



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA

**“PURIFICACIÓN DE
PROTEASAS
PRODUCIDAS POR
FERMENTACIÓN CON
BACILLUS
LICHENIFORMIS DE
BIOMASAS RESIDUALES”**

TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR

Ángela Pedriza González

JULIO, 2024





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. Dña. Paula Oulego Blanco y Dr. D. Sergio Collado Alonso (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **Ángela Pedriza González** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 18ª promoción curso 2023-2024.

Oviedo, 4 de julio de 2024

Manuel Rendueles de la Vega
Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser mi abrigo.

A mi hermana, por su incondicional apoyo.

A Héctor, por creer siempre en mí.

A Paula Oulego, que con su dedicación y conocimiento me ha guiado en la realización de este trabajo. Por convertir mi impaciencia en ganas de aprender. Gracias por su exigencia para conseguir que diera todo y más de mí.

A Juanfer, por guiarme, acompañarme y enseñarme. Por ponerme los pies en la tierra cuando ni yo sabía dónde estaba.

A Sergio Collado, por escucharnos y mantener siempre el ánimo del grupo.

Gracias por acompañarme en el camino.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. CONSIDERACIONES TEORICAS.....	12
2.1. Aguas residuales.....	12
2.2. Lodos activos.....	13
2.2.1. Gestión de lodo.....	14
2.2.2. Revalorización de lodos.....	16
2.3. <i>Bacillus licheniformis</i>	17
2.3.1. Proteasa.....	18
3. METODOLOGÍA EMPLEADA.....	20
3.1. Metodología bibliográfica.....	20
3.2. Material y métodos.....	20
3.2.1. Lodos activos.....	21
3.2.2. Tratamiento hidrotérmico del lodo.....	22
3.2.3. Cultivo de <i>Bacillus licheniformis</i>	23
3.2.4. Ajuste de pH del lodo a fermentar.....	24
3.2.5. Fermentación del lodo.....	25
3.2.6. Determinación del crecimiento de biomasa.....	26
3.2.7. Determinación de la concentración de carbohidratos.....	27
3.2.8. Determinación de la concentración de proteínas y ácido húmicos.....	27
3.2.9. Determinación de SST y SSV.....	28
3.2.10. Determinación de la actividad proteasa.....	29
3.2.11. Purificación de proteasa por precipitación.....	30
3.2.12. Purificación de proteasa por filtración.....	30
3.2.13. Determinación de la capacidad de detergencia de la proteasa.....	30
4. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	32
4.1. Análisis del crecimiento de <i>B. licheniformis</i>	32
4.2. Evolución de la concentración de nutrientes.....	33
4.3. Evolución de la concentración de carbohidratos durante la fermentación.....	34
4.4. Evolución de la concentración de proteínas durante la fermentación.....	35
4.5. Evolución de la concentración de ácidos húmicos durante la fermentación.....	37

4.6.	Análisis de la actividad proteasa	38
4.7.	Purificación.....	40
4.8.	Determinación de la capacidad de detergencia de la proteasa.....	43
5.	CONCLUSIONES.....	46
6.	SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	47
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	48

RESUMEN

El principal residuo de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), los lodos activos (LA), suponen uno de los mayores desafíos a nivel de gestión ambiental, debido a su elevada generación, así como a su contenido en patógenos y otros compuestos tóxicos. Sin embargo, los biopolímeros presentes en su estructura resultan una valiosa fuente de nutrientes para la obtención de productos de valor añadido, tales como las enzimas, una vez se produzca su solubilización. Por ello, el presente estudio se centró en el empleo de LA como biomasa residual renovable para la producción de proteasas mediante fermentación con *Bacillus licheniformis*.

Para ello, se evaluó el uso tanto de la hidrólisis térmica (HT) como la oxidación húmeda (OH), como estrategias para la solubilización de dichos compuestos valiosos, obteniéndose hasta $11,3 \pm 0,8$ g/L de biomoléculas solubilizadas tras 60 minutos de tratamiento a 140°C y 20 bar.

Los resultados relativos a la fermentación con *B. licheniformis* revelaron que el grado de asimilación de las biomoléculas fue similar para ambos lodos tratados hidrotérmicamente a un pH de 6,5 y tras 72 horas de fermentación. Sin embargo, la actividad de la proteasa fue mayor en el lodo tratado por OH que por HT, obteniéndose valores de 620 ± 17 U/mL y 370 ± 15 U/mL, respectivamente.

El tratamiento de purificación de la enzima cruda más eficaz, obtenida tras fermentar el lodo tratado por OH, resultó ser la combinación de precipitación con sulfato de amonio seguido de filtración por centrifugación con un tamaño de poro de 30 kDa. Así se obtuvo un valor de proteasa de 806 ± 16 U/mL.

En el estudio de detergencia se encontró que la aplicación de proteasa (50 μL) sobre la tela y el posterior lavado con agua (100 mL) y detergente (100 μL) fue la combinación más efectiva para eliminar manchas de sangre tanto en tela de algodón como de lino. Aplicando dicha combinación, se observó el valor más elevado de intensidad de blanco (91,7 para algodón y 89,8 para lino) y el más bajo de intensidad de amarillo (1,8 para algodón y -4,8 para lino), así como la menor diferencia de color respecto al blanco (8,3 para el algodón y 10,2 para el lino), lo que indica una correcta limpieza.

ABSTRACT

The main waste of wastewater treatment plants (WWTPs), activated sludge (AS), represents one of the biggest challenges in environmental management due to its high generation and its content of pathogens and other toxic compounds. However, the biopolymers present in its structure are a valuable source of nutrients for obtaining added-value products, such as enzymes, once they are solubilised. Therefore, this study focused on the use of AS as a renewable residual biomass to produce proteases through fermentation with *Bacillus licheniformis*.

To this end, both thermal hydrolysis (TH) and wet oxidation (WO) were evaluated as strategies for solubilizing the valuable compounds, obtaining up to 11,3 g/L of solubilized biomolecules after 60 minutes of treatment at 140°C and 20 bar.

The results related to the fermentation with *B. licheniformis* revealed that the degree of assimilation of the biomolecules was similar for both hydrothermally treated sludges at a pH of 6.5 and after 72 hours of fermentation. However, protease activity was higher in the sludge treated by WO than by TH, obtaining values of 620 ± 17 U/mL and 370 ± 15 U/mL, respectively.

The most effective purification treatment of the crude enzyme, obtained after the fermentation of the sludge treated by WO, was the combination of ammonium sulfate precipitation followed by centrifugation filtration with a pore size of 30 kDa, resulting in a protease value of 806 ± 16 U/mL.

In the detergency study, it was found that the application of protease (50 μ L) on the fabric followed by washing with water (100 mL) and detergent (100 μ L) was the most effective combination for removing blood stains on both cotton and linen fabrics. Applying this combination, the highest white intensity values are observed (91.7 for cotton and 89.8 for linen) and the lowest yellow intensity values (1.8 for cotton and -4.8 for linen), as well as the smallest color difference from white (8.3 for cotton and 10.2 for linen), indicating proper cleaning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del tratamiento de aguas residuales (MITECO).....	13
Figura 2. Flóculos formados durante el tratamiento biológico.	14
Figura 3. Observación de <i>Bacillus licheniformis</i> tras aplicar el método de tinción. (Sathiyarayanan et al., 2013)	17
Figura 4. Muestras de lodos activos recogidas en una EDAR de Mieres, Asturias.	21
Figura 5. Reactor discontinuo modelo PARR T316SS (Parr Instrument Co Moline) con el que se llevaron a cabo los tratamientos hidrotérmicos.	22
Figura 6. Colonias de <i>Bacillus licheniformis</i> aisladas en placas de medio específico.	24
Figura 7. Preinóculo de <i>Bacillus licheniformis</i> en medio líquido tras 12 horas de incubación a 37°C y 150 rpm.	24
Figura 8. Matraces de fermentación en la campana de flujo laminar en el momento de realizar la toma de muestra.	25
Figura 9. Eppendorfs con la muestra de fermentación tras la centrifugación en los que se observa el pellet de <i>Bacillus licheniformis</i> y el sobrenadante tras la centrifugación.	26
Figura 10. Espectrofotómetro UV-Visible Genesys 150 de Thermo Fisher Scientific.	26
Figura 11. Muestras tras la adición de reactivos para la determinación de carbohidratos.	27
Figura 12. Muestras tras la adición de reactivos para la determinación de proteínas y ácidos húmicos.	28
Figura 13. Crecimiento de <i>B. licheniformis</i> durante la fermentación con lodo hidrolizado (■) y lodo oxidado (●) a 37°C, 150 rpm y pH 6,5.	32
Figura 14. Evolución de la concentración de carbohidratos (CH) durante la fermentación con lodo hidrolizado (■) y lodo oxidado (●) a 37°C, 150 rpm y pH 6,5.	35
Figura 15. Evolución de la concentración de proteínas durante la fermentación con lodo hidrolizado (■) y lodo oxidado (●) a 37°C, 150 rpm y pH 6,5.	37
Figura 16. Evolución de la concentración de ácidos húmicos durante la fermentación con lodo hidrolizado (■) y lodo oxidado (●) a 37°C, 150 rpm y pH 6,5.	38
Figura 17. Evolución de la actividad proteasa durante la fermentación con lodo hidrolizado (■) y lodo oxidado (●) a 37°C, 150 rpm y pH 6,5.	39
Figura 18. Esquema de los procesos de purificación llevados a cabo sobre la fracción enzimática cruda para obtener proteasa pura. Imagen creada con BioRender.com.	40

Figura 19. Actividad proteasa del retenido aplicando únicamente filtración (■) y aplicando previamente precipitación y luego filtración (■).	41
Figura 20. Actividad proteasa del permeado aplicando únicamente filtración (■) y aplicando previamente precipitación y luego filtración (■).	41
Figura 21. Actividad proteasa del retenido obtenido tras pasar el permeado de 50kDa por el filtro de 30 aplicando únicamente filtración (■) y aplicando previamente precipitación y luego filtración (■).....	42
Figura 22. Muestras de tela de lino (a) sin manchar (a.1), tras ser manchada (a.2), aplicando la configuración 1 (a.3), aplicando la configuración 2 (a.4), aplicando la configuración 3 (a.5) y aplicando la configuración 4 (a.6) y en tela de algodón (b) sin manchar (b.1), tras ser manchada (b.2), aplicando la configuración 1 (b.3), aplicando la configuración 2 (b.4), aplicando la configuración 3 (b.5) y aplicando la configuración 4 (b.6).	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Jerarquía taxonómica de <i>Bacillus licheniformis</i> (ITIS).	17
Tabla 2. Caracterización del lodo activo inicial.	21
Tabla 3. Condiciones de operación de los tratamientos hidrotérmicos.	22
Tabla 4. Características de los lodos tras los tratamientos hidrotérmicos.	23
Tabla 5. Valores de ΔE , IA e IB obtenidos en las diferentes muestras realizadas en tela de algodón antes de lavar y tras el lavado.	44
Tabla 6. Valores de ΔE , IA e IB obtenidos en las diferentes muestras realizadas en tela de lino de antes de lavar y tras el lavado.	44

1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático es uno de los principales problemas que debe afrontar la sociedad, no solo por la rapidez de su avance, sino también por la posible irreversibilidad de los daños causados en un futuro. En los últimos tiempos, dicha emergencia climática ha instado a intensificar la búsqueda de opciones para el control de residuos, tanto industriales como urbanos. El manejo inadecuado de dichos residuos produce efectos negativos en los entornos receptores, pudiendo causar contaminación en el suelo, agua y aire, contribuyendo así al cambio climático y afectando a los ecosistemas y a la salud humana. No obstante, si estos residuos se gestionan y tratan de forma adecuada es posible obtener recursos con alto valor añadido.

En España se genera de media un volumen de aguas residuales de unas 13.361.642 toneladas al año, de las cuales, en torno al 30% son urbanas (INE). Estas aguas residuales se someten a un proceso de depuración antes de su vertido al medio receptor, con el objetivo de garantizar el menor impacto posible sobre la masa de agua receptora (MITECO). Concretamente, las aguas residuales son tratadas en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), donde se aplican tratamientos biológicos, generando cantidades significativas de lodos activos residuales (LA) (Zhang *et al.*, 2023). Así, en España se generaron en 2020 1.148.222 toneladas de lodos procedentes del tratamiento de aguas residuales urbanas (INE). Esto, sumado a la presencia de sustancias peligrosas en los LA, los elevados costes de eliminación y las estrictas regulaciones gubernamentales para su gestión, ha generado un grave problema ambiental. Por ello, representa uno de los principales desafíos en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Moreno *et al.*, 2024). En la actualidad, aunque las tasas y métodos de eliminación varían entre países, los principales enfoques de gestión de LA continúan siendo el uso agrícola, el compostaje, la disposición en vertederos o la incineración, suponiendo no solo riesgos significativos para el medio ambiente y la salud pública, sino que también conllevan el desperdicio de recursos renovables (Núñez *et al.*, 2022). En contraposición a los métodos de gestión previamente mencionados, las investigaciones actuales se centran en la revalorización de lodos mediante la producción de compuestos de interés tecnológico con numerosas aplicaciones (Muras *et al.*, 2021; Moreno *et al.*, 2024; Valdez-Chavez *et al.*, 2019). Este proceso no solo reduce la cantidad de residuos, sino que también puede generar productos útiles como biomoléculas (proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos), bioplásticos y enzimas de interés industrial.

En este sentido, los procesos de tratamiento hidrotérmicos, basados en la utilización de un disolvente acuoso a elevadas temperaturas y presiones con el propósito de obtener compuestos solubles de valor resultan de interés (Urrea *et al.*, 2018). Estos tratamientos, realizados bajo una atmósfera inerte (Hidrólisis Térmica, HT) u oxidante (Oxidación Húmeda, OH), producen una corriente tratada rica en compuestos orgánicos biodegradables en tiempos de residencia cortos. Además, el efluente resultante presenta condiciones estériles, lo que lo hace adecuado para su uso posterior como medio de cultivo microbiano (Moreno *et al.*, 2024).

