

Proyecto Fin de Grado
Grado en Ingeniería Química

Valorización del extrusionado de fresa residual
mediante digestión anaerobia. Optimización del
proceso con elementos trazas.

Autor: Elena Jiménez Páez

Tutor: Mónica Rodríguez Galán/ Fernando González Feroso

Dpto. Ingeniería Química y Ambiental
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla



Sevilla, 2020



Proyecto Fin de Grado
Grado en Ingeniería Química

**Valorización del extrusionado de fresa residual
mediante digestión anaerobia. Optimización
del proceso con elementos trazas.**

Autor:

Elena Jiménez Páez

Tutores:

Mónica Rodríguez Galán

Fernando González Feroso

Dpto. de Ingeniería Química y Ambiental

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2020

Proyecto Fin de Carrera: Valorización del extrusionado de fresa residual mediante digestión anaerobia. Optimización del proceso con elementos trazas.

Autor: Elena Jiménez Páez
Tutores: Mónica Rodríguez Galán
Fernando González Feroso

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2020

El Secretario del Tribunal

A mi familia
A mis profesores
A mis amigos

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi familia por todo el apoyo que me han dado todos estos años, por cada uno de los altibajos que han surgido a lo largo de la carrera que cuando eran malos han sabido aliviar con sus consejos y cuando había aprobados y recompensas eran los primeros que saltaban de alegría. Gracias por brindarme la oportunidad de poder tener una carrera profesional y sobre todo por ser la familia que sois, que siempre será mi mayor orgullo.

Agradecer a todos mis compañeros de la carrera y amigos por los momentos vividos desde el primer día hasta el último. Por todas esas horas en la sala de estudio, por esos momentos de nervios en los sótanos pre-exámenes, esos días de agobio extremo que a pesar de que están en la misma situación que tú saben como calmarte, pero, sobre todo por todos esos viajes, fiestas y risas juntos. Definitivamente, se convierten en tu familia. En especial agradecer a Jenni, Cristina, Silvia y Rocío os quiero mucho.

Muchas gracias, Plácido por hacerme siempre ver la luz al final del túnel y por todo el apoyo que me has dado en este periodo. Belén gracias por aguantarme desde que teníamos 4 años, por decirme que saliese cuando la cabeza no me daba para más y por apoyarme siempre. Por último, muchas gracias, Andrés por animarme y convencerme de que merecía la pena realizar las prácticas en el laboratorio, que, aunque le iba a tener que dedicar mucho esfuerzo y sacrificio sin duda iba a merecer la pena. Os quiero.

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, donde realicé los experimentos del presente trabajo por cada momento vivido allí, por tener un ambiente sano, trabajador y feliz, por ayudarme en todo lo que he necesitado, por ese auge cultural siendo más latinoamericanos en el laboratorio que españoles a los cuales adoraré siempre, que recordad, Fernanda, Evelin y Adriana, nos vemos en el Caribe. Pero, sobre todo, por enseñarme que hay vida fuera de la universidad y que si te gusta tu trabajo la motivación sale hasta de las paredes. Muchas gracias, Juan, Ángeles y Ainoa, por cada charla emocional y por hacerme sentir una más.

Por último, agradecer a mis profesores, y a mis tutores Mónica Rodríguez y Fernando González, por tratarnos como iguales y enseñarme conocimientos y valores hasta el final de este periodo.

Elena Jiménez Páez

Sevilla 2020

Resumen

España es uno de los principales países productores de fresa en el mundo, es debido a su elevada producción que la mayor parte de la fresa se vende como fruta fresca, pero existe una alternativa para aquella fruta que no se pueda comercializar en el mercado fresco. El 21% de la producción de fresa se destina para la transformación de productos derivados, como sería la producción de mermelada, yogur y saborizantes. Para la generación de estos productos derivados se produce un residuo denominado extrusionado de fresa residual que normalmente se destina a vertederos.

En este trabajo se ha considerado la reutilización del residuo de la fresa generado por la empresa HUDISA (Huelva), el cual se ha sometido a dos pretratamientos y al caracterizado correspondiente. El extrusionado de fresa residual contiene gran cantidad de compuestos bioactivos como fenoles y azúcares, es por eso por lo que se le realizan los pretratamientos hidrotérmicos, ya que permite la solubilización de estos, y así se facilita su extracción posterior. Se han realizado dos pretratamientos hidrotérmicos, uno a 170 °C durante 60 minutos y el otro denominado steam explosion a 220 °C durante 5 minutos. Tras el pretratamiento hidrotérmico y la extracción de los compuestos bioactivos se procede a realizar un proceso de digestión anaerobia en reactores semi-continuos y así poder obtener energía con la producción de biogás.

Este proyecto de digestión anaerobia ha tenido una duración de 312 días hábiles, de los cuales este trabajo se refiere a los últimos 75 días (209-312), donde se han realizado por triplicado la adición de los pretratamientos hidrotérmicos obtenidos variando la velocidad de carga orgánica para así observar el comportamiento que tenían los reactores y sus variaciones en la caracterización de estos. La velocidad de carga orgánica (VCO) que mejor se adecuó a la producción del reactor en el caso del pretratamiento hidrotérmico de 170 °C fue 1,25 VCO produciendo una cantidad de biogás de 242 ± 31 mL/g SV·d. El día 251 del proyecto se decidió añadir 5 mg/L de níquel para comprobar si se producía un aumento en la producción de biogás, ya que en trabajos anteriores se había llevado a cabo la adición de metales traza en BMP de 250 mL y provocó un aumento en la producción, es por eso que se decidió probar en reactores de mayor capacidad y poder comprobar si el níquel mejoraba la producción en una escala mayor. En el caso del pretratamiento hidrotérmico de 170 °C, los valores de producción de metano antes de la inyección de níquel eran de 221 ± 32 mL/g SV·d a 1,25 VCO y tras la inyección de níquel bajó a 47 ± 56 mL/g SV·d. El día 308 del proyecto se concluyó en funcionamiento de los reactores de 220 °C y debido al Covid-19 el día 312 de esta experiencia finalizó el funcionamiento de los reactores de 170 °C.

Abstract

Spain is one of the main strawberries producing countries in the world. Due to its high production, most of strawberries are depleted as fresh fruit. Moreover, an alternative is possible for the fruit that is not suitable for selling in the fresh-fruit market. 21% of the strawberry production ends up as derivate products, such as jam, yogurt, and flavorings. In addition, as a result of the production of the derivate products, a by-product named residual strawberry extrusion is generated and used for landfills.

The residual strawberry extrusion produced by the HUDISA industry, located in Huelva, has been reutilized in this work to perform pretreatments and characterization research. First, two hydrothermal pretreatments have been performed at different temperatures and residence times (170 °C, 60 min, and 220 °C, 5 min). The Residual strawberry extrusion is composed of bioactive compounds (phenols and sugars). Bioactive compounds become soluble due to the hydrothermal pretreatment, in order to facilitate their subsequent extraction. Secondly, the resultant product of the previous treatments are submitted to an anaerobic digestion process, carried out in semi-continuous reactors, and the energy necessary is produced by biogas.

The total duration of the project has been 312 active days. In this work, the results obtained in the last 75 active days (209-312) has been developed. In this period the addition of hydrothermal pretreatment has been triplicated by varying the organic loading speed to observe the behavior of the reactors and their variations of the characterization. Midway through the period, we decided to add 5 mg/L of nickel to perform improvement in the reaction speed and consequently increase the biogas production. In previous works, the addition of trace metals in 250 mL BMP had been carried out and caused an increase in production, it is the reason that we decided to test in higher capacity reactors and to be able to check if nickel improved production on a scale higher. In the case of the first hydrothermal pretreatment at 170 °C, the methane production values were around 221 ± 32 mL/g SV·d to 1,25 ORL, prior to nickel injection. After the nickel injection, the production values dropped to 47 ± 56 mL/g SV·d, taking into consideration the variation of the organic load rate. Finally, in the case of hydrothermal pretreatment at 220 °C, the methane production was 97 ± 32 mL/g SV·d to 0,75 ORL, prior to nickel injection. After the nickel injection, these values increased to 130 ± 45 mL/g SV·d. In the reactors where the hydrothermal pretreatment had undergone a temperature of 220°C, the productivity and characterization were not appropriate. The microorganisms were dying, which concluded in us switching off the operation in the reactors by the 308th day. As a result of Covid-19, this experience ended the operation of the reactors that were operating at 170 °C, by the 312th day.

Índice

Agradecimientos	9
Resumen	11
Abstract	13
Índice	15
Índice de Tablas	17
Índice de Figuras	19
1 Introducción	21
1.1 Propiedades de la fresa y su producción anual	21
1.2 Obtención del extrusionado de fresa residual	23
1.3 Gestión de los residuos agroalimentarios y posibles tratamientos	24
1.4 Pretratamiento hidrotérmico y extracción de compuestos bioactivos	26
1.5 Digestión anaerobia	26
1.6 Elementos traza en la digestión anaerobia	30
2 Objetivos y alcance	33
3 Materiales y método	35
3.1 Extrusionado de fresa residual e inóculo	35
3.2 Pretratamiento hidrotérmico	36
3.3 Preparación de muestras	37
3.4 Extracción de compuestos bioactivos	38
3.5 Digestión anaerobia	38
3.5.1 Montaje de los reactores	38
3.5.2 Operación de los reactores	40
3.6 Analíticas realizadas	42
3.6.1 pH	42

3.6.2	Alcalinidad	42
3.6.3	Demanda química de oxígeno total y soluble (DQOt y DQOs)	43
3.6.4	Sólidos totales, minerales y volátiles	44
3.6.5	Ácidos grasos volátiles	46
3.6.6	Azúcares totales disueltos	47
3.6.7	Fenoles	47
4	Resultados y discusiones	49
4.1	Efectos de los pretratamientos hidrotérmicos y posterior extracción de compuestos bioactivos.	49
4.1.1	Caracterización fisicoquímicas de los sustratos obtenidos	49
4.1.2	Estudio de los fenoles totales en las fases obtenidas	50
4.1.3	Estudio de los azúcares solubles en las fases obtenidas	51
4.2	Estudio de la digestión anaerobia tras los pretratamientos hidrotérmicos de 170 °C y 220 °C	52
4.2.1	Estudio de la digestión anaerobia del extrusionado de fresa tras el pretratamiento hidrotérmico a 170 °C y extracción de compuestos fenólicos.	52
4.2.2	Estudio de la digestión anaerobia del EFR tras el pretratamiento hidrotérmico a 220 °C y extracción de compuestos fenólicos	61
5	Conclusiones	69
6	Referencias	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones principales de varios oligoelementos en diversas enzimas cuya función es catalizar las reacciones en los reactores (Fermoso et al. 2008).....	31
Tabla 2. Datos generales de ambos pretratamientos hidrotérmicos.....	36
Tabla 3. Cálculo de Fase sólida y Fase líquida que hay que añadir diariamente a los reactores a partir de la VCO.....	41
Tabla 4. Caracterización de los sustratos.....	49
Tabla 5. Comprobación en porcentaje de la acumulación en los reactores.....	60
Tabla 6. Comprobación en porcentaje de la acumulación en los reactores.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de frutos rojos.	22
Figura 2. Producción de frutos rojos en España.	22
Figura 3. Esquema de obtención del EFR.	23
Figura 4. Esquema de las fases de los procesos anaerobios (Serrano, Moral 2015).....	28
Figura 5. Esquema del proceso.....	34
Figura 6. EFR.	35
Figura 7. Inóculo Copero.	36
Figura 8. Reactor inyección de vapor....	39
Figura 9. Reactor “Steam Explosion”	37
Figura 10. Centrífuga de eje vertical.....	37
Figura 11. Columna de extracción de fenoles	40
Figura 12. Fase líquida extraída de la columna.....	38
Figura 13. Esquema del proceso de producción de biogas.....	39
Figura 14. Reactores de la planta piloto	42
Figura 15. Borbotadores y gasómetros medidores de biogás.....	40
Figura 16. Diagrama de Gantt de las operaciones del reactor a partir del día 209 del experimento, siendo ORL la velocidad de carga orgánica (VCO)	41
Figura 17. pHmetro Crison.....	42
Figura 18. Equipo de medición de la alcalinidad.....	43
Figura 19. Digestor de las muestras de DQO soluble.	46
Figura 20. Bureta de valoración de la DQO total.....	44
Figura 21. Espectrofotómetro para la determinación de la DQO soluble.	44
Figura 22. Balanza analítica.	48
Figura 23. Estufa a 105°C	48
Figura 24. Mufla a 550°C.	46
Figura 25. Microplaca determinación de azúcares.....	47
Figura 26. Biorad lector de microplacas.	49
Figura 27. Microplaca de fenoles.....	48
Figura 28. Fenoles solubles en el extrusionado de fresa y en las fases líquidas y sólidas.....	50
Figura 29. Comparación de azúcares solubles.	51

Figura 30. Evolución del pH a lo largo de la experiencia en los reactores de 170 °C.	52
Figura 31. Evolución de la alcalinidad en los reactores de 170 °C a lo largo de la experiencia.	53
Figura 32. Evolución de los sólidos totales de los reactores de 170 °C.	54
Figura 33. Evolución de la cantidad presente en los reactores de 170 °C de sólidos volátiles.	54
Figura 34. Evolución de la degradación química de oxígeno en los reactores de 170 °C a lo largo de la experiencia.	55
Figura 35. Totalidad de los ácidos grasos volátiles en el reactor 1 a lo largo de la experiencia.	56
Figura 36. Ácidos grasos volátiles en el reactor 2 a lo largo de la experiencia.	56
Figura 37. Ácidos grasos volátiles en el reactor 3 a lo largo de la experiencia.	57
Figura 38. Cantidad de fenoles formados en los reactores de 170 °C a lo largo de la experiencia.	58
Figura 39. Producción de biogás semanal en mL CH ₄ /g SV.	59
Figura 40. Biodegradabilidad de la materia orgánica.	60
Figura 41. Evolución del pH para los reactores de 220 °C.	61
Figura 42. Evolución de la alcalinidad en los reactores de 220 °C a lo largo de la experiencia.	61
Figura 43. Evolución de los sólidos totales en los reactores de 220 °C a lo largo de la experiencia.	62
Figura 44. Evolución de la cantidad presente en los reactores de 220°C de sólidos volátiles.	63
Figura 45. Evolución de la degradación química de oxígeno para los reactores de 220 °C a lo largo de la experiencia.	64
Figura 46. Ácidos grasos volátiles presentes en el reactor 4 a lo largo de la experiencia.	64
Figura 47. Ácidos grasos volátiles en el reactor 5 a lo largo de la experiencia.	65
Figura 48. Ácidos grasos volátiles presentes en el reactor 6 a lo largo de la experiencia.	65
Figura 49. Cantidad de fenoles formados en los reactores de 220 °C a lo largo de la experiencia.	66
Figura 50. Producción de biogás en mL CH ₄ /g SV.	67
Figura 51. Biodegradabilidad de la materia orgánica.	68

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Propiedades de la fresa y su producción anual

La fresa es una planta de la familia de las rosáceas, cuyo fruto es comestible y de color rojo brillante. El fruto presenta una gran cantidad de pepitas, llamadas aquenios, los cuales se pueden encontrar hundidos, superficiales o sobresalientes de la pulpa.

La fresa presenta características antiinflamatorias, antiulcerosas, astringentes, antibacterianas, antioxidantes y antifúngicas (Hemmati et al., 2020). Estas características son beneficiosas y se debe a los numerosos compuestos que contiene la fresa, como los ácidos cítricos (aportan un 92% de acidez), salicílico, málico y oxálico (Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, 2004), los compuestos fenólicos como antocianinas, flavonoides y nutrientes como los azúcares, principalmente la glucosa, sacarosa y fructosa, vitamina C, ácido fólico y minerales como el magnesio, hierro, manganeso y potasio (Żebrowska, J., Dyduch-Siemińska, M., Gawroński, J., Jackowska, I., & Pabich, 2019). Por tanto, la fresa posee gran riqueza mineral y se considera un elemento muy indicado para curas de remineralización y para tratamientos de déficits nutricionales (Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Ganadería, 2008).

Los fitoquímicos de fresa se representan principalmente por la gran cantidad de compuestos fenólicos que contiene. La clase principal de compuestos fenólicos son los flavonoides, principalmente antocianinas y los flavonoles que tienen una menor contribución, seguidos por los taninos y los ácidos fenólicos. Las antocianinas son los compuestos fenólicos más conocidos de las fresas, esto se debe a que son las responsables de aportarles su color rojo tan característico. Los compuestos fenólicos junto con la vitamina C están relacionados con el poder antioxidante de las frutas, concretamente las fresas presentan entre 2 a 11 veces una capacidad mayor que las peras, manzanas y las uvas (Francesca, G., Sara, T., José, A., Jose, L. Q., Bruno, M., & Maurizio, 2012; Kelebek and Selli, 2011).

A nivel mundial, según la organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT, 2020), la fresa es el fruto rojo más producido en el mundo. En la **Figura 1** se muestra la producción de los frutos rojos en la última década cuya producción de fresa en la última década ha aumentado de casi 6 toneladas/año en 2008 hasta 9 toneladas/año en 2018. Esta producción de fresa corresponde con un área cosechada de 373 miles de hectáreas métricas (FAOSTAT, 2020).

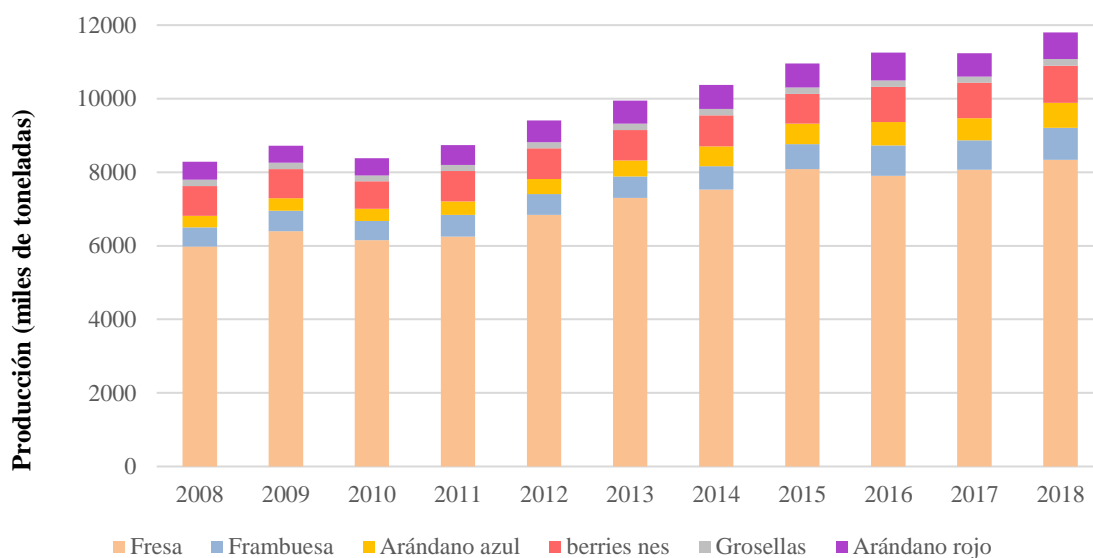


Figura 1. Producción mundial de frutos rojos.

El primer productor de fresas en Europa es España, cuya producción se encuentra reflejada en la **Figura 2** (FAOSTAT, 2020). Según los datos estadísticos, en 2018 se exportó el 78% de las fresas producidas en España al resto de países de la Unión Europea (Pérez, 2019) . El 90% de la producción en España corresponde a la provincia de Huelva, que a su vez corresponde con el 99,7% de la producción de fresa en Andalucía (Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Ganadería, 2019).

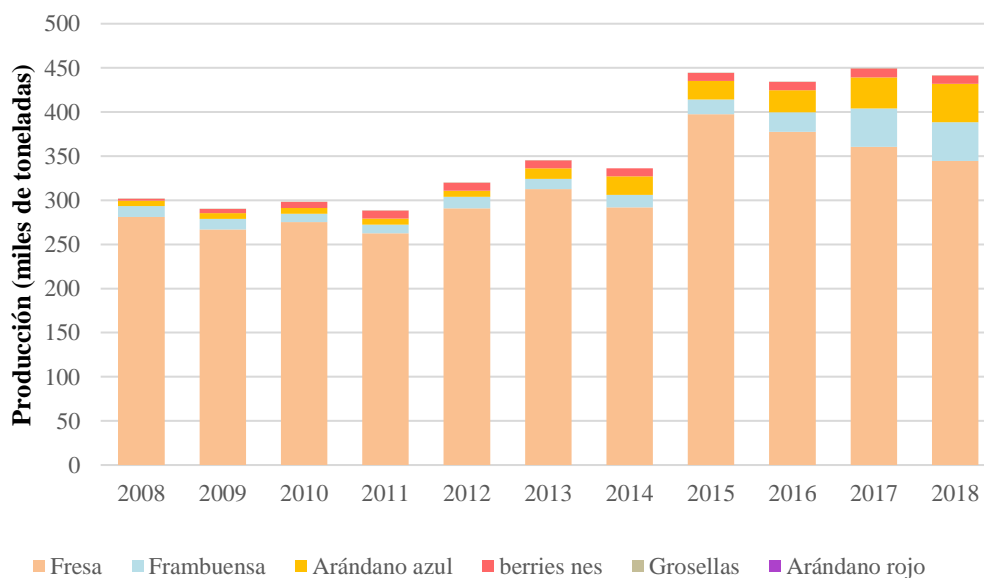


Figura 2. Producción de frutos rojos en España.

