

Proyecto Fin de Máster
Máster Universitario en Ingeniería Ambiental

Efecto de elementos traza en la digestión anaerobia
del residuo de fresa

Autor: Gabriel Alonso Segovia

Tutores: Bernabé Alonso Fariñas

Fernando González Feroso

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

Sevilla, 2019



Proyecto Fin de Máster
Máster Universitario en Ingeniería Ambiental

Efecto de elementos traza en la digestión anaerobia del residuo de fresa

Autor:

Gabriel Alonso Segovia

Tutores:

Bernabé Alonso Fariñas

Fernando González Feroso

Dpto. Ingeniería Química y Ambiental
Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2019

Proyecto Fin de Máster: Efecto de elementos traza en la digestión anaerobia del residuo de fresa

Autor: Gabriel Alonso Segovia

Tutores: Bernabé Alonso Fariñas
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, 2019

El Secretario del Tribunal

A mi familia y amigos

A mis maestros

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a todos los que me han ayudado en la realización de este trabajo. A mi tutor, Bernabé, por darme la oportunidad de trabajar con él. A mi tutor Fernando por confiar en mí una vez más y enseñarme tanto.

A todos mis compañeros de laboratorio por hacerme sentir como en casa y sin los cuales este trabajo no hubiera sido lo mismo. En especial agradecer a Juan, Ainoa y Ángeles por trasladarme su experiencia en el laboratorio y por estar siempre dispuestos a ayudarme.

A todos los profesores del Máster de Ingeniería Ambiental, por su esfuerzo y dedicación en estos años. Porque sigan motivándonos en nuestro camino laboral.

A mi familia y amigos por apoyarme y animarme a seguir estudiando, muchas gracias por todo.

Gabriel Alonso Segovia

Sevilla, 2019

La deficiencia de elementos traza en los microorganismos que realizan tratamientos biológicos de aguas residuales es más común de lo que se podría esperar. En el presente trabajo, se ha estudiado si existe una deficiencia de elementos traza en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual en régimen discontinuo. Es importante comprender los requisitos específicos de elementos traza en los microorganismos anaerobios con el objetivo de añadir sólo los elementos traza que pudiesen ser necesarios para mejorar el rendimiento de degradación del sustrato y su conversión a metano, así como reducir los costes operativos de esta adición de elementos traza. El objetivo de este trabajo fue evaluar la adición de seis metales esenciales (Co, Ni, Fe, Cu, Mn y Zn) para mejorar el rendimiento de la producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual. La evaluación de la adición de los elementos traza sobre el rendimiento de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual se ha realizado mediante un diseño estadístico de Plackett-Burman en base a la producción máxima de metano y a la velocidad máxima de producción de metano obtenidas experimentalmente en 9 condiciones de estudio definidas por el diseño estadístico. Para evaluar el potencial de recuperación de energía mediante digestión anaerobia, se ha realizado un ensayo de Potencial Bioquímico de Metano (PBM) para 9 condiciones de estudio, a las que se ha adicionado diferentes combinaciones de elementos traza. Este ensayo ha presentado una diferencia de 134 mL CH₄/mg SV entre la condición con mayor y menor producción máxima experimental de metano y una diferencia de 18 mL CH₄/mg SV d entre la condición con mayor y menor velocidad máxima de producción de metano en el rango de concentraciones de elementos traza estudiado. Los resultados de este ensayo han demostrado que la adición de Ni ha presentado un efecto significativamente positivo sobre la producción máxima de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual en el rango de concentraciones estudiado. Además, ningún metal estudiado ha presentado efectos significativamente negativos. En el caso del efecto de los elementos traza sobre la velocidad máxima de producción de metano, se ha observado que la adición de Zn presenta un efecto significativamente positivo. Por el contrario, la adición de Ni y Fe ha presentado un efecto significativamente negativo en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual en el rango de concentraciones estudiado. Cabe destacar el caso del Ni, el cual ha presentado un efecto significativamente positivo sobre la producción máxima de metano y un efecto significativamente negativo sobre la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual en el rango de concentraciones estudiado.