En este contexto, el uso de microorganismos del género Bacilo, como *Bacillus licheniformis*, ha demostrado ser particularmente eficaz para la obtención de biocompuestos. Esta bacteria, clasificada como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), se caracteriza por su capacidad para degradar hasta el 90% de los nutrientes presentes en los lodos, transformándolos en productos de valor añadido, como enzimas de valor industrial (Moreno *et al.*, 2024). Esto, junto con su elevada tasa de crecimiento la hacen ideal para procesos industriales de fermentación (Parrado *et al.*, 2014). Entre las enzimas producidas por *Bacillus licheniformis* resultan de interés las proteasas. Estas enzimas son de tipo hidrolítico y catalizan la ruptura de enlaces peptídicos, presentando numerosas aplicaciones en industrias alimentarias, farmacéuticas y de limpieza (Hamza, 2017; Supuran *et al.*, 2001; Tavano *et al.*, 2018). Estas enzimas abarcan aproximadamente el 60% del mercado global, siendo su principal aplicación la industria de detergentes, la cual genera alrededor de mil millones de euros en ventas anuales (Baweja *et al.*, 2016; Reddy *et al.*, 2022).

Por todo ello, el objetivo del presente trabajo fue la revalorización de los lodos de depuradora generados durante el tratamiento de aguas residuales urbanas como recurso renovable para la obtención de productos de valor añadido. Con este fin, el lodo se sometió a tratamientos hidrotérmicos, como la hidrólisis térmica y la oxidación húmeda, con el objeto de solubilizar las biomoléculas presentes en el lodo. Posteriormente, el lodo tratado se empleó como sustrato en un proceso de fermentación con *Bacillus licheniformis*, a fin de obtener enzimas de interés industrial: proteasas. Por último, para evaluar su efectividad como agente detergente, las proteasas fueron purificadas y empleadas en procesos de limpieza de muestras de tela manchadas con sangre animal.

2. CONSIDERACIONES TEORICAS

2.1. Aguas residuales.

Las aguas residuales son aquellas aguas alteradas en su composición por el uso al que han sido sometidas, lo que conlleva una pérdida de calidad y una necesidad de tratamiento o depuración (MITECO). El vertido de dichos efluentes sin tratar supone un fuerte impacto ambiental, así como un riesgo para la salud debido al elevado contenido en microorganismos y contaminantes que posee (Alcalde Sanz, 2012). Los principales tipos de aguas residuales son las urbanas y las industriales, teniendo importantes diferencias en su composición. Las aguas urbanas son aquellas que proceden de los núcleos de población, mientras que las industriales son aquellas que proceden de cualquier actividad o negocio en cuyo proceso de producción, transformación o manipulación se emplee agua (Muñoz Cuz, 2008). De esta forma, el tratamiento de las aguas industriales dependerá de la composición de estas, dado que su riesgo será distinto dependiendo de su procedencia (European Environment Agency, 2019).

Las aguas residuales urbanas, una vez que se producen, son conducida hacia las EDARs para ser tratadas en distintas etapas. Esta puede definirse como el conjunto de instalaciones que tiene por objeto la reducción de la contaminación de las aguas residuales hasta límites aceptables para el cauce receptor. Además, deben tratar los fangos producidos en los procesos de depuración del agua residual, a fin de conseguir un producto que cumpla con las condiciones exigidas para el destino que se les vaya a dar (MITECO).

La primera etapa del proceso es el tratamiento preliminar, destinado a preparar las aguas residuales, proteger la instalación y reducir condiciones indeseables (Rojas, 2002). Tras esto, el tratamiento primario, cuyo objetivo es la eliminación por medios físicos o mecánicos de parte del material sedimentable o flotante, seguido del tratamiento secundario, encargado de reducir los compuestos orgánicos presentes en el agua residual por procesos biológicos. Finalmente, se lleva a cabo el tratamiento terciario o avanzado, cuyo fin es complementar los procesos anteriormente indicados para lograr efluentes más puros (Figura 1) (Rojas, 2002; Ramalho, 2021). Tras ser tratadas, las aguas ya clarificadas y no potables pueden ser vertidas al medio con la pertinente autorización de las autoridades (MITECO).

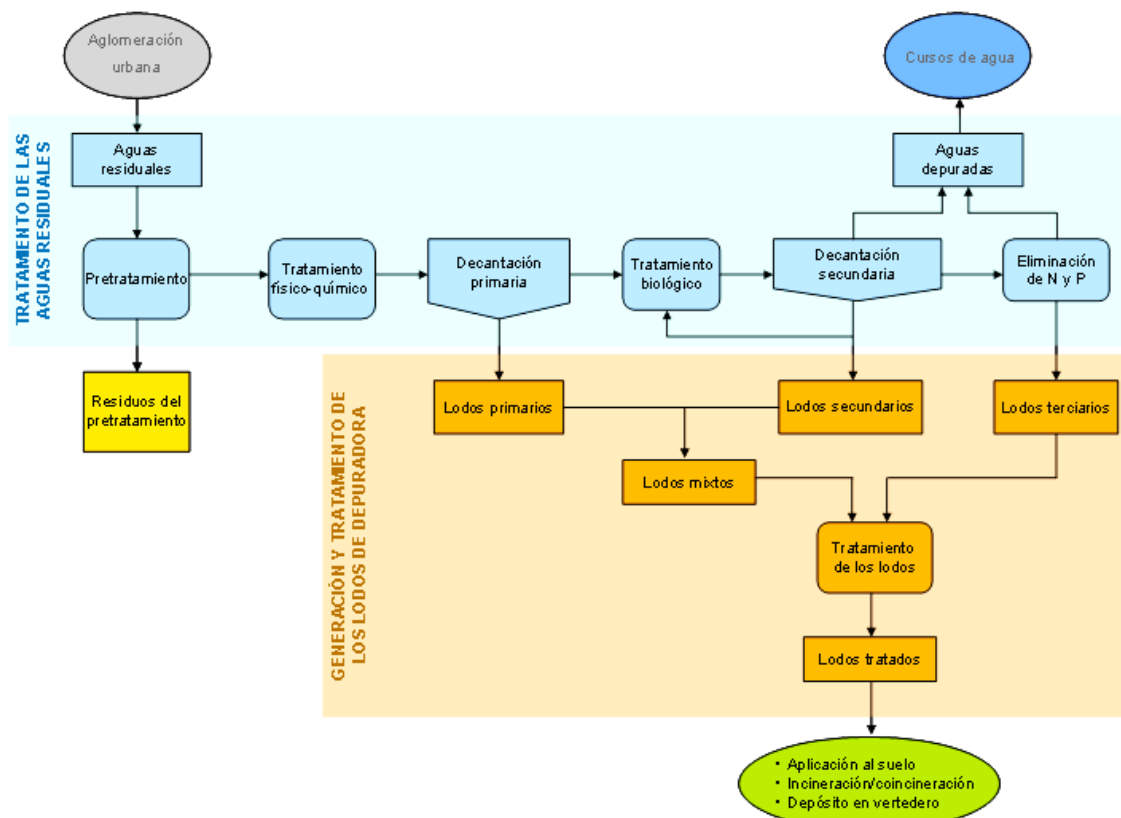


Figura 1. Diagrama de flujo del tratamiento de aguas residuales (MITECO).

Al finalizar el tratamiento, se obtiene el agua tratada y los lodos activos como residuo. En cuanto a los lodos, la cantidad que se produce en las EDARs viene condicionada por el tamaño de la población y el número de habitantes para los que haya sido diseñada.

2.2.Lodos activos.

En el año 2020, en España se generaron 1.148.222 toneladas de lodos provenientes del tratamiento de aguas residuales urbanas (INE). Los lodos consisten en una mezcla de agua y sólidos obtenida tras el tratamiento del agua residual, como resultado de procesos naturales o artificiales (MITECO). Los lodos se denominan “primarios” si proceden del tratamiento primario (compuestos principalmente por sólidos pesados y aceites) y “secundarios” o “activados” si proceden del tratamiento biológico, compuestos por microorganismos (Suarez-Iglesias *et al.*, 2017). El principio básico de la depuración biológica se fundamenta en la biofloculación, que consiste en una agregación de partículas finamente suspendidas en el medio líquido de origen la cual conduce a la formación de estructuras cuyas dimensiones y peso específico permiten su separación del medio líquido por decantación (Di Marzio, 2004).

Los flóculos consisten en la separación de la biomasa formada del efluente tratado. Estos presentan en su composición células bacterianas y partículas orgánicas e inorgánicas, así como sustancias poliméricas extracelulares (SPE), cuyo tamaño varía entre 1 micra y 1000 micras aproximadamente (Figura 2) (Moeller *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2022). Entre estas, destacan las SPE, ya que son los constituyentes principales de los lodos activos representando en torno al 80% de la masa total, siendo el porcentaje restante las células viables (Moeller *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2006). Las SPE son una mezcla de macromoléculas de elevado peso molecular y de origen biológico presentes en el interior de los agregados microbianos (Alonso *et al.*, 2011) y que se componen de proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos, además de materia orgánica y otros elementos traza (Tiruneh *et al.*, 2014; Urrea *et al.*, 2017).

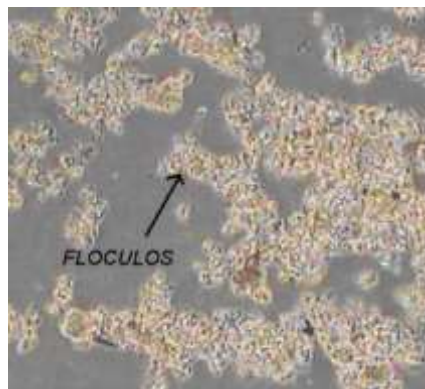


Figura 2. Flóculos formados durante el tratamiento biológico.

2.2.1. Gestión de lodo.

Conforme a la Ley 7/2022 del 8 de abril sobre residuos y suelos contaminados para una economía circular, el productor inicial u otro poseedor de residuos está obligado a asegurar el tratamiento adecuado de estos, disponiendo de opciones como tratar los residuos por sí mismo, encargar el tratamiento de sus residuos a un negociante registrado o a un gestor de residuos autorizado o, por otro lado, a una entidad pública o privada de recogida de residuos. Cabe señalar que los lodos también pueden presentar en su composición metales pesados, patógenos y contaminantes orgánicos, lo que limita su aplicación debido a las estrictas regulaciones medioambientales (Romero *et al.*, 2023). Es por ello por lo que los lodos han de ser tratados para asegurar un destino final adecuado. En el caso de los LA, son las EDAR las encargadas de su correcta gestión, ya que son estas las que los producen.

Cabe señalar que los lodos también pueden presentar en su composición metales pesados, patógenos y contaminantes orgánicos, lo que limita su aplicación debido a las estrictas regulaciones medioambientales (Romero *et al.*, 2023). Es por ello por lo que los lodos han de ser tratados para asegurar un destino final adecuado.

Según el Registro Nacional de Lodos, el destino principal de los lodos de depuradora es la aplicación en suelos agrícolas (aproximadamente un 80% de los lodos generados). Su empleo resulta beneficioso a la hora de reponer materia orgánica y otros compuestos como nitrógeno y fósforo al suelo (Delibacak *et al.*, 2020). Sin embargo, su aplicación supone una serie de modificaciones en la composición, textura, actividad biológica del suelo y, en algunos casos, la presencia de microcontaminantes tóxicos (Carbonell *et al.*, 2009). Estos contaminantes pueden suponer potencial daño, causando la eutrofización del suelo, así como la elevada acumulación de nutrientes en un ecosistema interfiriendo con las condiciones naturales del hábitat (Conci *et al.*, 2022). En términos de salud humana, existen riesgos significativos, como la propagación de enfermedades a través de virus, bacterias o priones; el deterioro cognitivo debido a la acumulación de plomo y la afección al sistema hormonal por la presencia de disruptores endocrinos (Öberg & Mason-Renton, 2018). A ello se le suma la creciente problemática relacionada con la resistencia a antibióticos, donde el abuso y el mal uso de estos conduce a la descarga continua al medio ambiente y propaga el crecimiento global de bacterias resistentes a antibióticos (Xu *et al.*, 2029).

Para paliar algunos de dichos problemas, uno de los métodos más empleados es la incineración. En este proceso, se emplea un incinerador para calentar y secar los lodos de depuradora, y luego se adoptan altas temperaturas para oxidar la materia orgánica en los lodos a fin de lograr su reducción, estabilización e inocuidad (Liang *et al.*, 2021). Sin embargo, una importante desventaja de este método es el elevado coste de los controles de contaminación en las emisiones producidas al aire (Fericelli, 2011). Además, las cenizas generadas pueden contener metales pesados que son susceptibles de solubilizarse en las condiciones adecuadas, aumentando el riesgo para la salud (Toledo Filho & Fontes, 2022).

Frente a los métodos de gestión ya mencionados, las investigaciones actuales se dirigen hacia los tratamientos de tipo hidrotérmico, cuya tecnología se basa en el empleo de un disolvente acuoso a altas temperaturas y presiones con el fin de obtener compuestos

solubles valiosos. Estas reacciones pueden darse bajo atmosferas inertes (hidrólisis térmica) u oxidantes (oxidación húmeda) (Urrea *et al.*, 2018) cuyas condiciones de operación pueden optimizarse a fin de favorecer la producción de diferentes tipos de compuestos valiosos (Moreno *et al.*, 2024).

2.2.2. Revalorización de lodos

El tratamiento de revalorización de lodos se refiere a los procesos mediante los cuales los lodos generados en las EDARs se transforman en productos de valor añadido, en lugar de ser simplemente desechados. El Programa Estatal de Prevención de Residuos se configura en torno a cuatro líneas estratégicas destinadas a incidir en los elementos clave de la prevención de residuos. Estas son la reducción de la cantidad de residuos, la reutilización y alargamiento de la vida útil de los productos, la reducción del contenido de sustancias nocivas en materiales y productos, y reducción de los impactos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente de los residuos generados (MITECO). Se destaca la estrategia de reutilización, donde no solo se generan menos residuos, sino que se obtiene un beneficio económico extra de su recuperación.