1.2 Obtención del extrusionado de fresa residual

La mayor parte de la producción de fresa se vende como fruta fresca, pero existe una alternativa para aquella fruta que no se pueda comercializar en el mercado fresco, por eso de los cultivos de fresa se destina un 21% para la transformación de productos derivados, como sería la producción de mermelada, yogur y saborizantes (MAPA, 2019; Siles, A., Guti, M.C., Angeles, M., Serrano, 2016). Dichos productos o subproductos son elaborados a partir del concentrado de fresa que se obtiene mediante un extrusionado de la misma. Para llegar a ese resultado se ha de realizar el siguiente proceso:

La fresa llega a la fábrica con un camión frigorífico, ya que el periodo de conservación de la fresa es muy corto. La cámara ha de tener una temperatura de 0 °C y mantener una humedad relativa de entre el 90-95%. Una vez llega a la fábrica se produce el triaje y lavado de éstas para su posterior tamizado e inactivación enzimática (mediante un tratamiento térmico a 65 °C) y así obtener el concentrado de fresa. Los tamices son los responsables de retener la fracción residual formada por la parte fibrosa y los aquenios. A este residuo se le llama extrusionado de fresa residual (**EFR**).



Figura 3. Esquema de obtención del EFR.

La mayor parte del EFR generado durante el proceso industrial se considera un residuo, y por consiguiente normalmente se deposita en vertedero. Es necesario destacar que los procedimientos llevados a cabo con la gestión de residuos ha de cumplir la legislación pertinente.

1.3 Gestión de los residuos agroalimentarios y posibles tratamientos

Según la **ley 22/2011** un residuo es toda aquella sustancia u objeto cuyo poseedor deseche o tenga la intención de desechar. El EFR es un residuo que podría considerarse subproducto. Se considera un subproducto a toda aquella sustancia u objeto resultante en un proceso de producción cuya finalidad no sea la producción de esa sustancia u objeto. Para considerarse un subproducto debe cumplir las siguientes restricciones:

- Se debe tener la seguridad de que la sustancia y objeto va a ser utilizado ulteriormente.
- La sustancia u objeto puede utilizarse directamente sin someterse a ninguna transformación posterior diferente a la utilizada en la práctica industrial habitual.
- Su uso posterior debe cumplir todos los requisitos para que no produzca impactos adversos para la salud humana o del medio ambiente.

En Europa se ha propuesto una gestión más sostenible de estos residuos, como la reutilización de estos recursos como materiales potenciales de alto valor añadido. Esto puede ser un beneficio social, económico y medio ambiental ya que de alguna forma se aspira a la eliminación progresiva de los vertidos y aumentar la eficiencia energética (Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Ganadería, 2019b).

Los residuos se gestionan mediante una valorización y eliminación. Las operaciones de valorización contienen un código identificado por la letra **R**, cuyo significado es la posible recuperación, regeneración, reutilización y reciclado, mientras que los residuos que se gestionan por operaciones de eliminación, se identifica por la letra **D**, que tiene como fin ser desechado y por tanto enviado a vertederos (Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Ganadería, 2019b). Siguiendo estas directrices, se distinguen los siguientes tratamientos (Ley Orgánica, 2011):

- **Reutilización:** proceso en el cual se recuperan los productos destinados como residuos para un nuevo uso sin sufrir transformaciones.
- **Reciclar:** proceso en el que los residuos se convierten en un nuevo producto. De esta forma, la materia prima se vuelve a incorporar en un nuevo ciclo sin gasto energético y sin producirse un aumento de volumen de los residuos.
- **Reducción:** proceso en el que se intenta minimizar la cantidad de residuos y el uso de energía durante la fabricación.

Las autoridades ambientales promueven las medidas que ofrece el **artículo 22 de la Directiva 2008/98/CE**, cuyos planes y programas de gestión están previstos en el **artículo 14**, impulsando:

- La recogida separada de biorresiduos para destinarlos al compostaje o a la digestión anaerobia, particularizando la fracción vegetal, los biorresiduos de grandes generadores y generados en hogares.

- El tratamiento de los biorresiduos recogidos separadamente, de forma que se proteja al medio ambiente y se lleve directamente a las instalaciones específicas sin que se produzcan alteraciones ni mezclas de residuos a lo largo del proceso.
- Utilización del compost producido a partir de los biorresiduos que sean ambientalmente seguros para la reutilización en los sectores agrícolas, la jardinería y regeneración de áreas degradadas como sustituyentes de fertilizantes minerales.

En la actualidad los métodos más comunes para la gestión de residuos alimentarios son la incineración y los vertederos. El principal inconveniente del cúmulo de biomasa es que puede haber fugas una vez depositado el residuo y provocar la contaminación del suelo o lixiviación y la ocupación del terreno. También puede provocar la contaminación atmosférica (Wang, J. Y., Liu, X. Y., Kao, J. C., & Stabnikova, 2006).

En España, según Eurostat 2020 solamente se recicla 84 kilogramos per cápita al año de residuos biológicos mediante compostaje y digestión anaerobia. Para poder evitar la deposición de los residuos alimentarios en vertederos, como el EFR, se han propuesto una serie de opciones que serán beneficiosas para la economía circular y más sostenible (Hemmati et al., 2020):

- **Compostaje:** proceso biológico que transforma residuos orgánicos en presencia de oxígeno en compost, siendo éste un fertilizante (Toledo, M., Siles, J., & Martín, 2018).
- **Biometanización/ Digestión anaerobia:** este tratamiento transforma la materia orgánica gracias a microorganismos anaeróbicos (ausencia de oxígeno), para la producción de biogás y por tanto capaces de producir calor y electricidad (Trujillo-Reyes et al., 2019).
- **Incineración:** proceso en el que se genera una reacción de combustión a elevadas temperaturas, cuyo objetivo principal es reducir el tamaño de los residuos hasta un 95%. Su principal problema es el elevado costo ya que necesita gran cantidad de energía eléctrica y personal cualificado.
- **Pirólisis:** degradación térmica de los residuos con el mismo objetivo de la incineración, reducción del tamaño, pero en ausencia de oxígeno. Su resultado son gases o líquidos de naturaleza inerte (Stevens, M. D., Black, B. L., Lea-Cox, J. D., Sadeghi, A. M., Harman-Fetcho, J., Pfeil, E., ... & Hapeman, 2009).

Una buena opción para la gestión de este residuo sería la digestión anaerobia. El mayor problema que se puede encontrar es que se perdería gran cantidad de compuestos de alto valor añadido que son beneficiosos para la salud, es por este motivo que se propone realizar un pretratamiento para así poder extraer estos compuestos y favorecer las reacciones producidas durante el proceso de la digestión anaerobia (Gagneten et al., 2019).

1.4 Pretratamiento hidrotérmico y extracción de compuestos bioactivos

La extracción de compuestos bioactivos de alto valor añadido permitiría considerar el EFR como un subproducto, en lugar de un residuo sin ningún valor económico. Para llevar a cabo la extracción de los compuestos bioactivos, sería necesario la solubilización de estos a partir del EFR. Los compuestos bioactivos que contiene la fresa esencialmente son los compuestos fenólicos y azúcares solubles cuya extracción se realiza a partir de una columna de adsorción-desorción. Se han propuesto diferentes técnicas para tratar el residuo de extrusionado de fresa, como son la de alta presión hidroestática (HHP), los campos eléctricos pulsados (PEF) y por último el pretratamiento hidrotérmico (Trujillo-Reyes et al., 2019).

Los métodos de pretratamiento hidrotérmico se clasifican según el tipo de material, pueden ser de tipo húmedo o tipo seco. En el caso de los residuos alimentarios se clasifican por tipo húmedo. Este método ayuda a solubilizar los azúcares a través de una hidrólisis y proporciona una pulpa más homogénea. Esto se debe a las elevadas temperaturas y a la elevada presión.

Los tratamientos hidrotérmicos se llevan a cabo en reactores. Hay un tipo de tratamiento llamado “Steam Explosion” que se utiliza para material lignocelulósico. La biomasa en este método se calienta con vapor saturado durante un corto periodo de tiempo y una presión elevada, reduciéndose muy rápido para que se produzca una descompresión explosiva. Los rangos de temperatura y presión que se suelen utilizar para este tipo de pretratamiento hidrotérmico son entre 160-260 °C y 0,69-4,83 MPa, respectivamente (Rincón et al., 2016).

El tratamiento hidrotérmico ha sido propuesto previamente para la solubilización y extracción de compuestos bioactivos de otros residuos agroindustriales, como el residuo sólido procedente de almazara (alperujo) (Serrano et al., 2017) y los extrusionados de fresa y frambuesa residuales (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019; Trujillo-Reyes et al., 2019). En el caso del EFR, se han ido haciendo pruebas a diferentes temperaturas de 90, 120, 150, 170 y 220 °C, obteniéndose una mayor extracción de compuestos bioactivos en el tratamiento hidrotérmico a 150 °C (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019).

Tras la realización de la extracción de compuestos de alto valor añadido en el EFR, es necesario realizar otro tratamiento y estabilización ya que sigue quedando mucho volumen de residuo.

1.5 Digestión anaerobia

Para poder estabilizar y valorizar la biomasa restante del EFR, se podría implementar un proceso que permita obtener energía o subproductos de interés, para ello se ha propuesto un tratamiento de digestión anaerobia tras el pretratamiento hidrotérmico y la extracción de compuestos bioactivos. La digestión anaerobia es un proceso biológico que transforma la materia orgánica gracias a microorganismos anaeróbicos (en ausencia de oxígeno), para la producción de biogás (CH₄, CO₂, H₂, H₂S), y en digestato (mezcla de productos minerales como N, P, K, Ca) a que son compuestos de difícil degradación (Serrano et al., 2015). Se utiliza mayoritariamente en la industria agroalimentaria para tratar efluentes de agua.

En la naturaleza se dan cuatro procesos biológicos, aerobios, anóxicos, anaerobios y procesos combinados. Los tratamientos anaerobios presentan ventajas frente a los aerobios (Serrano et al., 2015) :

- No necesitan aireación.
- Tiene la capacidad de trabajar a diferentes rangos de temperaturas (psicrofílico, mesofílico y termofílico)
- Produce entre 3 y 20 veces menos lodos que el tratamiento aerobio,
- Es capaz de resistir a altas tasas de carga orgánica y tienen una alta eficiencia Generación de biogás (mezcla de CH₄ y CO₂) el cual puede tener finalidades energéticas.

La digestión anaerobia también presenta inconvenientes, siendo el principal su elevado coste de implantación, por lo que para instalaciones de pequeño tamaño no sería rentable.

Los objetivos principales que presentan los procesos anaerobios son (Serrano Moral, 2015):

- Reducción de la materia volátil de los fangos purgados.
- Reducción de la concentración de patógenos.
- Obtención de un lodo digerido rico en nutrientes.
- Producción de biogás, cuya producción de metano ronda el 60%.
- Tratamiento de aguas de la industria agroalimentaria.
- Tratamiento de aguas industriales con la relación DBO/DQO. En aguas urbanas esta relación debe encontrarse entre 2/2,5.

Se han realizado varios estudios bioquímicos y microbiológicos que sustentan la descomposición del proceso de la digestión anaerobia en cuatro fases (**Figura 4**): Hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

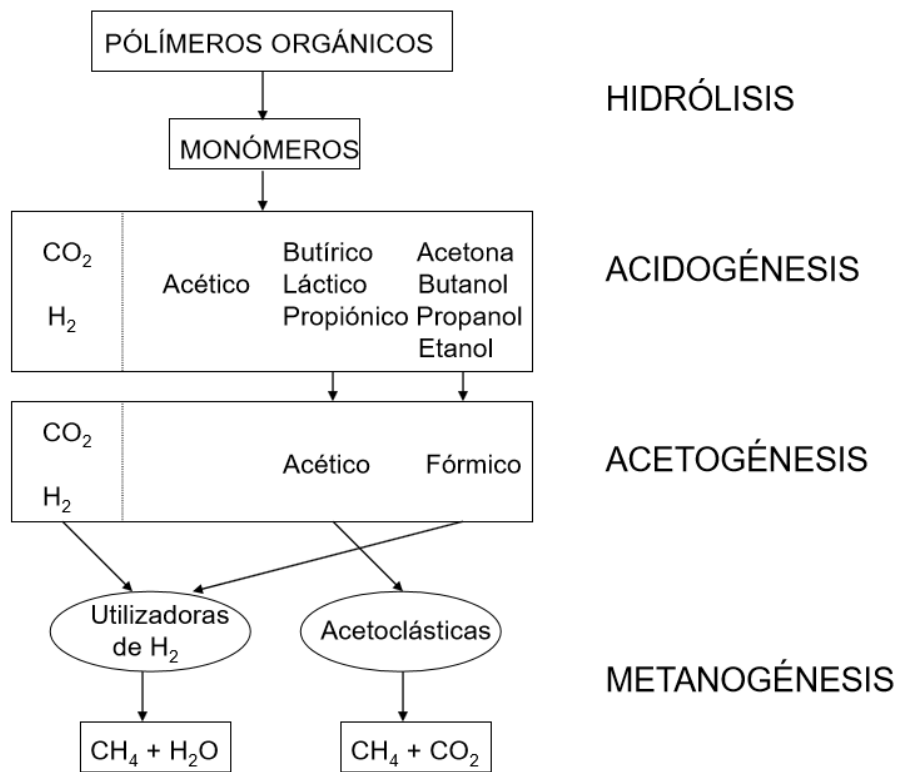
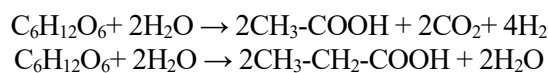


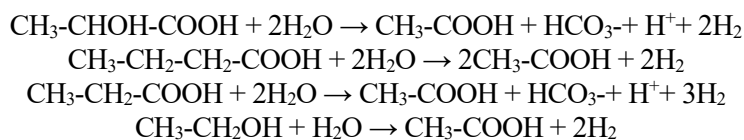
Figura 4. Esquema de las fases de los procesos anaerobios (Serrano Moral, 2015).

En primer lugar, se produce la etapa de hidrólisis, que es la fase en la que se descomponen las cadenas largas de materia orgánica más complejas en otras cadenas orgánicas más cortas y simples. Esta descomposición la realizan bacterias hidrolíticas que actúan en el exterior de la célula considerándose exoenzimas. Durante este proceso ya se produce CO_2 y su pH óptimo es de 5,3 y 6,7, dependiendo del sustrato (Serrano Moral, 2015).

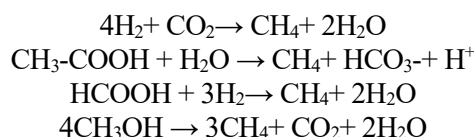


Tras la etapa de hidrólisis se produce la etapa de acidogénesis, que es la fase en la que se convierten los compuestos solubles como son los aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga en ácidos grasos de cadena corta C2-C6, hidrógeno y dióxido de carbono. Las dos primeras fases las realizan las bacterias hidrolíticas-acidogénicas y acetogénicas, cuya función es hidrolizar y fermentar cadenas complejas en ácidos orgánicos simples. El crecimiento bacteriano en esta etapa es rápido y su valor óptimo de pH es entre 5,5 y 6,7. Ya en esta etapa se empieza a producir H_2S , CO_2 y NH_3 (Serrano Moral, 2015).

A continuación, se produce la etapa de acetogénesis, donde se degradan los ácidos orgánicos de cadena corta en ácido acético. Las bacterias acetogénicas transforman el ácido propiónico y butírico en ácido acético. Su crecimiento es muy lento y sus reacciones son complicadas debido a la acumulación de hidrógeno disuelto (Serrano Moral, 2015).



Por último, se produce la etapa de metanogénesis. La metanogénesis es el proceso más lento y por tanto más dominante y el que marca la cinética. La producción de metano puede producirse a partir de hidrógeno gas, dióxido de carbono y acetato. Su pH óptimo se encuentra en un rango de entre 6,8 y 7,5 (Serrano Moral, 2015).



En los procesos anaerobios son necesarios controlar varios parámetros, como son la alimentación, temperatura, grado de mezcla, cantidad de nutrientes, pH, alcalinidad, concentración de ácidos grasos volátiles, fenoles, azúcares y producción de biogás.

Existen varios tipos de reactores anaerobios, las tecnologías que se usan se basan en la retención de los microorganismos como son (Grau Vilalta, 1999) :

- Reactores discontinuos, consiste en adicionar solo una vez los reactivos en el interior del reactor. Una vez adicionado, se espera un tiempo a que se produzca la reacción y se vacía el reactor. Por lo tanto, hay un tiempo en el que no se produce flujo de materia de entrada ni de salida del reactor. En la digestión anaerobia este tipo de reactores se utilizan para sustratos sólidos. Normalmente se realizan BMP (Potencial bioquímico del metano)
- Reactores continuos, en lo cuales el flujo de materia es constante durante todo el periodo de operación. Los reactores continuos se suelen utilizar para sustratos líquidos en la digestión anaerobia.
- Reactores semi-continuos, se trabaja por lotes; es decir se carga una vez la alimentación y se deja que reaccione durante un periodo de tiempo, y una vez pase ese tiempo se vuelve a alimentar. Así sucesivamente. Cuanto más tiempo trabaja el reactor a la máxima velocidad mayor será su productividad. Una de las ventajas del proceso discontinuo es que es capaz de operar durante mucho tiempo en estas condiciones disminuyendo el tiempo muerto. En la digestión anaerobia se suele utilizar este tipo de reactores para sustratos sólidos.

En el proceso de la digestión anaerobia es muy importante que el rendimiento sea elevado. Hay estudios que conforman que el pretratamiento realizado a sustratos orgánicos mejora los rendimientos de producción de CH_4 o H_2 de los residuos alimentarios (Karthikeyan et al., 2018). Se han realizado varios estudios que demuestran que cuanto más complejos sean los residuos, son capaces de formar más cantidad

de ácidos grasos volátiles (AGV) y por tanto hace que aumente el rendimiento de la producción de CH_4 (Gutiérrez, M., Carlos, L., & Pérez Olmo, 2003).

El proceso de la digestión anaerobia es muy complejo, hay diferentes compuestos y sustancias que son capaces de matar a los microorganismos provocando una inhibición del proceso. Los inhibidores más comunes son algunos metales pesados, fenoles, tiosulfatos, tiocianatos, cianuros, tensoactivos aniónicos, antibióticos y algunos pesticidas. Estos inhibidores podrían ser tóxicos en el proceso dependiendo de la concentración en la que se encuentren. Sin embargo, algunos compuestos como el níquel, cobalto, molibdeno y selenio, han resultado ser beneficiosos en pequeñas cantidades para los microorganismos metanogénicos (Lorenzo Acosta Yaniris, 2005). De hecho, hay estudios donde se ha realizado la adición de residuos con alto contenido de níquel y cobalto en reactores anaerobios, mejorando su producción entre un 25-50% (Gutiérrez, M., Carlos, L., & Pérez Olmo, 2003).

1.6 Elementos traza en la digestión anaerobia

Se considera metales pesados a los que pertenecen a elementos de transición y son inhibidores de los microorganismos incluyéndose los SRB (bacterias reductoras de sulfato) y los metanogénicos (Altas, 2009). La diferencia fundamental de los elementos traza u oligoelementos frente a los metales pesados, es que los elementos traza son aquellos metales que se encuentran en cantidades bajas, pero indispensables para el mantenimiento vital (Alarcón-Corredor, O, 2009). Estos elementos se pueden clasificar en tres grupos, los macroelementos (N,K,P), macroelementos secundarios (Ca,Mg,S,Na) y oligoelementos o elementos traza (B,Cu,Ni,Zn,Fe,Mn,Mo) (Rodríguez and Flórez, 2004). El exceso o defecto de estos elementos pueden provocar alteraciones en el organismo. Según Altas 2009 “*Los metales pesados pueden ser estimulantes, inhibidores o incluso tóxicos para las reacciones bioquímicas, dependiendo de sus concentraciones*”. La presencia de estos materiales traza son esenciales para el funcionamiento de muchas enzimas y coenzimas, pero en caso de añadirse en cantidades excesivas puede provocar toxicidad e inhibición (Li and Fang, 2007). Esta inhibición se debe a la unión de los metales pesados a las enzimas, que provoca una alteración en la estructura y en las actividades enzimáticas (Vallee, B. L., & Ulmer, 1972).

