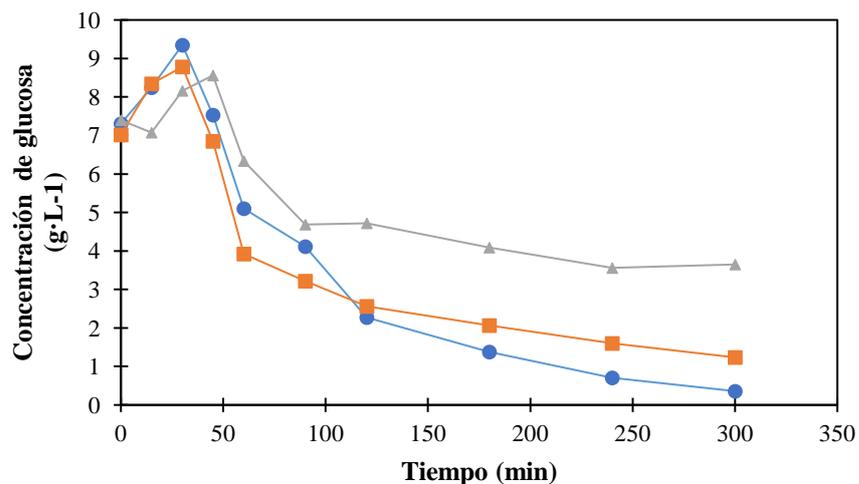


Figura 11. Concentración de glucosa frente al tiempo para las hidrólisis térmicas realizadas a 130 °C ( $\blacktriangle$ ), 150 °C ( $\blacksquare$ ) y 170 °C ( $\bullet$ ), con 70% de lodo y 30% de residuo de manzana.

#### 4.2.2 Estudio de la suplementación con residuo de manzana

En este punto, cabe indicar que se realizaron tres experimentos de hidrólisis térmica: i) lodo de depuradora sin ninguna adición; ii) mezcla de lodo con un 30% (v/v) de residuo de manzana y iii) residuo de manzana.

Con esto se busca determinar el efecto que tiene cada uno de los dos componentes en el tratamiento hidrotérmico, así como caracterizar los residuos en usados en las condiciones iniciales y determinar si hay algún tipo de interacción debido a su mezcla.

Dada la distinta naturaleza de cada uno de los tres experimentos, se ha considerado mostrar los resultados de manera individual y no presentar gráficas comparativas.. Ello es debido a la composición tan desigual entre el lodo de depuradora y el residuo de manzana, lo que dificulta su comparación al presentar los diferentes compuestos para cada una de las tres hidrólisis valores que están en órdenes de magnitud distintos. Por este motivo, se presentan los datos en forma de tablas, para así ofrecer una comparación numérica de la gran diferencia existente, y que además justifica finalmente la adición del residuo estudiado.

##### 4.2.2.1 Análisis espectrofotométricos de la solubilización de nutrientes

A la vista de los datos presentados en las Tablas 5 y 6 cabe indicar que los azúcares totales, y aún más en el caso de los reductores, provienen del residuo de manzana. En el estudio

de Urrea *et al.* (2014) donde se había trabajado con lodos muy parecidos, se observan resultados que están en concordancia con el contenido en carbohidratos aquí obtenido en el experimento de lodo sin suplementación. Por otro lado, en el recientemente citado estudio llevado a cabo por Hecke *et al.* (2006), encontraban valores del orden de los 100 g·kg<sup>-1</sup> para los azúcares. Considerando que el zumo es una disolución acuosa, resulta asumible que tendrá una densidad similar a la del agua, aproximadamente de 1 kg·L<sup>-1</sup>. Sin ser valores exactamente comparables, no deja de ser un indicador de valores similares, en el mismo orden de magnitud.

Tabla 5. Concentraciones de carbohidratos totales para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana.

Tiempo (min)	Concentración (g·L <sup>-1</sup> )		
	0%	30%	100%
0	0,11	43,5	121
15	5,52	70,1	262
30	2,25	87,2	331
45	1,45	65,7	244
60	1,49	37,7	203
90	1,57	29,0	155
120	1,65	24,2	86,9
180	1,48	22,3	79,1
240	1,42	16,2	54,4
300	1,40	15,0	49,6

Tabla 6. Concentraciones de azúcares reductores para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana.

Tiempo (min)	Concentración (g·L <sup>-1</sup> )		
	0%	30%	100%
0	0,00	17,4	92,2
15	0,91	17,4	97,5
30	0,26	20,5	143
45	0,49	25,1	137
60	0,76	19,9	89,4
90	1,08	14,8	35,9
120	1,13	10,9	28,2
180	1,41	7,43	19,4
240	1,25	4,79	13,9
300	1,25	3,34	10,3

En la Tabla 7, se muestran los valores obtenidos para los compuestos fenólicos en los tres estudios realizados. A la vista de los resultados, se deduce que la mayor parte de este tipo de compuestos proviene de igual manera del residuo de manzana. Para reducir la presencia de

dichos compuestos habría que aumentar el ratio lodo:manzana, sin embargo, esto resultaría en un descenso de la concentración de azúcares que no compensaría el cambio, sobre todo de cara a la posterior fermentación del hidrolizado.

Tabla 7. Concentraciones de compuestos fenólicos para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana.

Tiempo (min)	Concentración (g·L <sup>-1</sup> )		
	0%	30%	100%
0	0,06	0,15	0,40
15	0,11	0,24	0,46
30	0,10	0,28	0,97
45	0,26	0,71	2,18
60	0,48	1,76	4,15
90	0,48	1,76	4,16
120	0,62	1,64	3,93
180	0,68	1,55	3,73
240	0,77	1,49	3,31
300	0,88	1,44	3,23

En la Tabla 8, se muestra la evolución de los valores del pH y de los tres experimentos comparativos. Las manzanas tienen un contenido en azúcares reductores mucho mayor. Esto resulta en una mayor producción de ácidos orgánicos a medida que estos azúcares se van degradando, de ahí una mayor bajada del pH.

En cuanto a los ácidos húmicos, los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 8. pH para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana.

Tiempo (min)	Concentración (g·L <sup>-1</sup> )		
	0%	30%	100%
0	7,13	5,37	5,02
15	6,27	5,23	4,98
30	6,62	5,19	4,64
45	6,55	4,96	4,59
60	5,96	4,78	4,41
90	5,65	4,75	4,14
120	5,52	4,65	4,05
180	5,35	4,62	4,34
240	5,28	4,25	4,32
300	5,13	4,45	4,12

Tabla 9. Concentración de ácidos húmicos para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana.

Tiempo (min)	Concentración (g·L <sup>-1</sup> )		
	0%	30%	100%
0	0,00	0,67	1,43
15	0,92	4,57	19,3
30	1,37	1,23	24,6
45	1,86	6,67	61,5
60	4,45	27,4	77,2
90	5,14	31,7	154
120	5,86	27,4	184
180	4,43	20,0	201
240	8,35	24,1	199
300	8,36	22,1	194

Las proteínas, cuyos valores son mostrados en la Tabla 10, indican que las manzanas contienen una cantidad ligeramente mayor de proteínas que el lodo, si bien ambos contribuyen al aporte global. La tendencia que muestran es muy similar a la que aparece en los experimentos realizados a diferentes temperaturas, observándose un aumento gradual hasta llegar a un máximo, en torno a los 60-90 minutos, en el que mantienen los valores más o menos constantes o se reducen ligeramente (pequeña degradación).

Tabla 10. Concentración de proteínas para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana.

Tiempo (min)	Concentración (g·L <sup>-1</sup> )		
	0%	30%	100%
0	0,00	0,03	0,15
15	0,20	0,87	2,05
30	0,93	2,31	4,01
45	1,94	4,56	4,16
60	1,88	5,78	5,23
90	3,64	5,34	6,26
120	3,01	5,02	5,92
180	4,92	4,98	5,26
240	4,86	4,56	5,75
300	4,68	4,66	5,62

#### 4.2.2.2 Análisis cromatográfico del perfil de azúcares

Los resultados de las cromatografías realizadas en los experimentos de hidrólisis en los que se comparan las composiciones del lodo, el residuo de manzana y la mezcla de ambos se muestran en las Tablas 11 y 12. Los valores son ligeramente superiores a los obtenidos con el método espectrofotométrico del DNS lo que es debido al empleo de técnicas distintas. Cabe indicar que la concentración de glucosa y fructosa en el lodo es baja, obteniéndose como máximo 0,39 y 0,19 g·L<sup>-1</sup>, respectivamente. Por otro lado, la concentración de fructosa fue superior a la de glucosa, tanto en la mezcla del 30% como en la del 100% de residuo de manzana, durante todo el tiempo de reacción. En ambos casos, la máxima concentración se alcanzó para 30 minutos de reacción, comenzando a disminuir a partir de dicho tiempo.