Trace elements deficiency in microorganisms involved in biological wastewater treatments is more common than might be expected. In the present work, it has been studied if there is a deficiency of trace elements in the anaerobic digestion of residual strawberry extrudate carried out in batch mode. It is important to understand the specific requirements of trace elements in anaerobic microorganisms with the aim of adding only the trace elements that may be necessary to improve the substrate removal efficiency and, therefore its conversion to methane, as well as reducing the operating costs of the addition of trace elements. The aim of this work was to evaluate the addition of six metals (Co, Ni, Fe, Cu, Mn and Zn) to increase the methane production yield in the anaerobic digestion of residual strawberry extrudate. The evaluation of the addition of the trace elements on the methane yield in the anaerobic digestion of residual strawberry extrudate was carried out through a statistical design of Plackett-Burman based on the maximum methane production and the maximum methane production rate obtained experimentally in 9 tested conditions defined by statistical design. To evaluate the energy recovery potential by anaerobic digestion, Biochemical Methane Potential (BMP) test was carried out for 9 assayed conditions, for which different combinations of trace elements have been added. This test has presented a difference of 134 mL CH₄/mg VS between the condition with the highest and the lowest experimental maximum methane production and a difference of 18 mL CH₄/mg SV d between the condition with the highest and the lowest maximum methane production rate within the range of trace element concentrations studied. The results of these tests have demonstrated that the addition of Ni has a significantly positive effect on the maximum methane production in the batch anaerobic digestion of residual strawberry extrudate within the concentration range studied. In addition, no metal studied has significantly negative effects. In the case of the effect of trace elements on the maximum methane production rate, it has been observed that the addition of Zn has a significantly positive effect. By contrast, the addition of Ni and Fe presents a significantly negative effect on anaerobic digestion of residual strawberry extrudate within the concentration range studied. It should be noted the case of Ni, which has a significantly positive effect on the maximum methane production and a significantly negative effect on the maximum methane production rate in the anaerobic digestion of residual strawberry extrudate within the concentration range studied.

Agradecimientos	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
Índice	xv
Índice de Tablas	xvii
Índice de Figuras	xx
Notación	xxii
1. Introducción	1
1.1. <i>Importancia del sector de la fresa en el mundo</i>	1
1.2. <i>Generación de extrusionado de fresa residual</i>	2
1.3. <i>Tratamiento del extrusionado de fresa residual</i>	3
1.3.1. Definición de residuo y gestión de residuos a nivel europeo	3
1.3.2. Generación de residuos y valorización a nivel nacional	3
1.3.3. Alternativas para el tratamiento de residuos alimentarios	3
1.4. <i>Digestión anaerobia</i>	5
1.4.1. Etapas de la digestión anaerobia	5
1.4.2. Comparación de la digestión anaerobia frente a la aerobia	6
1.4.3. Inconvenientes y desafío para la mejora de la digestión anaerobia	7
1.5. <i>Importancia de los elementos traza</i>	8
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1. <i>Extrusionado de fresa residual e inóculo</i>	12
3.2. <i>Toma de muestra y conservación de extrusionado de fresa residual e inóculo</i>	12
3.3. <i>Técnicas analíticas empleadas en la caracterización de extrusionado de fresa residual, inóculo y PBM</i>	13
3.3.1. pH	13
3.3.2. Alcalinidad	13
3.3.3. Sólidos totales (ST)	14
3.3.4. Sólidos minerales (SM)	14
3.3.5. Sólidos volátiles (SV)	15
3.3.6. Demanda química de oxígeno total y soluble (DQO _{total} y DQO _{soluble})	15
3.3.7. Fenoles totales y solubles	16
3.3.8. Azúcares solubles	18
3.3.9. Ácidos grasos volátiles (AGV)	19
3.3.10. Plasma acoplado inductivamente (ICP)	19
3.4. <i>Diseño estadístico de Plackett-Burman</i>	20
3.5. <i>Digestión anaerobia</i>	21
3.5.1. Inóculo	21
3.5.2. Sustrato	22
3.5.3. Factores experimentales	22