Como se ha expuesto anteriormente, el rendimiento del proceso de la digestión anaerobia es muy importante, es por eso por lo que una pequeña alteración de los elementos traza puede provocar una pérdida del rendimiento. Existen pocos estudios acerca de la adición de traza de metales que afecten al rendimiento en la digestión anaerobia, pero se conoce que la mayor parte de los metales son imprescindibles para el crecimiento o la actividad biológica en caso de que haya insuficiencia puede limitar la actividad de la población microbiana en los reactores (Demirel and Scherer, 2011; Fernando G. Feroso et al., 2009)

En la **Tabla 1** se muestran algunas de las funciones principales de varios oligoelementos en diversas enzimas.

Tabla 1. Funciones principales de varios oligoelementos en diversas enzimas cuya función es catalizar las reacciones en los reactores (Fermoso et al., 2008).

Elementos traza	Función enzimática	Elementos traza	Función enzimática
Cu	Superóxido dismutasa Hidrogenasa (anaerobios facultativos) Nitrito reductasa Acetil-CoA sintetasa	Mn	Estabilizar la metiltransferasa en bacterias productoras de metano Reacciones redox
Co	Enzimas B12 CO-desidrogenasa Metiltransferasa Hidrogenasa	Ni	CO-desidrogenasa Acetil-CoA sintetasa Hidrogenasa Ureasa Metil-CoA sintetasa Estabilizar ADN, ARN
Fe	CO-desidrogenasa Metano monooxigenasa NO-reductasa Superóxidodismutasa Nitrito y nitrato reductasa Nitrogenasa	Zn	Hidrogenasa Formiato deshidrogenasa Superóxidodismutasa

De los metales traza nombrados en la **Tabla 1**, se han realizado diversos estudios adicionándolos a reactores de digestión anaerobia (Fernando G Fermoso et al., 2009; Serrano et al., 2015)

Según las propiedades de estos elementos traza se va a dar más incapie en el Zn y el Ni, ya que se han realizado varios estudios cinéticos a los metales presentados en la **Tabla 1** y eran los que tenían una mejor respuesta en la digestión anaerobia. Según los estudios, el níquel es capaz de mejorar la producción de biogás entre un 25-50% (Gutiérrez, M., Carlos, L., & Pérez Olmo, 2003)

Hay estudios en los que se estuvo probando diferentes dosis de metales traza como el Fe, Co y Ni para comprobar si se estabilizaba efectivamente la digestión anaerobia mesofílica con una carga orgánica pequeña. Observaron que añadiendo 0,4g Fe/kg, 0,5mg Co/kg y 0,5 mg Ni/kg se benefició la tasa de producción de biogás y el rendimiento (Cao et al., 2018).

Anteriormente en el mismo laboratorio se han realizado adiciones de elementos traza al EFR en BMP (por lotes) en reactores de digestión anaerobia, obteniendo el níquel como uno de los elementos traza que mejoraban la producción de biogás (Alonso Segovia, 2019).

2 OBJETIVOS Y ALCANCE

Este proyecto tiene dos objetivos principales,

1. En primer lugar, el estudio del efecto del EFR tras un pretratamiento hidrotérmico, y la extracción de compuestos de alto valor añadido en reactores de digestión anaerobia.
2. En segundo lugar, el estudio del rendimiento del proceso de digestión anaerobia tras la adición de metales traza, en este caso níquel.

Para poder alcanzar esos objetivos, se han realizado los siguientes procesos:

- Tratamientos hidrotérmicos a dos condiciones diferentes, se realiza a las temperaturas de 170 °C a 5 bares durante 60 minutos y steam explosion 220 °C a 32 bares durante 5 minutos.
- Extracción de los compuestos fenólicos solubilizados en las fases líquidas después de la realización de los pretratamientos hidrotérmicos.
- Caracterización del EFR, y de las fases obtenidas tras los pretratamientos hidrotérmicos y extracción de los compuestos fenólicos.
- Proceso de digestión anaerobia a partir de la fase sólida y fase líquida desfenolizada tras los pretratamientos y evaluación de los parámetros de control del proceso de digestión anaerobia.
- Adición de metales traza en el proceso de digestión anaerobia, concretamente Níquel (8 mg/l) y evaluación de los parámetros de control del proceso de digestión anaerobia.

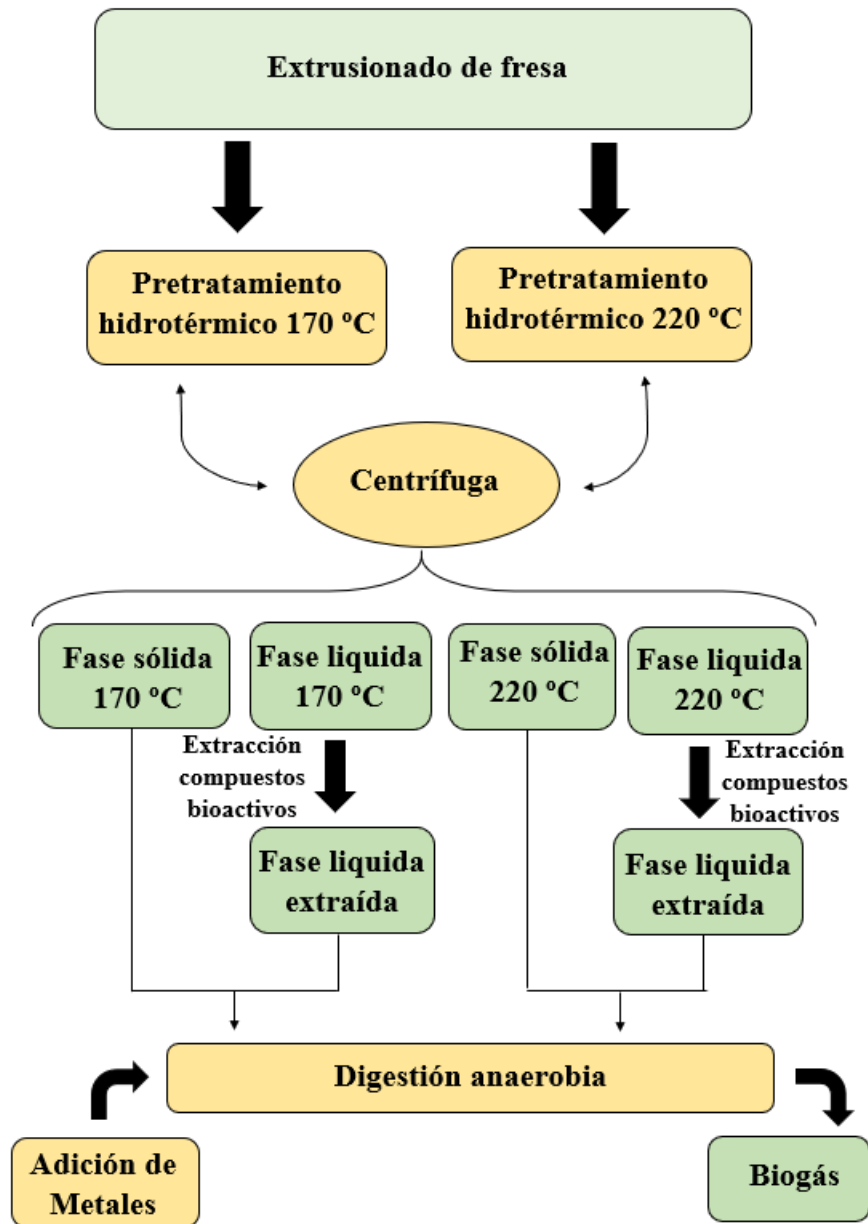


Figura 5. Esquema del proceso.

3 MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Extrusionado de fresa residual e inóculo

La empresa que suministra el sustrato utilizado para los ensayos es HUDISA S.A, cuya localización se encuentra en Lepe (Huelva). Hudisa surge del conjunto de 19 cooperativas productoras de frutos rojos, sugiriendo la transformación de la fruta de industria. Esta empresa procesa y comercializa concentrados, purés y fruta congelada de frambuesa, mora arándano y fresa (HUDISA, 2020). Todos estos productos provienen de la misma provincia de Huelva, que como se ha dicho anteriormente, es la zona que produce la mayor parte de los frutos rojos de Europa y la segunda del mundo. El EFR se obtuvo el 18 de marzo del 2018, el cual se generó mediante una extrusión de tornillo doble y luego pasado por un tamiz de 0,5 mm. Su conservación se realiza en una cámara frigorífica cuya temperatura se encuentra a -20 °C, almacenándose de forma individual, en bolsas de plástico herméticas para evitar su deterioro. Cuando es necesario la utilización del extrusionado, se almacena en una cámara frigorífica a 4 °C para evitar su fermentación.



Figura 6. Extrusionado de fresa EFR.

En este estudio, como fuente de inóculo para la digestión anaerobia se ha empleado un lodo proveniente del tratamiento anaerobio de las aguas residuales, que fue suministrado por el EDAR EL COPERO (EMASESA), localizada en Dos Hermanas (Sevilla). Esta estación depuradora de aguas residuales tiene una capacidad actual de tratamiento de 255.000 m³/día y depura las aguas de la cuenca sur de Sevilla, del polígono industrial La Isla y la población de Dos Hermanas. La muestra se obtuvo el 12 de marzo de 2019 y se conserva en garrafas de 5 litros en una cámara frigorífica a 4 °C.



Figura 7. Inóculo Copero.

3.2 Pretratamiento hidrotérmico

Se han propuesto dos pretratamientos hidrotérmicos diferentes a 170 °C y a 220 °C, los cuales han sido realizados en la planta piloto del Instituto de la Grasa, sede del CSIC en Sevilla. El reactor con el que se realiza el pretratamiento hidrotérmico a 170 °C (**Figura 8**), opera por inyección de vapor (se calienta de forma directa e indirectamente debido a una camisa externa por la que circula vapor de agua), y en régimen discontinuo. Tiene una capacidad de 100 L y puede alcanzar una temperatura y presión máxima de 190 °C y 12 bar. En el reactor se introducen 4,93 kilogramos de EFR durante 60 minutos a una presión de 8,7 bar dando como resultado un sustrato. Por otro lado, el reactor que opera a 220 °C (**Figura 9**) es de “steam explosión”, el EFR se trata con vapor sobrecalentado provocando una pérdida de carga tan elevada que desencadena una descomposición explosiva del extrusionado. El reactor opera en régimen discontinuo pudiendo alcanzar una temperatura y presión máxima de 240 °C y 2,7 bar. Para el tratamiento realizado en esta experiencia de 220 °C se introducen 4,239 kilogramos de fresa durante 5 minutos a una presión de 30 bar obteniéndose de nuevo otro sustrato. En la **Tabla 2**, se presentan los resultados obtenidos de ambos pretratamientos hidrotérmicos.

Tabla 2. Datos generales de ambos pretratamientos hidrotérmicos.

	T [°C]	P [bar]	Tiempo [min]	Masa inicial [kg]	Masa final FS [kg]	Masa final FL [kg]	Agua añadida	Ratio FS	Ratio FL
Pretratamiento 1	170	8,7	60	4,93	2,36	12,72	10,15	16	84
Pretratamiento 2	220	30	5	4,239	3,50	11,98	11,241	23	77



Figura 8. Reactor inyección de vapor



Figura 9. Reactor "Steam Explosion"

3.3 Preparación de muestras

La masa que se genera en el reactor durante el pretratamiento hidrotérmico se introduce en un equipo de centrifugación de eje vertical, cuya capacidad máxima es de 20 kg. En el interior de la centrifuga se encuentra un filtro de polipropileno donde el residuo sólido queda retenido, siendo ésta la **fase sólida (FS)**. La **fase líquida (FL)** sale por una boca perpendicular como se puede ver en la **Figura 10**.



Figura 10. Centrifuga de eje vertical.

Para la caracterización de la FL, se eliminó el sólido que queda en suspensión. Una vez centrifugado, se filtra la muestra con microfiltros de nylon de 0,45 micrometros.

Para la extracción de compuestos solubles de la FS, se introduce en un recipiente 20 g de FS diluyéndose con 160 g de agua, ésta mezcla se lleva a agitación y se deja durante 24 horas. Una vez pase el tiempo, se filtra

la muestra con los microfiltros de 0,45 micrometros (Thompson, W.H., Leege, P.B., Millner, P.D., Watson, 2001).

3.4 Extracción de compuestos bioactivos

Para la extracción de compuestos fenólicos se utiliza una columna de adsorción-desorción (**Figura 11**) de 4,5 centímetros de diámetro y 140 centímetros de altura. Esta columna se rellena de una resina adsorbente Amberlite XAD16, cuya función es adsorber los compuestos fenólicos ya que se quedan atrapados en sus poros. Esta resina es capaz de tratar 10 L de fase líquida por cada litro de resina introducida en la columna.

Cuando se introduce la resina en la columna, es necesario realizar una limpieza de la columna y posteriormente activar la resina. Para ello se introducen 2 L de agua y a continuación 1 L de etanol al 96%. La columna se rellena de la fase líquida obtenida en el pretratamiento hidrotérmico que irá pasando a través de la resina y se obtendrá una **fase líquida desfenolizada o extraída (FLE) (Figura 12)**. Esta extracción de compuestos se realiza de igual manera para los reactores de 170 °C y los de 220 °C. Por ultimo, se extraen los fenoles de la resina con 1 L de etanol 80 % y otro litro al 96 %, donde se concentran todos los fenoles que se han extraído.



Figura 11. Columna de extracción de fenoles



Figura 12. Fase líquida extraída de la columna.

3.5 Digestión anaerobia

3.5.1 Montaje de los reactores

En primer lugar, se realizó el montaje de 6 reactores cuyo funcionamiento es en regimen semi-continuo. Cada reactor tenía una capacidad de 2 L, pero su volumen útil era de 1,7 L. Todos los reactores estaban

fabricados de vidrio, los cuales tenían 2 orificios, uno de ellos se utilizaba para la alimentación y extracción de muestras y el otro para la extracción del biogás que se genera.

Los reactores son de mezcla perfecta para así favorecer el flujo de materia, por ello a cada reactor se le añadió un imán y posteriormente se colocó encima de un agitador. Cada agitador tenía la opción de regular la velocidad de agitación, así se controlaba que no se produjesen espuma y se mantuviese homogéneo.

Para tapar el orificio de la alimentación se colocó un tapón de goma, el cual se agujereó y se le introdujo un tubo que llegase a una profundidad media del reactor. A la salida de ese tubo se colocó una goma flexible que permitiese la entrada de la carga, teniendo en cuenta que no es posible la entrada de aire, cada vez que se alimentaba o se extraía la misma cantidad de muestra del reactor, se debía colocar una pinza metálica que estrangulase esta goma y así impedir la entrada de aire. La alimentación y la extracción se realizaban con jeringuillas de 100 mL de capacidad.

El otro orificio cuyo funcionamiento era la salida de biogás se enroscó un adaptador al reactor de forma que quedase conectado a un tubo de goma donde pasaba el biogás. Ese biogás producido ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$) se desplazaba por el tubo de goma hasta una trampa y luego se dirigía a unos borbotadores de hidróxido de sodio (3 normal), cuya función era atrapar el CO_2 en forma de carbonato y así permitir que solo circulasen el CH_4 . A continuación, ese biogás llega a unos depósitos que contienen agua (gasificadores) y por diferencia de presión, hace que desplace el agua y caiga a un bidón vacío. El agua que cae en el bidón correspondería con la cantidad de CH_4 producido por los reactores. En la **Figura 13**, se muestra una representación gráfica del proceso explicado.

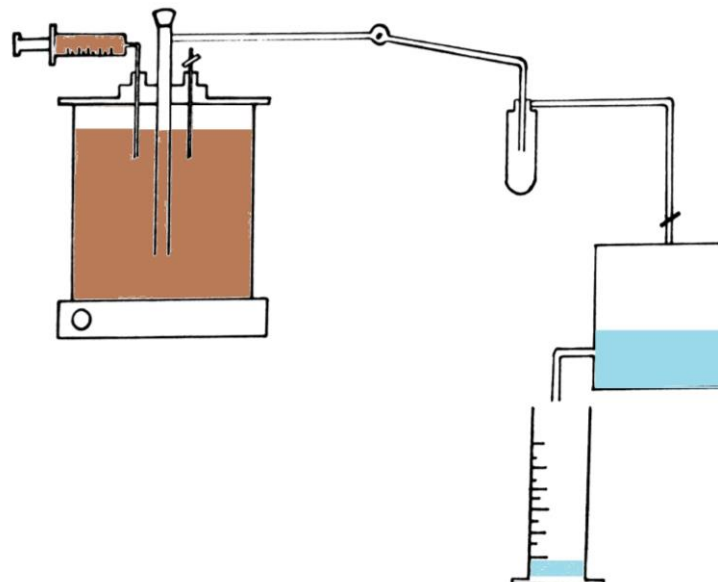


Figura 13. Esquema del proceso de producción de biogás.



Figura 14. Reactores de la planta piloto



Figura 15. Borbotadores y gasómetros medidores de biogás

3.5.2 Operación de los reactores

La digestión anaerobia de las fases obtenidas tras los pretratamientos hidrotérmicos de 170 y 220 °C y posterior extracción de los compuestos fenólicos (FS+FLE) se ha llevado a cabo durante 312 días. La digestión anaerobia tenía las siguientes condiciones, tenía un caudal de 70 mL/día y un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 25 días, para asegurarse que los reactores se habían estabilizado a diferentes velocidades de carga orgánica (VCO) se realizaron tres veces cada TRH, por tanto, su TRH final sería de 60 días. En este trabajo se estudia a partir del día 209.

A lo largo del ensayo de digestión anaerobia se ha ido modificando la VCO de la siguiente manera por orden cronológico:

- Reactores de pretratamiento hidrotérmico a 170 °C (1; 1,5; 1; **1,25**; 1,5; 1 VCO).
- Reactores de pretratamiento hidrotérmico a 220 °C (1; 0,5; 1; **0,75**; 1 VCO).

Este TFG comienza el día 2 de diciembre de 2019 (día 209 del experimento) cuando al reactor de 170 °C se le estaba añadiendo 1,25 VCO y al reactor de 220 °C 0,75 VCO. El día 259 comenzó la inyección de 5 mg/L de níquel a cada uno de los reactores. Para que esto fuese posible, se realizó una dilución de 8 mg/L de níquel en 100 mL con agua destilada. Como el reactor tiene un volumen útil de 1,7 L, para que la concentración de níquel se mantuviese constante se le añadió a cada reactor 8,5 mg, obteniéndose un resultado de 1.062,5 µL de

níquel que habría que inyectar el primer día. el primer día. La inyección de níquel se realiza diariamente para mantener constante los niveles y que no se consuma a lo largo del tiempo, por lo que habría que añadir todos los días el resultado de la (Ec. 1)

$$\text{Concentración diaria} = \frac{1.062,55 \mu\text{L níquel}}{24 \text{ días}} \cdot \frac{7 \text{ días semana}}{5 \text{ días laborables}} = 62 \mu\text{L} \frac{\text{níquel}}{\text{día}} \quad \text{Ec. 1}$$

Los valores de la velocidad de carga orgánica se han representado en las **Tabla 2**, junto con los resultados de fase sólida y fase líquida que habría que añadir para cada carga y tratamiento hidrotérmico.

Tabla 3. Cálculo de Fase sólida y Fase líquida que hay que añadir diariamente a los reactores a partir de la VCO.

VCO	170 °C		220 °C	
	Fase sólida	Fase líquida	Fase sólida	Fase líquida
0,75	-	-	14,87	87,51
1	9,42	50,79	17,35	59,37
1,25	11,78	63,49	-	-
1,5	14,14	76,19	-	-

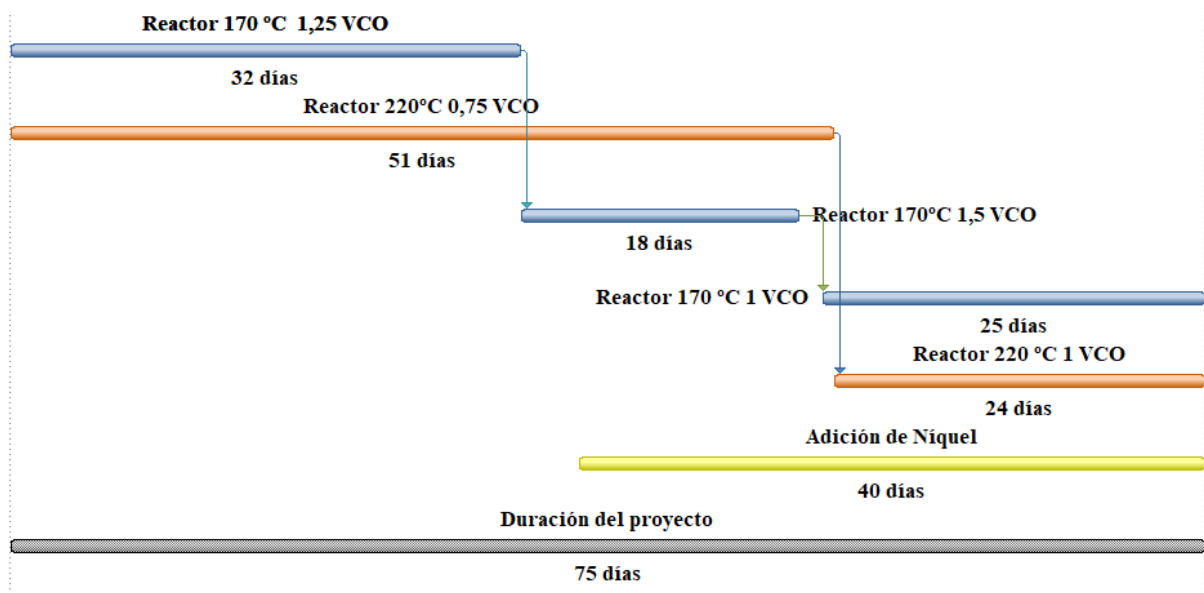


Figura 16. Diagrama de Gantt de las operaciones del reactor a partir del día 209 del experimento.