En el caso de los lodos, como ya se mencionó anteriormente, entre su composición destacan biomoléculas como materia orgánica, proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos, además de otros elementos traza (Tiruneh *et al.*, 2014; Urrea *et al.*, 2017). Dada su composición es posible obtener numerosos subproductos en función del tratamiento que se aplique. Una de las técnicas de revalorización más empleada es el compostaje, donde los lodos se mezclan con material estructural y se someten a un proceso de degradación aerobia, para emplearse posteriormente como compost en el suelo agrícola (Song y Lee, 2010). Los lodos también se emplean en la producción de materiales de construcción, utilizando las cenizas obtenidas en la incineración como materia prima para el ecocemento o como aditivo en otros materiales (Chang *et al.*, 2020). Asimismo, el lodo puede ser utilizado en la producción de combustibles como el biogás, obtenido mediante digestión anaerobia de la materia orgánica de los lodos (Demirbas *et al.*, 2016). Sin embargo, resulta más interesantes las aplicaciones no energéticas centradas en la obtención de productos de alto valor añadido como pueden ser los biopolímeros (Urrea *et al.*, 2018), bioplásticos (Romero *et al.*, 2024) o biocompuestos como enzimas de interés industrial (Moreno *et al.*, 2024; Ghani *et al.*, 2013).

Por ello, en vista de su composición, el lodo tratado hidrotérmicamente podría utilizarse para la producción de enzimas hidrolíticas, como las proteasas, empleando microorganismos capaces de utilizarlo como sustrato en procesos fermentativos, entre los que se incluye el *Bacillus licheniformis* (Raheem *et al.*, 2018).

2.3. *Bacillus licheniformis*.

Descrita por primera vez en 1898 por Weigmann, la especie *Bacillus licheniformis* es una bacteria Gram + con forma bacilar cuya jerarquía taxonómica se ve reflejada en la Tabla 1 (ITIS). Se trata de un organismo de morfología bacilar irregular, cuyo ancho no es superior a 1 μm (Figura 3) (Campaña Vardesoto, 2018). Requiere temperaturas mínimas de crecimiento de 15°C y máximas de 55°C, además de pHs ligeramente ácidos, en torno a 5,7-6,8 (Garrity *et al.*, 2008). Anaerobio facultativo, móvil y formador de esporas resistentes, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, especialmente en suelo y plantas (Guo *et al.*, 2016; Muras *et al.*, 2021).

Tabla 1. Jerarquía taxonómica de *Bacillus licheniformis* (ITIS).

Reino	Bacteria
Subreino	Posibacterias
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	Bacillus
Especie	<i>Bacillus licheniformis</i>

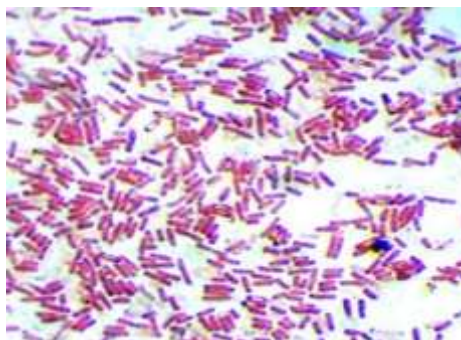


Figura 3. Observación de *Bacillus licheniformis* tras aplicar el método de tinción. (Sathiyarayanan *et al.*, 2013)

Con los años, esta bacteria ha generado gran interés en el ámbito de la biotecnología debido al amplio campo de operación en procesos como la obtención de antibióticos (Valdez-Chavez *et al.*, 2019), compuestos bioactivos (Muras *et al.*, 2021) o biocompuestos como enzimas de interés industrial (Moreno *et al.*, 2024; Ghani *et al.*, 2013). En estudios recientes acerca del reciclado de residuos provenientes del tratamiento de aguas residuales, se ha observado que el uso de bacterias del género *Bacillus*, entre las que se encuentra *Bacillus licheniformis*, supone la digestión del 90% de los nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) presentes en el residuo (Moreno *et al.*, 2024; Seo *et al.*, 2022).

Bacillus licheniformis es una bacteria clasificada como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA, lo que permite su uso en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas. Además, se trata de organismos industrialmente activos dadas sus altas tasas de crecimiento y sus cortos tiempos de fermentación, presentando también capacidad para secretar proteínas extracelulares (Parrado *et al.*, 2014). En resumen, *Bacillus licheniformis* es una bacteria versátil y robusta y de gran utilidad para aplicaciones industriales y biotecnológicas, especialmente por su capacidad para producir enzimas de valor comercial.

2.3.1. Proteasa

Las proteasas se incluyen en el grupo de las hidrolasas, las cuales son enzimas cuya finalidad es degradar el sustrato catalizando la hidrólisis de los enlaces químicos. En el caso de las proteasas, también conocidas como peptidasas, catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos (Holmberg, 2018). Estos enlaces peptídicos constituyen la unión entre los aminoácidos que conforman las proteínas. Dicha unión se forma por la reacción de síntesis entre el grupo carboxilo ($R_1\text{-COOH}$) del primer aminoácido con el grupo amino ($R_2\text{-NH}_2$) del segundo aminoácido (Guillén, 2009). Para su degradación, las proteasas activan un nucleófilo que ataca el carbono del enlace peptídico causando la migración de los electrones del doble enlace carbono-oxígeno hacia el oxígeno, lo que genera un intermedio de alta energía. Este intermedio se estabiliza gracias a la acción de la proteasa hasta que finalmente se produce la ruptura del enlace (Tavano *et al.*, 2018).

Las proteasas pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano. Las proteasas bacterianas son uno de los grupos más importantes de enzimas, debido a su implicación

en numerosos procesos industriales alimentarios (Tavano *et al.*, 2018) y farmacéuticos (Supuran *et al.*, 2001) o en la elaboración de cuero, textil y lana, entre otros (Hamza, 2017). Otra área de aplicación prometedora es la gestión de residuos industriales y domésticos (Moreno *et al.*, 2024) así como la producción de detergentes (Saeki *et al.*, 2007; Vojcic *et al.*, 2015).

Considerando su potencial biotecnológico, resulta crucial explorar nuevos tipos de proteasas que puedan generar beneficios tangibles en las sociedades industriales. En el panorama actual, es de gran importancia la investigación de proteasas provenientes de fuentes novedosas, con el fin de optimizar los procesos industriales de manera sostenible con el medio ambiente. En este sentido, el enfoque de este estudio se ha dirigido hacia la revalorización de lodos activados tratados hidrotérmicamente para la producción de enzimas (proteasas) mediante procesos de fermentación y la posterior utilización de dichas enzimas como detergentes.

3. METODOLOGÍA EMPLEADA

3.1. Metodología bibliográfica

Con el propósito de reunir información previa a la realización del experimento, se realizó una búsqueda bibliográfica en línea, apoyándose en diversos motores de búsqueda como ScienceDirect, PubChem, PubMed, Google Scholar, Royal Society of Chemistry, Scientific Reports, Eurostat Metadata y MDPI. Para llevar a cabo dichas búsquedas se seleccionaron una serie de **palabras clave**¹ y se acotaron los datos teniendo en cuenta la fecha de publicación, valorando positivamente los artículos publicados más recientemente. No obstante, se tuvieron en cuenta los resultados de publicaciones previas que han permitido el avance y desarrollo de la materia a tratar.

Para fijar conceptos, se llevaron a cabo búsquedas generales de información acerca de las aguas residuales, lodos activos, *Bacillus licheniformis* y las proteasas. Posteriormente, se amplió dicha información teniendo en cuenta aspectos como el tratamiento de las aguas residuales, la gestión de los lodos y los tratamientos de revalorización de estos, así como las características del *Bacillus licheniformis* y los productos resultantes de su metabolismo. Se recopiló información acerca de las características y funciones de las proteasas, además de sus posibles usos en procesos industriales, especialmente en el ámbito alimentario.

¹**Palabras clave:** aguas residuales, tratamiento de aguas residuales, lodos activos, revalorización de lodos, *Bacillus licheniformis*, proteasa.

3.2. Material y métodos

Para la puesta en marcha de la parte experimental del presente trabajo y a fin de cumplir los objetivos propuestos, se emplearon los materiales y métodos que se describen a continuación. Todo el trabajo experimental se realizó en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Facultad de Química, así como en la Planta Piloto “José Coca” de la misma facultad, pertenecientes a la Universidad de Oviedo.

3.2.1. Lodos activos.

Los lodos activos empleados en este trabajo han sido facilitados por una EDAR ubicada en Mieres (Asturias), España. Las muestras se transportaron hasta el laboratorio en botes de 2,5 L en condiciones de refrigeración (Figura 4). Una vez en el laboratorio, se llevó a cabo la caracterización previa del lodo activo en la que se determinó el pH, los sólidos suspendidos totales y volátiles, materia orgánica (medida como DQO total y soluble) y las biomoléculas solubles. Estos datos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización del lodo activo inicial.

Parámetro	Valor
pH	6,75 ± 0,07
Sólidos suspendidos totales (SST) (g/L)	34,60 ± 0,07
Sólidos suspendidos volátiles (SSV) (g/L)	25,350 ± 0,002
DQO total* (g/L)	34 ± 4
DQO soluble* (g/L)	1,0 ± 0,5
Carbohidratos solubles (g/L)	0,28 ± 0,02
Proteínas solubles (g/L)	0,96 ± 0,05
Ácidos Húmicos solubles (g/L)	0,17 ± 0,01

*DQO: Demanda Química de Oxígeno



Figura 4. Muestras de lodos activos recogidas en una EDAR de Mieres, Asturias.

3.2.2. Tratamiento hidrotérmico del lodo.

Los tratamientos hidrotérmicos a los que se someten los lodos activos, hidrólisis térmica (HT) y oxidación húmeda (OH), se llevaron a cabo en un reactor de tipo semicontinuo modelo *PARR T316SS* (*Parr Instrument Co Moline, Illinois, Estados Unidos*) con capacidad de un litro (Figura 5), el cual se cargó al 70% para garantizar condiciones de operación seguras. Este cuenta con un agitador de turbina con seis palas, una camisa térmica y un sistema de control que permite mantener constantes las condiciones de trabajo. Las condiciones de operación que se aplican en cada uno de los tratamientos se muestran en la Tabla 3, siendo estos los valores óptimos de trabajo obtenidos por el grupo en estudios previos (Moreno *et al.*, 2024).

Tabla 3. Condiciones de operación de los tratamientos hidrotérmicos.

Tratamiento	Atmósfera	Temperatura	Presión	Tiempo	Agitación	Flujo
HT	Inerte (N ₂)	140°C	20 bar	60 min	300 rpm	1.200 mL/min
OH	Oxidante (O ₂)	140°C	20 bar	60 min	300 rpm	1.200 mL/min



Figura 5. Reactor discontinuo modelo *PARR T316SS* (*Parr Instrument Co Moline*) con el que se llevaron a cabo los tratamientos hidrotérmicos.

El lodo tratado tanto por hidrólisis como por oxidación se recogió en botes estériles y se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 20 minutos a fin de eliminar los sólidos presentes, empleando la centrifuga Compact High Speed Refrigerated Centrifuge Model 6500 (Kubota Laboratory Centrifuges, Japón). Por otro lado, se procedió a su caracterización en la que se determinó el pH y las biomoléculas solubles (Tabla 4).

Tabla 4. Características de los lodos tras los tratamientos hidrotérmicos.

	Lodo sometido a OH	Lodo sometido a HT
pH	$4,7 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,2$
Carbohidratos solubles (g/L)	$3,1 \pm 0,1$	$2,21 \pm 0,03$
Proteínas solubles (g/L)	$4,2 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,6$
Ácidos Húmicos solubles (g/L)	$4,0 \pm 0,6$	$5,0 \pm 0,2$
DQO total (g/L)	$14,7 \pm 0,3$	$15,9 \pm 0,5$

3.2.3. Cultivo de *Bacillus licheniformis*.

La cepa de *Bacillus licheniformis* que se empleó en el proceso de fermentación pertenece a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), concretamente, es la CECT 20, siendo su designación NCTC 10341 y sus condiciones óptimas de cultivo a 37°C durante 48 horas en aerobiosis.

La cepa de *B. licheniformis* se cultivó siguiendo las indicaciones del CECT. En primer lugar, la cepa se sembró en estría en placas de agar con la siguiente composición: 5 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl, 1 g/L de extracto de carne, 1 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de agar (Figura 6). Tras incubar las placas durante 48 horas a 37°C, se procedió a realizar el preinóculo, revitalizando 3 o 4 colonias en medio estéril y manteniéndolas en condiciones aerobias a 37°C y 150 rpm durante 12 horas. Se emplearon 100 mL de medio líquido (Figura 7), el cual presenta la misma composición que el medio sólido, a excepción del agar.



Figura 6. Colonias de *Bacillus licheniformis* aisladas en placas de medio específico.



Figura 7. Preinóculo de *Bacillus licheniformis* en medio líquido tras 12 horas de incubación a 37°C y 150 rpm.

3.2.4. Ajuste de pH del lodo a fermentar

El lodo empleado como sustrato para la fermentación ha de presentar un pH óptimo para el crecimiento de *B. licheniformis*. Para ello, se determina y ajusta el pH en condiciones estériles empleando un pH-metro sensION+ pH3 (Hach, Estados Unidos) y las disoluciones HCl 2 M y NaOH 1 M. El pH óptimo para el crecimiento de *Bacillus licheniformis* en estas condiciones es de 6,5. De esta forma, se ajusta únicamente el pH del lodo oxidado (pH 4,7) ya que el hidrolizado (pH 6,1) presenta un valor próximo al óptimo de crecimiento.

3.2.5. Fermentación del lodo

La fermentación se llevó a cabo en matraces de 500 mL a los que se adicionó 100 mL de lodo tratado por HT y por OH. Estos se cubren con tapones de algodón y con papel aluminio y se esterilizan para evitar la contaminación del medio (Figura 8).



Figura 8. Matraces de fermentación en la campana de flujo laminar en el momento de realizar la toma de muestra.

Para llevar a cabo la inoculación de los medios ya estériles, se adicionan 10 mL del preinóculo a un tubo Falcon estéril de 50 mL y se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 10 minutos, empleando la centrífuga Hareus Multifuge X1 Centrifuge Series, (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Tras esto, el sobrenadante se desechó y el pellet obtenido se resuspendió en 5 mL del lodo estéril que se empleará como medio de fermentación. La suspensión se homogeniza con ayuda de un vórtex y posteriormente se adiciona al matraz de 500 mL con el medio estéril. Se incuban a 37°C y 150 rpm con ayuda de un agitador orbital (New Brunswick Sci, Estados Unidos).