3.5.4	Procedimiento operativo	26
3.6.	<i>Estudio de la cinética</i>	27
4.	Resultados y discusión	28
4.1.	<i>Caracterización de extrusionado de fresa residual e inóculo</i>	28
4.2.	<i>Digestión anaerobia</i>	31
4.2.1	Caracterización analítica de las condiciones de estudio	31
4.2.2	Producción de metano experimental para cada condición de estudio	33
4.2.3	Producción máxima de metano experimental frente a la biodegradabilidad en cada condición de estudio	35
4.2.4	Parámetros obtenidos del modelo Logístico en cada condición de estudio	37
4.3.	<i>Correlación lineal entre los metales y los parámetros de estudio</i>	38
5.	Conclusiones	44
	Referencias	46

Índice de Tablas

Tabla 1. Métodos de gestión de residuos alimentarios y características para su selección (Bernstad & la Cour Jansen, 2012; Karthikeyan et al., 2018).	4
Tabla 2. Comparación entre digestión aerobia y anaerobia (Cervantes et al., 2007).	7
Tabla 3. Papel de algunos elementos traza esenciales en varias enzimas que catalizan las reacciones y transformaciones anaerobias (Fermoso et al., 2009).	9
Tabla 4. Matriz experimental de un diseño factorial fraccionado de Plackett-Burman para cada condición de estudio.	21
Tabla 5. Preparación de una disolución para 1 L de macronutrientes.	23
Tabla 6. Concentraciones de las diluciones de elementos traza preparados.	23
Tabla 7. Cantidades de inóculo, sustrato, macronutrientes, Na ₂ CO ₃ y agua destilada que se ha adicionado a las condiciones de estudio.	24
Tabla 8. Matriz de las concentraciones de elementos traza inicial, añadido y final en cada condición.	24
Tabla 9. Caracterización analítica: pH, humedad, sólidos, DQO _{total} , DQO _{soluble} , fenoles totales y azúcares de extrusionado de fresa residual con sus desviaciones estándar.	28
Tabla 10. Caracterización analítica: pH, alcalinidad y sólidos del inóculo con sus desviaciones estándar.	29
Tabla 11. Caracterización analítica: concentración de metales(mg de metal/kg de sólidos totales) en el extrusionado de fresa residual y en el inóculo.	30
Tabla 12. Caracterización analítica de los efluentes del proceso de digestión anaerobia al finalizar el ensayo de PBM con sus desviaciones estándar: pH, alcalinidad, sólidos totales, minerales y volátiles de las condiciones de estudio.	32
Tabla 13. Caracterización analítica de los efluentes del proceso de digestión anaerobia al finalizar el ensayo de PBM con sus desviaciones estándar: DQO _{soluble} , AGV, relación entre AGV y DQO _{soluble} , fenoles totales y fenoles solubles de las condiciones de estudio.	33
Tabla 14. Valores de biodegradabilidad en DQO, biodegradabilidad en SV y producción máxima de metano experimental de las diferentes condiciones de estudio con sus desviaciones estándar.	36
Tabla 15. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos con el modelo Logístico (Parámetro Sigmoidal 4) de las diferentes condiciones de estudio.	37
Tabla 16. Valores de los parámetros cinéticos y duplicados seleccionados a partir de los cuales se ha realizado el estudio estadístico.	38

Tabla 17. Resumen del modelo estadístico en el que se muestra el efecto de la adición de los metales estudiados sobre la producción máxima de metano del modelo Logístico ($P_{m\acute{a}x}$), la $P_{m\acute{a}x}$ con una re-parametrización y la velocidad máxima de producción de metano (R_m). También se recogen los valores de R^2 , R-ajustado, significancia del modelo y falta de ajuste para la $P_{m\acute{a}x}$, la $P_{m\acute{a}x}$ con re-parametrización y la R_m .