3.6 Analíticas realizadas

3.6.1 pH

El pH puede definirse como una medida del grado de acidez o basicidad de una solución que varía entre el 0 y 14. Se determina un pH ácido cuando el pH disminuye y es menor que 7, al igual que se determina un pH básico cuando el pH aumenta y es mayor que 7.

Para la determinación del pH se ha utilizado un pHmetro Crison (**Figura 17**), el cual se compone de un electrodo de vidrio y que al ser introducido en la muestra se obtenía una lectura digital y proporcionaba el valor de pH. Este pHmetro era necesario calibrarlo cada vez que se utilizaba con 3 muestras tampón de pH 4,7 y 9,21.



Figura 17. pHmetro Crison.

3.6.2 Alcalinidad

La alcalinidad mide la cantidad de iones ácidos y la capacidad tampón de una disolución acuosa, es decir, intenta mantener el pH estable frente a la adición de un ácido o una base.

La alcalinidad se ha realizado añadiendo en un vaso de precipitado un volumen conocido de la muestra, concretamente 500 μL de muestra y 40 mL de agua destilada. A continuación, se le iba añadiendo lentamente una disolución de ácido sulfúrico 0,02 N con una bureta automática (**Figura 18**), hasta que alcanzase un pH de 4,6. Es en este momento cuando se convierte más HCO_3^- a H_2CO_3 (APHA, 2012).

La determinación de la alcalinidad viene dada por la (**Ec. 2**),

$$\text{Alcalinidad} \left[\frac{\text{mg CaCO}_3}{\text{L}} \right] = V \cdot N \cdot 50 \cdot \frac{1000}{V_m} \quad \text{Ec. 2}$$

Siendo,

V: volumen gastado de ácido sulfúrico [mL].

V_m : volumen tomado de muestra [mL].

N: normalidad del ácido sulfúrico (0,02N).

50: peso equivalente de CaCO₃

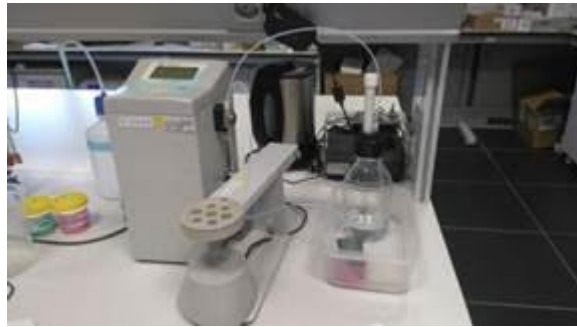


Figura 18. Equipo de medición de la alcalinidad.

3.6.3 Demanda química de oxígeno total y soluble (DQOt y DQOs)

La demanda química de oxígeno indica la cantidad de oxígeno que se requiere hasta la oxidación completa de la materia orgánica.

Para la determinación de la DQO_{total} se produce la oxidación con dicromato, pero el reflujó es abierto. La muestra debe estar sometida a 150°C en digestión durante 120 minutos al igual que la DQO_{soluble}. Tras la digestión, se deja enfriar y se añade un exceso de K₂Cr₂O₇ de concentración conocida, en un medio de ácido fuerte, como es el ácido sulfúrico (H₂SO₄) y en presencia de un catalizador de sulfato de plata. El dicromato potásico que no ha reaccionado en la digestión se valora con SAF (sulfato ferroso amónico hexahidratado) y se utiliza ferroina como indicador en una bureta (**Figura 20**). Todos los resultados se expresan en mg O₂/kg (APHA, 2012).

La determinación de la DQO se calcula a partir de la (**Ec. 3**),

$$DQO_{total} \left[\frac{\text{mgO}_2}{\text{kg}} \right] = \frac{(B-M) \cdot 8 \cdot 1.000 \cdot N_{FAS}}{m} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde,

B: volumen de FAS gastado en la valoración del blanco [mL].

M: volumen de FAS gastado en la valoración de la muestra [mL].

M: peso de muestra [g].

8: peso equivalente del oxígeno.

El método que se ha utilizado para determinar la DQO_{soluble} es la oxidación con dicromato potásico. En primer lugar, se toma la muestra y se valora con 2,5 mL de dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) y 3,5 mL de sulfato de plata (Ag_2SO_4). Cada vez que el dicromato potásico se terminase había que hacerlo, por lo que se tenía que realizar una recta de calibrado. Para ello se preparaban disoluciones de ftalato potásico preparadas por diluciones de un patrón teórico de DQO_{soluble} conocido, cuyo valor es 1,1796 mg Oxígeno/mg.

La muestra se somete a oxidación química, para ello se introducen en un digestor (**Figura 19**) a $150^\circ C$ durante 120 minutos y posteriormente se mide la absorbancia, a 600 nm en un espectrofotómetro marca Thermo elctron corporation: Genesys 10 vis (**Figura 21**).



Figura 19. Digestor de las muestras de DQO_{soluble} . **Figura 20.** Bureta de valoración de la DQO_{total}



Figura 21. Espectrofotómetro para la determinación de la DQO_{soluble} .

3.6.4 Sólidos totales, minerales y volátiles

Los sólidos totales (ST) se definen como la materia que permanece como residuo una vez se haya evaporado y secado a una temperatura de entre $103-105^\circ C$. El valor que aporta los sólidos totales son los sólidos disueltos totales, los suspendidos totales y los sólidos retenidos en el filtro (APHA, 2012).

Para la determinación de los ST se pesó un crisol de porcelana vacío en una balanza de precisión (**Figura 22**). Una vez obtenido el peso de este crisol, se le introduce la muestra bien homogeneizada y se vuelve a pesar para saber el peso exacto de la muestra. Tras esto, se introduce el crisol en la estufa a 105°C (**Figura 23**) durante 24 horas y después se vuelve a pesar para determinar los ST.

Una vez determinados los ST se llevan los crisoles a la mufla (**Figura 24**), cuya temperatura se encuentra a 550°C durante 2 horas. Esto se realiza para determinar los sólidos minerales (SM), que son aquellos sólidos que una vez calcinada la muestra siguen permaneciendo.

La diferencia de los ST y los SM son los Sólidos volátiles (SV), que son los sólidos que se pierden durante la calcinación.

La determinación de los sólidos minerales, sólidos totales y sólidos volátiles se expresan en las (**Ec. 3,4 y 5**)

$$SM \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] = \frac{(A-B) \cdot 10^6}{m} \quad \text{Ec. 4}$$

$$ST \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] = \frac{(A-B) \cdot 10^6}{m} \quad \text{Ec. 5}$$

$$SV = ST - SM \quad \text{Ec. 6}$$

Siendo,

SM: sólidos minerales de la muestra.

ST: sólidos totales presentes en la muestra.

SV: sólidos volátiles tras la calcinación.

A: peso de la muestra calcinada más el peso del crisol [g]

B: peso del crisol [g]

M: masa inicial de muestra [g]

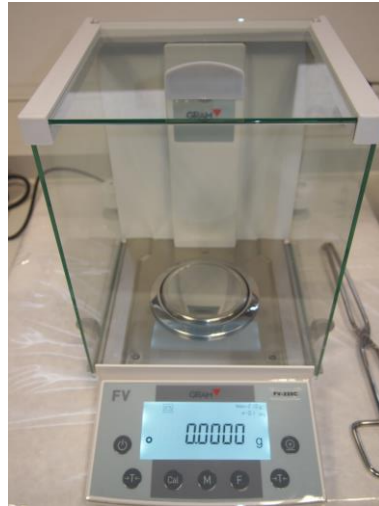


Figura 22. Balanza analítica.



Figura 23. Estufa a 105°C



Figura 24. Mufla a 550°C.

3.6.5 Ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos volátiles (AGV) son productos intermedios de la degradación anaerobia de materia orgánica. El 15% del metano producido en la fermentación metabólica pertenece a los ácidos grasos volátiles. Si éstos ácidos grasos estuvieran presente dentro de los reactores a altas concentraciones puede provocar estrés a los microorganismos por lo que la concentración de éstos ácidos son muy importantes en los reactores anaerobios (González et al., 2005).

Concretamente los AGV que se han analizado en los reactores de digestión anaerobia son el ácido acético, el ácido propiónico, el ácido isobutírico, el ácido butírico, el ácido valérico, el ácido isovalérico y el ácido caproico.

La determinación de los AGV se ha realizado a través de la cromatografía gaseosa con detector de ionización de flama (FID), cuyo modelo es GC-2010, marca shimadzu, equipado con una columna Stabilwax- Da cuya composición es 100% etilenglicol.

Se toma la muestra del reactor ya filtrada y centrifugada y a continuación se hace una dilución pertinente sabiendo que hay que tomar 1.350 μL de muestra y 150 μL del reactivo o IS. El reactivo está formado por ácido etilbutírico que es el patrón interno IS y el ácido fosfórico al 30%. Esta dilución se realiza en un tubo Eppendorf de 2 mL, llenando un total de 1,5 mL. Este tubo Eppendorf se introduce en la centrífuga unos 7 minutos a 4.000 revoluciones por minuto. A continuación, se introduce 1 mL de los Eppendorf ya centrifugados en viales de 2 mL de capacidad y posteriormente se procede a su análisis.

3.6.6 Azúcares totales disueltos

El método utilizado para cuantificar la cantidad de azúcares totales es el de la Antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno). Su característica principal es que aprovecha las propiedades de los monosacáridos, produciendo la deshidratación en un medio ácido caliente formandose hidroximetafurfural. Este compuesto forma junto con la antrona un color verde con un máximo de absorbancia de 630 nm (Dische, 1962; Scaramboni et al., 2015).

Para la determinación de los azúcares (**Figura 25**) en las muestras se le ha añadido a cada muestra el reactivo Antrona-sulfúrico. A continuación, se han agitado con el vortex y calentadas en un baño de agua a una temperatura de 100 °C durante 5 minutos. Por ultimo, se midió la absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas Bio-Rd modelo iMark Microplate Absorbance Reader (Hércules, CA, EE. UU). Para determinar la concentración de los azúcares totales se ha de interpolar la absorbancia obtenida por el biorad con una recta de calibrado obtenida de diferentes diluciones de una disolución patrón de glucosa, con peso conocido.

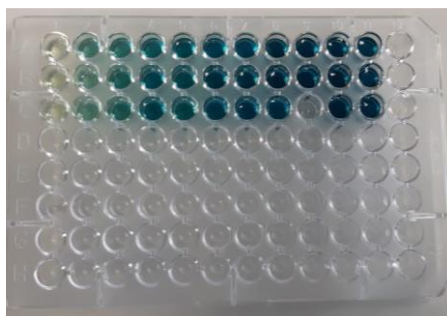


Figura 25. Microplaca determinación de azúcares.

3.6.7 Fenoles

Los compuestos polifenólicos desempeñan funciones fisiológicas, interviniendo en el crecimiento y en la reproducción de los microorganismos. Tradicionalmente se consideraban sustancias antinutritivas, esto se

debe a que uno de sus componentes principales como son los taninos realizaba un efecto adverso en la digestibilidad de las proteínas (García Martínez E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, 2015).

Para la determinación de fenoles se ha utilizado el método colorimétrico o Folin-Cicocalteu. El reactivo utilizado es una mezcla de molibdato sódico con wolframato sódico. Estos reactivos reaccionan con los compuestos fenólicos que se encuentran en la muestra. El folin cuyo color es amarillo, cuando se reduce por los compuestos fenólicos da un color azul intenso. La intensidad de este color se mide en el biorad a 655 nm (Singleton, V.L., Rossi, 1965).

Para la extracción de los compuestos fenólicos se introducen 10 mL de muestra en un bote opaco de 100 mL de capacidad. A continuación, se introducen 20 mL de metanol al 80%. Una vez hecha la solución se lleva al baño ya precalentado a 70°C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se sacarán los botes y cuando se enfríen se filtrarán y se depotaran a erpendors de 2 mL.

Para realizar el análisis de las muestras se han preparado una dilución de carbonato sódico, y el reactivo folin-cicocalteu. En una microplaca (**Figura 27**) se realiza por triplicado cada muestra diluida, incorporando 20 μL de muestra, 80 μL de la dilución de carbonato sódico y 100 μL de Folin. Se esperan 10-15 minutos y se mide la absorbancia a 655 nm en el Bio-rad (**Figura 26**), cuyo modelo es iMark (Hércules, CA, EE. U).

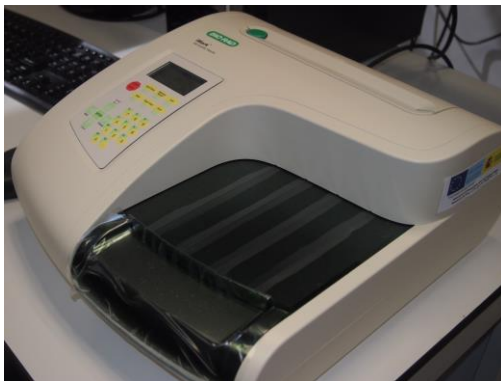


Figura 26. Biorad lector de microplacas.

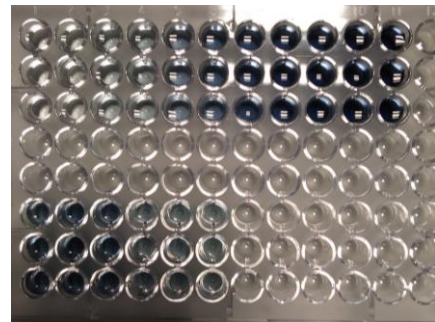


Figura 27. Microplaca de fenoles.

4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el siguiente apartado se van a mostrar los resultados del presente trabajo, cuya división va a ser por un lado el proceso del pretratamiento hidrotérmico y la extracción de compuestos bioactivos, y por otro lado el proceso de digestión anaerobia.

4.1 Efectos de los pretratamientos hidrotérmicos y posterior extracción de compuestos bioactivos.

4.1.1 Caracterización fisicoquímicas de los sustratos obtenidos

En la **Tabla 4** se muestran los valores de pH, sólidos totales, sólidos volátiles, sólidos minerales y la humedad del extrusionado de fresa.

Tabla 4. Caracterización de los sustratos.

	pH	ST [mg/kg EFR]	SM [mg/kg EFR]	SV [mg/kg EFR]	Humedad [%]	DQOtotal [mg O ₂ /kg EFR]	DQOsoluble [mg O ₂ /kg EFR]	Ratio DQOs/DQOt
Extrusionado de fresa residual	3,6±0,1	152.403±1.592	6.694±177	145.709±10	84,8±0,16	142.565±9.452	7.325±87	0,05
FS 170 °C	3,96±0,1	81.988±2.018	2.997±245	78.991±15	82,9±0,42	108.555±2.497	2.595±82	0,02
FL 170 °C	3,98±0,1	48.019±512	3.070±1.079	44.949±1.829	98,1±0,02	56.870±512	56.414±1.128	0,99
FLE 170 °C	4±0,1	45.829±591	4.337±311	41.493±1.757	98,2±0,26	42.350±6.056	46.830±1.123	1,11
FS 220 °C	3,87±0,1	92.455±2.161	3.547±51	88.908±2.196	88,8±0,03	171.945±6.362	2.173±27	0,01
FL 220 °C	3,89±0,1	45.065±789	3.377±77	41.687±805	98,4±0,01	54.830±5.593	51.565±1.614	0,94
FLE 220 °C	3,89±0,1	26.736±380	2.323±177	24.413±220	99,1±0,01	40.685±10.000	42.952±5.378	1,06

Como se muestra en la **Tabla 4** se puede observar que los valores de pH se encuentran en torno a 4, cuyo valor puede deberse a la degradación de los ácidos del EFR, este valor habrá que tenerlo en cuenta en los posteriores procesos biológicos. Del EFR el 96 % de los sólidos totales corresponde a sólidos volátiles. En el pretratamiento hidrotérmico de 170 °C la cantidad total de sólidos volátiles presentes en FS+FL son de 123.940 mg/kg de EFR y en el pretratamiento hidrotérmico con la cantidad de sólidos volátiles presentes en el pretratamiento hidrotérmico de 220 °C hay 130.587 mg/kg EFR, habiendo en ambos pretratamientos una cantidad inferior de aproximadamente del 10 %, esto quiere decir que el sustrato tiene gran cantidad de materia orgánica. El 4% restante de los sólidos totales corresponde con los sólidos minerales, los cuales pueden estar

presentes como sales y/o carbonatos El EFR tiene una humedad relativa bastante alta, en torno al 85%, si se compara la humedad de las fases sólidas de 170 °C y 220 °C se puede observar cómo la humedad de la fase sólida del pretratamiento hidrotérmico de 220 °C tiene un 6 % más de humedad relativa que la fase sólida del pretratamiento hidrotérmico de 170 °C esto es debido al tipo de tratamiento steam explosion a 220 °C. De mismo modo, la humedad de la fase líquida de 220 °C tiene un valor de 98,4%, que es mayor que en el tratamiento hidrotérmico de 170 °C, cuyo valor es de 98,1%, siendo la diferencia el valor de los sólidos en suspensión.

Por último, en la **Tabla 4** se puede observar los datos obtenidos de la DQO total y soluble para cada una de las fases. Los valores más elevados de la DQOtotal corresponden con las fases sólidas, siendo la del pretratamiento hidrotérmico de 220 °C mayor que el de 170 °C un 37 %. Las fases líquidas de ambos tratamientos podrían considerarse prácticamente del mismo valor. Con respecto a la DQOsoluble, la FS+FL es 8 veces mayor que el extrusionado de fresa pasando a la fase líquida un 87% más que del extrusionado de fresa, esto se debe a que la materia orgánica se ha solubilizado más en la fase sólida de 170 °C que en el EFR y en la de 220 °C. En último lugar se representa el ratio DQOsoluble/DQOtotal. Las fases sólidas de 170 °C y 220 °C tienen valores del mismo orden que el ratio del EFR siendo muy pequeños, esto quiere decir que prácticamente el 90% de la materia orgánica no es soluble. Por el contrario, las fases líquidas de 170 °C y 220 °C tienen una relación DQOsoluble/DQOtotal igual a la unidad. Esto quiere decir que la materia orgánica en la FL es materia orgánica soluble, que podría ser más fácilmente degradable en el posterior tratamiento de digestión anaerobia.

4.1.2 Estudio de los fenoles totales en las fases obtenidas

En la **Figura 28** se van a mostrar todos los datos de los fenoles obtenidos en el EFR y en las fases obtenidas tras los pretratamientos hidrotérmicos.

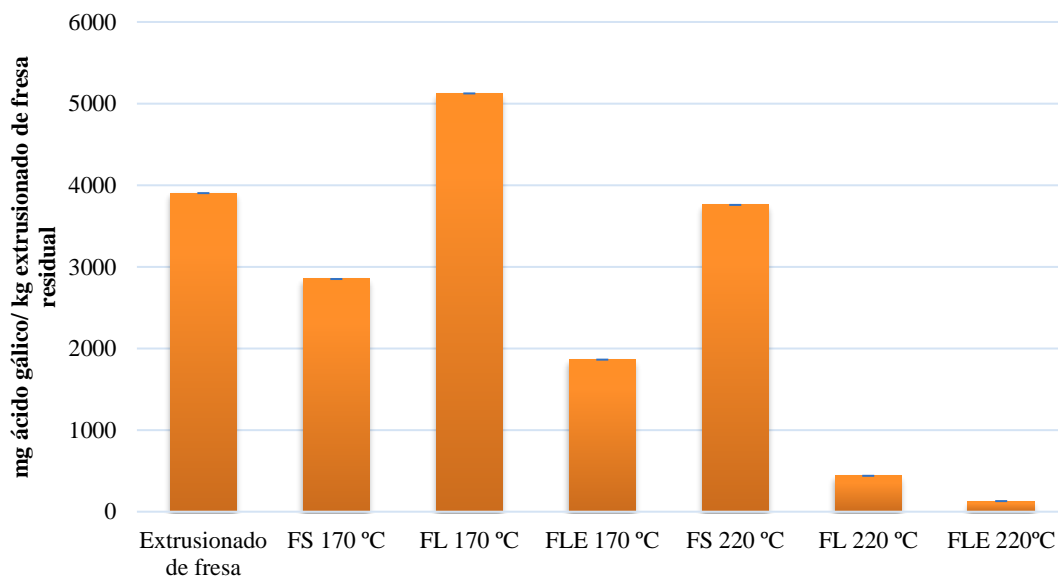


Figura 28. Fenoles solubles en el EFRy en las fases líquidas y sólidas.