Durante la fermentación se llevó a cabo la toma de muestras para conocer la evolución de dicho proceso. Las muestras se tomarón por duplicado recogiendo 1 mL de muestra en un Eppendorf de 2 mL estéril (Figura 9). Tras esto, las muestras se centrifugaron a 13.500 rpm durante 10 minutos en una microcentrífuga 5424 (Eppendorf, Alemania). El sobrenadante obtenido se recogió en nuevos Eppendorf y se empleó posteriormente para el análisis de la proteasa. Por otro lado, el pellet se resuspendió en 1 mL de NaCl 0,7% (p/v) para determinar el crecimiento de la biomasa (densidad óptica).



Figura 9. Eppendorfs con la muestra de fermentación tras la centrifugación en los que se observa el pellet de *Bacillus licheniformis* y el sobrenadante tras la centrifugación.

3.2.6. Determinación del crecimiento de biomasa

Para la determinación del crecimiento de biomasa, se analiza la densidad óptica (DO) de las células de *B. licheniformis*, previamente resuspendidas en NaCl 0,7% (p/v), midiendo la absorbancia a 600 nm. Para evitar interferencias, aquellas muestras cuya absorbancia es superior a 0,3 u.a., son diluidas en concentración 1:10. La medida de la absorbancia se lleva a cabo en un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 150 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) (Figura 10).



Figura 10. Espectrofotómetro UV-Visible Genesys 150 de Thermo Fisher Scientific.

Para determinar el peso seco de las células y obtener la concentración celular, se centrifugaron 5 mL de cultivo (13000 rpm, 10 min). Las células recolectadas se lavaron con una disolución acuosa de NaCl al 0,7% (p/v) y posteriormente se secaron a 80 °C hasta alcanzar un peso constante.

3.2.7. Determinación de la concentración de carbohidratos

Para la determinación de la concentración de carbohidratos se empleó el método de Dubois (Dubois *et al.*, 1956) relativo al análisis de polisacáridos solubles. Empleando D-glucosa como patrón, se obtuvo la curva de calibrado del proceso. Las muestras estudiadas se diluyeron en una concentración de 1:100 y se tomó 1 mL. A estas se le adicionan 0,5 mL de fenol al 5% y, seguidamente 2,5 mL de ácido sulfúrico al 96%. Se agitaron y se dejaron reposar durante una hora a oscuras (Figura 11). Finalmente, se mide la absorbancia a 492 nm en el espectrofotómetro UV-Visible Genesys 150 Thermo Scientific, (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).



Figura 11. Muestras tras la adición de reactivos para la determinación de carbohidratos.

3.2.8. Determinación de la concentración de proteínas y ácido húmicos

Para la determinación de proteínas y ácidos húmicos se llevó a cabo el método de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951). Este método se basa en medir la absorbancia total y la absorbancia ciega en presencia o ausencia de sulfato cúprico. Empleando albúmina de suero bovino y ácido húmico como patrones, se obtuvieron las curvas de calibrado de los procesos. Para el cálculo de la absorbancia se tuvo en cuenta la relación entre las proteínas y los ácidos húmicos, la cual se detalla en las siguientes ecuaciones, donde ABS hace referencia a la absorbancia:

$$\text{ABS (Proteína)} = 1,25 \cdot (\text{ABS Total} - \text{ABS Ciega})$$

$$\text{ABS (Ácido Húmico)} = \text{ABS Ciega} - (0,2 \cdot \text{ABS Proteína})$$

Para calcular la absorbancia total, se preparó el reactivo 1 mediante la combinación de tartrato sódico potásico al 2%, sulfato cúprico pentahidratado al 1%, y una disolución de carbonato sódico al 2% y NaOH 1 M, en una proporción de 50:0,5:0,5. Para determinar la absorbancia ciega, se preparó el reactivo 2 siguiendo el mismo procedimiento, pero sustituyendo el sulfato cúprico pentahidratado por agua destilada.

Tras esto, a 1 mL de muestra se le adicionaron 5 mL de los reactivos 1 o 2 y se mantuvo en oscuridad durante 15 minutos a fin de que se llevara a cabo la reacción. Pasado el tiempo, se agregaron 300 μL del reactivo Folin-Ciocalteu, previamente diluido en agua destilada (en una proporción de 1:2), y se dejó reaccionar durante 30 minutos más en la oscuridad (Figura 12). Finalmente, se midió la absorbancia a 580 nm utilizando el mismo espectrofotómetro empleado para la determinación de la concentración de carbohidratos.



Figura 12. Muestras tras la adición de reactivos para la determinación de proteínas y ácidos húmicos.

3.2.9. Determinación de SST y SSV.

Se llevó a cabo la determinación del contenido en sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) de los lodos activados. Para ello, se pesó un Falcon de 50 mL vacío, y se anotó tanto el peso de la tapa como el del tubo. Se adicionaron 30 mL de muestra en el Falcón y se centrifugó durante 20 minutos a $10.000 \times g$, empleando la centrífuga Hareus Multifuge X1 Centrifuge Series, (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). El sobrenadante obtenido se desechó y el pellet obtenido se

secó en la estufa durante 2 horas a 105°C. Una vez transcurrido el tiempo, se sacó de la estufa y se dejó enfriar. Una vez frío, se procedió a medir su peso de nuevo, obteniendo así el valor de los sólidos suspendidos totales (SST).

Tras esto, los sólidos secados a 105°C se pasaron a crisoles de cerámica pesados previamente, los cuales fueron introducidos en una mufla durante 5 horas a 550°C. Una vez transcurrido el tiempo, se sacaron de la mufla y se dejaron enfriar. Una vez fríos, se procede de nuevo a medir su peso, obteniendo así el valor de los sólidos suspendidos fijos (SSF). Tras esto, para obtener el valor de los sólidos suspendidos volátiles (SSV), se calcula la diferencia entre los SST y los SSF. Las ecuaciones empleadas para obtener dichos valores son las siguientes:

$$\text{SST (g/L)} = \text{Peso Falcon tras 24 horas a 105°C (g)} - \text{Peso del Falcon vacío (g)} / \text{Volumen muestra (L)}$$

$$\text{SSF (g/L)} = (\text{Peso crisol + muestra}) \text{ (g)} - \text{Peso crisol 5 h mufla 550°C (g)} / \text{Volumen muestra (L)}$$

$$\text{SSV (g/L)} = (\text{SST} - \text{SSF}) / \text{Volumen muestra (L)}$$

3.2.10. Determinación de la actividad proteasa

Para la determinación de la actividad proteasa se llevó a cabo una dilución 1:20 de la muestra en un buffer de tris-glicina 0,2 M. Se tomaron 120 µL de dicha dilución y se añadieron 480 µL de azocaseína al 1%, dejándolo reaccionar durante 1 hora a 45°C. Pasado el tiempo, se adicionaron 600 µL de ácido tricloroacético al 10% y se centrifugaron las muestras a 16.000 × g durante 10 minutos. Tras centrifugar, se pipetearon 800 µL del sobrenadante en 200 µL de NaOH 1,8 M y se midió la absorbancia a 420 nm, para la cual se empleó el espectrofotómetro UV-Visible Genesys 150 Thermo Scientific, (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Para la realización del blanco, se procedió de la misma manera sustituyendo los 120 µL de muestra por 120 µL de buffer tris-glicina. Tras esto, se llevó a cabo el mismo protocolo que para las muestras.

Se debe tener en cuenta que una unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de enzima necesaria para aumentar la absorbancia a 420 nm en 0,1 unidades en 1 h (Moreno *et al.*, 2024).

3.2.11. Purificación de proteasa por precipitación

Las proteasas fueron parcialmente purificadas por el método de precipitación con sulfato de amonio. Se seleccionó este procedimiento debido a su simplicidad, bajo coste, corto tiempo de separación de fases e idoneidad para operación continua, lo que lo hace factible para su uso a escala industrial (Hyde *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2020).

Una vez alcanzados los picos máximos de actividad enzimática en los medios de cultivo, estos se trasvasaron a tubos Falcon estériles de 50 mL y se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm para eliminar las células de *B. licheniformis*. Tras esto, se añadió sulfato de amonio a 100 mL de sobrenadante hasta una saturación del 80% a 20°C. El precipitado resultante fue recogido por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos y posteriormente redisolto en 25 mL de tampón fosfato 0,05 M. Finalmente, este extracto enzimático se dializó con el mismo tampón fosfato empleado anteriormente a 4°C en condiciones de agitación para eliminar el sulfato de amonio. Por tanto, el líquido recuperado de la bolsa de diálisis se consideró proteasa parcialmente purificada.

3.2.12. Purificación de proteasa por filtración

La proteasa fue purificada empleando filtros para centrífuga Amicon Ultra-15 (Millipore, Irlanda) con tamaños de poro de 3, 30, 50 y 100 kDa. Una vez alcanzados los picos máximos de actividad enzimática en los medios de cultivo, estos se trasvasaron a tubos Falcon estériles de 50 mL y se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm para eliminar las células de *B. licheniformis*, empleando la centrífuga Hareus Multifuge X1 Centrifuge Series, (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Tras esto, se introdujeron 10 mL de sobrenadante en cada filtro para centrífuga Amicon Ultra-15 y se centrifugaron a $6.500 \times g$ durante 30 minutos empleando la misma centrífuga. Tras la centrifugación, se obtiene un retenido y un permeado cuya actividad proteasa varió en función del tamaño de poro empleado. Para las muestras purificadas por precipitación con sulfato amonio se aplicó el mismo procedimiento de filtración descrito anteriormente.

3.2.13. Determinación de la capacidad de detergencia de la proteasa

La capacidad de detergencia de la proteasa para eliminar las manchas de sangre de la ropa se estudió utilizando diferentes telas manchadas de sangre de vaca según el

método sugerido por Liya *et al.*, 2023. La sangre de vaca utilizada en este estudio se obtuvo del Matadero Central de Asturias.

Para ello, se emplearon telas de algodón y de lino de un tamaño de 5 cm × 5 cm que se tiñeron con 100 µL de sangre de vaca y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente (20°C) durante 24 horas. Las configuraciones experimentales incluyen:

- Configuración 1: tela manchada sumergida en 100 mL de agua destilada.
- Configuración 2: tela manchada sumergida en 100 mL de agua destilada con 100 µL de detergente y 50 µL de enzima purificada.
- Configuración 3: tela manchada sumergida en 100 mL de agua destilada con 100 µL de detergente y 50 µL de enzima purificada, que se añadieron previamente a la tela antes de sumergirla.
- Configuración 4: tela manchada sumergida en 100 mL de agua destilada y 50 µL de enzima purificada.

Las telas se lavaron durante una hora a 45°C empleando cada una de las disoluciones detergentes. Pasado el tiempo, las telas se extraen de las diferentes disoluciones limpiadoras y se dejan secar al aire durante 24 horas. Finalmente, se determina el color residual de la tela tras el lavado con un colorímetro LC 100 (Lovibond, Reino Unido). Tras obtenerse los valores de L^* (luminosidad), a^* (coordenadas rojo/verde) y b^* (coordenadas amarillo/azul) en la escala CIELAB, se calculó la diferencia del color de la muestra con respecto al estándar/patrón (tela sin manchar) (ΔE), la intensidad de amarillo (IA) y la intensidad de blanco (IB). Las ecuaciones empleadas para obtener dichos valores son las siguientes:

$$\Delta E = \sqrt{((L^*_1 - L^*_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2)}$$

$$IA = (142,86 * b) / L^*$$

$$IB = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

4. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1. Análisis del crecimiento de *B. licheniformis*.

Para la obtención de la proteasa, se llevó a cabo la fermentación empleando como sustrato tanto el lodo sometido a hidrólisis térmica como el lodo sometido a oxidación húmeda. Para ello, se inoculó *Bacillus licheniformis* en ambos medios, ajustados a pH 6,5, obteniéndose así sus respectivas curvas de crecimiento (Figura 13). Las curvas de crecimiento presentan ciertas diferencias en función del microorganismo empleado y de las condiciones de cultivo que se apliquen; sin embargo, todas tienen en común una serie de fases. Primero, está la fase de latencia o adaptación al medio, seguida de la fase exponencial o logarítmica, luego la fase estacionaria y, finalmente, de la fase de muerte.

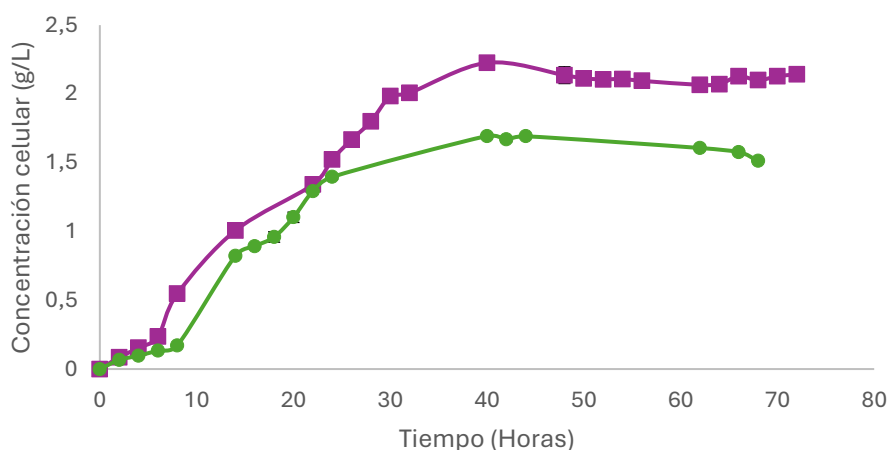


Figura 13. Crecimiento de *B. licheniformis* durante la fermentación con lodo hidrolizado (■) y lodo oxidado (●) a 37°C, 150 rpm y pH 6,5.

El proceso comienza en la fase de latencia. En base a la Figura 13, cabe señalar que dicha fase tiene una duración menor (6 horas) cuando se empleó el lodo hidrolizado como sustrato, siendo de 8 horas para el lodo oxidado. Ello puede ser debido a la presencia de compuestos inhibidores, tales como ácidos orgánicos (ácido acético, ácido fórmico y otros ácidos de cadena corta) o compuestos de tipo fenólico (furfural e hidroximetilfurfural), en el lodo oxidado (Wang *et al.*, 2018). La concentración celular final que se obtuvo fue de $2,1 \pm 0,2$ g/L. Con relación a la fase exponencial, esta comienza pasadas las 6 horas para el lodo hidrolizado y las 8 horas para el oxidado, y se extiende hasta las 40 horas. Este crecimiento acelerado se debe a las reacciones correspondientes con el metabolismo primario, que tienen lugar en la fase exponencial, donde el

microorganismo sintetiza moléculas de bajo peso molecular que se comportan como productos finales o intermedios en las distintas rutas anabólicas o catabólicas, siendo, por tanto, esenciales para el crecimiento.