Tabla 11. Concentración de fructosa para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana.

Tiempo (min)	Concentración (g·L <sup>-1</sup> )		
	0%	30%	100%
0	0	28,0	146
15	0,04	28,4	159
30	0,24	25,1	176
45	0,16	20,4	105
60	0,14	7,25	67,2
90	0,19	4,93	26,2
120	0,04	3,46	23,2
180	0,02	2,75	16,2
240	0	1,47	17,9
300	0	1,15	19,3

Tabla 12. Concentración de glucosa para cada tiempo en los experimentos realizados con un 0%, 30% y 100% (v/v) de residuo de manzana.

Tiempo (min)	Concentración (g·L <sup>-1</sup> )		
	0%	30%	100%
0	0,00	7,02	36,2
15	0,03	8,35	51,2
30	0,04	8,78	56,4
45	0,06	6,85	43,1
60	0,07	3,92	36,2
90	0,08	3,21	14,2
120	0,14	2,56	12,1
180	0,19	2,07	7,32
240	0,29	1,60	4,27
300	0,39	1,23	3,96

Tras estudiar el efecto de la temperatura y la suplementación con residuo de manzana y ver su efecto en la producción de distintas biomoléculas de interés (carbohidratos, azúcares reductores totales, glucosa, fructosa, proteínas, ácidos húmicos y compuestos fenólicos) se llega a la conclusión de que la opción más adecuada será hidrolizar la mezcla de 70% lodo y 30% residuo de manzana a 150 °C durante 45 min.

En estas condiciones se alcanza una alta concentración de azúcares, así como de proteínas, pero sin llegar a desarrollarse los compuestos inhibidores. Resulta positivo además reducir el tiempo lo máximo posible de cara a optimizar el proceso. De igual manera, un descenso de 20 °C frente a la temperatura más alta estudiada, resulta interesante en cuanto al ahorro energético del proceso, aspecto muy importante de cara a una implementación a gran escala.

### **4.3. Fermentación**

En el proceso de fermentación, tal y como se ha indicado previamente, se estudia por un lado el crecimiento celular, y por otro la evolución de la composición del medio. De esta manera se analiza la viabilidad del proceso para la formación del compuesto de interés y la asimilación de la materia orgánica presente en el residuo tratado.

#### **4.3.1 Crecimiento celular**

En este apartado se muestran los resultados obtenidos del crecimiento en placa y la densidad óptica. Para determinar el número de UFC·mL<sup>-1</sup> se emplea la siguiente expresión:

$$UFC \cdot mL^{-1} = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias aisladas en placa (UFC)} \cdot \text{Dilución realizada}}{\text{Volumen de muestra sembrado (mL)}} \quad [3]$$

Las curvas de crecimiento celular representadas en la Figura 12 muestran la gran diferencia entre una inoculación del 10% y del 20%. Doblando la cantidad inicial de células se aprecia que, por ejemplo, a las 12 horas del inicio del experimento, la cantidad de células ya resultar ser más bien el triple, debido a la cinética exponencial que siguen. Si bien la relación entre los máximos globales para ambas curvas si se acerca a la proporción inicial, el tiempo necesario para alcanzar este máximo también se debe de tener en cuenta, de cara a una optimización del proceso; en especial, en un cambio a escala industrial donde los

comportamientos se desvían mucho más de la idealidad. Cabe destacar que no se observa fase de latencia para el 20% de inóculo, mientras que para el 5% y 10% se requieren unas 4 h de aclimatación por parte de la bacteria.

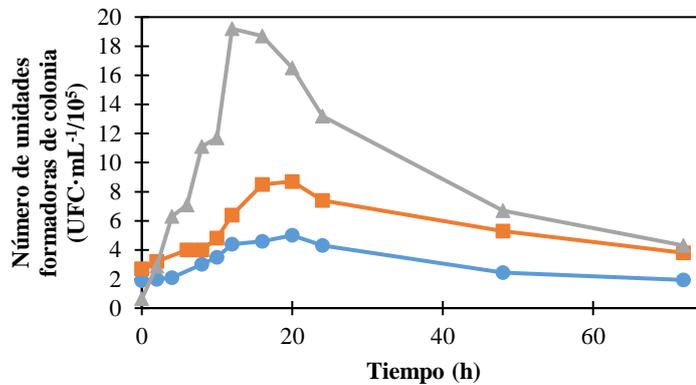


Figura 12. Número de unidades formadoras de colonias frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento.

A continuación, se presentan los resultados para la densidad óptica (Figura 13). Si bien el crecimiento en placa es una herramienta eficaz, la determinación de este parámetro es más rápida. Ambos datos son necesarios para asegurarse de que los resultados presentados son correctos. Por otro lado, conviene mencionar que el crecimiento en placa constituye un método más fiable de cara a la estimación de las curvas de crecimiento. Esto se debe a que la densidad óptica no diferencia entre colonias viables y no viables. Una célula que ya ha muerto no da lugar a una nueva colonia en una placa de agar, sin embargo, si contribuye a la turbidez de la muestra a la hora de una medición espectrofotométrica.

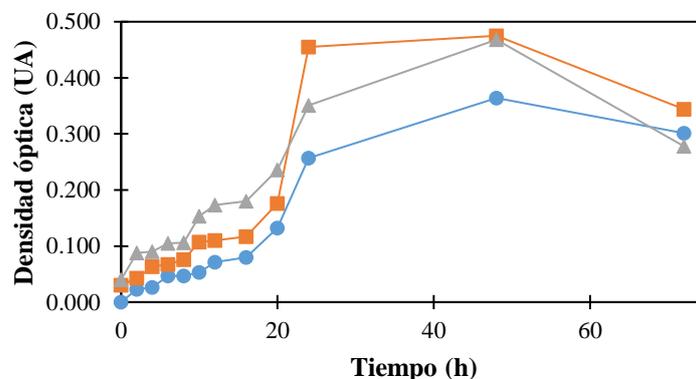


Figura 13. Densidad óptica frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento.

### 4.3.2 Análisis de la composición

A continuación, se presenta el análisis de los distintos compuestos presentes en las fermentaciones. Así, se mostrarán los resultados comparando los tres experimentos realizados con una distinta concentración celular inicial.

En la Figura 14, se observan las concentraciones de etanol obtenidas en los diferentes experimentos.. Se llega a una concentración máxima de  $11,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  independientemente de la cantidad de inóculo empleado, por lo que este parámetro prácticamente no tiene influencia en el rendimiento. A pesar de que la mayor cantidad de células viables se alcanza entre las 16 h y 24 h, según indica la curva de crecimiento en placa, la mayor producción de etanol se alcanza a tiempo final (72 h), aunque el incremento entre las 24 h y las 72 h no es muy elevado (30%). Ello indica que siguen produciendo de etanol pero de manera paulatina.

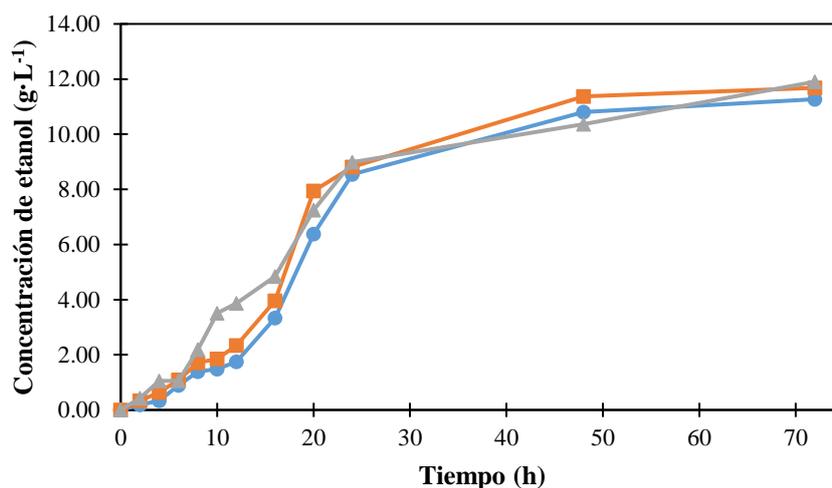


Figura 14. Concentración de etanol frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento.