Como se observa en la **Figura 28**, los fenoles que se obtienen de la suma FS+FL en el pretratamiento hidrotérmico de 170 °C es de 7.978 mg ácido gálico/kg EFR, un 60 % más que en el extrusionado de fresa. Al realizarle el tratamiento hidrotérmico al EFR se liberan gran cantidad de compuestos solubles que se van a repartir posteriormente entre la fase sólida (36%) y la fase líquida (64%), por eso será necesario la extracción de compuestos bioactivos de la FL, cuyo resultado es la fase líquida extraída que en el caso del pretratamiento hidrotérmico de 170 °C se elimina aproximadamente un 65% de estos compuestos bioactivos de la FL. En el caso del pretratamiento hidrotérmico de 220 °C, si se compara la cantidad de fenoles que contiene la fase sólida más la fase líquida, con respecto a los fenoles del EFR es un 18 % mayor, aunque en este caso, la mayor parte de los compuestos fenólicos se han desplazado a la fase sólida siendo alrededor del 90%. Con respecto a la FLE tiene un rendimiento menor pusiendose extraer el 30% de los compuestos fenólicos de la FL.

4.1.3 Estudio de los azúcares solubles en las fases obtenidas

En la **Figura 29** se comparan los valores obtenido de azúcares solubles que contiene el EFR con las fases obtenidas tras el pretratamiento hidrotérmico.

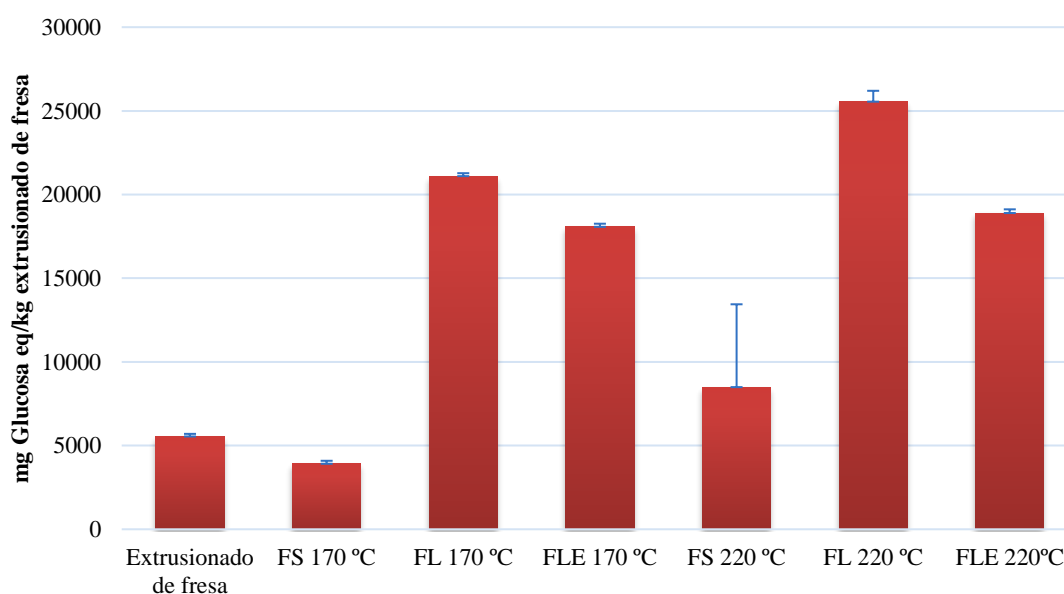


Figura 29. Comparación de azúcares solubles.

Respecto a los azúcares solubles, como se observa en la **Figura 29**, tras la aplicación de ambos pretratamientos hidrotérmicos se puede observar que ambos aumentan considerablemente la cantidad de azúcares con respecto al extrusionado de fresa. En el caso del pretratamiento hidrotérmico de 170 °C hay un 49 % más cantidad de azúcares que en el extrusionado de fresa, habiendose desplazado más cantidad de azúcares a la fase líquida, que, tras la eliminación de los compuestos bioactivos, la FLE disminuye un 15% con respecto a la fase líquida. En el caso del pretratamiento hidrotérmico de 220 °C hay un 84% más de azúcares que en el extrusionado de fresa, desplazándose a la fase líquida la mayor parte de los azúcares. Tras la eliminación de los

compuestos bioactivos, en este caso los azúcares, la FLE disminuye un 26% con respecto a la fase líquida de 220 °C.

4.2 Estudio de la digestión anaerobia tras los pretratamientos hidrotérmicos de 170 °C y 220 °C

4.2.1 Estudio de la digestión anaerobia del extrusionado de fresa tras el pretratamiento hidrotérmico a 170 °C y extracción de compuestos fenólicos.

En este apartado se van a discutir los resultados obtenidos en los tres reactores a los cuales se les ha estado alimentando con el pretratamiento hidrotérmico de 170 °C.

4.2.1.1 Estudio de la evolución del pH y alcalinidad

En las Figuras 30 y 31 se muestran los resultados del pH y de la alcalinidad obtenidos durante la experiencia.

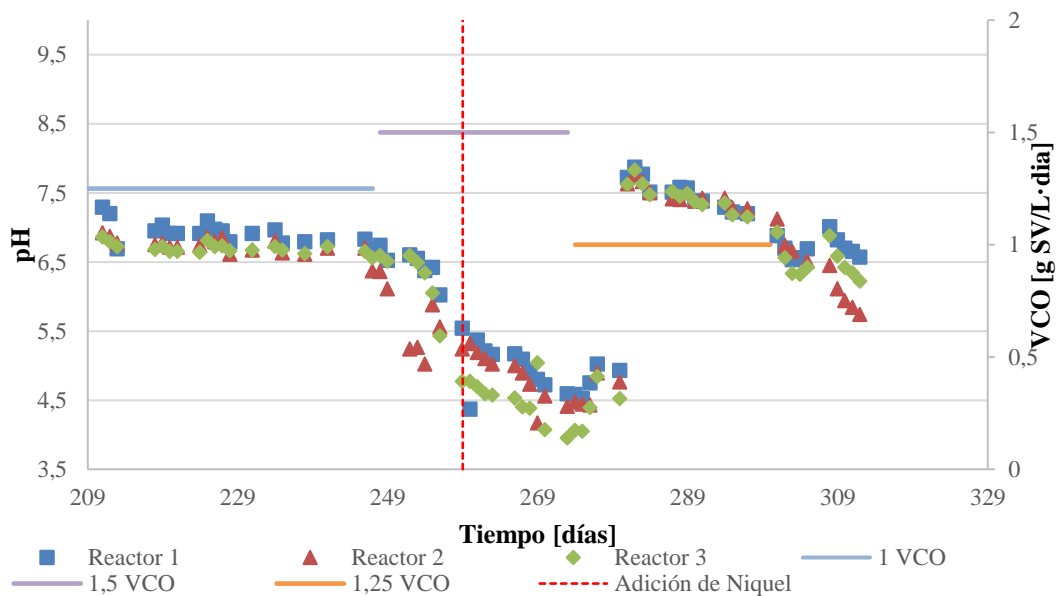


Figura 30. Evolución del pH a lo largo de la experiencia en los reactores de 170 °C.

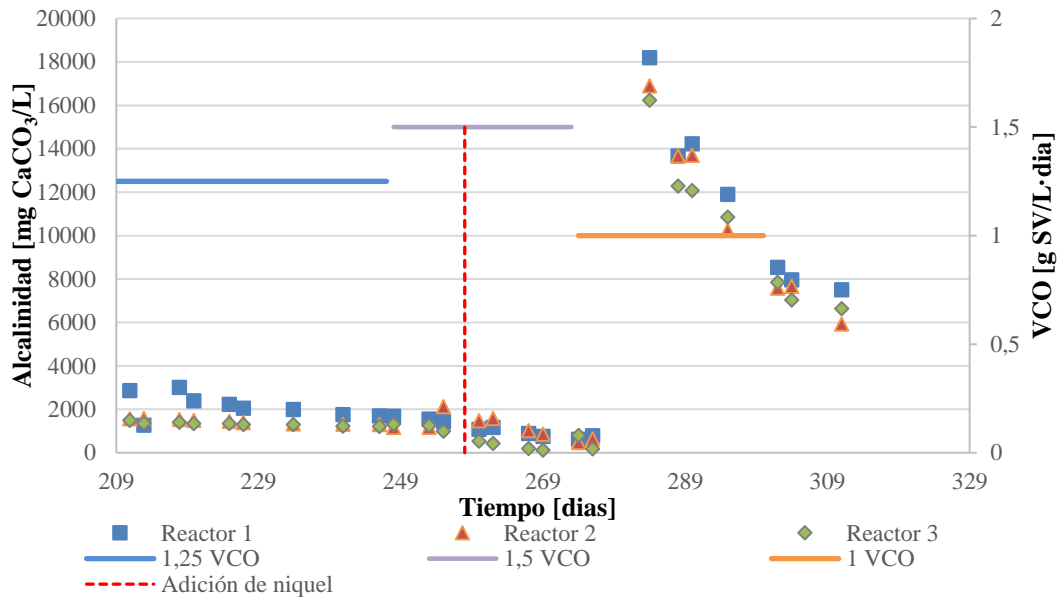


Figura 31. Evolución de la alcalinidad en los reactores de 170 °C a lo largo de la experiencia.

Como se puede observar en la **Figura 30**, entre los días 209 y 250, los reactores se mantenían constantes con un pH entre 6,5 y 7,5 cuando su VCO era 1,25, por lo que se encontraban dentro de su pH óptimo, es decir, el reactor se mantenía estable. El pH óptimo de un reactor de digestión anaerobia oscila entre 6,6 y 7,6, que se logra a través de parámetros de proceso o adición de nutrientes (Lorenzo Acosta Yaniris, 2005). En la **Figura 31**, se muestra cómo para 1,25 VCO la alcalinidad se mantenía prácticamente estable, pero a partir del día 250 se cambió a 1,5 VCO para observar cómo actuarían los reactores a ese cambio de carga, comprobándose que su producción de biogás disminuía obteniéndose así un pH bastante ácido rondando los 4,5. Esto se podía deber a que al aumentar la velocidad de carga orgánica (VCO) se le está introduciendo al reactor más materia orgánica, por lo que podría saturarse y por lo tanto no le da tiempo a consumir toda la materia orgánica y favorecer a las bacterias acidogénicas provocando la acidificación del reactor (Pérez and Torres, 2008). Cuando las condiciones son favorables las bacterias metanogénicas son capaces de consumir los ácidos evitando su acumulación y por tanto garantizando la alcalinidad natural del medio y su pH óptimo, pero en el caso de que las condiciones en el reactor no sean favorables, provocan una rápida disminución de la alcalinidad y por consecuencia también disminuirá su pH (Pérez and Torres, 2008). A partir del día 284, en la **Figura 31** se observa una decadencia de la alcalinidad tras la inyección de bicarbonato sódico, ya que cae la concentración bruscamente indicando que la materia orgánica no es capaz de biodegradarse completamente por lo que se forman ácidos para completar esa biodegradación. También se puede observar en ambas figuras, que tras la adición de níquel no se produce ninguna mejora en el pH ni en la alcalinidad, sino que sigue descendiendo. Cuando se produjo la disminución del pH, se decidió cambiar su VCO a 1 para que se pudieran volver a recuperar las condiciones óptimas del reactor. Como se observaba que no mejoraban las condiciones se le inyectó a cada reactor bicarbonato sódico hasta conseguir un pH de 7,8 y así revivir los reactores.

4.2.1.2 Comparación de los sólidos en los reactores de digestion anaerobia

En las Figuras 32 y 33 se representa la evolución de los sólidos totales y volátiles que se han generado a lo largo de la experiencia.

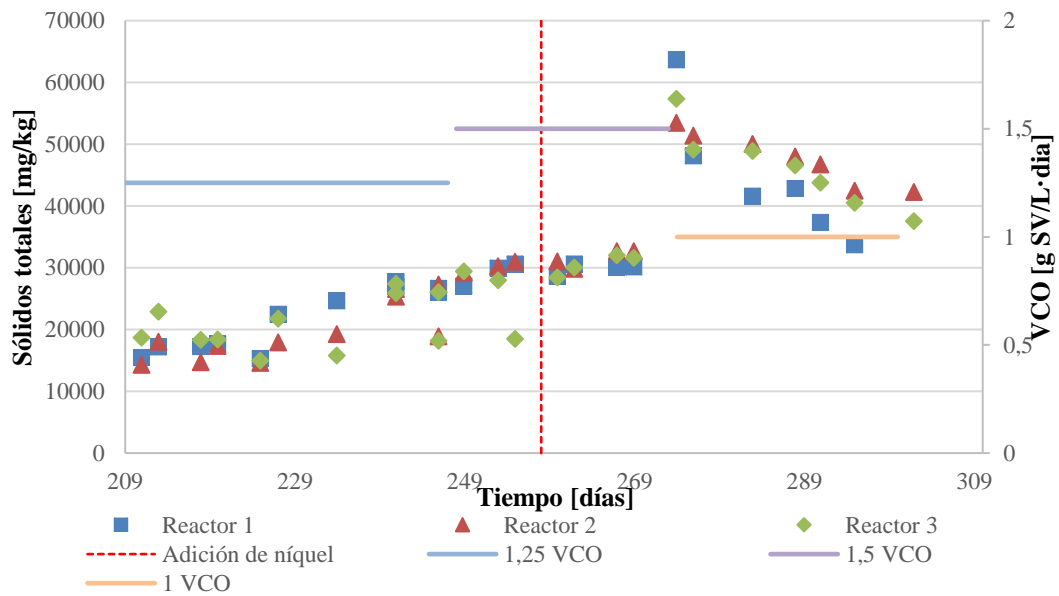


Figura 32. Evolución de los sólidos totales de los reactores de 170 °C.

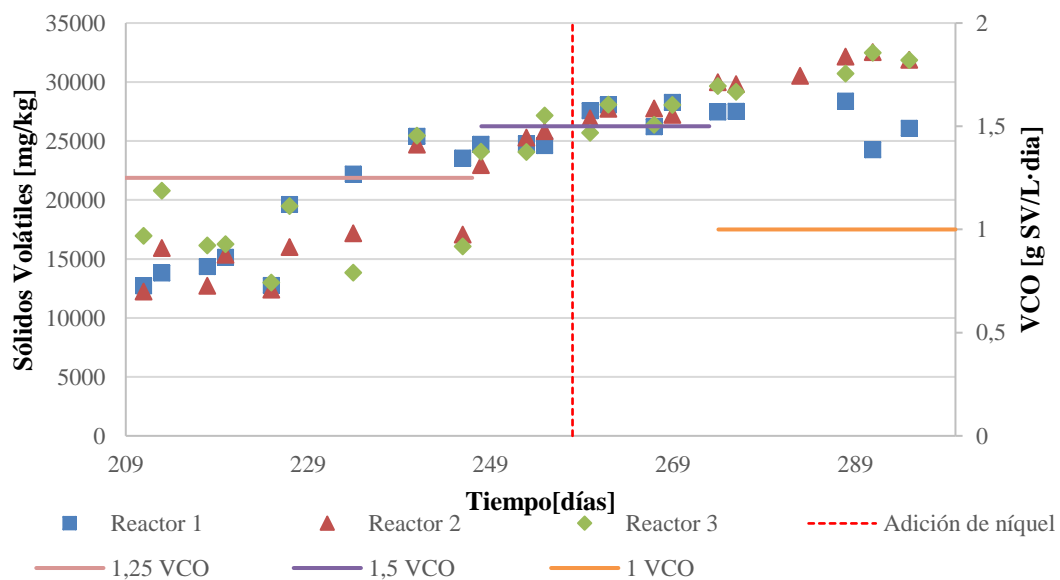


Figura 33. Evolución de la cantidad presente en los reactores de 170 °C de sólidos volátiles.

Como se observa en las Figuras 32 y 33, la cantidad de sólidos totales cuando la VCO era 1,25 se obtiene un valor medio de 19.347 ± 4.142 mg/kg mientras que los sólidos volátiles tienen un valor medio de 16.910 ± 4.211 mg/kg. Esto quiere decir que hay gran cantidad de materia orgánica tras el proceso de la digestión

anaerobia cuando la VCO es de 1,25, ya que tienen una relación SV/ST del 87%. Cuando se produce el cambio a 1,5 VCO el valor medio de los sólidos totales aumenta con respecto a la VCO de 1,25, siendo su valor de 28.140 ± 2.700 mg/kg, de igual forma sucede con los sólidos volátiles, teniendo un valor medio de 26.271 ± 1.700 mg/kg, produciéndose así una relación de SV/ST del 94%. Este aumento de sólidos en el reactor puede ser debido a una acumulación de materia orgánica, verificándose así los valores obtenidos mediante el decrecimiento del pH y de la alcalinidad. Por último, se produjo el cambio a 1 VCO dando una cantidad de sólidos totales de 46.042 ± 10.000 mg/kg y un valor de sólidos volátiles de 30.675 ± 4.614 mg/kg, obteniéndose así un incremento de sólidos en el reactor y teniendo una relación de SV/ST de más del 65%. La variación de los porcentajes que relacionan la cantidad de sólidos volátiles con respecto a los sólidos totales aumenta de forma proporcional con la velocidad de carga orgánica, esto se debe a que a mayor VCO más alimentación se le añade al reactor (fase sólida + fase líquida), y es por este motivo que aumenta la cantidad de sólidos en el reactor. Antes del cambio de VCO se produjo la inyección de níquel, pero como se puede observar en ambas figuras no se detecta ninguna mejora en los reactores. En este último caso se produce un aumento de los sólidos en los reactores. En la **Figura 32**, se produce un cambio brusco a partir del día 274 ya que se le añadió a cada uno de los reactores bicarbonato sódico hasta aumentar su pH a 7,8, por este motivo se pudo producir acumulación de bicarbonato sódico en los reactores y aumentar así los sólidos totales.

4.2.1.3 Estudio de la evolución de la materia orgánica soluble en los reactores

En la **Figura 34** se muestran los valores de la DQO soluble, en las **Figuras 35, 36 y 37** se muestran los ácidos grasos volátiles y en la **Figura 38** los fenoles correspondientes a los reactores de pretratamiento hidrotérmico a 170 °C.

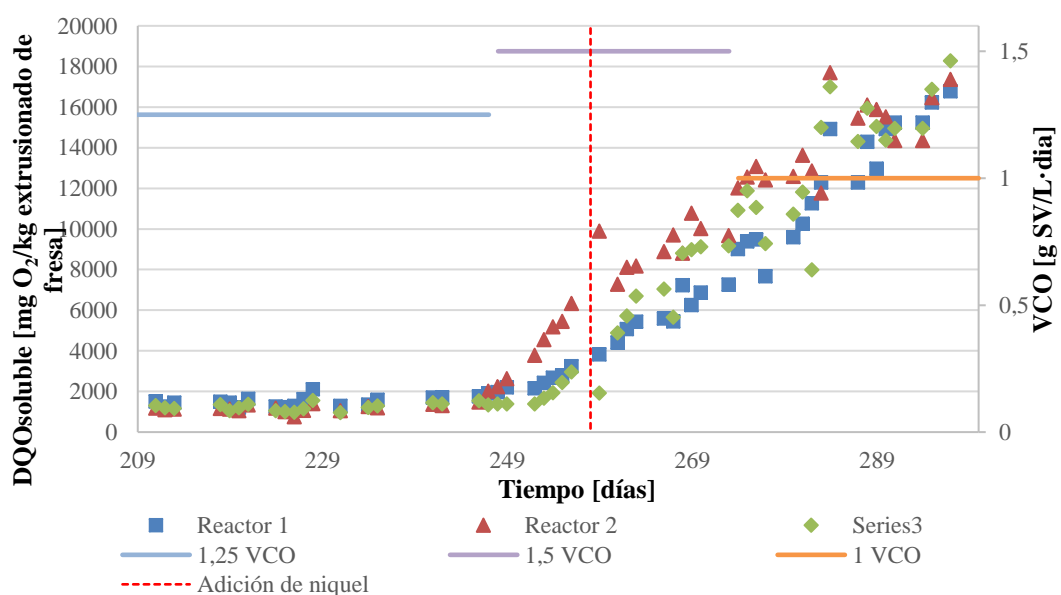


Figura 34. Evolución de la degradación química de oxígeno en los reactores de 170 °C a lo largo de la experiencia.