Por otro lado, durante la fase estacionaria, comienza a disminuir la velocidad de crecimiento hasta hacerse nula debido a que se produce o bien el agotamiento del suministro de algún nutriente esencial, por acumulación de productos metabólicos que sean tóxicos o por disminución de la oxigenación, o cambios en las condiciones de pH del medio de cultivo (Benintende, S., & Sanchez, C., 2002). En esta fase se dan reacciones del metabolismo secundario, donde se sintetizan moléculas que no están implicadas en funciones de crecimiento, pero que forman parte de grupos de compuestos químicamente relacionados entre sí y producidos por un grupo reducido de microorganismos (Madigan, 2015). Finalmente, se dio la fase de muerte, en la cual se puso fin al proceso de fermentación. Esto es debido a la disminución de células viables de *B. licheniformis* y, por tanto, la nula síntesis de compuestos. La concentración celular final que se obtuvo fue de $1,5 \pm 0,1$ g/L.

Los valores obtenidos se compararon con obtenidos por otros autores. Estos autores emplearon diferentes sustratos durante la fermentación de *B. licheniformis*, tales como medio salino (De Macedo *et al.*, 2002) o medio enriquecido en glicerol (KO y Gross, 1998), los cuales mostraron un amplio rango de valores de concentración celular (entre 2,34 g/L y hasta 20,5 g/L). Así, los valores obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro de los valores observados en otros estudios similares, demostrándose que ambos sustratos son adecuados para el crecimiento de *B. licheniformis*.

4.2. Evolución de la concentración de nutrientes.

La fermentación depende de varios factores, siendo la concentración del sustrato uno de los más importantes. Por ello, es fundamental determinar el tiempo óptimo de pretratamiento de LA para maximizar la concentración de biopolímeros obtenidos. Los principales biopolímeros analizados fueron carbohidratos, proteínas y ácidos húmicos, ya que todos estos pueden ser metabolizados en mayor o menor medida por *B. licheniformis*. Tanto en la HT como en la OH se observó un aumento notable en la concentración de biopolímeros solubles debido a la ruptura y solubilización de los flóculos de LA.

En base a las Tablas 2 y 4, la concentración de carbohidratos aumentó de $0,28 \pm 0,01$ g/L a $3,1 \pm 0,1$ g/L (60 min) aplicando el tratamiento en presencia de oxígeno y hasta $2,21 \pm 0,03$ g/L (60 min) en su ausencia. Estos datos son similares a los obtenidos en otros estudios, donde se observó un rango de valores desde $1,16 \pm 0,07$ hasta $2,5 \pm 0,1$ g/L (Romero *et al.*, 2024). Con relación a las proteínas (Tablas 2 y 4), la concentración aumentó de $0,96 \pm 0,05$ g/L a $4,2 \pm 0,1$ g/L (60 min) aplicando el tratamiento en presencia de oxígeno y hasta $3,9 \pm 0,6$ g/L (60 min) en su ausencia. Estos datos son similares a los obtenidos en otros estudios, donde se observó un rango de valores desde $2,0 \pm 0,1$ (Moreno *et al.*, 2024) y hasta $6,50 \pm 0,03$ g/L (Romero *et al.*, 2024). Finalmente, en referencia a la concentración de ácidos húmicos (Tablas 2 y 4), esta aumentó de $0,17 \pm 0,01$ g/L a $4,0 \pm 0,6$ g/L (60 min) aplicando el tratamiento en presencia de oxígeno y hasta $5,0 \pm 0,2$ g/L (60 min) en su ausencia.

Así, se obtuvieron $11,1 \pm 0,8$ g/L y $11,3 \pm 0,8$ g/L de biopolímeros tras 60 minutos de tratamiento por hidrólisis térmica (HT) y oxidación húmeda (OH), respectivamente, a 140°C y 20 bar. Estos datos se encuentran dentro del rango de valores obtenidos en otros estudios empleando diferentes sustratos (entre 0,6 g/L hasta 14 g/L) (Romero *et al.*, 2024; Sánchez *et al.*, 2020; Shih *et al.*, 2001). De esta forma, se puede determinar que los tratamientos hidrotérmicos resultan adecuados para la solubilización de los biopolímeros presentes en los lodos.

4.3. Evolución de la concentración de carbohidratos durante la fermentación

El consumo de carbohidratos (Figura 14) en el lodo oxidado fue muy bajo, en torno al 7% durante la fase exponencial de *B. licheniformis*. Durante la fase estacionaria, el consumo fue similar, en torno al 9%. Así, al final del proceso, la concentración de carbohidratos fue de $2,57 \pm 0,01$ g/L, lo que supone un descenso de un 16% con respecto a la concentración inicial. El consumo de carbohidratos fue similar al obtenido en otros estudios con *B. licheniformis* en los que se reportaron asimilaciones entre el 6,5% y el 54,7% (Parrado *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2024).

Por el contrario, en el lodo hidrolizado, el consumo de carbohidratos se inició desde la fase de latencia, alcanzándose durante la misma un consumo del 18,8%. El mayor consumo se observó durante la fase exponencial (33,5%), obteniéndose al final de la misma una asimilación del 52,3%. Durante la fase estacionaria, el consumo fue mucho menor (6,5%). Ello puede ser debido a un elevado consumo de oxígeno dada la alta

densidad celular, lo que puede limitar el metabolismo aerobio (Huang y Tang, 2007). Al final de la fermentación, la concentración de carbohidratos descendió un 58,7% respecto de la concentración inicial, con un valor de $0,9 \pm 0,1$ g/L.

De esta forma, se observó un mayor consumo de carbohidratos empleando lodo HT frente a los OH. Esto se explica debido a la rápida asimilación de los azúcares simples presentes en el lodo hidrolizado por parte de *B. licheniformis* tanto para el mantenimiento celular como para su crecimiento. Sin embargo, no ocurre de igual manera durante la fermentación con lodo OH como sustrato, lo que se debe a las reacciones previas de oxido-reducción que dificultan el metabolismo de los azúcares (Arias y López, 2019).

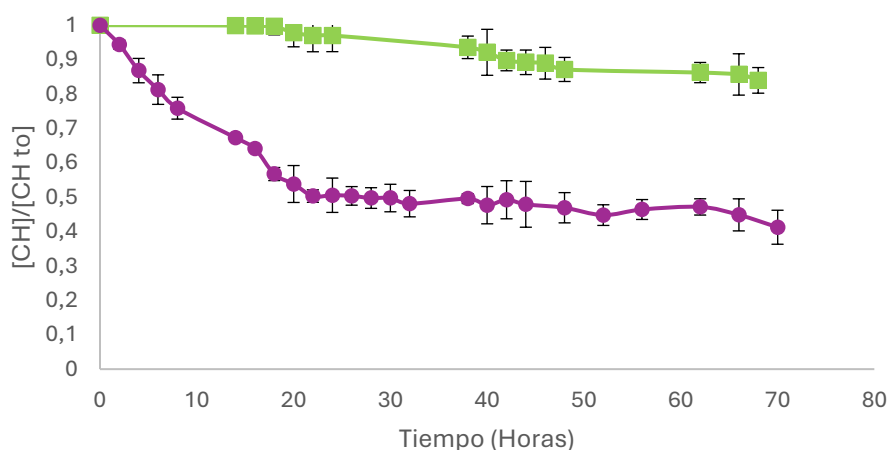


Figura 14. Evolución de la concentración de carbohidratos (CH) durante la fermentación con lodo hidrolizado (■) y lodo oxidado (●) a 37°C, 150 rpm y pH 6,5.

4.4. Evolución de la concentración de proteínas durante la fermentación

Las proteínas presentes en lodo oxidado comienzan a ser consumidas por *B. licheniformis* durante la fase de latencia, alcanzándose un consumo del 9% al finalizar esta fase (Figura 15). Dicho consumo resultó ser muy significativo durante la fase exponencial, especialmente hasta las 22 horas, donde se consumió el 68,7% con respecto a la concentración inicial. Esto puede ser debido al diferente tamaño y estructura del biopolímero, resultante de los diversos pretratamientos hidrotermales (Moreno *et al.*, 2024), sumado al hecho de que la oxidación genere proteínas de menor tamaño y más fácilmente asimilables (Wang *et al.*, 2018). Además, indica la preferencia metabólica de *B. licheniformis* por consumir proteínas y carbohidratos como fuente de carbono y energía (Moreno *et al.*, 2024).

A partir de estas 22 horas y hasta el fin de la fase exponencial (40 horas), el consumo fue muy bajo (4,5%), siendo el consumo total asociado a esta fase del 73,2%. Ello implica una rápida asimilación de las proteínas por parte de *B. licheniformis* y la formación de productos metabólicos (Moreno *et al.*, 2024). Durante la fase estacionaria el consumo fue mínimo (1,3%) lo que puede estar asociado a una vía metabólica de mantenimiento (Voigt *et al.*, 2004). La concentración final de proteína tras la fermentación del lodo oxidado resultó ser $0,79 \pm 0,05$ g/L, lo que implicó una asimilación del 74,5% respecto a la proteína inicial. Estos datos están en concordancia con los obtenidos en estudios con *B. licheniformis*, donde se dieron reducciones entre el 44% y el 91% (Romero *et al.*, 2024).

Con relación al comportamiento del lodo hidrolizado como sustrato, la evolución de las proteínas durante la fase de latencia (hasta 6 horas) fue similar a la observada en el caso del lodo oxidado, siendo su consumo del 7,8%. Sin embargo, durante la fase exponencial, la asimilación fue progresiva durante las 40 horas que duró dicha fase, sin observarse ningún periodo donde su consumo fuera especialmente significativo. En este sentido, el consumo a las 22 horas resultó ser 2,4 veces menor que el obtenido cuando se empleó lodo oxidado (68,7%). Al final de la fase de exponencial, la asimilación fue del 59%, siendo este valor 1.24 veces menor que el obtenido para el lodo oxidado. En base a estos resultados la metabolización de las proteínas por parte *B. Licheniformis* también fue relativamente rápida. En la fase estacionaria, siguió observándose un moderado consumo de proteínas (20,8%). En este caso, la concentración final obtenida fue $1,1 \pm 0,3$ g/L, resultando una asimilación del 80% de las proteínas.

El consumo de proteínas empleando como sustrato lodo oxidado fue ligeramente inferior al obtenido para el lodo hidrolizado. Ello puede atribuirse a la presencia de un entorno menos favorable debido a los compuestos inhibidores, lo que lleva a *B. licheniformis* a activar mecanismos de supervivencia en condiciones de estrés que implican la utilización de proteínas como fuente de energía y nutrientes (Wang *et al.*, 2018). Así mismo, el consumo se ve influido por la concentración inicial, siendo mayor en el lodo oxidado ($4,2 \pm 0,1$ g/L) que en el hidrolizado ($3,9 \pm 0,6$ g/L). Esto conllevó a una mayor asimilación de las proteínas en el lodo hidrolizado, debido a que su concentración inicial era menor y por tanto se consumió más respecto al lodo oxidado.

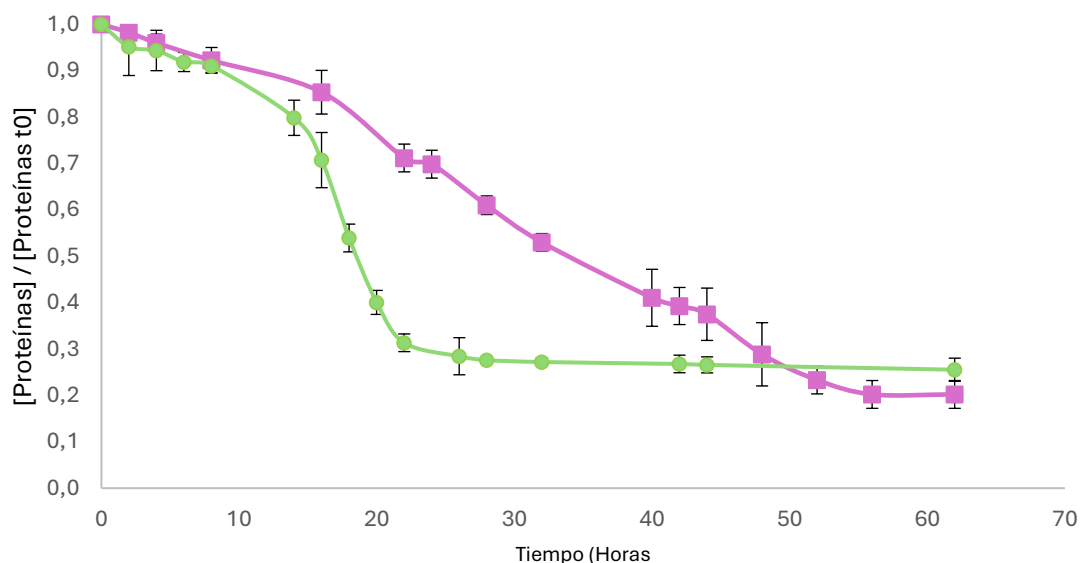


Figura 15. Evolución de la concentración de proteínas durante la fermentación con lodo hidrolizado (■) y lodo oxidado (●) a 37°C, 150 rpm y pH 6,5.

4.5. Evolución de la concentración de ácidos húmicos durante la fermentación

El consumo final relativo a los ácidos húmicos fue muy similar para ambos tipos de lodos tratados (Figura 16). Así, para el lodo tratado por HT fue del 59% y para el tratado por OH del 62%. Sin embargo, la evolución del consumo fue muy diferente durante la fase de latencia y la estacionaria. Así, el consumo observado durante la fase de latencia fue de un 8,6% para el lodo hidrolizado (tras 6 horas), mientras que para el lodo oxidado el valor resultó ser del 26,1% (tras 8 horas). Para la fase estacionaria, prácticamente no hubo consumo (0,9%) cuando se empleó el lodo oxidado, mientras que, para el lodo hidrolizado el valor fue de 14%, en ambos casos tras 72 horas de fermentación. En a la fase exponencial, la evolución fue similar, aunque el consumo obtenido fue mayor para el lodo oxidado (56,5%) que para el hidrolizado (45,2%). Si se observa la evolución del consumo de proteínas (Figura 15), cabe señalar que los ácidos húmicos se siguieron consumiendo tras 22 horas, lo que coincide con el periodo de agotamiento proteico. Estos resultados sugieren una mayor afinidad de *B. licheniformis* por proteínas que por ácidos húmicos, posiblemente debido a que es más fácilmente metabolizable (Romero *et al.*, 2024). Estos resultados son consistentes con los valores reportados por otros estudios, donde para lodos oxidados se observó una reducción del 53% en la concentración de ácidos húmicos (Urrea *et al.*, 2017) y para lodos hidrolizados 40,2% (Romero *et al.*, 2024).