En las Figuras 15 y 16 aparece representada la evolución del consumo de glucosa y fructosa, respectivamente. Estos resultados concuerdan con las conclusiones sacadas respecto a la evolución del etanol: el mayor consumo tanto de glucosa como de fructosa (en torno al 80% en ambos casos) se produce durante las primeras 24 h, siendo mucho más lento (44% para glucosa) a partir de ese tiempo.

La cantidad de etanol producida así como el consumo de glucosa en las últimas horas de la fermentación es bajo, por lo que habría que evaluar si es adecuado emplear tiempos más cortos a fin de procesar el lodo más rápido. Por ejemplo, si se reduce el tiempo de fermentación 24 horas, lo que implica una reducción del 66% en el tiempo de reacción, la producción de etanol media se reduce en un 24,4%. Si aplicamos una reducción menor, del 33% (fermentando durante 48 h), la bajada porcentual en producción alcohólica es tan solo del 6,5%.

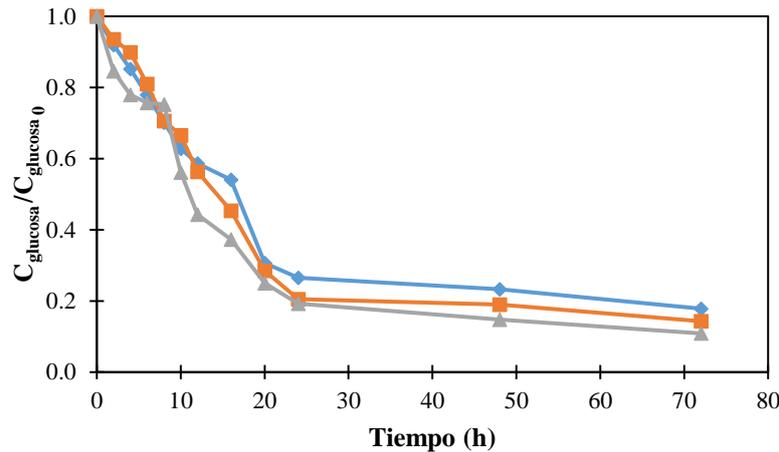


Figura 15. Concentración de glucosa, normalizada, frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento. Concentración de glucosa inicial:  $7,70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

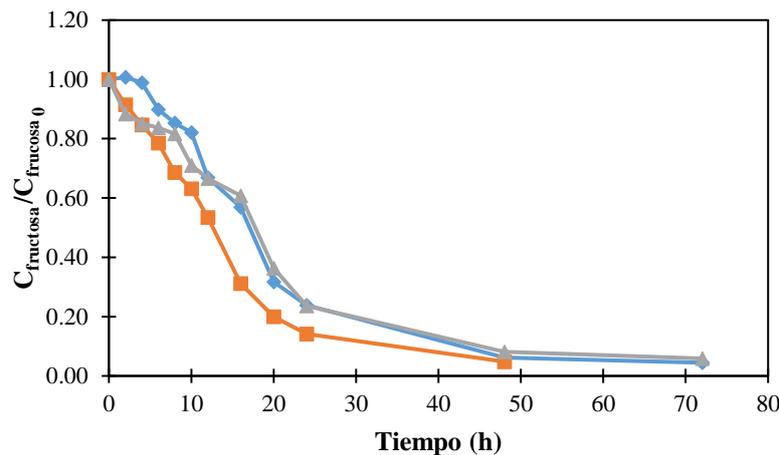


Figura 16. Concentración de fructosa frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento. Concentración de fructosa inicial:  $22,28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Un dato interesante que calcular, para poder estimar si las fermentaciones realizadas han sido adecuadas o no, es el rendimiento. Sencillamente, este parámetro consiste en calcular la relación entre la cantidad de producto obtenido etanol y cuanto sustrato utilizan para ello las células. Es una manera de normalizar los resultados de las fermentaciones, obviando las concentraciones absolutas, y centrándose en la productividad relativa. Estos cálculos se encuentran en la Tabla 13.

Se trata de unos buenos datos de rendimiento, en valores cercanos a los de la bibliografía investigada previamente.

Acudiendo a estudios previos para encontrar referencias, se citaban en la contextualización teórica rendimientos obtenidos por Lee y Huang (2000) de entre 0,4 y 0,45, o los de entre 0,32 y 0,40 de Cazetta *et al.* (2007). En definitiva, valores similares, si bien no del todo comparables debido a la distinta naturaleza de los sistemas.

Tabla 13. % de inóculo añadido a cada experimento, con sus concentraciones de glucosa y fructosa iniciales y de etanol finales; y el rendimiento etanol/azúcar.

% inóculo añadido	Concentración de etanol final (g·L <sup>-1</sup> )	Concentración de glucosa inicial (g·L <sup>-1</sup> )	Concentración de fructosa inicial (g·L <sup>-1</sup> )	Y <sub>etanol</sub> (g etanol·g azúcar <sup>-1</sup> )
5	11,3	6,97	23,8	0,366
10	11,7	7,68	22,8	0,383
20	11,9	8,46	20,2	0,415

En la Figura 17, se observa como varía la concentración de acetaldehído a lo largo del tiempo. Este compuesto es el precursor inmediato del etanol en la cadena metabólica de las *Zymomonas*, por tanto, es una sustancia que se forma inicialmente y luego se va consumiendo durante la fermentación, dando lugar a más moléculas de etanol. Por tanto, tiene sentido que siga una tendencia creciente en los momentos en los que más crecimiento celular hay, mientras que, en la fase estacionaria y, a continuación, en la de muerte celular, sus valores vayan disminuyendo. No obstante, por su carácter de intermedio nunca se acumula demasiado, y los valores máximos que alcanza no superan nunca los 2,5 g·L<sup>-1</sup>.

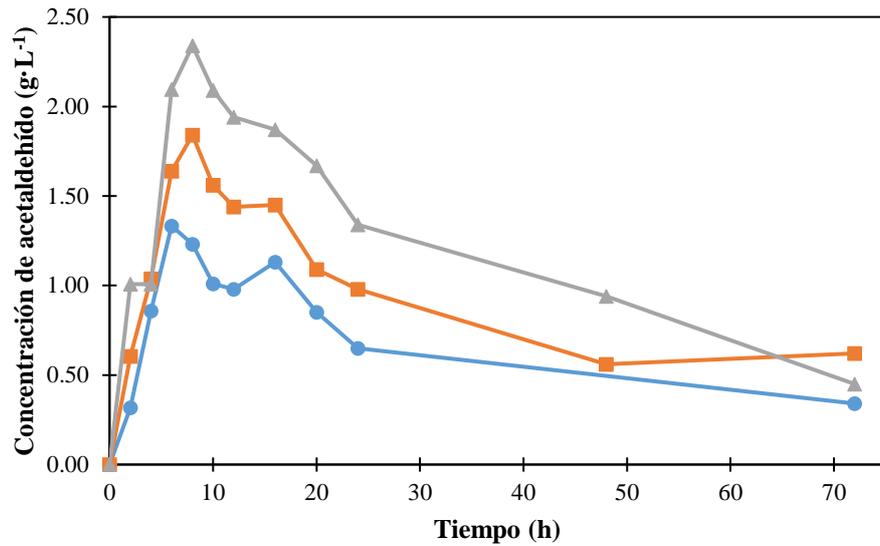


Figura 17. Concentración de acetaldehído frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento.

Por último, se analiza la presencia de ácidos orgánicos en las muestras durante la fermentación.. Así, se determinó la presencia de cuatro ácidos: ácido acético, láctico, málico y pirúvico. A continuación, se presentan los resultados (Figuras 18 a 21).

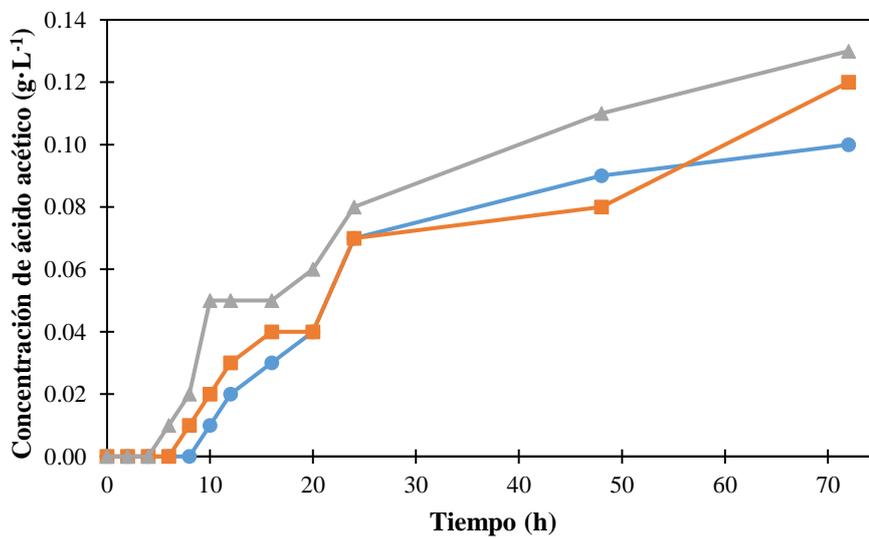


Figura 18. Concentración de ácido acético frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento.