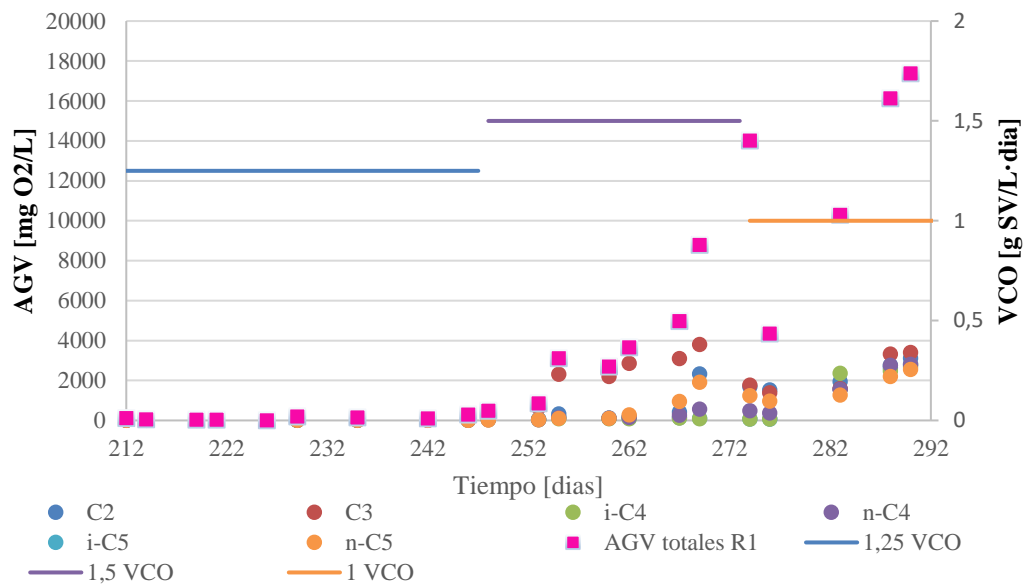


Figura 35. Totalidad de los ácidos grasos volátiles en el reactor 1 a lo largo de la experiencia.

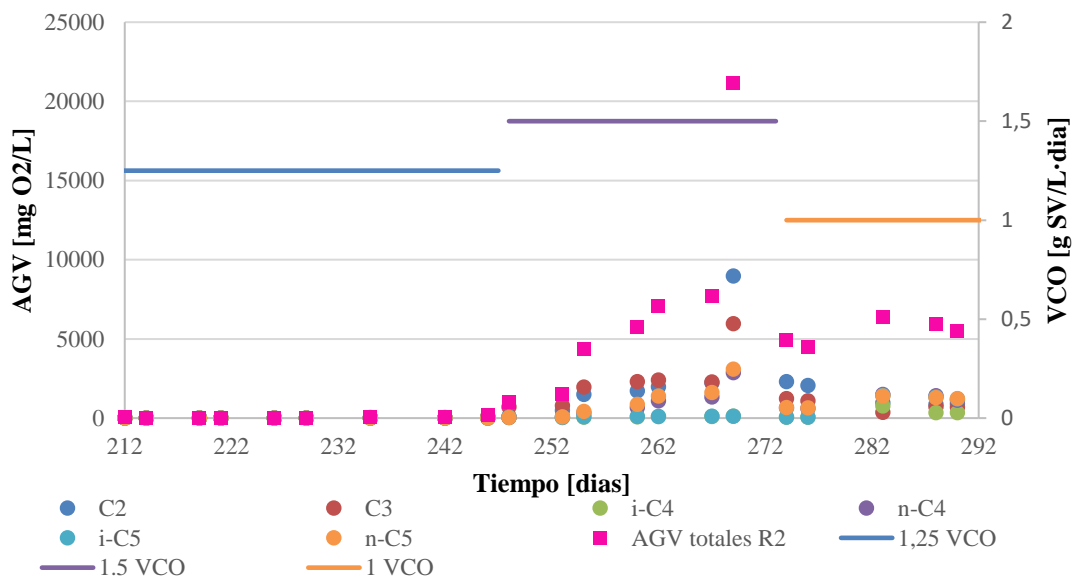


Figura 36. Ácidos grasos volátiles en el reactor 2 a lo largo de la experiencia.

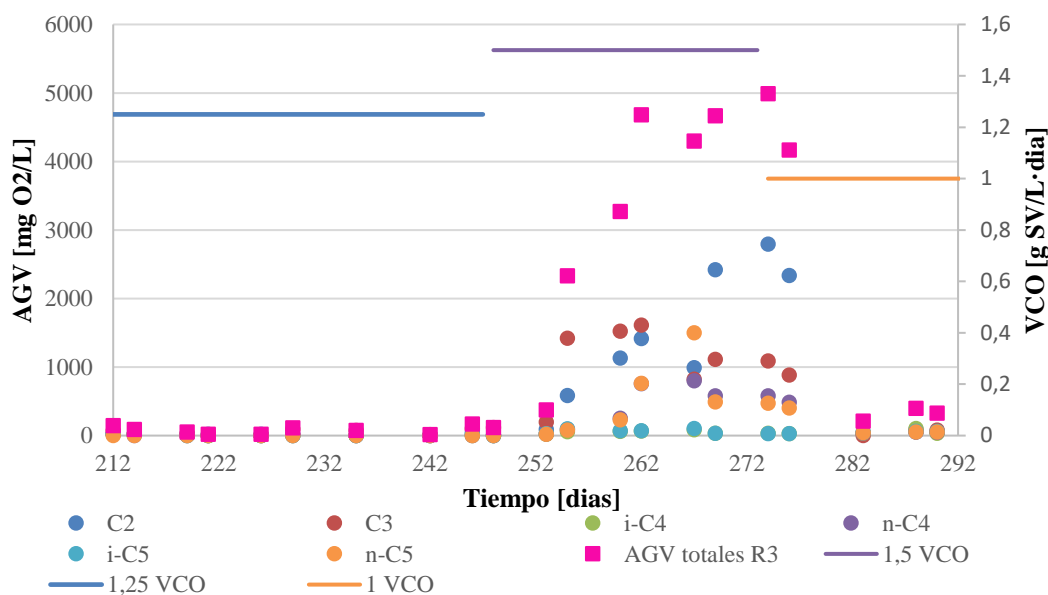


Figura 37. Ácidos grasos volátiles en el reactor 3 a lo largo de la experiencia

En la **Figura 34** se puede observar que a lo largo de la experiencia la DQO soluble aumenta gradualmente a partir del cambio a 1,5 VCO. Esto quiere decir, que los microorganismos que se encuentran en el reactor no son capaces de consumir la materia orgánica, se encuentran saturados y por tanto se acumula en el reactor. Este motivo puede ser debido a la acidificación del reactor. A su vez se puede demostrar la acidificación en las **Figuras 35, 36 y 37**, donde se representan la cantidad de ácidos grasos volátiles que hay en los reactores.

En la **Figura 35** se representa el reactor 1, que como se puede observar a partir del día 252, empiezan a aumentar concretamente los ácidos C3 (ácido propiónico) y n-C5 (ácido caproico), pero a medida que pasan los días aumentan todos los ácidos provocando la acidificación en el reactor cuando su VCO es 1,5 y así confirmando el aumento gradual de la DQO soluble, la disminución del pH y una inhibición del proceso. Hay veces que los microorganismos no son capaces de asimilar el ácido propiónico tan eficientemente como el ácido acético debido a una inestabilidad y provocan una reducción de la etapa metanogénica provocando más acumulación de este ácido frente al resto de ácidos grasos volátiles (Rodicio, 2013). De mismo modo sucede en los reactores 2 y 3 como se pueden observar en las **Figuras 36 y 37**, aumentando en el reactor 2 prácticamente todos los ácidos por igual, y en el reactor 3 aumentando los ácidos C3 (ácido propiónico), C2 (ácido acético) y n-C5 (ácido caproico). Al realizar una media de los reactores se puede observar claramente la relación de AGV/DQO soluble para cada una de las velocidades de carga orgánica y pudiéndose así comparar la **Figura 34** con las **Figuras 35, 36 y 37**, por ejemplo, cuando los reactores se encuentran con una VCO de 1,25 hay un 6% de ácidos grasos volátiles totales en la DQO soluble siendo este valor muy bajo y por tanto provocando un funcionamiento estable en los reactores. Cuando se cambia a 1,5 VCO se produce un cambio bastante brusco en la relación aumentando la cantidad de ácidos grasos volátiles con un 68% en la DQO soluble, es por este motivo que los reactores comienzan a funcionar de forma inadecuada y corroborándose así la acidificación del reactor

en comparación de su anterior velocidad de carga orgánica. Por último, la cantidad de ácidos grasos volátiles cuando la VCO es de 1 disminuye obteniéndose un valor del 41% en la DQO soluble, pero a pesar de la disminución sigue siendo un valor alto, por lo que los reactores fueron capaces de recuperarse totalmente. Es probable que, si la experiencia hubiese continuado, los reactores hubiesen disminuido la relación AGV/DQO soluble y podrían haber llegado a estabilizarse.

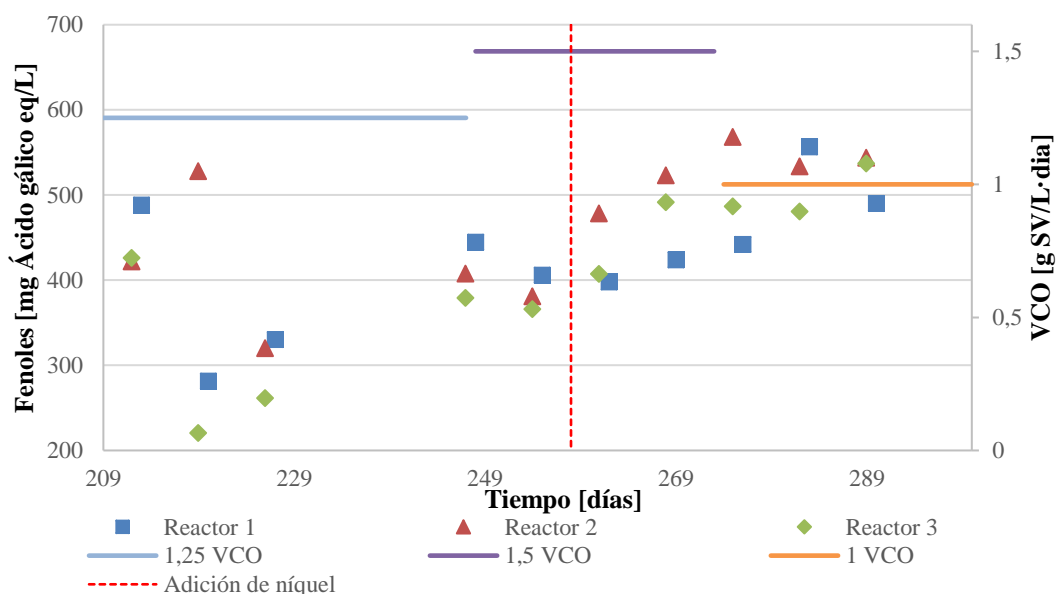


Figura 38. Cantidad de fenoles formados en los reactores de 170 °C a lo largo de la experiencia.

La concentración de fenoles en los reactores de pretratamiento hidrotérmico de 170 °C cuando se encontraban con una VCO de 1,25 se produjo una disminución en la concentración de fenoles en torno al 60%. Cuando se cambió a 1,5 VCO aumentó la cantidad de fenoles en los reactores en torno al 70%, volviéndose de forma más uniforme cuando se cambió a 1 VCO. Un reactor de digestión anaerobia se inhibe cuando llega a una concentración de 800 mg ácido gálico/L (Trujillo-Reyes et al., 2019). Como se observa en la **Figura 38** a lo largo de la experiencia han ido aumentando la cantidad de fenoles, llegando a un valor máximo de 569 mg ácido gálico/L, provocando una acumulación en los reactores debido a que no se está degradando completamente la materia orgánica.

4.2.1.4 Producción de biogas y biodegradabilidad

A continuación, se muestra en la **Figura 39** la cantidad de metano producido en los 3 reactores alimentados con las fases obtenidas del pretratamiento hidrotérmico a 170 °C.

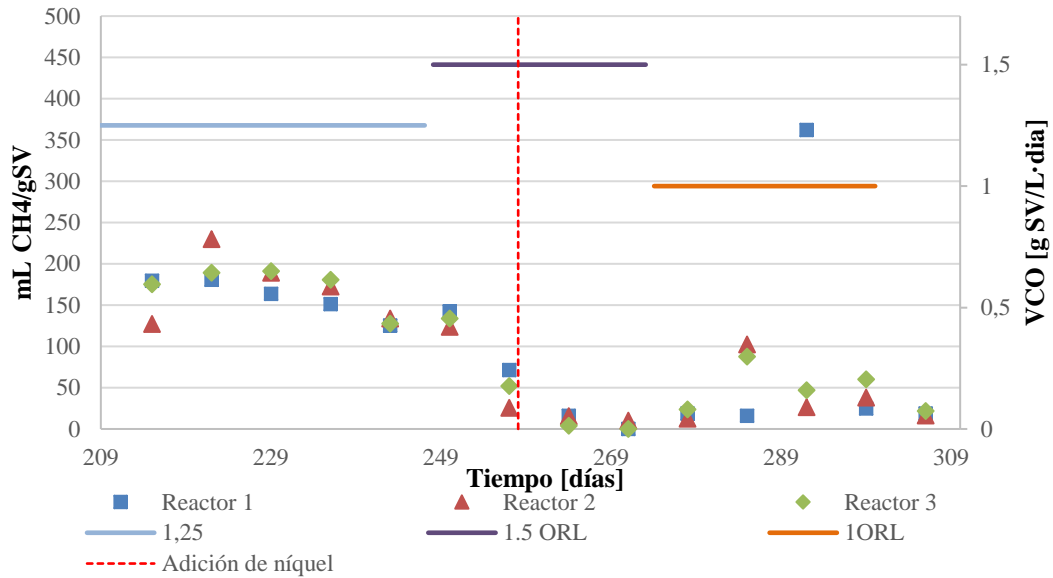


Figura 39. Producción de biogás semanal en mL CH₄/g SV.

Como se puede observar en la **Figura 39** al principio de la experiencia cuando los reactores se estaban alimentando con una VCO de 1,25 producían 163 ± 53 mL CH₄/g SV manteniéndose prácticamente entre ese rango, pero una vez se cambió a 1,5 VCO se puede observar cómo se produce una caída brusca en la producción cuya media es de entre $15 \pm 7,07$ mL CH₄/g SV, esto puede deberse al aumento de los AGV, ya que si el pH cae a valores más ácidos, también lo hará la concentración de CH₄ y por tanto la actividad biológica cesa (Arhoun et al., 2017). A partir del día 258 se produce la adición de níquel y aún así no produjo una mejora en el rendimiento de los reactores cuando la VCO. Como la producción del reactor era prácticamente nula se decidió volver a cambiar la VCO a 1. Es muy probable que los datos obtenidos fueran tan bajos puesto que se estaba produciendo acumulación de materia orgánica, al no degradarse completamente, por ese motivo se pudo producir menos cantidad de metano. A partir del momento en el que se cambia a 1 VCO se puede notar una mejora en la producción de biogás, pero es muy tenue siendo esta entre $35,4 \pm 17,67$ mL CH₄/g SV, si este cambio se hubiera prolongado durante más tiempo lo más probable es que el reactor se hubiese estabilizado. Debido al Covid-19 no se pudieron registrar más valores de la producción del biogás porque se tuvieron que parar los reactores.

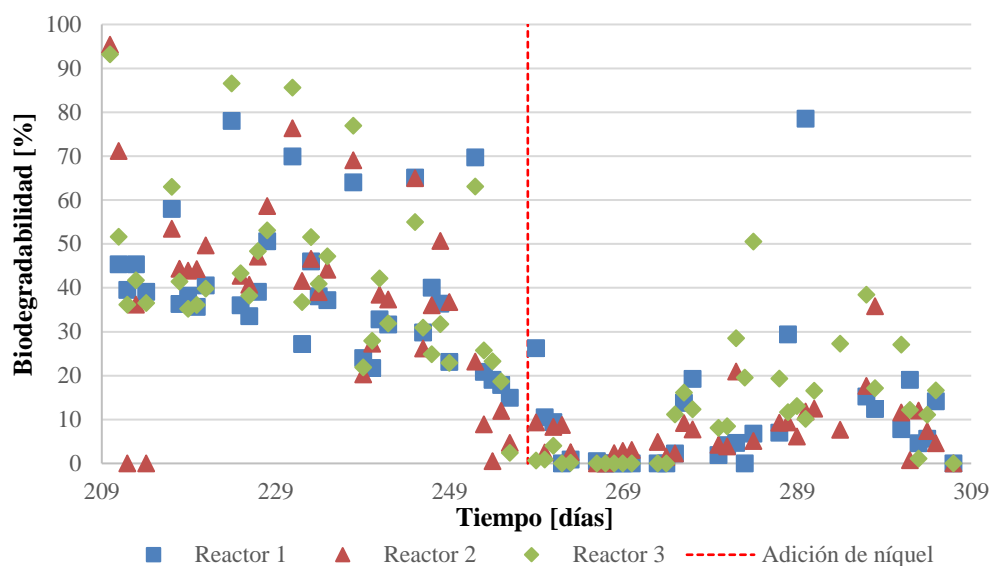


Figura 40. Biodegradabilidad de la materia orgánica.

La biodegradabilidad compara la cantidad de materia orgánica que se ha degradado en el reactor. Como se observa en la **Figura 40** al principio de la experiencia se consumía correctamente la materia orgánica, produciendo para 1,25 VCO 46% de biodegradabilidad, pero cuando se fueron produciendo acumulaciones no se consumía totalmente provocando cuando la VCO era de 1,5 (día 248) una biodegradabilidad del 12%. Cuando se cambió el día 274 a 1 VCO se obtuvo una biodegradabilidad del 23% habiendo mejorado con respecto a la VCO 1,5. Esta acumulación la facilita la relación entre la DQO del metano y la DQO soluble ya que no coincide su suma con la cantidad de DQO_{total}, esto se puede comprobar en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Comprobación en porcentaje de la acumulación en los reactores.

		DQO _{soluble} en la DQO _{total} [%] diariamente	DQO _{CH4} en la DQO _{total} [%]
170 °C	1,25	23	46
	1,5	28	12
	1		23

Como se puede corroborar en la **Tabla 5**, para ninguna velocidad de carga orgánica la suma de la DQO_{soluble} con la DQO_{CH4} coincide con la DQO_{total}. En el caso de la velocidad de carga orgánica de 1,25 se observa claramente que se producen acumulaciones ya que diariamente se acumula un 23 % de la DQO_{soluble} en la DQO_{total}.

4.2.2 Estudio de la digestión anaerobia del EFR tras el pretratamiento hidrotérmico a 220 °C y extracción de compuestos fenólicos

A continuación, se van a presentar los resultados de la caracterización de los reactores alimentados con el EFR cuyo tratamiento hidrotérmico fue de 220 °C.

4.2.2.1 Estudio de la evolución del pH y alcalinidad

En la **Figura 41** y **42** se van a mostrar los resultados del pH y la alcalinidad durante la experiencia.

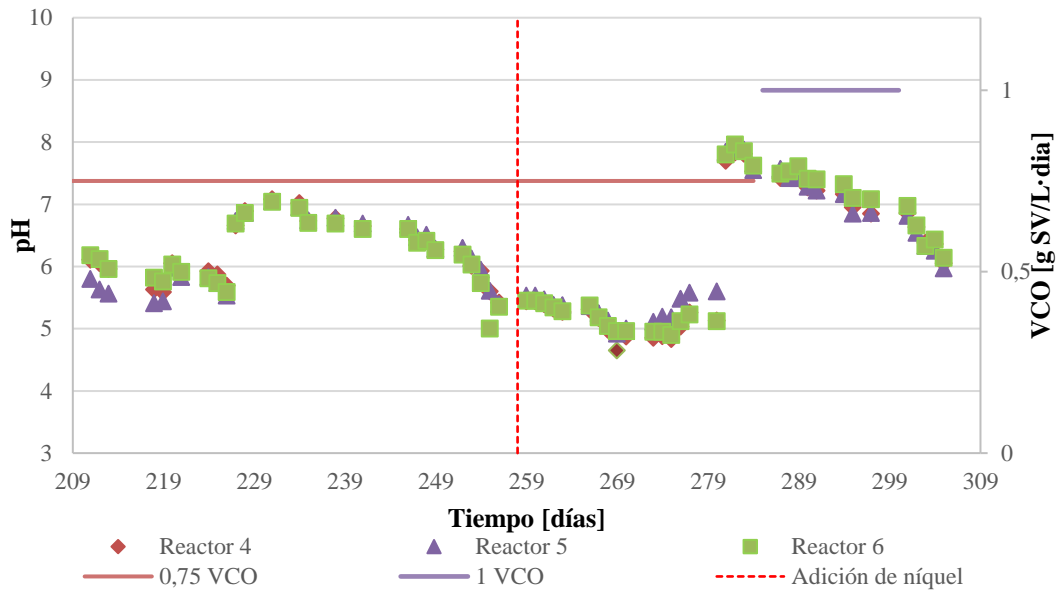


Figura 41. Evolución del pH para los reactores de 220 °C.