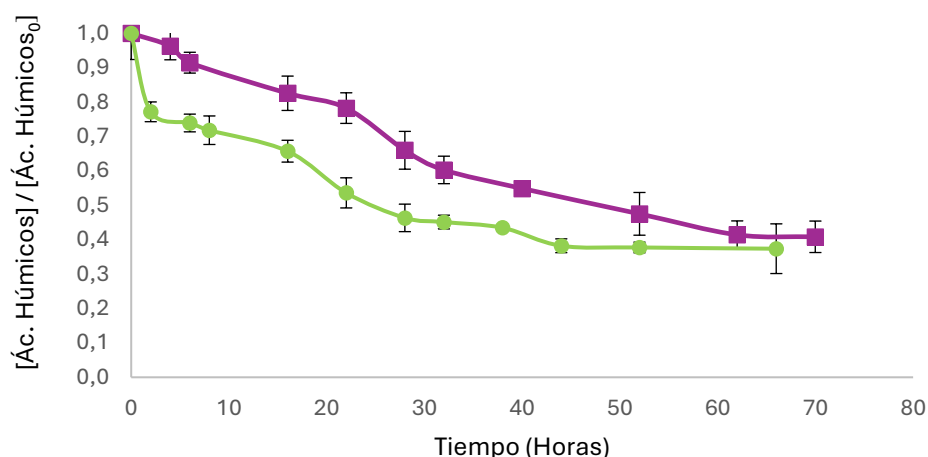


Figura 16. Evolución de la concentración de ácidos húmicos durante la fermentación con lodo hidrolizado (■) y lodo oxidado (●) a 37°C, 150 rpm y pH 6,5.

4.6. Análisis de la actividad proteasa

La actividad proteasa va ligada al crecimiento de *B. licheniformis*, ya que es un metabolito primario que se excreta simultáneamente con el crecimiento del microorganismo (Parrado et al., 2014). La producción de proteasa está influida por la velocidad de consumo de proteínas (Baweja et al., 2016), viéndose favorecida la biosíntesis de proteasas con un acelerado consumo de las proteínas durante la fermentación. Así mismo, diversos autores indicaron que *B. licheniformis* posee la capacidad de adquirir nitrógeno de diversas fuentes como proteínas para la biosíntesis de enzimas (Espoui et al., 2022; Lomthong et al., 2022).

De esta forma, se observó que la concentración de proteasa en el lodo oxidado presentó un crecimiento significativo durante la fase de crecimiento exponencial de *B. licheniformis*, observándose un aumento del 89,3% respecto a la concentración inicial. Este aumento en la producción de proteasa se produce cuando las proteínas comienzan a consumirse (Figura 15), liberándose así el nitrógeno y favoreciendo la síntesis de proteasa. Durante la fase estacionaria la producción de proteasa fue menos acusada lo que puede estar asociado a una vía metabólica de mantenimiento (Voigt et al., 2004). La concentración final de proteasa que se obtuvo fue de 630 ± 17 U/mL (Figura 17).

Con relación al comportamiento del lodo hidrolizado como sustrato, la evolución de las proteasas durante la fase exponencial se dio de manera progresiva durante las 40 horas que duró dicha fase. Se observó un aumento del 59,9%, sin contemplar ningún periodo donde su producción fuera especialmente significativa. Esto puede deberse a la

asimilación progresiva de las proteínas que se da durante la fase exponencial (Figura 15), lo que generó una menor síntesis de proteasa. En la fase estacionaria, se observó un aumento exponencial en la producción de proteasa, obteniendo una concentración final de 370 ± 15 U/mL (Figura 17).

En el presente estudio, la enzima cruda que mostró mayor actividad fue la obtenida tras la fermentación del lodo tratado con OH. La diferencia observada en los valores obtenidos puede deberse al rápido consumo de proteínas en el lodo oxidado respecto al consumo en el lodo hidrolizado, donde se observó que el consumo a las 22 horas resultó ser 2,4 veces menor en el HT que el OH. Esto puede deberse al consumo progresivo de las proteínas en medio hidrolizado, provocando una menor liberación de nitrógeno al medio y por tanto una menor síntesis de proteasa (Baweja *et al.*, 2016; Espoui *et al.*, 2022; Lomthong *et al.*, 2022).

Los datos obtenidos en la fermentación empleando como sustrato lodo oxidado concuerdan con los reportados por Romero *et al.* (2024), los cuales obtuvieron valores de actividad de proteasa entre 390 U/mL y 700 U/mL. Sin embargo, se observaron estudios realizados con *B. licheniformis* sobre diferentes sustratos, donde los valores recogidos (57 U/mL y 230 U/mL) (Zhou *et al.*, 2012; Parrado *et al.*, 2014) son inferiores a los obtenidos en el presente estudio. Por ello, se considera que la proteasa obtenida con el lodo tratado por OH podría ser de interés en diversas aplicaciones industriales.

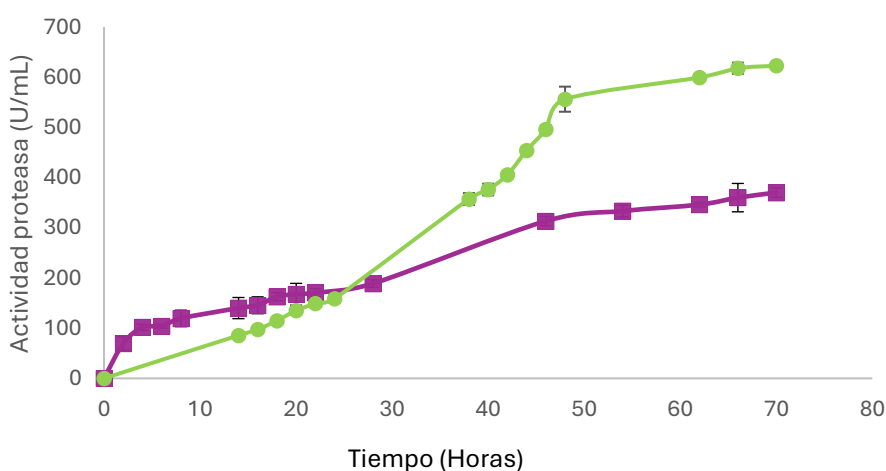


Figura 17. Evolución de la actividad proteasa durante la fermentación con lodo hidrolizado (■) y lodo oxidado (●) a 37°C, 150 rpm y pH 6,5.

4.7. Purificación

Dado que la actividad proteasa obtenida fue mayor en el lodo tratado por OH, los estudios de purificación de la proteasa se llevaron a cabo con la enzima cruda obtenida con dicho lodo. Como se indicó anteriormente, la fracción líquida de los lodos después del proceso de fermentación está compuesta principalmente por las enzimas producidas (proteasas) y los biopolímeros residuales. El sobrenadante obtenido tras separar las células bacterianas se empleó como fracción enzimática cruda y se sometió a dos procesos diferentes de purificación como se observa en la Figura 18.

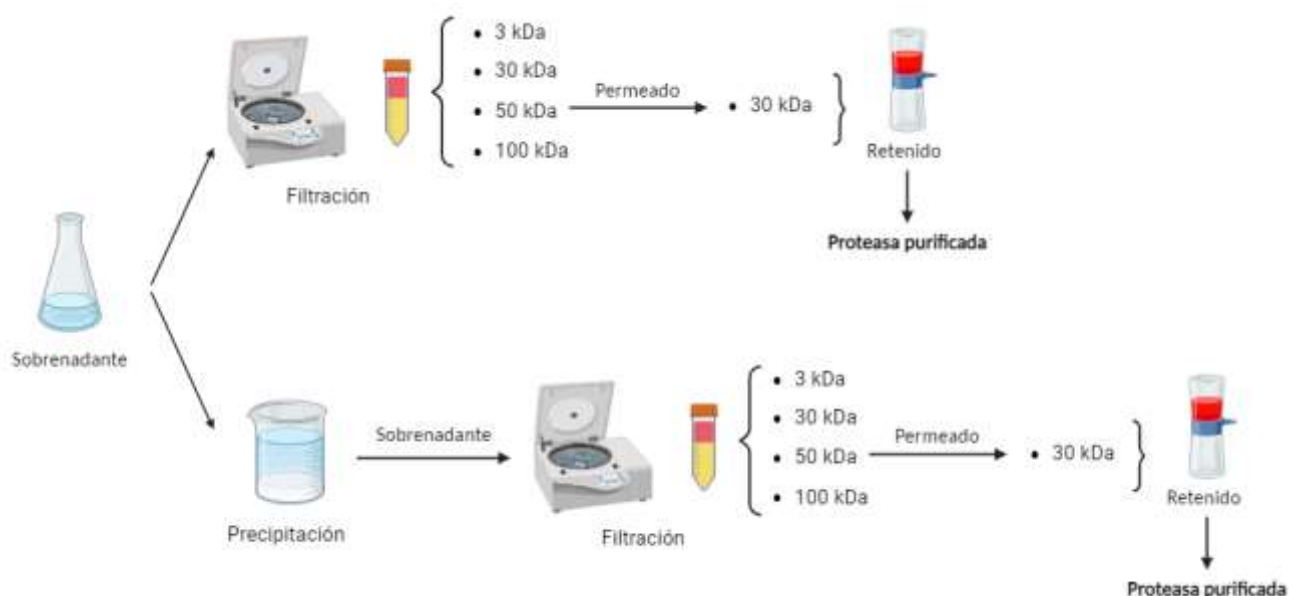


Figura 18. Esquema de los procesos de purificación llevados a cabo sobre la fracción enzimática cruda para obtener proteasa pura. Imagen creada con BioRender.com.

En la primera purificación enzimática, únicamente se emplearon filtros para centrífuga Amicon Ultra-15 (Millipore, Ireland) con diferentes tamaños de poro (3, 30, 50 y 100 kDa). En la segunda purificación, tras la precipitación de la proteasa con sulfato de amonio, se llevó a cabo el mismo proceso de filtración ya explicado. Tras finalizar ambas filtraciones, se determinó la actividad proteasa tanto del permeado como del retenido, observando que para ambos procesos el retenido obtenido con el filtro de 30 kDa es el que presenta la mayor actividad proteasa (Figuras 19 y 20). Aplicando únicamente filtración se obtuvo un valor máximo para la actividad proteasa de 565 ± 53 U/mL, mientras que combinando la precipitación con la filtración se obtuvo una actividad proteasa de 701 ± 40 U/mL (Figura 20).

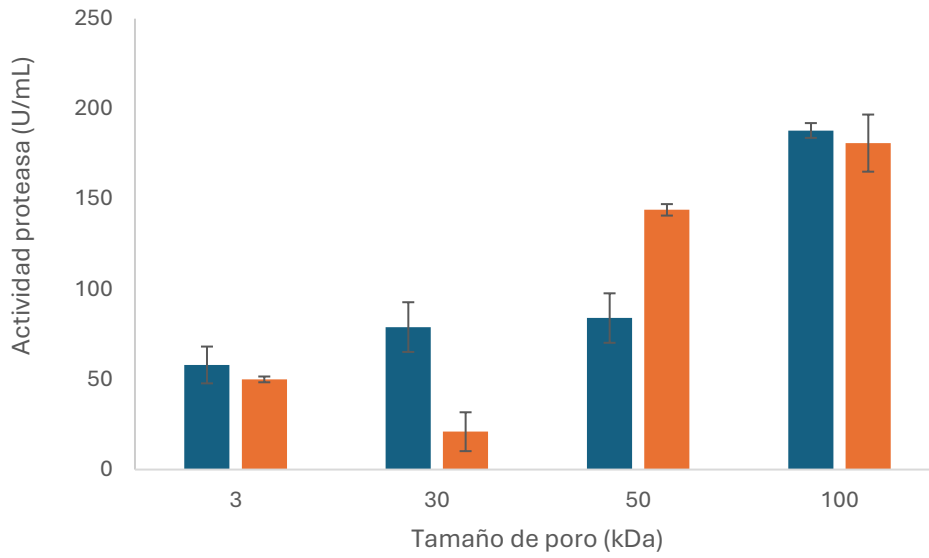


Figura 20. Actividad proteasa del permeado aplicando únicamente filtración (■) y aplicando previamente precipitación y luego filtración (■).

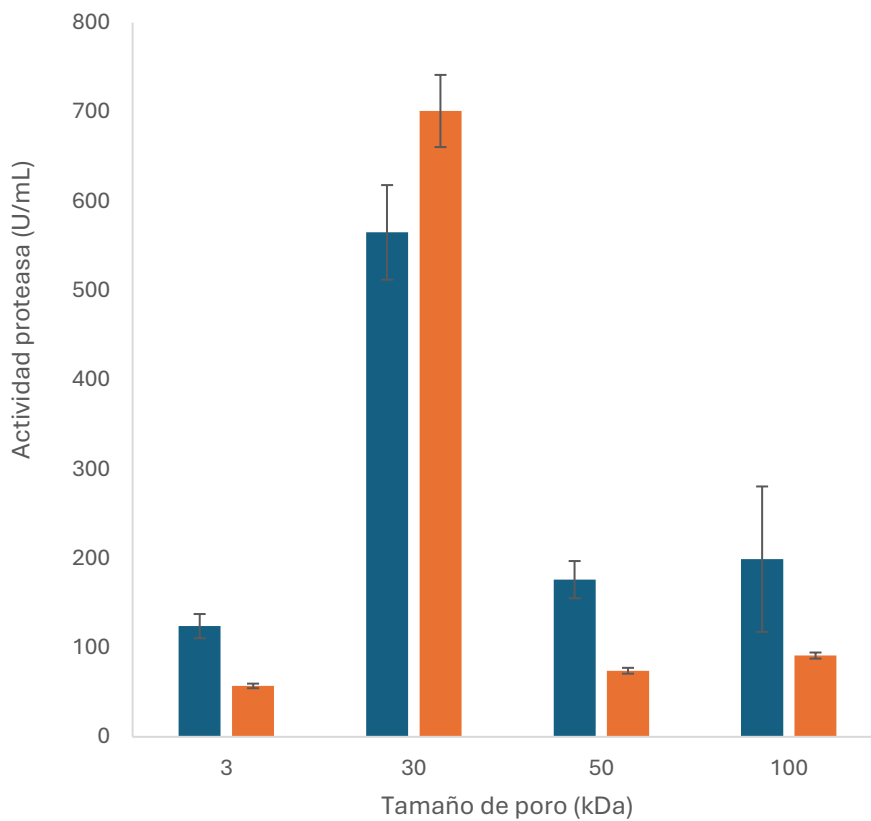


Figura 19. Actividad proteasa del retenido aplicando únicamente filtración (■) y aplicando previamente precipitación y luego filtración (■).