El ácido acético se considera un importante inhibidor de las *Zymomonas mobilis*, sin embargo, los valores obtenidos son extremadamente bajos, como se puede apreciar en la Figura 18, con lo que su efecto se considera mínimo.

En la figura 19, aparece representada la evolución del ácido pirúvico en las fermentaciones realizadas. Este es el precursor directo en la vía metabólica del acetaldehído, el cual era a su vez el precursor del etanol. Por lo tanto, su presencia es normal. Su evolución concuerda con el resto de los datos, apareciendo en los momentos de mayor crecimiento celular.

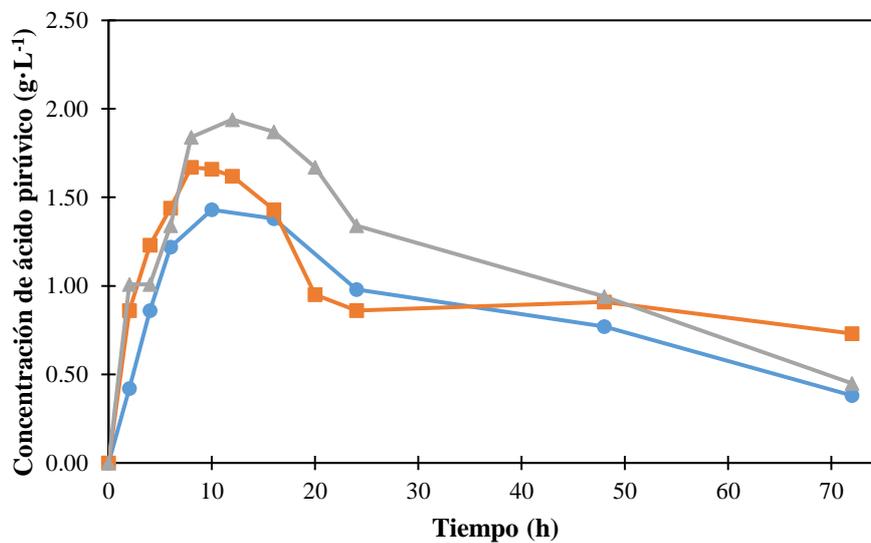


Figura 19. Concentración de ácido pirúvico frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento.

El ácido málico es el inicio de una pequeña vía de degradación del piruvato, que se oxida en un desvío catabólico en vez de continuar hacia el etanol. Al ser un intermedio, sigue evoluciones similares a otros compuestos anteriores que igualmente daban paso al siguiente producto metabólico, con ascenso en línea con la del crecimiento celular y descenso posterior a medida que la fermentación iba terminando, tal y como puede apreciarse en la Figura 20.

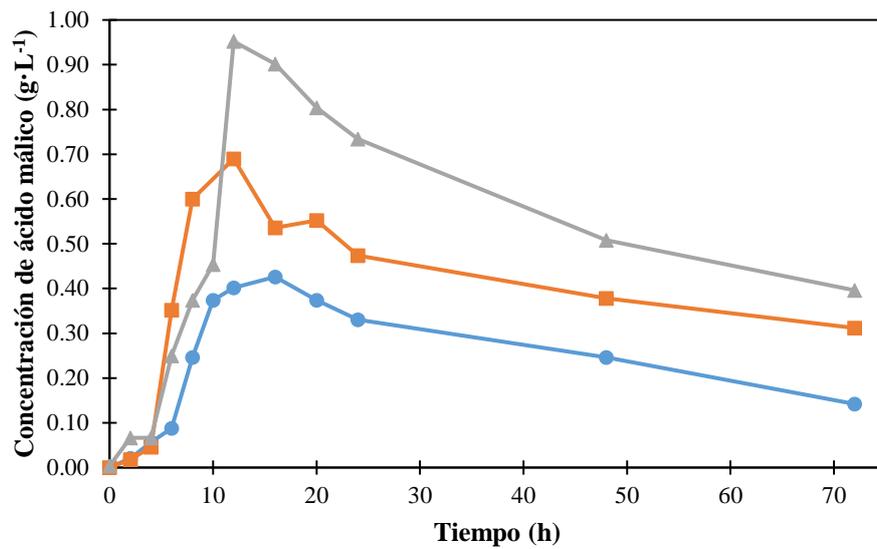


Figura 20. Concentración de ácido málico frente al tiempo, para las fermentaciones realizadas con un 5% (●), 10% (■) y 20% (▲) de inóculo al inicio del experimento.

El hecho de que este compuesto aparezca en una vía alternativa al camino principal hacia la producción de energía nos podría indicar un descenso en el rendimiento del proceso. Sin embargo, este efecto no es muy acusado, dado que las concentraciones no llegan en ningún caso a  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Si se observa la situación del malato en la Figura 2, podrá verse que dentro del catabolismo de las *Zymomonas mobilis* parece formar parte de alguna modificación, o ciclo incompleto de Krebs, es decir, algún grupo de reacciones similares a las que realizan las células aerobias en el proceso de respiración celular.

## 5. CONCLUSIONES

La hidrólisis térmica es un tratamiento interesante y versátil debido a su naturaleza. Al depender básicamente de la temperatura empleada, en lugar de la adición de algún reactivo, es capaz de procesar una gran variedad de sustratos y solubilizar sus componentes esenciales. Además, en base a este trabajo se ha puesto de manifiesto su capacidad para procesar residuos urbanos y alimenticios y convertirlos en un sustrato fermentable a fin de obtener diversos compuestos de interés.

Por otro lado, el aporte de residuo de manzana al lodo ha permitido incrementar significativamente la fracción de azúcares simples disponibles para la fermentación con *Zymomonas mobilis*, llegando hasta los 25-30 g·L<sup>-1</sup>. El análisis del efecto de la temperatura ha permitido una cierta optimización de las condiciones del proceso, a fin de obtener el sustrato necesario y mantener en límites aceptables la aparición de compuestos inhibidores, como los fenólicos (0,71 g·L<sup>-1</sup> en las condiciones óptimas: 150 °C y 45 min).

Además, se ha transformado el medio pasando de tener un lodo viscoso a un líquido fácilmente homogeneizable y, además, fermentable.

La fermentación con *Zymomonas mobilis* de la mezcla de 70% lodo y 30% residuo de manzana ha producido 11,9 g·L<sup>-1</sup> de etanol de un total 28,7 g·L<sup>-1</sup> de azúcares fermentables (glucosa y fructosa), lo que representa un rendimiento de 0,415 g etanol/g azúcar consumido.

El estudio de los componentes orgánicos contenidos en la mezcla ha permitido seguir la ruta catabólica principal, desde los carbohidratos iniciales hasta la producción final del etanol, pasando por intermedios como el acetaldehído o el piruvato, y produciendo secundariamente ácidos orgánicos como el ácido málico o acético.

En base a este trabajo, se presenta una alternativa de interés basada en la combinación de tratamientos químicos y biológicos para la valorización de los lodos de depuradora y residuo de manzana para la producción de bioetanol.