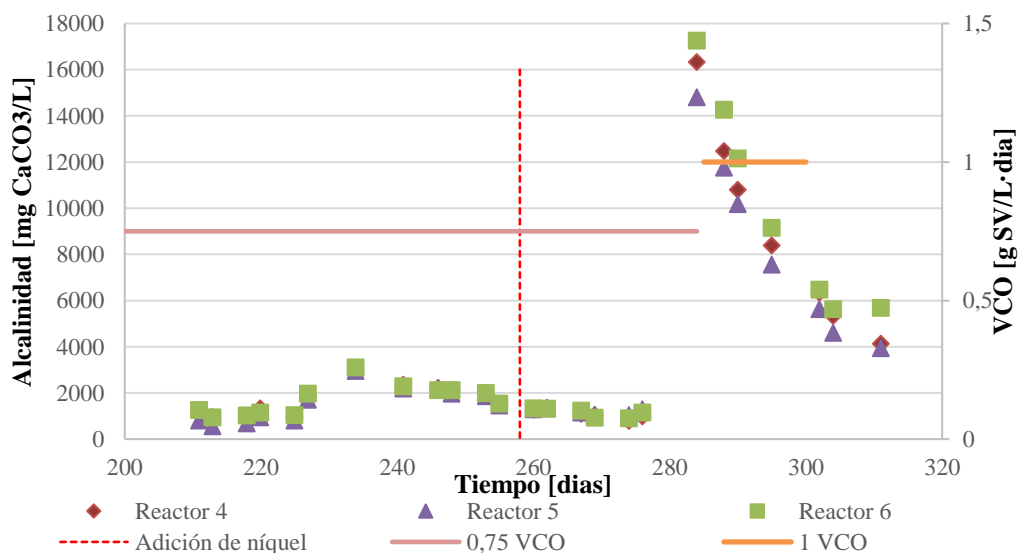


Figura 42. Evolución de la alcalinidad en los reactores de 220 °C a lo largo de la experiencia.

En la **Figura 41**, se observa que los reactores de 220 °C no han funcionado correctamente a lo largo de la experiencia ya que para que su pH se encontrase dentro del rango óptimo de la digestión anaerobia (6,5-7,5)

ha hecho falta inyección de bicarbonato sódico cada cierto periodo de tiempo. Desde el día 209 hasta el día 229 se mantuvieron aproximadamente constantes, cuyo pH era de 6 pudiéndose considerar cierta estabilidad. A partir de ese día se les inyectaron a los reactores bicarbonato sódico para que aumentase un poco su pH, pero volvió a descender produciéndose una acidificación llegando a un pH de hasta 4,5. Por última estancia se decidió aumentar el pH a 7,8 al igual que con los reactores de 170 °C el día 281, y también se decidió aumentar su VCO a 1, ya que como los reactores no estaban funcionando correctamente tras más de 280 días de operación se tomó la decisión de saturarlos al máximo para observar su duración antes de que los microorganismos dejaran de responder y por tanto produciéndose la muerte del reactor.

En la **Figura 42**, se puede verificar el descenso del pH, ya que disminuye la concentración de la alcalinidad en cada reactor. Los valores de la alcalinidad son prácticamente idénticos en los 3 reactores, al principio se mantenían con una concentración de entre 1.500 mg CaCO₃/L, pero a partir del día 274 que fue cuando se inyectó bicarbonato, por eso la subida repentina de la alcalinidad, empezó a decaer de nuevo hasta los 4.000 mg CaCO₃/L. A pesar de que el día 259 se le inyectase la concentración de níquel, se puede observar que no se produzco ninguna mejoría relevante en los reactores.

4.2.2.2 Comparación de los sólidos en los reactores de digestion anaerobia

En las **Figuras 43 y 44** se recogen los datos obtenidos de los sólidos totales y volátiles durante toda la experiencia.

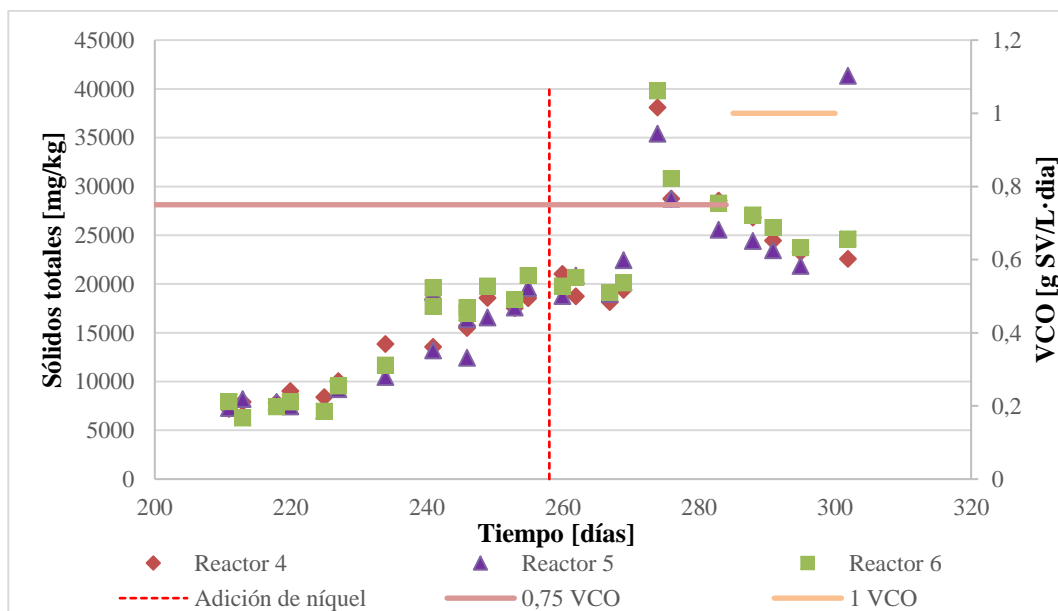


Figura 43. Evolución de los sólidos totales en los reactores de 220 °C a lo largo de la experiencia.

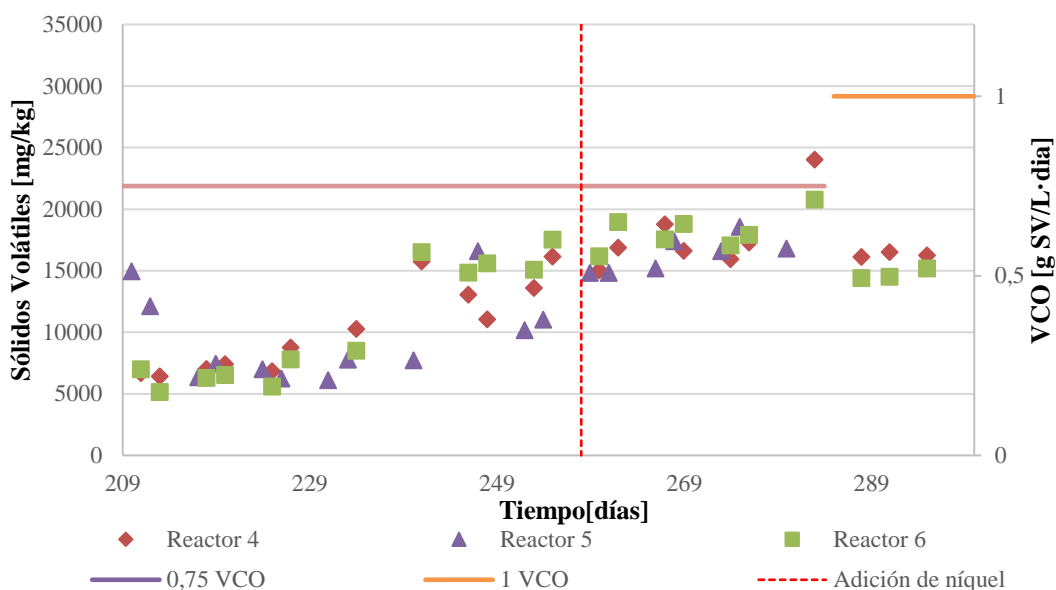


Figura 44. Evolución de la cantidad presente en los reactores de 220°C de sólidos volátiles.

Como se puede observar en las **Figuras 43 y 44**, la cantidad de sólidos totales cuando la VCO es de 0,75 se obtiene un valor medio de 15.688 ± 7.400 mg/kg mientras que los sólidos volátiles tienen un valor medio de 13.013 ± 4.200 mg/kg quedando más del 80% de materia orgánica tras el proceso de digestión anaerobia. Al igual que sucede en el pretratamiento hidrotérmico de 170 °C se produce un cambio brusco en la cantidad de sólidos totales a partir del día 274, esto se debe a que los reactores no estaban teniendo un buen funcionamiento y como se ha comentado anteriormente el pH estaba disminuyendo bruscamente, por este motivo se les inyectaron a los reactores bicarbonato sódico. Cuando se cambió la VCO a 1 la cantidad de sólidos totales tienen un valor medio de 26.660 ± 4.140 correspondiéndose un 77% a los sólidos volátiles. En este caso se produce un aumento de los sólidos totales ya que se podía haber acumulado el bicarbonato añadido, al igual que sucedió en el pretratamiento hidrotérmico de 170 °C. Se puede observar que tras la inyección de níquel no se produce ninguna mejora en los reactores.

4.2.2.3 Estudio de la evolución de la materia orgánica soluble en los reactores

En la **Figura 45** se muestran los valores de la DQO soluble, en las **Figuras 46, 47 y 48** se muestran los ácidos grasos volátiles y en la **Figura 49** los fenoles correspondientes a los reactores de pretratamiento hidrotérmico a 220 °C.

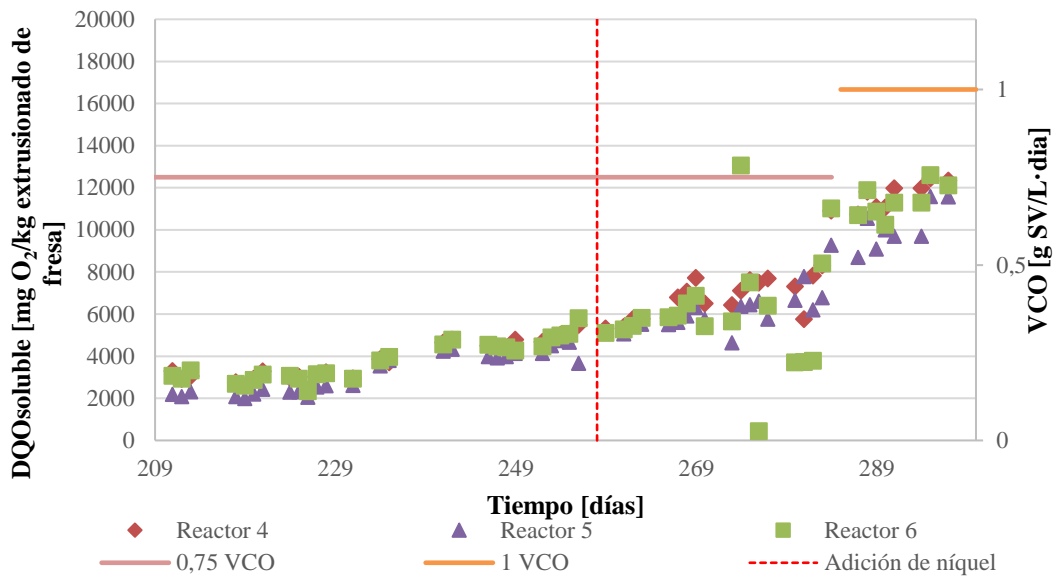


Figura 45. Evolución de la degradación química de oxígeno para los reactores de 220 °C a lo largo de la experiencia.

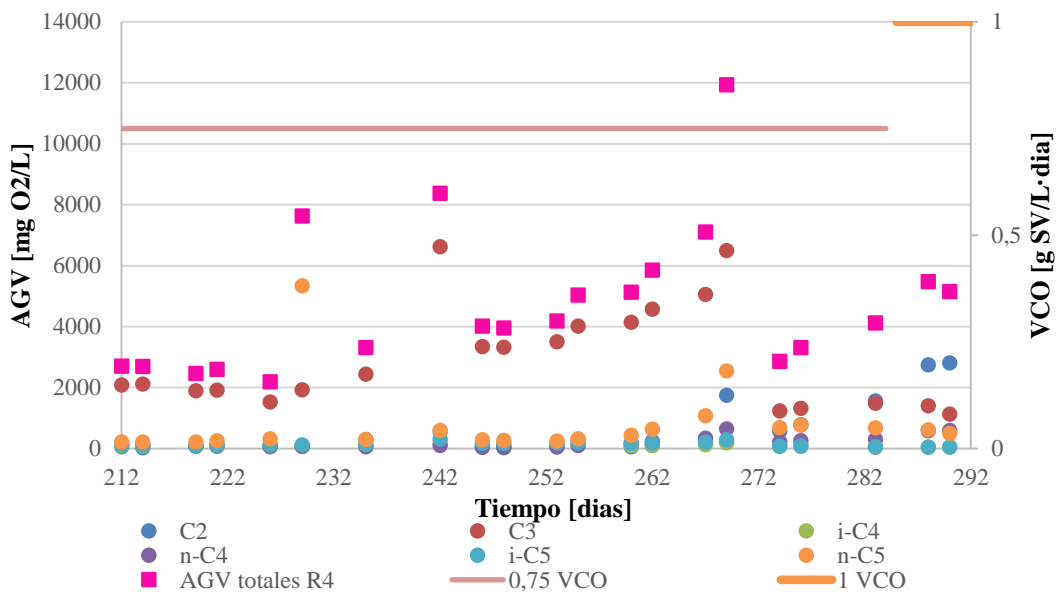


Figura 46. Ácidos grasos volátiles presentes en el reactor 4 a lo largo de la experiencia.

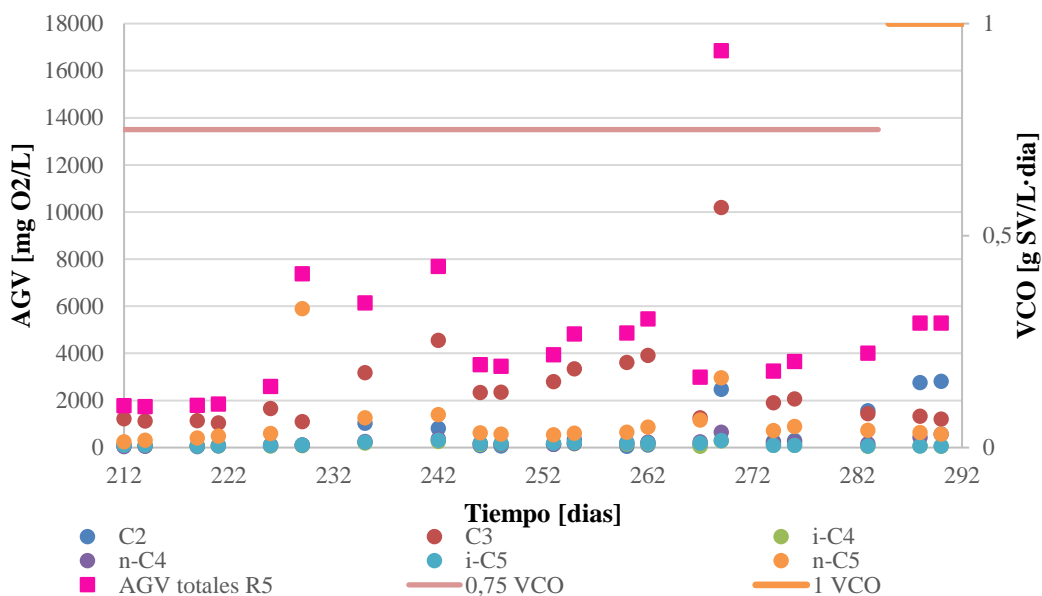


Figura 47. Ácidos grasos volátiles en el reactor 5 a lo largo de la experiencia.

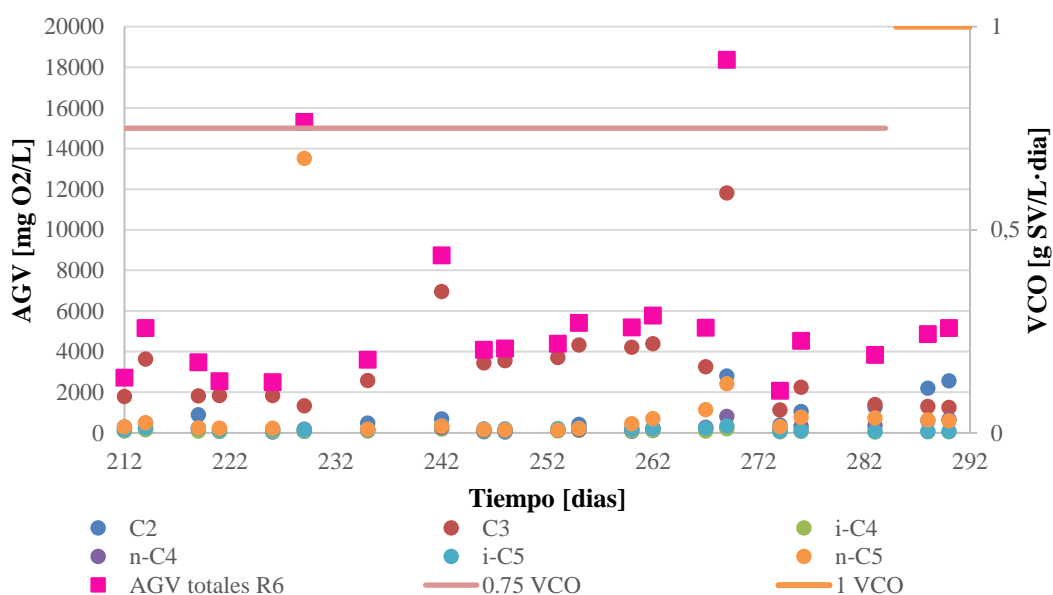


Figura 48. Ácidos grasos volátiles presentes en el reactor 6 a lo largo de la experiencia.

En la **Figura 45**, se puede observar que a lo largo de la experiencia la DQO soluble aumenta gradualmente. En este pretratamiento térmico los reactores se encuentran inestables prácticamente en toda la experiencia. Al igual que sucede en los reactores de 170 °C los reactores no son capaces de consumir la materia orgánica debido a la alta acidificación del reactor e inhibe el proceso.

En las **Figuras 45, 46 y 47** se representan los ácidos grasos volátiles de los reactores 4, 5 y 6. En todas las figuras se muestra que los ácidos no se han mantenido constantes en ningún momento, sino que los reactores han estado acidificados. Por eso se puede explicar el mal funcionamiento de los reactores a lo largo de toda la experiencia incluyendo así la acumulación de materia orgánica. En todos los reactores se ve que el ácido propiónico concretamente es el que se encuentra más descontrolado. En comparación con las **Figuras 35, 36 y**

37 que los ácidos empiezan a aumentar a partir del día 252. Al aumentar los ácidos provocan la acidificación en el reactor y así confirmando el aumento gradual de la DQO soluble, la disminución del pH y una inhibición del proceso. Si se comparan los valores de los ácidos grasos volátiles totales con respecto a la DQO soluble se observa que el 85% de AGV corresponden con la DQO soluble cuando su VCO es de 0,75. Este valor es muy elevado, provocando el mal funcionamiento de los reactores. En el caso de 1 VCO se observa una disminución de AGV en la DQO soluble, siendo este valor del 43%.

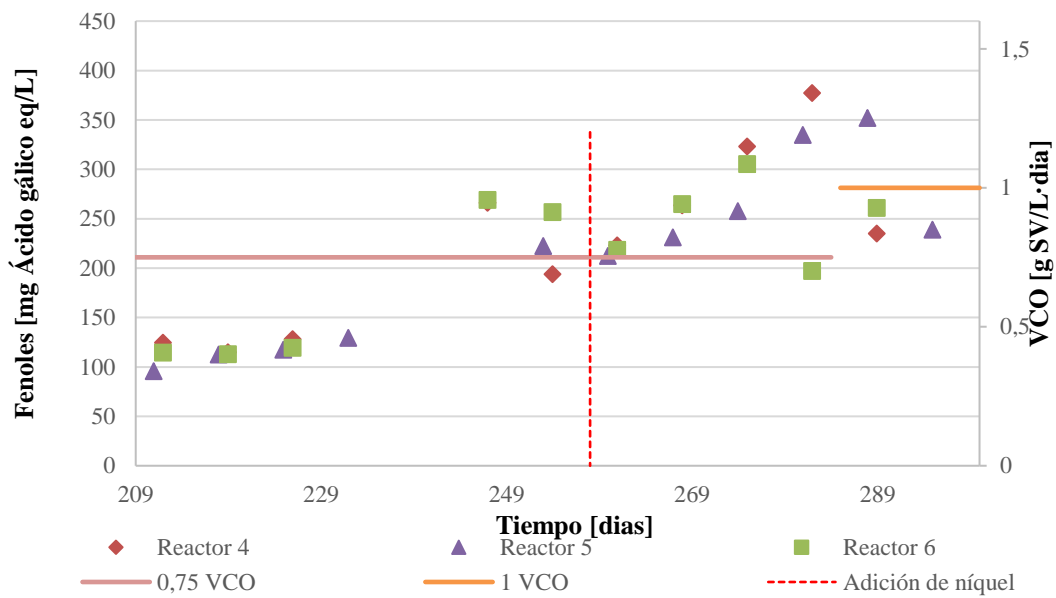


Figura 49. Cantidad de fenoles formados en los reactores de 220 °C a lo largo de la experiencia.