39

Índice de Figuras

Figura 1. Producción mundial de fresa en 2017 (FAO, 2019).	2
Figura 2. Diagrama esquemático del proceso de digestión anaerobia (adaptado de: Serrano (2015)).	6
Figura 3. Extrusionado de fresa residual.	12
Figura 4. Recta de calibrado de DQO_{soluble} con ftalato ácido de potasio.	16
Figura 5. Reacción de Folin-Ciocalteu (Gómez, 2014).	17
Figura 6. Recta de calibrado de fenoles con ácido gálico.	17
Figura 7. Formación de hidroximetilfurfural a partir de glucosa en medio ácido y su reacción con la antrona.	18
Figura 8. Recta de calibrado de azúcares con glucosa.	18
Figura 9. Sistema experimental para la determinación del Potencial Bioquímico de Metano (PBM).	26
Figura 10a. Producción de metano ($\text{mL CH}_4/\text{g SV}$) de las condiciones 1, 2 y 3 con sus desviaciones estándar.	33
Figura 10b. Producción de metano ($\text{mL CH}_4/\text{g SV}$) de las condiciones 4, 5 y 6 con sus desviaciones estándar.	34
Figura 10c. Producción de metano ($\text{mL CH}_4/\text{g SV}$) de las condiciones 7, 8 y 9 con sus desviaciones estándar.	35

Notación

AGV	Ácidos Grasos Volátiles
B ₂	Producción acumulativa de metano durante la segunda etapa
B ₀	Producción acumulativa de metano en el inicio de la segunda etapa
CoA	Coenzima A
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DQO _T	Demanda Química de Oxígeno total
DQO _S	Demanda Química de Oxígeno soluble
EE.UU	Estados Unidos de América
eq	Equivalente
EFR	Extrusionado de fresa residual
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FID	Detector de Ionización de Lama
FS	Fenoles Solubles
FT	Fenoles Totales
GEI	Gases de Efecto Invernadero
ICP	Plasma Acoplado Inductivamente
ICP-OES	Plasma Acoplado Inductivamente con Espectrofotómetro de Emisión Óptico
I.R.N.A.S.	Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla
KJ	Kilojulio
máx.	Máximo
min.	Mínimo
P	Producción máxima de metano obtenida en la segunda etapa
P _{máx}	Producción máxima de metano del modelo Logístico
PBM	Potencial Bioquímico de Metano
RIS	Relación entre el Inóculo y el Sustrato
R _m	Velocidad máxima de producción de metano
SFA	Sulfato Ferroso Amónico
ST	Sólidos Totales
SM	Sólidos Minerales
SV	Sólidos Volátiles
t	Tonelada
t (d)	Tiempo en días
TRH	Tiempo de Residencia Hidráulico
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente
λ (d)	Tiempo de retardo en días
-1	Nivel bajo de concentración de elementos traza estudiados
0	Nivel medio o punto central de concentración de elementos traza estudiados
+1	Nivel alto de concentración de elementos traza estudiados

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del sector de la fresa en el mundo

Las fresas son conocidas como las reinas de las bayas caracterizadas por su aroma único, exquisito sabor y color rojizo. El interés por las fresas se ha incrementado últimamente debido a sus propiedades terapéuticas y farmacológicas (Aguilera et al., 2011). Las fresas ejercen efectos terapéuticos como reducción de enfermedades coronarias, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos, entre otros (Aaby et al., 2007; Astrid, 2008; Ceci et al., 2016).

Las investigaciones sobre fresas se han centrado principalmente sobre sus compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante (Kelebek & Selli, 2011; Klopotek et al., 2005; Panico et al., 2009). Wang y Jiao (2000) han demostrado que presentan una gran capacidad antioxidante contra la formación de radicales libres y por tanto contra el envejecimiento de la piel. La capacidad antioxidante de las fresas está asociada al ácido ascórbico también conocido como vitamina C, a los compuestos fenólicos y otros compuestos ácidos (Ceci et al., 2016; Ojeda et al., 2008; Wang & Jiao, 2000). Nutricionalmente, la fresa presenta pocas grasas y calorías, además tiene un alto contenido en vitaminas, carbohidratos, minerales y fibras. El ácido cítrico es el que más contribuye con un 92% a la acidez de la fresa (Ojeda et al., 2008).

Debido a las propiedades anteriormente comentadas y a su extendido consumo, la producción mundial de fresa se ha multiplicado en los últimos 40 años (Trichodex, 2016). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2019) la producción de fresas, en 2017, ha alcanzado valores en torno a 9,2 millones de toneladas en todo el mundo. En la **Figura 1** se puede observar que Estados Unidos es el primer productor de fresa a nivel mundial con un total de más de 1,4 millones de toneladas, representando con ello un 15,8 % del total de las fresas producidas en el año 2017. A nivel nacional, España es el quinto país productor de fresas en el mundo después de Estados Unidos, México, Egipto y Turquía (FAO, 2019). España con una producción de 360.416 toneladas representa un 3,9% del total de fresa en el mundo (**Figura 1**) (FAO, 2019).