## 6. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\mu L$	Microlitros, unidad de volumen.
$\mu m$	Micrómetros, unidad de longitud.
<i>ABS</i>	Absorbancia.
<i>BSA</i>	Albúmina de suero bovino.
$^{\circ}C$	Grados centígrados, unidad de temperatura.
<i>CN</i>	Número de Color (Color Number, en inglés).
<i>DNS</i>	Ácido 3,5-dinitrosalicílico.
<i>g</i>	Gramos, unidad de masa.
<i>h</i>	Horas, unidad de tiempo.
$mg \cdot L^{-1}$	Miligramos por litro, unidad de concentración.
<i>min</i>	Minutos, unidad de tiempo.
<i>mL</i>	Mililitro, unidad de volumen.
<i>nm</i>	Nanómetro, unidad de longitud.
<i>ppm</i>	Partes por millón, equivale a $mg \cdot L^{-1}$ para una disolución.
<i>rpm, RPM</i>	Revoluciones por minuto, unidad de velocidad de giro.
<i>UA</i>	Unidades arbitrarias, aquellas que no responden a una magnitud física definida e independiente, sino que tienen solo un sentido dentro de un sistema relativo, como puede ser la absorbancia.
<i>UFC</i>	Unidades formadores de colonia, magnitud usada para cuantificar la cantidad de células de una población microbiológica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] AGHEL B., GOURAN A., BEHAEIN S., 2022. *Intensified biogas upgrading via various wastewater using microchannel*. Chemical Engineering and Processing – Process Intensification Vol. 175.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2022.108927>
- [2] BAIRD C., CANN M., 2013. *Química Ambiental 2ª Edición*. Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.
- [3] BERG J. M., TYMOCZKO J.L., STRYER L., 2007. *Bioquímica 6ª Edición*. Editorial Reverté S. A., Barcelona, España.
- [4] CAZETTA M.L., CELLIGOI M.A.P.C., BUZATO J.B., SCARMIO I.S., 2007. *Fermentation of molasses by Zymomonas Mobilis: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production*. Bioresource Technology Vol. 98, págs. 2824-2828.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.026>
- [5] CONESA DOMÍNGUEZ C., 2018. *Aprovechamiento de residuos en la industria hortofrutícola*. Curso Tecnología Poscosecha de cítricos y otros cultivos en la Comunidad Valenciana. Poscosecha y Universidad Politécnica de Valencia, Comunidad Valenciana, España. [Consultado el 12 de julio de 2022] [Disponible en <https://www.bibliotecahorticultura.com/wp-content/uploads/2018/02/CONESA-DOM% C3% 8DNGUEZ-Claudia.-Febrero-2018.-Aprovechamiento-de-residuos-en-la-industria-hortofrut% C3% ADcola-Presentaci% C3% B3n.pdf>]
- [6] DÍAZ M., 2021. *Ingeniería de Procesos 3ª Edición*. Ediciones Paraninfo S.A., Madrid, España.
- [7] DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F., 1956. *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. División de Bioquímica de la Universidad de Minnesota. St. Paul, Minnesota, Estados Unidos de América.  
DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- [8] FOLIN O., CIOCALTEU V., 1927. *On tyrosine and tryptophane determinations in proteins*. The Journal of Biological Chemistry Vol. 73 N° 2, págs. 627-650. American

- Society for Biochemistry and Molecular Biology. Rockville, Maryland, Estados Unidos de América.
- DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84277-6)
- [9] FRØLUND B., GRIEBE T., NIELSEN P. H., 1995. *Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix*. Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 43 N° 4, págs. 755–761.
- DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00164784>
- [10] HECKE K., HERBINGER K., VEVERIČ R., TROBEC M., TOPLAK H., ŠTAMPAR F., KEPPEL H., GRILL D., 2006. *Sugar-, acid-, and phenol contents in apple cultivars from organic and integrated fruit cultivation*. European Journal of Clinical Nutrition Vol. 60, págs. 1136-1140. Nature Publishing Group. Londres, Reino Unido.
- DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602430>
- [11] Instituto Tecnológico de Canarias, 2005. *Proyecto Depuranat. Tecnologías: Aireación prolongada*. Las Palmas de Gran Canaria, España.
- [Consultado el 3 de abril de 2022] [Disponible en: [http://depuranat.itccanarias.org/index2.php?option=com\\_tecnologias&func=ver&id=13](http://depuranat.itccanarias.org/index2.php?option=com_tecnologias&func=ver&id=13)]
- [12] KÁDÁR Z., FONSECA C., 2019. *Bio-Products from Sugar-Based Fermentation Processes*. en BASTIDAS-OYANEDEL J.R., SCHMIDT J.E., 2019. *Biorefinery (Integrated Sustainable Processes for Biomass Conversion to Biomaterials, Biofuels, and Fertilizers)*. Springer-Verlag. Ciudad de Luxemburgo, Luxemburgo.
- [13] KALNENIEKS U., PAPPAS K.M., BETTENBROCK K., 2020. *Zymomonas Mobilis metabolism: Novel tools and targets for its rational engineering*. Advances in Microbial Physiology Vol. 77, págs. 37-88.
- DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2020.08.001>
- [14] KRISHNAN M.S., HO N. W. Y., TSAO G.T., 1999. *Fermentation Kinetics of Ethanol Production from Glucose and Xylose by Recombinant Saccharomyces 1400(pLNH33)* Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 77-79, págs. 373-388.
- DOI: <https://doi.org/10.1385/ABAB:78:1-3:373>
- [15] LEE W., HUANG C., 2000. *Modelling of ethanol fermentation using Zymomonas Mobilis ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose*. Biochemical Engineering Journal Vol. 4, págs. 217-227.
- DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00051-0)

- [16] LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. The Journal of Biological Chemistry 193, págs. 265-75. American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Rockville, Maryland, Estados Unidos de América.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- [17] MATEUSZ P., MARCHETTI R., DI LORENZO F., FABOZZI A., GIRAUD E., GULLY D., PADUANO L., MOLINARO A., D'ERRICO G., SILIPO A., 2018. *Zymomonas mobilis exopolysaccharide structure and role in high ethanol tolerance*. Carbohydrate Polymers Vol. 201, págs. 293-299.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.072>
- [18] Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015. *Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR)*. Madrid, España.  
[Consultado el 8 de abril de 2022] [Disponible en: [https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/planes-y-estrategias/pemaraprobado6noviembrecondae\\_tcm30-170428.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/planes-y-estrategias/pemaraprobado6noviembrecondae_tcm30-170428.pdf)]
- [19] Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009. *Caracterización de los lodos de depuradoras generados en España*. Madrid, España.  
[Consultado el 7 de abril de 2022]  
[Disponible en: [https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/lodos\\_depuradoras\\_tcm30-185077.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/lodos_depuradoras_tcm30-185077.pdf)]
- [20] PALAMAE S., CHORIT W., CHATSUNGNOEN T., CHISTI Y., 2020. *Simultaneous nitrogen fixation and ethanol production by Zymomonas Mobilis*. Journal of Biotechnology Vols. 314-315, págs. 41-52.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.03.016>
- [21] STELLMAN J.M., 1998. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Madrid.
- [22] SUÁREZ IGLESIAS O., URREA J.L, OULEGO P., COLLADO S., DÍAZ M., 2017. *Valuable compounds from sewage sludge by thermal hydrolysis and wet oxidation. A review*. Science of the Total Environment Vols. 584-585, págs. 921-934.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.140>
- [23] SUMNER J.B., GRAHAM V.A., 1921. *Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine*. The Journal of Biological Chemistry

Vol.47, N° 1, págs. 5-9. American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Rockville, Maryland, Estados Unidos de América.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86093-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86093-8)

- [24] ULDIS K., PAPPAS K.M. BETTENBROCK K., 2020. *Zymomonas Mobilis metabolism: Novel tools and targets for its rational engineering*. Advances in microbial Physiology Vol. 77, págs. 37-88.

DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2020.08.001>

- [25] URREA J.L., COLLADO S., LACA A., DÍAZ M., 2014. *Wet oxidation of activated sludge: Transformations and mechanisms*. Journal of Environmental Management Vol. 146, págs. 251-259.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.043>

- [26] URREA J.L., COLLADO S., LACA A., DÍAZ M., 2015. *Rheological behavior of activated sludge treated by thermal hydrolysis*. Journal of Water Process Engineering Vol. 5, págs. 153-159.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2014.06.009>

- [27] URREA J.L., GARCÍA M., COLLADO S., OULEGO P., DÍAZ M., 2018. *Sludge hydrothermal treatments. Oxidizing atmosphere effects on biopolymers and physical properties*. Journal of environmental Management Vol. 206, págs. 284-290.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.043>

# APÉNDICE: RECTAS DE CALIBRADO

## A.1. Métodos espectrofotométricos

### Azúcares reductores

Tabla A1. Concentración y absorbancias medidas y medias para el calibrado de azúcares reductores.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	ABS <sub>1</sub> (UA)	ABS <sub>2</sub> (UA)	ABS <sub>3</sub> (UA)	ABS <sub>media</sub> (UA)
200	0,097	0,106		0,102
400	0,167	0,184		0,176
600	0,294	0,323	0,307	0,308
800	0,396	0,442	0,462	0,433
1000	0,51	0,545	0,526	0,527