La concentración de fenoles en los reactores de pretratamiento hidrotérmico de 220 °C ha ido aumentando a lo largo de la experiencia. Esto se puede deber a que se han ido acumulando en los reactores, ya no se está biodegradando la materia orgánica completamente. Un reactor de digestión anaerobia se inhibe cuando llega a una concentración de 800 mg ácido gálico/L (Trujillo-Reyes et al., 2019). Como se observa en la **Figura 49** a lo largo de la experiencia han ido aumentando la cantidad de fenoles, provocando una acumulación en los reactores debido a que no se está degradando completamente la materia orgánica.

4.2.2.4 Biodegradabilidad y producción de biogas

A continuación, se muestra en la **Figura 50** la cantidad de metano producido en los 3 reactores alimentados con las fases obtenidas del pretratamiento hidrotérmico a 220 °C.

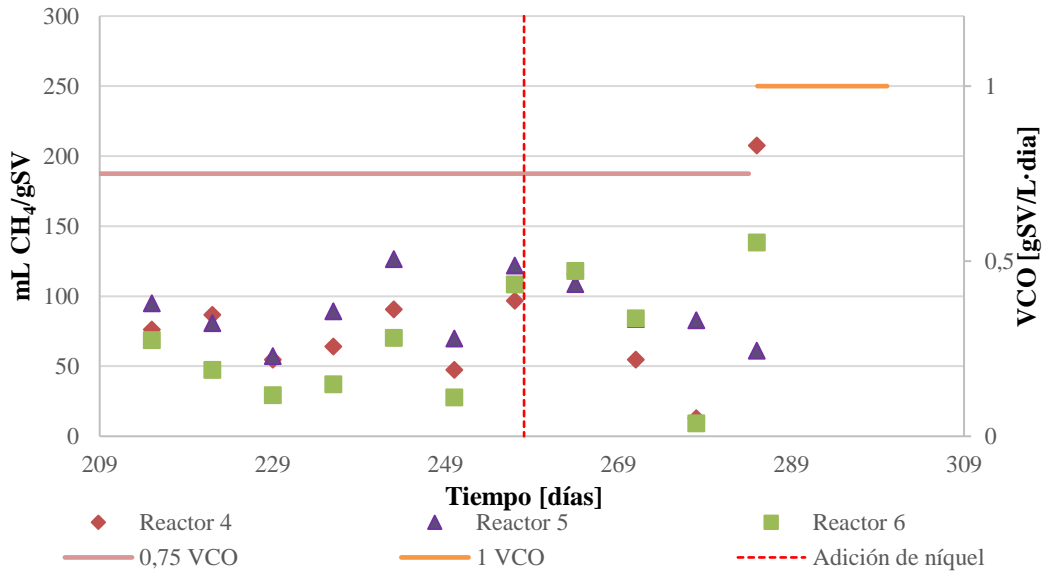


Figura 50. Producción de biogás en mL CH₄/g SV.

En la **Figura 50**, se muestra una media semanal de la producción de biogás de cada uno de los reactores que operaban con la alimentación del pretratamiento hidrotérmico de 220 °C. Al principio cuando el reactor operaba con 0,75 VCO los valores de producción de biogás tenía un valor medio de $78 \pm 13,5$ mL CH₄/g SV siendo este valor más bajo que en el pretratamiento anterior. El día 258 del proceso se inyectó níquel, pero no se produjo ninguna mejora en la producción, al contrario, los valores de producción disminuyeron, pero no tiene porqué tener toda la responsabilidad el níquel, ya que como se ha comprobado con los otros datos de caracterización de los reactores, se estaban produciendo acumulaciones de materia orgánica y por tanto esto también pudo afectar al reactor. Una vez que se cambió a 1 VCO la producción media de los tres reactores fue de 136 ± 76 debido a la alta desviación y a las respuestas generadas de la caracterización, el día 310 de la experiencia se desconectaron contemplando que no se iba a conseguir una recuperación.

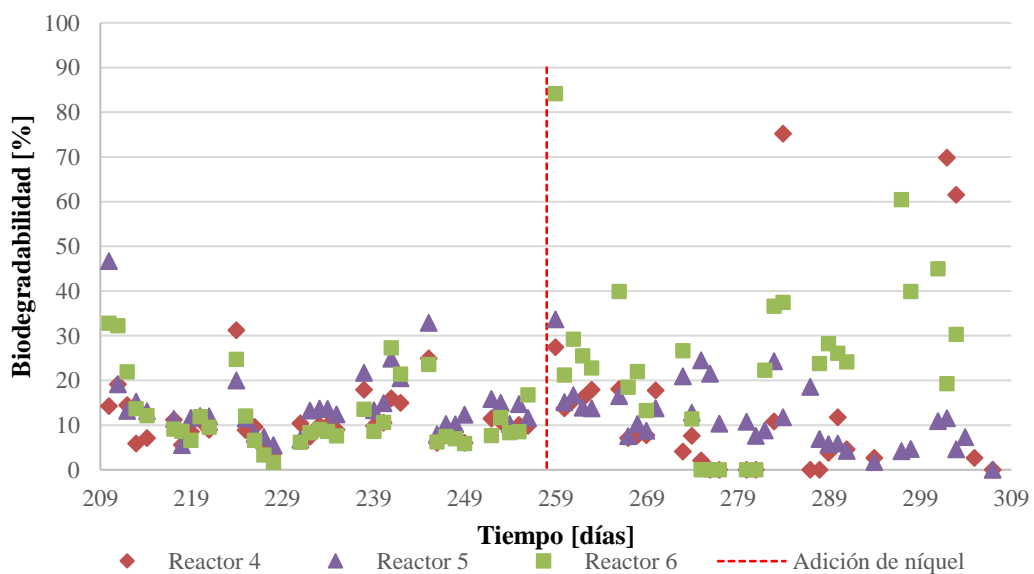


Figura 51. Biodegradabilidad de la materia orgánica.

Por último, en la **Figura 51**, se observa que durante toda la experiencia la materia orgánica no se ha degradado completamente, saliendo una biodegradabilidad del 16% cuando la VCO se encontraba en 0,75. Cuando se aumentó la velocidad de carga orgánica a 1 (día 287), la biodegradabilidad aumentó siendo un 7%, corroborando de esta forma que se estaba produciendo una acumulación en los reactores al no coincidir la relación entre la DQO del metano y la DQO soluble ya que no coincide su suma con la cantidad de DQO_{total}. En este caso, ambas velocidades de carga orgánica se observan claramente que se producen acumulaciones ya que dan porcentajes muy superiores al 100%. Es por eso que en la **Tabla 6** se representan las acumulaciones diarias de DQO_{soluble} en los reactores y la acumulación total de la DQO_{CH4}.

Tabla 6. Comprobación en porcentaje de la acumulación en los reactores.

		DQO_{soluble} en la DQO_{total} [%]	DQO_{CH4} en la DQO_{total} [%]
220 °C	0,75	78	16
	1	24	7

5 CONCLUSIONES

Tras los ensayos realizados al EFR y tras el posterior pretratamiento hidrotérmico y la extracción de los compuestos bioactivos se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Se ha obtenido una solubilización de la materia orgánica en DQO de un 42% en el pretratamiento hidrotérmico de 170 °C y un 40% en el pretratamiento hidrotérmico de 220 °C.

- Tras los pretratamientos hidrotérmicos y extracción de compuestos fenólicos se ha obtenido un valor de 3.261 ± 187 mg ácido gálico/kg FLE en el pretratamiento de 170 °C y un valor de 310 ± 221 mg ácido gálico/kg EFR en FLE tras el pretratamiento hidrotérmico de 220 °C. Este proceso de extracción de compuesto fenólicos podría ser beneficioso ya que se podría sacar rentabilidad económica y también es beneficiosa para la digestión anaerobia, ya que estos compuestos a altas concentraciones son inhibitorios.

- En el estudio de la digestión anaerobia del pretratamiento hidrotérmico a 170 °C tras probar las diferentes velocidades de cargas orgánicas se ha concluido que la mayor velocidad de carga orgánica que los reactores son capaces de soportar es 1,25 g SV/L·d obteniéndose una producción de biogás de 242 ± 31 mL CH₄/g SV·d. La biodegradabilidad para esa VCO es un 46% de metano y una acumulación diaria de DQO soluble del 23% en el reactor.

- En el caso del pretratamiento hidrotérmico a 220°C tras las dos velocidades de carga orgánica se ha concluido que la mayor velocidad de carga orgánica que los reactores son capaces de soportar es 0,75 obteniéndose una producción de biogás de 109 ± 36 mL CH₄/g SV·d. La biodegradabilidad para esa VCO es un 16% de metano y una acumulación del 78%.

- Tras la adición de metales traza en los reactores, concretamente 5 mg/L níquel, se pudo comprobar que a lo largo de la experiencia no produjo ninguna mejora en la producción de biogás en ninguno de los dos pretratamientos hidrotérmicos. De hecho, en el caso del pretratamiento hidrotérmico de 170 °C, los valores de producción de metano medios antes de la inyección de níquel para 1,25 VCO estaban en torno a 221 ± 32 mL/g SV·d y tras la inyección de níquel bajó a 47 ± 56 mL/g SV·d, teniendo en cuenta cantidad de materia orgánica y la acumulación de la misma es probable que la adición del níquel no fuese la culpable de la decadencia en la producción. No se ha podido verificar este hecho, aunque convendría confirmar esta teoría. Por último, en el caso del pretratamiento hidrotérmico de 220 °C los valores de producción de metano antes de la inyección de níquel para 0,75 VCO eran de 97 ± 32 mL/g SV y tras la inyección aumenta a 130 ± 45 mL/g SV·d. Quizás la adición de níquel no funcionase adecuadamente en los reactores ya que de por sí no estaban teniendo un buen

funcionamiento comprobándose con los parámetros medidos. En los reactores de pretratamiento hidrotérmico de 170 °C si se hubiese adicionado cuando su velocidad de carga orgánica era de 1,25 es probable que si hubiera mejorado la producción ya que para esa VCO se podía considerar que los reactores trabajaban adecuadamente. En el caso del pretratamiento hidrotérmico a 220 °C para 0,75 VCO los reactores podían considerarse estables y es por esta razón que al adicionar el níquel mejoró un poco la producción.

- Si esta operación de digestión anaerobia se llevase a gran escala (volúmenes mayores a X, L), se disminuiría la cantidad de bioresiduos que se almacenan en los vertederos, por tanto, se podría producir gran cantidad de biogás, que podría ser utilizado como un combustible limpio, por lo que no provocaría tanta contaminación al medio ambiente. Sería conveniente para ver si este proceso es viable económica y medioambientalmente realizar un análisis económico y un análisis de ciclo de vida que corroboraría la eficacia del proceso. Además, si se implantase en el proceso la extracción de compuestos fenólicos en el análisis de ciclo de vida se comprobaría si es factible. Hay estudios realizados al EFR que confirman que económicamente sería factible.

6 REFERENCIAS

- Alarcón-Corredor, O, M., 2009. Los elementos traza. *Revista Médica de la extensión Portuguesa* 4 (3), 107–124.
- Alonso Segovia, G., 2019. Efecto de elementos traza en la digestión anaerobia del residuo de fresa. Trabajo fin de máster. Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Universidad de Sevilla.
- Altas, L., 2009. Inhibitory effect of heavy metals on methane-producing anaerobic granular sludge. *Journal of hazardous materials* 162 (2–3), 1551–1556. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.048>
- APHA, 2012. *Standar Methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA.
- Arhoun, B., Gomez-lahoz, C., Abdala-diaz, R.T., Rodriguez-maroto, M., Garcia-herruzo, F., Vereda-alonso, C., Arhoun, B., Gomez-lahoz, C., Abdala-diaz, R.T., 2017. Toxic / Hazardous Substances and Environmental Engineering Production of biogas from co-digestion of livestock and agricultural residues : A case study. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 52, 856–861. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1312189>
- Cao, W., Wang, M., Liu, M., Zhang, Z., Sun, Z., Miao, Y., Sun, C., 2018. The chemical and dynamic distribution characteristics of iron, cobalt and nickel in three different anaerobic digestates: Effect of pH and trace elements dosage. *Bioresource Technology* 269, 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.094>
- Demirel, B., Scherer, P., 2011. Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass and Bioenergy* 35, 992–998. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.022>
- Dische, Z., 1962. Color reactions of carbohydrates In *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Vol 1, (Whistler RL, editor; and Wolfrom ML, editor., Eds).
- Eurostat, 2020. Recycling of

- biowaste. https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/cei_wm030/default/table?lang=en (accessed 2.20.20).
- FAOSTAT, 2020. Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (accessed 1.23.20).
- Fermoso, Fernando G., Bartacek, J., Jansen, S., Lens, P.N.L., 2009. Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.043>
- Fermoso, F.G., Bartacek, J., Jansen, S., Lens, P.N.L., 2008. Metal supplementation to UASB bioreactors : from cell-metal interactions to full-scale application. *Science of the Total Environment*, The 407, 3652–3667. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.043>
- Fermoso, Fernando G, Collins, G., Bartacek, J., Flaherty, V.O., Lens, P., 2009. Acidification of methanol-fed anaerobic granular sludge bioreactors by cobalt deprivation: Induction and microbial community dynamics. *Biotechnology and bioengineering* 99(1), 49-58. <https://doi.org/10.1002/bit.21528>
- Francesca, G., Sara, T., José, A., Jose, L. Q., Bruno, M., & Maurizio, B., 2012. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 28, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Gagneten, M., Corfield, R., Mattson, M.G., Sozzi, A., Leiva, G., Salvatori, D., Schebor, C., 2019. Spray-dried powders from berries extracts obtained upon several processing steps to improve the bioactive components content. *Powder Technology* 342, 1008–1015. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.09.048>
- García Martínez E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A., 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu.
- González, E., Sanhueza, M., Vargas, A., L, D.A., 2005. Medición de ácidos grasos volátiles mediante la degradación anaerobia de un vertido salino. *Journal of chemical technology and biotechnology* 6.
- Grau Vilalta, M.D., 1999. Estudio del comportamiento de reactores discontinuos y semicontinuos: modelización y comprobación experimental. Universidad Politécnica de Cataluña.
- Gutiérrez, M., Carlos, L., & Pérez Olmo, J.M., 2003. Proceso para el tratamiento biológico anaerobio de aguas residuales industriales. Monografía, 306-338.
- Hemmati, S., Ahmeda, A., Salehabadi, Y., Zangeneh, A., Zangeneh, M.M., 2020. Synthesis, characterization, and evaluation of cytotoxicity, antioxidant, antifungal, antibacterial, and cutaneous wound healing effects of copper nanoparticles using the aqueous extract of Strawberry fruit and L-Ascorbic acid. *Polyhedron* 114425. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2020.114425>

- HUDISA, 2020. Hudisa.<http://www.hudisa.es/> (accessed 3.5.20).
- Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Ganadería, P. y D.S., 2019a. Producción en Andalucía. <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/areas/agricultura/sanidad-vegetal/paginas/produccion-integrada-atrías-material-divulgativo.html> (accessed 2.17.20).
- Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Ganadería, P. y D.S., 2019b. Producción y posesión de residuos. <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente> (accessed 2.18.20).
- Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Ganadería, P. y D.S. (Ed.), 2008. La fresa de Huelva. Viceconsejería. Servicio de Publicaciones y Divulgación.
- Karthikeyan, O.P., Trably, E., Mehariya, S., Bernet, N., Wong, J.W.C., Carrere, H., 2018. Bioresource Technology Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery : A review. *Bioresource Technology* 249, 1025–1039. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.105>
- Kelebek, H., Selli, S., 2011. Characterization of phenolic compounds in strawberry fruits by RP-HPLC-DAD and investigation of their antioxidant capacity. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 34, 2495–2504. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.591029>
- Ley Orgánica, 22/2011, 2011. 28 de julio, Residuos y suelos contaminados. (BOE núm. 181, 29 de Julio 2011, pp.85650 a 85705).
- Li, C., Fang, H.H.P., 2007. Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge. *Chemosphere* 67, 668–673. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.005>
- Lorenzo Acosta Yaniris, O.A.M.C., 2005. Digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte 1. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. *Icida* 1, 35–48.
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A.R., 2004. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (20), 6178–6187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf049450r>
- MAPA, 2019. Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. <https://www.mapa.gob.es/es/> (accessed 4.14.20).
- Pérez, A., 2019. Volumen de fresas exportadas desde España a los distintos países de la Unión Europea en 2018. <https://es.statista.com/estadisticas/509844/exportaciones-de-fresas-en-espana-por-pais-de-destino/> (accessed 3.12.20).
- Pérez, A., Torres, P., 2008. Indices de alcalinidad para el control del tratamiento anaerobio de aguas residuales fácilmente acidificables (Alkalinity indices for control of anaerobic treatment of readily acidifiable wastewaters). *Ingeniería y Competitividad* 10, 41–52.

- Rincón, B., Rodríguez-gutiérrez, G., Bujalance, L., Fernández-bola, J., Borja, R., 2016. Influence of a steam-explosion pre-treatment on the methane yield and kinetics of anaerobic digestion of two-phase olive mill solid waste or alperujo 2, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.04.010>
- Rodicio, J.M., 2013. Estudio del comportamiento de reactores anaerobios de tipo ASBR frente a compuestos de difícil degradación y/o efectores negativos.
- Rodríguez-Gutiérrez, G., Cardoso, J.C., Rubio-Senent, F., Serrano, A., Borja, R., Fernández-Bolaños, J., Fermoso, F.G., 2019. Thermally-treated strawberry extrudate: A rich source of antioxidant phenols and sugars. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 51, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.017>
- Rodríguez, M., Flórez, V., 2004. Elementos Esenciales Y Beneficiosos. Repositorio de la Producción Científica de la Universidad de Almería. Departamento de Agronomía. 25–36.
- Scaramboni, C., Urban, R.C., Lima-souza, M., Nogueira, R.F.P., Cardoso, A.A., Allen, A.G., Campos, M.L.A.M., 2015. Total sugars in atmospheric aerosols : An alternative tracer for biomass burning. *Atmospheric Environment* 100, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.11.003>
- Serrano, A., Fermoso, F.G., Alonso-Fariñas, B., Rodríguez-Gutierrez, G., Fernandez-Bolaños, J., Borja, R., 2017. Phenols recovery after steam explosion of Olive Mill Solid Waste and its influence on a subsequent biomethanization process. *Bioresource Technology* 243, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.093>
- Serrano, A., Siles, J.A., Gutiérrez, M.C., Martín, M.Á., 2015. Improvement of the biomethanization of sewage sludge by thermal pre-treatment and co-digestion with strawberry extrudate. *Journal of Cleaner Production* 90, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.11.039>
- Serrano Moral, A., 2015. Tratamiento de residuos y subproductos agroindustriales mediante co-digestión anaerobia. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Siles, A., Guti, M.C., Angeles, M., Serrano, A., 2016. Improvement of the biomethanization of sewage sludge by thermal pre-treatment. 90. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.11.039>
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. 16 (3), 144–158.
- Stevens, M. D., Black, B. L., Lea-Cox, J. D., Sadeghi, A. M., Harman-Fetcho, J., Pfeil, E., ... & Hapeman, C.J., 2009. A comparison of three cold-climate strawberry production systems: Environmental effects. *HortScience* 44 (2), 298–305.
- Thompson, W.H., Leege, P.B., Millner, P.D., Watson, M.E., 2001. Test methods for the examination of composting and compost. The United States Composting Council Research and Education Foundation.

The United States Department of Agriculture.

Toledo, M., Siles, J., & Martín, M., 2018. Multivariate analysis and biodegradability test to evaluate different organic wastes for biological treatments: Anaerobic co-digestion and co-composting. *Waste Management*. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.06.052>

Trujillo-Reyes, Á., Cubero-Cardoso, J., Rodríguez-Gutiérrez, G., García-Martín, J.F., Rodríguez-Galán, M., Borja, R., Serrano, A., Famoso, F.G., 2019. Extraction of phenolic compounds and production of biomethane from strawberry and raspberry extrudates. *Biochemical Engineering Journal* 147, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.023>

Vallee, B. L., & Ulmer, D.D., 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annual review of biochemistry* 41(1), 91–128.

Wang, J. Y., Liu, X. Y., Kao, J. C., & Stabnikova, O., 2006. Digestion of pre-treated food waste in a hybrid anaerobic solid–liquid (HASL) system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81(3), 345/351.

Żebrowska, J., Dyduch-Siemińska, M., Gawroński, J., Jackowska, I., & Pabich, M., 2019. Genetic estimates of antioxidant properties in the conventionally and in vitro propagated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch). *Food Chemistry* 299, 125110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125110>