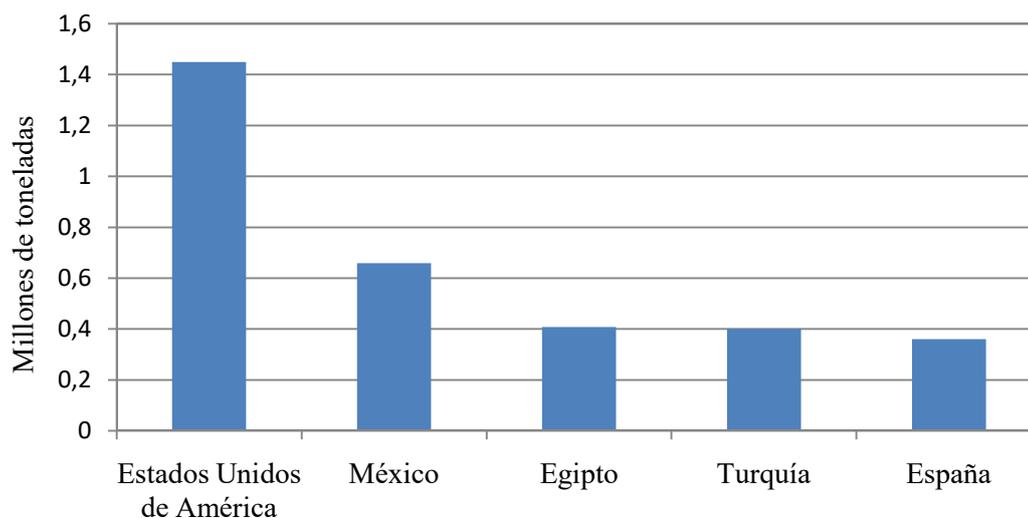


Figura 1. Producción mundial de fresa en 2017 (FAO, 2019).

En Andalucía y más concretamente en la provincia de Huelva, se localiza la mayor producción de fresa de España. Durante la temporada 2016-2017, en la campaña onubense la producción ascendió a 302.500 toneladas, que corresponde al 84% de la producción española y al 18% de la Unión Europea (FAO, 2019; Huelva información, 2018). En cuanto a la facturación, ésta superó los 454,6 millones de euros, lo que supone alrededor de un 15 % más de lo que se facturó la campaña anterior (Huelva información, 2018). Por otro lado, Huelva es el mayor exportador de fresa a nivel nacional, correspondiendo la mayor parte de las ventas al exterior a la Unión Europea. Debido a esto, se puede apreciar la importancia que tiene el sector de la fresa, y por tanto, es normal considerar a la fresa como uno de sus motores de crecimiento.

1.2. Generación de extrusionado de fresa residual

La mayor parte de la fresa se vende fresca, aunque una alternativa interesante que se lleva a cabo para las producciones que no pueden vender en el mercado fresco es la comercialización de productos secundarios como mermeladas, yogures o helados, entre otros. En torno al 21% de la producción total de fresas se ha venido utilizando para la elaboración de estos productos secundarios (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019; Serrano, 2015). Estos productos se elaboran a partir de un concentrado de fresa que se hace mediante la extrusión de toda la fresa.

Durante el proceso industrial, las fresas se extrusionan mediante tamices con diferentes tamaños de malla, de forma que se retiene una fracción residual, formada por la parte fibrosa y los aquenios, llamada extrusionado de fresa residual (EFR). El extrusionado de fresa residual puede alcanzar alrededor del 7%, en peso del total de la fresa. Debido a su alto contenido en materia orgánica este residuo debe ser gestionado para cumplir con la Directiva Marco de residuos 2008/98/CE (Directiva 2008/98/CE, 2008; Serrano, 2015; Serrano et al., 2014).