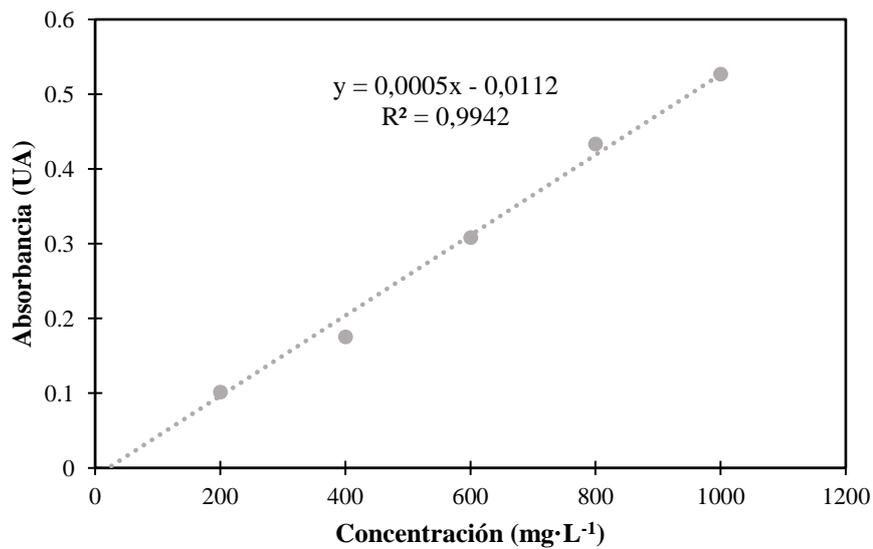


Figura A1. Absorbancia frente a concentración para el calibrado de azúcares reductores.

**Proteínas**

Tabla A2. Concentración y absorbancias medidas, medias y totales para el calibrado de proteínas.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	ABS <sub>1</sub> (UA)	ABS <sub>2</sub> (UA)	ABS <sub>3</sub> (UA)	ABS <sub>total</sub> (UA)
50	0,065	0,069	0,066	0,067
150	0,229	0,240	0,210	0,226
250	0,322	0,301	0,361	0,328
350	0,464	0,468	0,472	0,468
450	0,552	0,557	0,548	0,552
500	0,667	0,649		0,658

Tabla A3. Concentración y absorbancias medidas, medias y ciegas para el calibrado de proteínas.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	ABS <sub>1</sub> (UA)	ABS <sub>2</sub> (UA)	ABS <sub>3</sub> (UA)	ABS <sub>ciega</sub> (UA)
200	0,015	0,016	0,021	0,017
400	0,053	0,067	0,068	0,063
600	0,088	0,087	0,080	0,085
	0,112	0,116	0,120	0,116
800	0,147	0,151	0,169	0,156
1000		0,201	0,204	0,203

Tabla A4. Concentración y absorbancias finales para el calibrado de proteínas.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	ABS <sub>proteínas</sub> (UA)
50	0,062
150	0,205
250	0,304
350	0,440
450	0,496
500	0,569

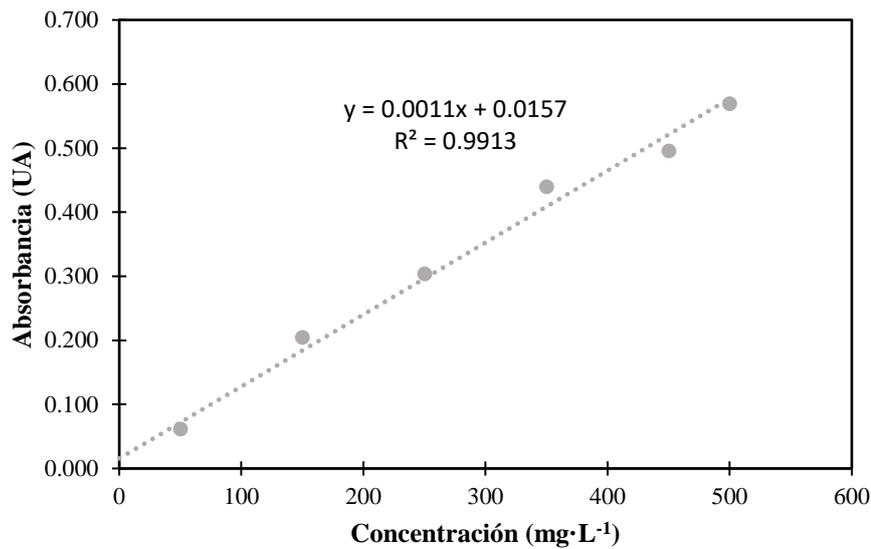


Figura A2. Absorbancia frente a concentración para el calibrado de proteínas.

## Ácidos Húmicos

Tabla A5. Concentración y absorbancias medidas, medias y totales para el calibrado de ácidos húmicos.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	ABS <sub>1</sub> (UA)	ABS <sub>2</sub> (UA)	ABS <sub>3</sub> (UA)	ABS <sub>total</sub> (UA)
50	0,049	0,053	0,061	0,054
150	0,154	0,167	0,149	0,157
250	0,240	0,289	0,266	0,265
350	0,393	0,386	0,381	0,387
450	0,453	0,498	0,459	0,470
500	0,533	0,568	0,544	0,548

Tabla A6. Concentración y absorbancias medidas, medias y ciegas para el calibrado de ácidos húmicos.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	ABS <sub>1</sub> (UA)	ABS <sub>2</sub> (UA)	ABS <sub>3</sub> (UA)	ABS <sub>total</sub> (UA)
50	0,065	0,072	0,064	0,067
150	0,187	0,189	0,184	0,187
250	0,303	0,284	0,280	0,289
350	0,405	0,397	0,415	0,406
450	0,503	0,501	0,508	0,504
500	0,584	0,571	0,566	0,574

Tabla A7. Concentración y absorbancias finales para el calibrado de ácidos húmicos.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	ABS (UA)
50	0,062
150	0,205
250	0,304
350	0,440
450	0,496
500	0,569

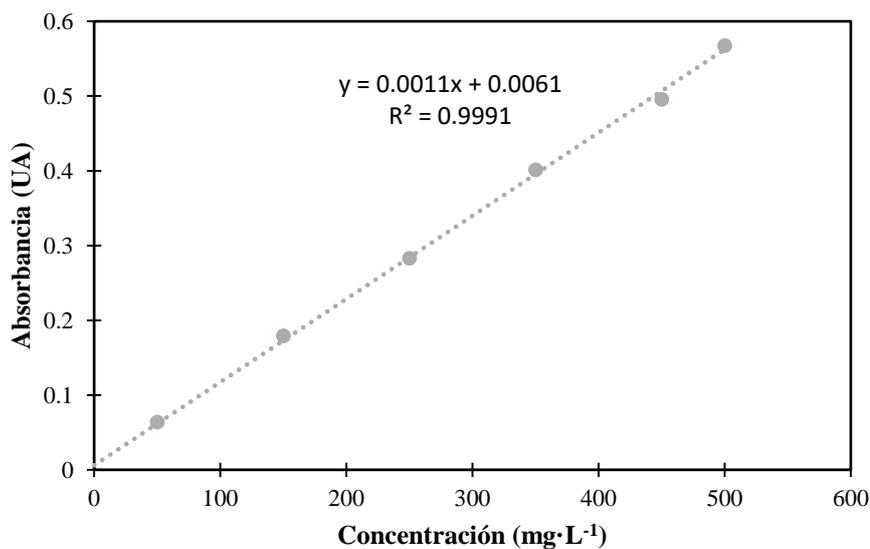


Figura A3. Absorbancia frente a concentración para el calibrado de ácidos húmicos.

### Compuestos fenólicos

Tabla A8. Concentración y absorbancias medidas y medias para el calibrado de compuestos fenólicos.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	ABS <sub>1</sub> (UA)	ABS <sub>2</sub> (UA)	ABS <sub>3</sub> (UA)	ABS <sub>media</sub> (UA)
20	0,122	0,116	0,125	0,121
40	0,225	0,224	0,219	0,223
60	0,322	0,325	0,328	0,325
80	0,418	0,425	0,421	0,421
100	0,546	0,548	0,545	0,546

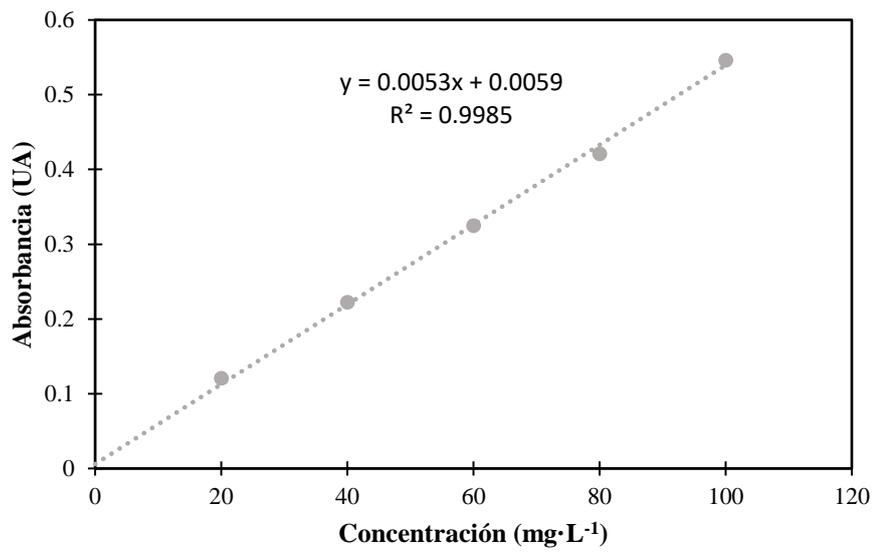


Figura A4. Absorbancia frente a concentración para el calibrado de compuestos fenólicos.