Así, se observó que el tamaño de la proteasa era superior a 30 kDa e inferior a 50 kDa, valores que concuerdan con los reflejados en otros estudios (Kim *et al.*, 2001; Orhan *et al.*, 2005; Sathishkumar *et al.*, 2015). A fin de aumentar la concentración de proteasa, el permeado obtenido con los filtros de 50 kDa de tamaño de poro se pasó de nuevo por filtros de 30 kDa. Aplicando únicamente filtración se obtuvo un valor máximo para la actividad proteasa de 420 ± 45 U/mL, mientras que combinando la precipitación con la filtración se obtuvo una actividad proteasa de 806 ± 16 U/mL (Figura 21).

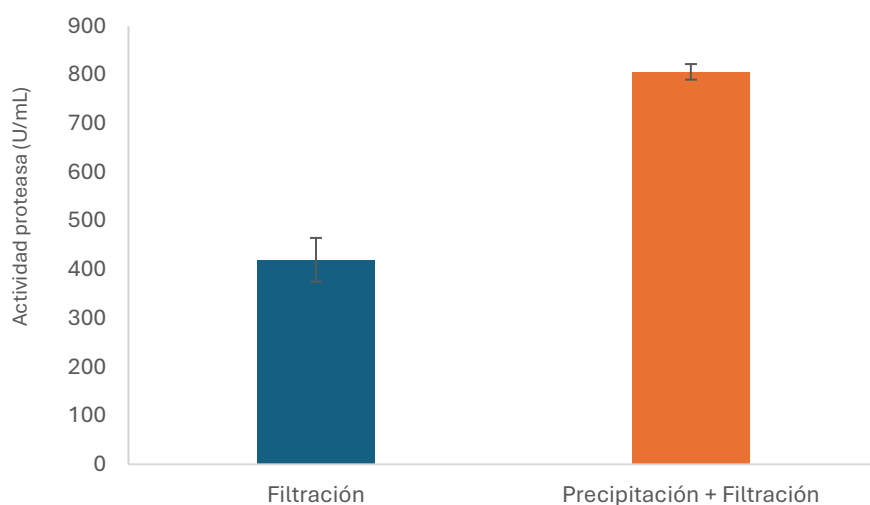


Figura 21. Actividad proteasa del retenido obtenido tras pasar el permeado de 50 kDa por el filtro de 30 aplicando únicamente filtración (■) y aplicando previamente precipitación y luego filtración (■).

Los resultados obtenidos se compararon con los llevados a cabo por otros autores. Estos autores aplicaron diferentes métodos de purificación de enzimas, tales como cromatografía (Souza *et al.*, 2017; Suberu *et al.*, 2019), precipitación (Sathishkumar *et al.*, 2015) y filtración (Naidu, 2011), los cuales mostraron diferentes valores de actividad de proteasa (entre $4,6 \pm 2$ U/mL y 903 ± 4 U/mL), siendo inferiores a los obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, en ciertos estudios donde se empleó la precipitación, se observaron valores de actividad proteasas similares a los obtenidos en el presente estudio (Moreno *et al.*, 2024; Sathishkumar *et al.*, 2015). En consecuencia, se considera que un tratamiento previo de precipitación de la proteasa permite un aumento importante la actividad tras el proceso de filtración.

4.8. Determinación de la capacidad de detergencia de la proteasa

Las pruebas para evaluar la capacidad de detergencia se llevaron a cabo con la enzima purificada mediante precipitación y filtración con las diferentes configuraciones indicadas en el apartado 3.2.12. Tras llevar a cabo dichas pruebas, se calculó la diferencia de color de la muestra frente al patrón o blanco (tela sin manchar) (ΔE), la intensidad de amarillo (IA) y la intensidad de blanco (IB) en los diferentes trozos de tela de lino y algodón (Figura 21), obteniéndose los datos que mostrados en las Tablas 5 y 6. La configuración más efectiva fue aquella que presentó menores valores de ΔE , puesto que, a mayor valor de esta, mayor diferencia de color entre la muestra y el blanco (Arroyo Figueroa *et al.*, 2018). Así mismo, se buscan valores para la intensidad de amarillo relativamente bajos y para la intensidad de blanco altos, puesto que buscamos que la tela no adquiriera el color del sustrato y además se limpie.

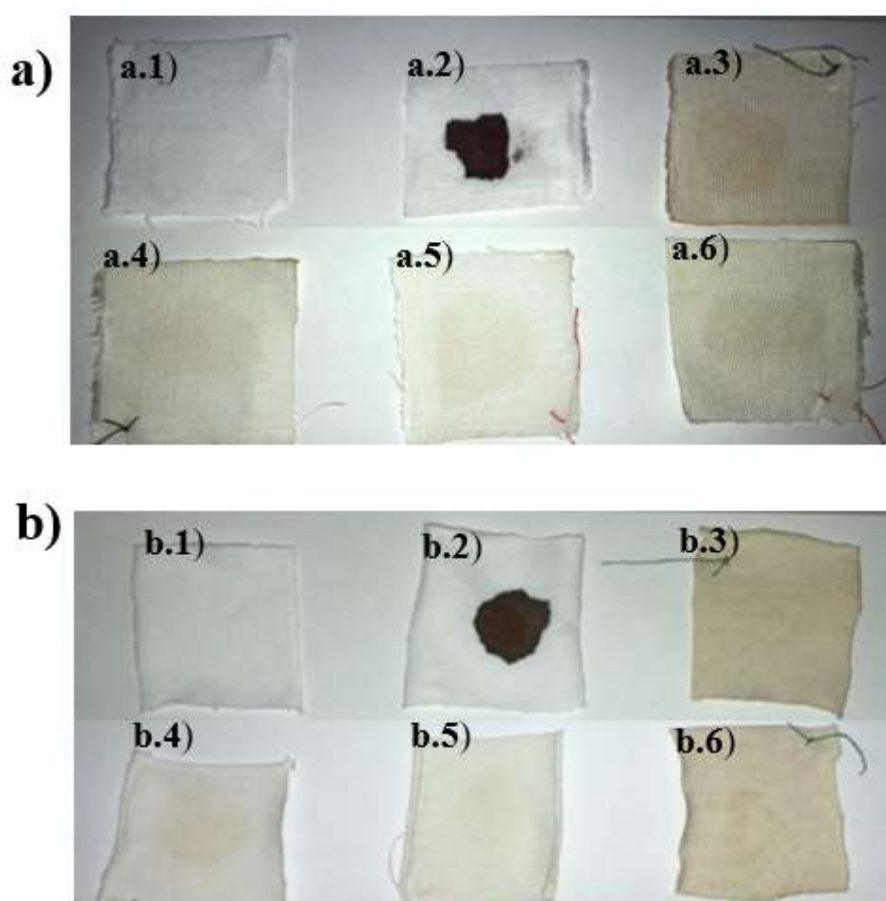


Figura 22. Muestras de tela de lino (a) sin manchar (a.1), tras ser manchada (a.2), aplicando la configuración 1 (a.3), aplicando la configuración 2 (a.4), aplicando la configuración 3 (a.5) y aplicando la configuración 4 (a.6) y en tela de algodón (b) sin manchar (b.1), tras ser manchada (b.2), aplicando la configuración 1 (b.3), aplicando la configuración 2 (b.4), aplicando la configuración 3 (b.5) y aplicando la configuración 4 (b.6).

Se observó que la configuración 3 (en la que se adicionó el enzima directamente a la mancha) es la más efectiva tanto en las pruebas realizadas en algodón como en las realizadas en lino. Los valores de ΔE aplicando la configuración 3 para lavar tanto la tela de algodón como la de lino fueron de 8,3 y 10,2 respectivamente. Esto indica que la diferencia de color en la tela respecto al blanco tras el lavado es mínima. Así mismo, los valores de IA son de 1,8 y -4,8 respectivamente, mostrando el escaso amarilleamiento de la tela tras el lavado. Finalmente, los valores obtenidos para IB fueron de 91,7 para el algodón y 89,8 para el lino, lo que muestra el poder blanqueante de la configuración 3.

Tabla 5. Valores de ΔE , IA e IB obtenidos en las diferentes muestras realizadas en tela de algodón antes de lavar y tras el lavado.

	ΔE	IA	IB
Blanco (tela sin manchar)	0	-20,7	85,4
Tela manchada con sangre	61,9	64,3	38,1
Configuración 1 (H₂O)	18,5	19,2	81,5
Configuración 2 (H₂O + DET^(a) + ENZ^(b))	9,7	1,1	90,3
Configuración 3 (H₂O + DET^(a) + ENZ^(b))	8,3	1,8	91,7
Configuración 4 (H₂O + ENZ^(b))	17,0	15,4	83,0

^(a) Detergente; ^(b) Enzima (proteasa)

Tabla 6. Valores de ΔE , IA e IB obtenidos en las diferentes muestras realizadas en tela de lino de antes de lavar y tras el lavado.

	ΔE	YI	WI
BLANCO (tela sin manchar)	0	-22,5	83,9
SANGRE	71,8	51,4	28,2
Configuración 1 (H₂O)	15,0	8,6	88,0
Configuración 2 (H₂O + DET^(a) + ENZ^(b))	12,6	5,3	87,4
Configuración 3 (H₂O + DET^(a) + ENZ^(b))	10,2	-4,8	89,8
Configuración 4 (H₂O + ENZ^(b))	10,7	-3,3	89,3

^(a) Detergente; ^(b) Enzima (proteasa)

Los resultados del presente estudio indicaron que la proteasa purificada podría usarse como aditivo detergente en el sector de lavandería. La eficacia de las proteasas microbianas para la eliminación de manchas proteicas, especialmente de sangre, ha sido documentada en la literatura, tanto utilizando la enzima en su forma cruda como purificada (Liya *et al.*, 2023; Contesini *et al.*, 2018). La aplicación de proteasa fúngica sobre sustratos proteicos en combinación con una determinada concentración detergente era efectiva para eliminar manchas de sangre humana de telas de algodón, lo que sugiere su posible aplicación como aditivo en detergentes (Chimbekujwo *et al.*, 2020).

5. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que los tratamientos hidrotérmicos de los lodos activos resultaron adecuados para obtener sustratos de interés para la biosíntesis de proteasas a través de la fermentación bacteriana con *B. licheniformis*. Así, se obtuvieron $11,1 \pm 0,8$ g/L y $11,3 \pm 0,8$ g/L de biopolímeros tras 60 minutos de tratamiento por hidrólisis térmica (HT) y oxidación húmeda (OH), respectivamente, a 140°C y 20 bar. En lo relativo a la fermentación con *B. licheniformis*, los mejores resultados se obtuvieron con el lodo tratado mediante OH, alcanzándose una actividad de proteasa de 620 ± 17 U/mL.

El empleo de la precipitación con sulfato de amonio seguido de filtración por centrifugación con un tamaño de poro de 30 kDa resultó ser el método más adecuado para la purificación de las proteasas, obteniéndose actividades de proteasas de 806 ± 16 U/mL. Estos extractos enzimáticos purificados pueden considerarse candidatos prometedores para su empleo en aplicaciones de detergencia o limpieza, concretamente para la eliminación de manchas de sangre en diferentes tipos de telas (algodón y lino).

Por lo tanto, los tratamientos hidrotérmicos de los lodos activos de depuradora y su posterior fermentación con *B. licheniformis* se considera una estrategia prometedora para la gestión de dichos lodos, así como la obtención de productos de alto valor añadido.

6. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABS Absorbancia

DO Densidad óptica

DQO Demanda química de oxígeno

EDAR Estación de Depuración de aguas residuales

GRAS Generally Recognized As Safe

IA Intensidad de amarillo

IB Intensidad de blanco

LA Lodos activos residuales

OH Oxidación húmeda

HT Hidrolisis térmica

SPE Sustancias poliméricas extracelulares

SSF Sólidos suspendidos fijos

SST Sólidos suspendidos totales

SSV Sólidos suspendidos volátiles

Símbolos griegos:

ΔE Diferencia del color de la muestra frente al patrón

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alcalde Sanz, L. (2012). Evaluación y gestión del riesgo asociado a la reutilización de aguas residuales. [Ph.D. Thesis, Universitat de Barcelona]. En TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). <https://www.tdx.cat/handle/10803/82147>
- Alonso, S. C., Pérez, A. L., Díaz, M., Andreu, P. S., Abellán, M., Polo, M., & Pérez, A. R. (2011). Sustancias poliméricas extracelulares (SPE) en sistemas de depuración biológica de aguas residuales.: parte I: tipos y formación. *Tecnología del agua*, 31(333), 40-48.
- Ahmed, H. K., Fawy, H. A., & Abdel-Hady, E. S. (2010). Study of sewage sludge use in agriculture and its effect on plant and soil. *Agric. Biol. JN Am*, 1(5), 1044-1049.
- Arias S. y López D.M. (2019). Reacciones químicas de los azúcares simples empleados en la industria alimentaria. *Lámpsakos*, núm. 22, pp. 123-136. <https://doi.org/10.21501/21454086.3252>
- Arroyo Figueroa, G., Dzul-Cauih, J. G., Vargas rodriguez, L., & Medina Saavedra, T. (2018). Evaluación de la solidez del color en el teñido de lana y algodón con extracto de cáscara de cacao Evaluation of the color fastness in the dyeing of wool and cotton with cocoa shell extract. *Revista de Simulación y Laboratorio*, 5(16), 10-13.
- Baweja, M., Tiwari, R., Singh, PK, Nain, L., Shukla, P. (2016). Una proteasa alcalina de *Bacillus pumilus* MP 27: análisis funcional de su modelo de unión hacia sus aplicaciones como aditivo detergente. *Frente. Microbiol.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01195>
- Benintende, S., & Sanchez, C. (2002). Crecimiento bacteriano. Universidad de Entre Ríos, Catedra de Microbiología Agrícola.
- Campaña Verdesoto, A. M. (2018). Identificación microbiológica y molecular mediante PCR en tiempo real de dos bacterias del género *Bacillus*, de interés agrobiotecnológico (Bachelor's thesis).
- Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babín, M. M., Fernández, C., Alonso, E., & Tarazona, J. V. (2009). Sewage sludge applied to agricultural soil: ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(4), 1309-1319.
- Chang, Z., Long, G., Zhou, JL y Ma, C. (2020). Valorización de lodos de depuradora en la fabricación de materiales de construcción y edificación: una revisión. *Recursos, Conservación y Reciclaje*, 154, 104606.