1.3. Tratamiento del extrusionado de fresa residual

1.3.1. Definición de residuo y gestión de residuos a nivel europeo

Uno de los principales problemas que hay en la actualidad es la generación de grandes volúmenes de residuos, con el impacto que supone sobre el medio ambiente y la salud de las personas. Según la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre residuos se define residuo como *“cualquier sustancia u objeto del cual su poseedor se desprenda o tenga la intención o la obligación de desprenderse”*.

Los residuos pueden presentar una gran pérdida de recursos ya sea en forma de energía o materiales. Además la gestión y eliminación de los residuos en vertederos y procesos de incineración producen problemas como contaminación del agua, aire y el suelo. Debido a esto se ha establecido una jerarquía de gestión de los residuos que prioriza la prevención, la reutilización y el reciclaje, mientras que la valorización energética o material y la deposición en vertederos se disponen al final de la jerarquía ya que son opciones que generan un gran impacto sobre el medio ambiente y la salud de las personas (Directiva 2008/98/CE, 2008).

1.3.2. Generación de residuos y valorización a nivel nacional

En España, como en el resto del mundo, se generan gran cantidad de residuos. En la actualidad, la disposición de residuos en vertederos es una práctica muy común en los países en desarrollo debido a que sale más rentable económicamente que otras alternativas que, como se ha comentado anteriormente, se deben priorizar (Karthikeyan et al., 2018).

En el sector de la industria agroalimentaria, la deposición de residuos agroalimentarios en vertederos ha sido la opción más extendida a lo largo de los años (Serrano, 2015). Dado que la normativa europea en materia de residuos se está endureciendo estos últimos años, es de vital importancia estudiar diferentes alternativas para una correcta gestión y la valorización económica de los residuos.

1.3.3. Alternativas para el tratamiento de residuos alimentarios

A nivel mundial, se han eliminado en vertederos alrededor de $1,3 \times 10^9$ toneladas de residuos de alimentos, lo que ha contribuido a $3,3 \times 10^9$ toneladas $\text{CO}_2\text{-eq/año}$ de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Fisgativa et al., 2017; Saleemdeen et al., 2017). Esta emisión ha representado el 9,1% de las emisiones globales a nivel mundial de CO_2 (WEDODATA, 2019). Se ha previsto que para 2025 se generen alrededor de $2,5 \times 10^9$ toneladas de residuos alimentarios a nivel mundial. Para reducir el impacto ambiental, estos se deben evitar, reducir o recuperar, reutilizar o procesar y reciclar para desarrollar una economía circular sostenible y respetuosa con el medio ambiente (Karthikeyan et al., 2018).

Dado que la gestión de los residuos alimentarios se debe realizar de una forma ambientalmente sostenible, es fundamental el estudio de nuevas formas de tratamientos de estos residuos. En la **Tabla 1**, se plantean y discuten diferentes métodos de gestión de residuos alimentarios.

Tabla 1. Métodos de gestión de residuos alimentarios y características para su selección (Bernstad & la Cour Jansen, 2012; Karthikeyan et al., 2018).

Alternativas de gestión	Rango de impacto del cambio climático (kg CO ₂ -eq/t)	Coste (€/t)	Ventajas	Desventajas
Vertedero	400 (min.) 1200 (máx.)	40-65	Barato. Equipos simples.	Olor, requerimientos de suelo, emisiones de GEI y contaminación ambiental.
Compostaje	-50 (min.) 1850 (máx.)	40-110	Reciclaje de nutrientes esenciales y carbono.	Tiempo de proceso largo y requiere supervisión.
Digestión anaerobia	-400 (min.) 400 (máx.)	45-140	Producción de biofertilizantes. Reciclaje de materia orgánica y recuperación de energía.	Requiere supervisión.
Incineración	-250 (min.) 600 (máx.)	50-250	Proceso rápido, recupera energía y ahorra espacio	Coste elevado y requiere supervisión.

Según la jerarquía de gestión de residuos alimentarios, la prevención es la mejor opción seguida del tratamiento biológico y la desintegración térmica, y como última alternativa, la deposición en vertederos.