## A.2. Cromatografía líquida de alta resolución

### Glucosa

Tabla A9. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado de glucosa.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	Área del pico (cuentas)	Tiempo de retención (min)
10	2723,6	20,865
50	27336,2	20,933
100	54792,3	20,919
200	103320,5	20,917
500	264934,4	20,924
1000	546794,6	20,924
2000	1122779,3	20,918
3000	1684565,4	20,889

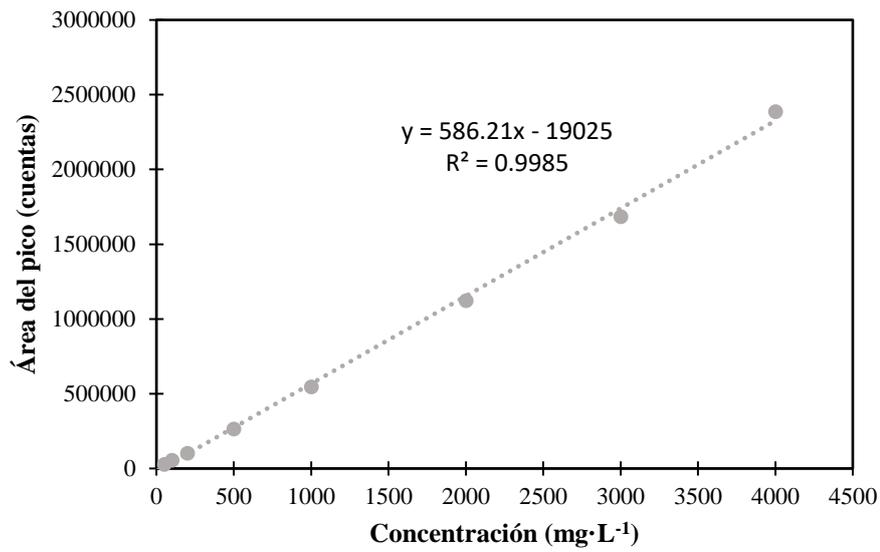


Figura A5. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de glucosa.

## Fructosa

Tabla A10. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado de fructosa.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	Área del pico (cuentas)	Tiempo de retención (min)
<b>10</b>	4766,5	22,842
<b>50</b>	24250,2	22,864
<b>100</b>	45465,6	22,870
<b>200</b>	92348,9	22,868
<b>500</b>	224086,9	22,873
<b>1000</b>	452162	22,874
<b>2000</b>	907461,9	22,871
<b>3000</b>	1326109,2	22,870
<b>4000</b>	1957308,5	22,866

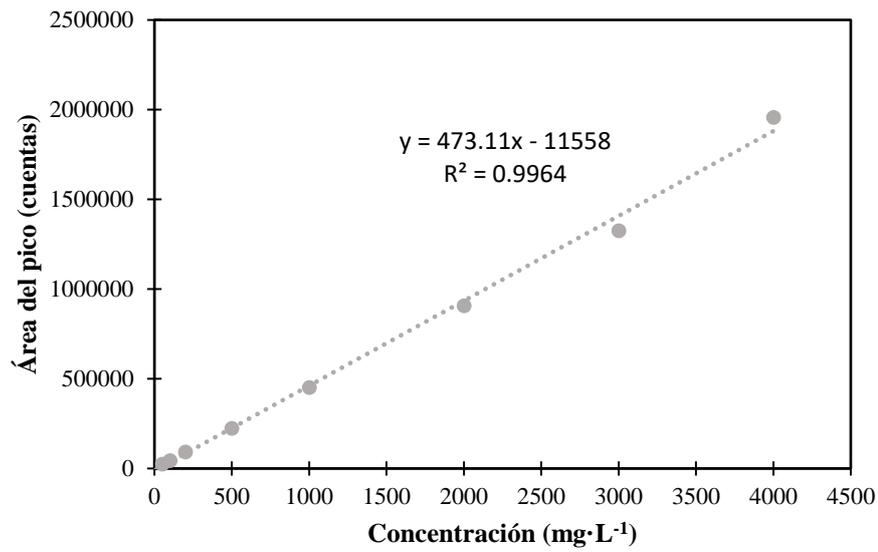


Figura A6. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de fructosa.

## Etanol

Tabla A11. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado de etanol.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	Área del pico (cuentas)	Tiempo de retención (min)
10	3138,3	44,25
50	12226,1	44,276
100	24963,5	44,273
200	46128,1	44,271
500	100576,8	44,262
1000	233921,3	44,238
2000	459097,9	44,209
3000	691926,1	44,194

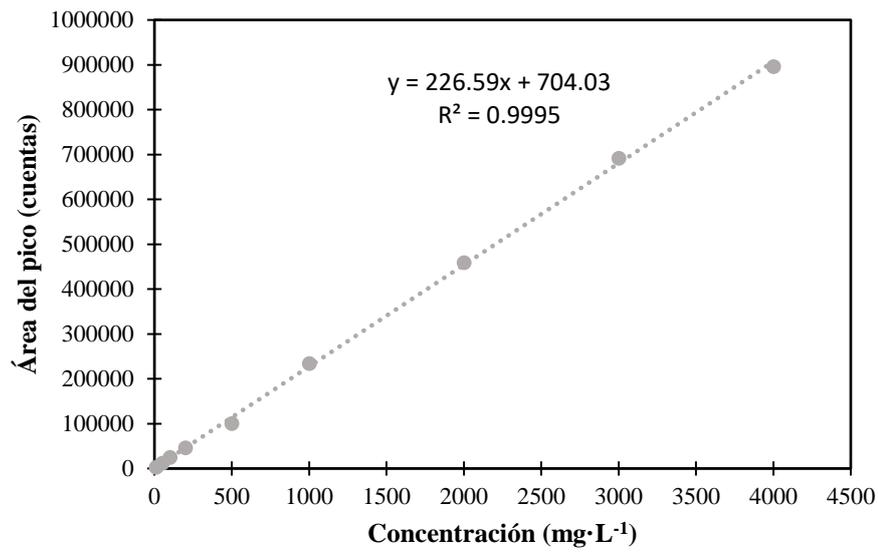


Figura A7. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de etanol.

### Acetaldehído

Tabla A12. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado de acetaldehído.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	Área del pico (cuentas)	Tiempo de retención (min)
10	916,1	39,142
50	3994,3	39,118
100	17947	39,091
200	37713,8	39,099
500	95373,1	39,086
1000	198008,2	39,071
2000	414335,3	39,058
3000	587151,8	39,032
4000	540398,1	39,001

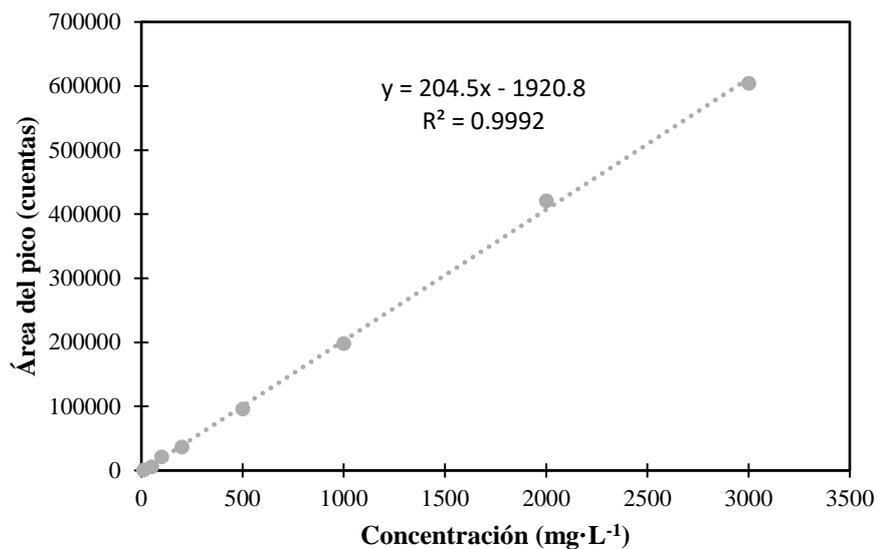


Figura A8. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de acetaldehído.