- Conci, E., Becker, A. R., Arena, A. P., & Civit, B. M. (2022). A literature review of eutrophication in Life Cycle Assessment. Relevance for pampean agroecosystems in Argentina. *South Florida Journal of Development*, 3(1), 618-643. <https://doi.org/10.46932/sfjdv3n1-046>
- Contesini, F. J., Melo, R. R. D., & Sato, H. H. (2018). An overview of Bacillus proteases: from production to application. *Critical reviews in biotechnology*, 38(3), 321-334.
- Delibacak, S., Voronina, L., & Morachevskaya, E. (2020). Use of sewage sludge in agricultural soils: Useful or harmful. *Eurasian Journal of Soil Science*, 9(2), 126-139.
- De Macedo, M., Segura, R., Piñero Bonilla, J., & Coello, N. (2002). Obtención de un hidrolizado proteico por fermentación sumergida de plumas utilizando Bacillus spp. *Rev. Cient. Fac. Cienc. FCV-LUZ*, 12, 214-220.
- Di Marzio, W. D. (2004). Microbiología de lodos activados: una herramienta retrospectiva y predictiva de la depuración de efluentes. *Revista Agua Latinoamérica*. Cap, 12, 45-50
- Edar Bens (2019) Las instalaciones. Disponible en: <https://edarbens.es/las-instalaciones/> (Accedido: 18 abril 2024).
- European Environment Agency. (2019, EEA Report No). Industrial waste water treatment pressures on environment—European Environment Agency [Publication]. <https://www.eea.europa.eu/publications/industrial-waste-water-treatment-pressures>
- Fericelli, P. D. (2011, August). Comparison of sludge treatment by gasification vs. incineration. In Ninth LACCEI Latin American and Caribbean Conference (LACCEI'2011), Engineering for a Smart Planet, Innovation, Information Technology and Computational Tools for Sustainable Development.
- Garrity, G., Vos, P., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (Eds.). (2008). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 3).
- Ghani, M., Ansari, A., Aman, A., Zohra, R. R., Siddiqui, N. N., & Qader, S. A. U. (2013). Isolation and characterization of different strains of Bacillus licheniformis for the production of commercially significant enzymes. *Pak. J. Pharm. Sci*, 26(4), 691-697.
- Guillén, M. V. L. (2009). Estructura y propiedades de las proteínas. Disponible en: <http://www.uv.es>: http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf. 34p.

- Guo, J., Zhang, H., Wang, C., Chang, J.-W., & Chen, L.-L. (2016). Construction and analysis of a genome-scale metabolic network for *Bacillus licheniformis* WX-02. *Research in Microbiology*, 167(4), 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.005>
- Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S., Eddouaouda, K., Khelouia, L., Annane, R., El Hattab, M., & Jaouadi, B. (2018). Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1033-1048.
- Hamza, T. A. (2017). Bacterial protease enzyme: safe and good alternative for industrial and commercial use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 3(1), 1-10.
- Holmberg, K. (2018). Interactions between surfactants and hydrolytic enzymes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 168, 169-177.
- Huang, W.-C. and Tang, I.C. (2007) *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Yang, S.-T. (ed), pp. 185-223, Elsevier, Amsterdam.
- Instituto Nacional de Estadística (INE) Recogida y tratamiento de las aguas residuales por comunidades y ciudades autónomas, tipo de indicador y periodo. (s. f.). Recuperado 10 de mayo de 2024, de <https://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t26/p067/p01/serie/10/&file=01005.px>
- Kim, S., Kim, Y., & Rhee, I. K. (2001). Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. *Archives of Microbiology*, 175, 458-461.
- Ko, Y. H., & Gross, R. A. (1998). Effects of glucose and glycerol on γ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biotechnology and bioengineering*, 57(4), 430-437.
- Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular, Pub. L. No. Ley 7/2022, BOE-A-2022-5809 48578 (2022). <https://www.boe.es/eli/es/l/2022/04/08/7>
- Liang, Y., Xu, D., Feng, P., Hao, B., Guo, Y. y Wang, S. (2021). Incineración de lodos de depuradora municipal y su control de la contaminación atmosférica. *Revista de Producción Más Limpia*, 295 , 126456.
- Liya, S. M., Umesh, M., Nag, A., Chinnathambi, A., Alharbi, S. A., Jhanani, G. K., & Brindhadevi, K. (2023). Optimized production of keratinolytic proteases from *Bacillus tropicus* LS27 and its application as a sustainable alternative for dehairing, destaining and metal recovery. *Environmental research*, 221, 115283.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.1.
- Madigan, M. T. (2015). *Brock biology of microorganisms* (Fourteenth edition). Pearson
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR). Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/saneamiento-depuracion/sistemas/edar.html> (Accedido: 18 abril 2024).
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. Lodos de Depuración de Aguas Residuales. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora.html> (Accedido: 08 mayo 2024).
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. Planes y Programas. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/planes-y-estrategias/planes-y-programas.html> (Accedido: 21 mayo 2024)
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. Vertidos de Aguas Residuales. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/concesiones-y-autorizaciones/vertidos-de-aguas-residuales.html> (Accedido: 18 abril 2024).
- Moeller, G., & Tomasini, A. C. (2004). *Microbiología de lodos activados. Memorias curso internacional de sistemas integrados de tratamiento de aguas residuales y su reúso para un medio ambiente sustentable* [Internet]. Bogotá: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).
- Moreno, J. F., Oulego, P., Collado, S., & Díaz, M. (2024). Valorisation of waste activated sludge for protease production by *Bacillus licheniformis*. *Journal of Cleaner Production*, 141282.
- Muñoz Cruz, A. (2008). *Caracterización y tratamiento de aguas residuales*. Trabajo de fin de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Muras, A., Romero, M., Mayer, C., & Otero, A. (2021). Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Critical reviews in biotechnology*, 41(4), 609-627.
- Naidu, K. S. (2011). Characterization and purification of protease enzyme. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, (Issue), 107-112.

- Núñez, D., Oulego, P., Collado, S., Riera, F.A., Díaz, M., (2022). Separation and purification techniques for the recovery of added-value biocompounds from waste activated sludge. *A Rev. Resour. Conserv. Recycl.* 182 <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106327>.
- Oberg (Öberg), G., & Mason-Renton, S. A. (2018). On the limitation of evidence-based policy: Regulatory narratives and land application of biosolids/sewage sludge in BC, Canada and Sweden. *Environmental Science & Policy*, 84, 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2018.03.006>
- Orhan, E., Omay, D., & Güveniur, Y. (2005). Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. In *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 183-194). Humana Press.
- Parrado, J., Rodriguez-Morgado, B., Tejada, M., Hernandez, T., & Garcia, C. (2014). Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme and Microbial Technology*, 57, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.01.001>
- Raheem, A., Sikarwar, V. S., He, J., Dastyar, W., Dionysiou, D. D., Wang, W., & Zhao, M. (2018). Opportunities and challenges in sustainable treatment and resource reuse of sewage sludge: A review. *Chemical Engineering Journal*, 337, 616-641. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.149>
- Ramalho, R. S. (2021). *Tratamiento de aguas residuales*. Editorial Reverté.
- Reddy, N., Deekonda, V., Seshagiri, S., Reddy, R., Gangula, AK (2022). Producción, caracterización y aplicaciones de proteasas producidas por *Bacillus licheniformis*, *Acinetobacter pittii* y *Aspergillus Niger* utilizando torta de aceite de semilla de neem como sustrato. *Prod. de cultivos industriales*. 187 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115403>.
- Rojas, R. (2002). *Sistemas de tratamiento de aguas residuales*. *Gestión integral de tratamiento de aguas residuales*, 1(1), 8-15.
- Romero, L., Oulego, P., Collado, S., & Díaz, M. (2023). Advanced thermal hydrolysis for biopolymer production from waste activated sludge: Kinetics and fingerprints. *Journal of Environmental Management*, 342, 118243.
- Romero, L., Weng, S., Oulego, P., Collado, S., Marcet, I. and Díaz, M. (2024) Hydrolyzed sewage sludge as raw bio-based material for hermetic bag production. *Waste Management* 174, 31-43.

- Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T. e Ito, S. (2007). Proteasas alcalinas detergentes: propiedades enzimáticas, genes y estructuras cristalinas. *Revista de biociencia y bioingeniería*, 103 (6), 501-508.
- Sánchez-León, E., Bello-Morales, R., López-Guerrero, J. A., Poveda, A., Jiménez-Barbero, J., Gironès, N., & Abrusci, C. (2020). Isolation and characterization of an exopolymer produced by *Bacillus licheniformis*: In vitro antiviral activity against enveloped viruses. *Carbohydrate polymers*, 248, 116737.
- Sathishkumar, R., Ananthan, G., & Arun, J. (2015). Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2), 214-220.
- Sathiyarayanan, G., Saibaba, G., Seghal Kiran, G., & Selvin, J. (2013). Process optimization and production of polyhydroxybutyrate using palm jaggery as economical carbon source by marine sponge-associated *Bacillus licheniformis* MSBN12. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36, 1817-1827.
- Seo, K. W., Gu, M. B., Tsang, Y. F., Choi, Y.-S., & Chung, J. (2022). Application of endospore-forming *Bacillus* species to food waste-recycling wastewater treatment: A focus on the fate of macromolecular nutrients. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107584. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107584>
- Shih, I. L., Van, Y. T., Yeh, L. C., Lin, H. G., & Chang, Y. N. (2001). Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresource technology*, 78(3), 267-272.
- Souza, P. M., Werneck, G., Aliakbarian, B., Siqueira, F., Ferreira Filho, E. X., Perego, P., & Junior, A. P. (2017). Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1103-1110.
- 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. *The Science of the Total Environment*, 584-585, 921-934. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.140>
- Suberu, Y., Akande, I., Samuel, T., Lawal, A., & Olaniran, A. (2019). Cloning, expression, purification and characterisation of serine alkaline protease from *Bacillus subtilis* RD7. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101264.

- Supuran, C.T., Scozzafava, A. y Mastrolorenzo, A. (2001). Proteasas bacterianas: uso terapéutico actual y perspectivas de futuro para el desarrollo de nuevos antibióticos. *Opinión de expertos sobre patentes terapéuticas*, 11 (2), 221-259.
- Tavano, O. L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 412-436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>
- Tian, Y., Zheng, L., & Sun, D. Z. (2006). Functions and behaviors of activated sludge extracellular polymeric substances (EPS): a promising environmental interest. *Journal of Environmental Sciences*, 18(3), 420-427.
- Tiruneh, A. T., Mtshali, J., & Fadiran, A. (2014). Characterization of Sewage Sludge Generated from Wastewater Treatment Plants in Swaziland in Relation to Agricultural Uses. *Resources and Environment*, 4, 190-199. <https://doi.org/10.5923/j.re.20140404.02>
- Toledo Filho, R. D., & Fontes, C. M. A. (2022). 6—Sewage sludge ash. En R. Siddique & R. Belarbi (Eds.), *Sustainable Concrete Made with Ashes and Dust from Different Sources* (pp. 233-279). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824050-2.00010-3>
- Urrea, J. L., Collado, S., Oulego, P., & Díaz, M. (2017). Formation and degradation of soluble biopolymers during wet oxidation of sludge. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(4), 3011-3018. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02664>
- Urrea, J. L., García, M., Collado, S., Oulego, P., & Díaz, M. (2018). Sludge hydrothermal treatments. Oxidising atmosphere effects on biopolymers and physical properties. *Journal of Environmental Management*, 206, 284-290. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.043>
- Valdez-Chavez, K. A., Luna-González, A., González-Ocampo, H. A., Escamilla-Montes, R., Orozco-Medina, C., & Fierro-Coronado, J. A. (2019). Protective effect of medicinal plants and *Bacillus licheniformis* BCR 4-3 on white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.
- Voigt, B., Schweder, T., Becher, D., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Feesche, J., & Hecker, M. (2004). A proteomic view of cell physiology of *Bacillus licheniformis*. *Proteomics*, 4(5), 1465-1490. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300684>

- Vojcic, L., Pitzler, C., Körfer, G., Jakob, F., Martinez, R., Maurer, KH y Schwaneberg, U. (2015). Avances en la ingeniería de proteasas para detergentes para ropa. *Nueva biotecnología*, 32 (6), 629-634.
- Wang, S., Sun, X., & Yuan, Q. (2018). Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: a review. *Bioresource Technology*, 258, 302-309.
- Xu, R., Yang, ZH, Zheng, Y., Wang, QP, Bai, Y., Liu, JB, ... y Fan, CZ (2019). El análisis metagenómico revela los efectos de la presión antibiótica a largo plazo sobre la digestión anaeróbica de lodos y el riesgo de resistencia a los antimicrobianos. *Tecnología de biorecursos* , 282 , 179-188.
- Ye, Y., Hao, H., Guo, W., Woong, S., Duc, D., Fu, Q., Wei, W., Ni, B., Cheng, D., Liu, Y., 2022. A critical review on utilization of sewage sludge as environmental functional materials. *Bioresour. Technol.* 363 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127984>.
- Zhang, Y., Wang, X., Zhu, W., Zhao, Y., Wang, N., Gao, M., & Wang, Q. (2023). Anaerobic fermentation of organic solid waste: Recent updates in substrates, products, and the process with multiple products co-production. *Environmental Research*, 116444.
- Zhou, C., Yang, G., Zhang, L., Zhang, H., Zhou, H., & Lu, F. (2021). Construction of an alkaline protease overproducer strain based on *Bacillus licheniformis* 2709 using an integrative approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 1449-1456. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.208>