Los vertederos y la incineración son los métodos más comunes para la gestión de residuos alimentarios. Sin embargo, la deposición de los residuos de alimentos en vertederos tiene problemas como la ocupación del terreno, contaminación atmosférica, producción de malos olores y el aumento de la cantidad de patógenos en el suelo y el agua (**Tabla 1**) (Wang et al., 2006). Por lo tanto, se excluye esta alternativa, aunque como se ha comentado anteriormente es un método ampliamente utilizado. La incineración de residuos alimentarios supone un elevado coste debido a que consume mucha energía para evaporar el agua que contiene, y, por tanto, conlleva un elevado coste por tonelada de residuo (**Tabla 1**).

En comparación con el tratamiento térmico de residuos alimentarios, los procesos biológicos suponen menor coste por tonelada de residuo tratada y son más rentables económicamente (**Tabla 1**). El compostaje es el proceso biológico más extendido en los países desarrollados, como por ejemplo EE.UU, seguido de la digestión anaerobia (Karthikeyan et al., 2018). Sin embargo, el tiempo operacional y los impactos del proceso de compostaje sobre el medio ambiente son significativamente mayores que los de la digestión anaerobia (Mata-Alvarez et al., 2000) (**Tabla 1**). Además, el proceso de compostaje presenta otros problemas

ambientales como la rápida acidificación de los residuos alimentarios, altos contenidos de humedad, eutrofización, incremento de la ecotoxicidad, entre otros (Lee et al., 2007). La digestión anaerobia, en cambio, es un proceso de tratamiento de residuos atractivo en el que se logra disminuir la carga contaminante del influente. Por ello, la digestión anaerobia es una alternativa interesante y prometedora para el tratamiento y la valorización de residuos en forma de metano, ya que es un combustible respetuoso con el medio ambiente y con alto poder calorífico.

1.4. Digestión anaerobia

1.4.1. Etapas de la digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso biológico que, en ausencia de oxígeno y por la acción de un grupo muy diverso de microorganismos, transforma la materia orgánica en productos gaseosos o “biogás” (principalmente CH₄ y CO₂) y en digestato, que es una mezcla de productos minerales (N, P, K Ca, etc.) y compuestos de difícil biodegradación (IDAE, 2007). La composición del “biogás” depende tanto de la materia orgánica digerida como del proceso en sí, pero normalmente tiene un contenido de metano entre el 50-70% y 30-50% de dióxido de carbono (González, 2015; Lorenzo & Obaya, 2005).

La materia orgánica utilizada es cualquier biomasa residual, como restos de comida, restos de hojas, residuos ganaderos, lodos de plantas depuradoras de aguas residuales, tanto urbanas como domésticas e industriales. Este proceso de digestión anaerobia, que implica la degradación y estabilización de materia orgánica, se compone de cuatro etapas o fases (**Figura 2**). La primera fase es la hidrólisis que consiste en la rotura de los compuestos de alto peso molecular (proteínas, carbohidratos o lípidos, entre otros) por la acción de enzimas extracelulares producidas por bacterias hidrolíticas, en consecuencia se producen compuestos solubles más sencillos (aminoácidos, azúcares y ácidos grasos). Estos compuestos son degradados en la fase acidogénica o fermentativa dando lugar, principalmente, a ácido acético, alcoholes, hidrógeno, dióxido de carbono y otros productos intermedios. En la fase acetogénica se transforman los ácidos orgánicos en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono. Por último, en la fase metanogénica se genera metano a partir de ácido acético, o hidrogeno y dióxido de carbono (Serrano, 2015) (**Figura 2**).