### Ácido acético

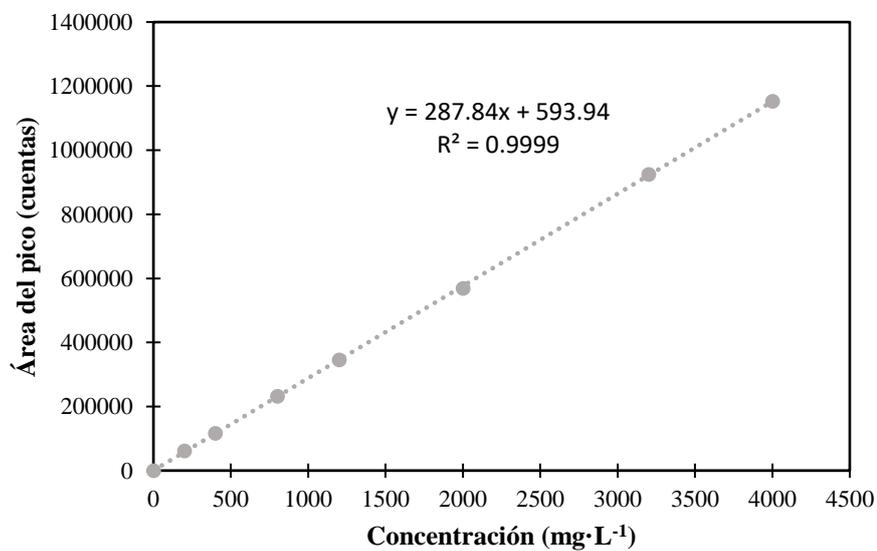


Figura A9. Área del picofrente a la concentración para el calibrado de ácido acético.

Tabla A13. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado del ácido acético.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	Área del pico (cuentas)	Tiempo de retención (min)
0	-	-
200	3994,3	33,243
400	17947	33,256
800	37713,8	33,262
1200	95373,1	33,269
2000	414335,3	33,281
3200	587151,8	33,285
4000	540398,1	33,306

### Ácido láctico

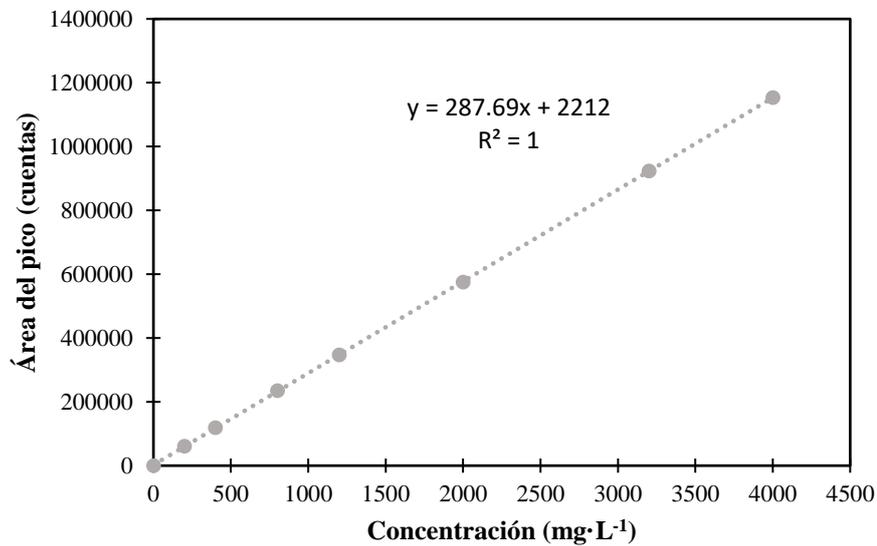


Figura A10. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de ácido láctico.

Tabla A14. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado del ácido láctico.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	Área del pico (cuentas)	Tiempo de retención (min)
0	-	-
200	60423,4	27,533
400	118661,5	27,615
800	234443,4	27,73
1200	347056,7	27,75
2000	575116,3	27,941
3200	923676	28,083
4000	1153036,7	28,151

**Ácido málico**

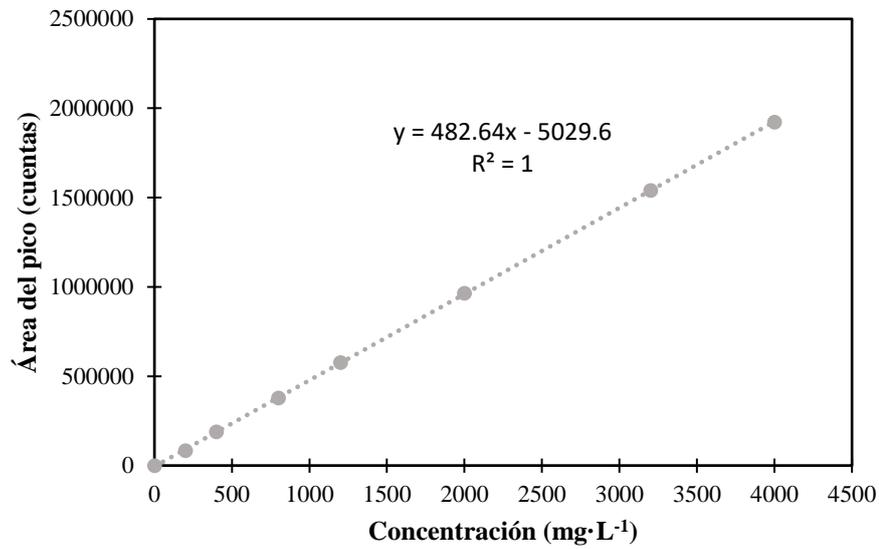


Figura A11. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de ácido málico.

Tabla A15. Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado del ácido málico.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	Área del pico (cuentas)	Tiempo de retención (min)
0	-	-
200	83485,8	20,066
400	189206,5	20,22
800	377796,6	20,44
1200	576668	20,603
2000	964746,8	20,773
3200	1540013,1	20,968
4000	1922963,2	21,091

**Ácido pirúvico**

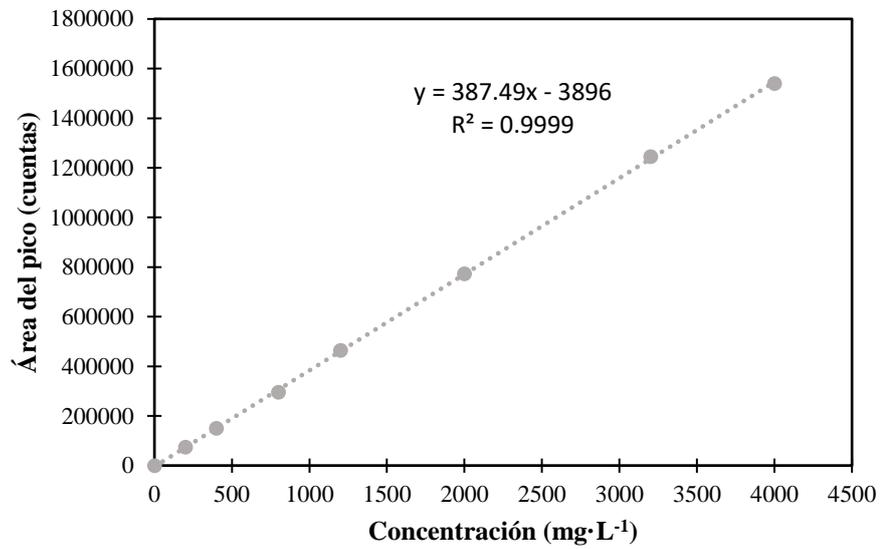


Figura A12. Área del pico frente a la concentración para el calibrado de ácido pirúvico.

Tabla A16 Concentración, área del pico y tiempo de retención para el calibrado del ácido pirúvico.

Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )	Área del pico (cuentas)	Tiempo de retención (min)
0	-	-
200	74649,6	14,343
400	150100,9	14,684
800	294960,2	15,125
1200	464216,6	15,469
2000	773002,9	16,068
3200	1244952,5	16,639
4000	1539350,9	16,886