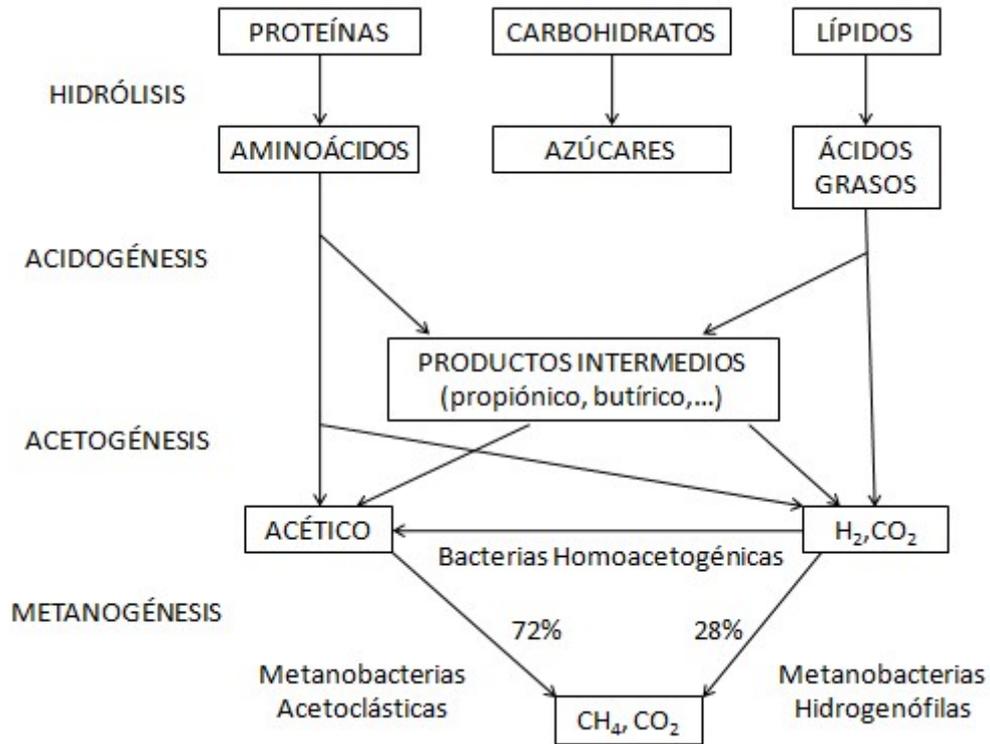


Figura 2. Diagrama esquemático del proceso de digestión anaerobia (adaptado de: Serrano (2015)).

1.4.2. Comparación de la digestión anaerobia frente a la aerobia

La digestión anaerobia, en comparación con la aerobia, presenta la ventaja de que no se produce un elevado coste en la aireación del sistema (Lorenzo & Obaya, 2005; Serrano, 2015). Dado que el oxígeno es poco soluble en el agua y no está presente en la digestión anaerobia, no se necesita tanta superficie para solubilizarlo como se necesitaría en la digestión aerobia. Otra ventaja es la baja tasa de división de los microorganismos, es decir, sólo invierten el 5% de la degradación de la materia orgánica en la producción de biomasa, mientras que el 95% lo convierten en CH₄ y CO₂ (**Tabla 2**). Por lo tanto, hay baja producción de lodos con lo que reducen costes en el tratamiento y deposición de fangos (Lorenzo & Obaya, 2005). También presentan otras ventajas importantes como menor requerimiento nutricional, capacidad de trabajar con elevadas cargas orgánicas y la conversión del 95% de la materia orgánica en biogás (**Tabla 2**).

Tabla 2. Comparación entre digestión aerobia y anaerobia (Cervantes et al., 2007).

Parámetro	Aerobio	Anaerobio
Generación de calor	2840 KJ/mol de glucosa	393 KJ/mol de glucosa
Destino del carbono	50% se convierte en CO ₂ 40-50% se incorpora a la biomasa bacteriana	95% se convierte en CH ₄ y CO ₂ 5% se convierte en biomasa bacteriana
Destino de la energía	60% se almacena en nueva biomasa 40% se pierde como calor	90% retenida en CH ₄ 3-5% perdida como calor 5-7% almacenada en biomasa
Consumo de energía	Alto	Bajo
Adición de nutrientes	Alta, especialmente Nitrógeno	De mínima a nula
Tiempo de arranque	Corto	Largo
Avance de la tecnología	Tecnología establecida	En consolidación
Tolerancia a la temperatura	Amplio rango	Mayores de 15 °C

Debido a estas ventajas, la digestión anaerobia es una técnica atractiva para su aplicación a aguas residuales, tanto urbanas (Pedrero et al., 2010) como agroindustriales (Cervantes et al., 2007), así como para estabilizar el lodo aerobio (Appels et al., 2008; Bolzonella et al., 2005) o residuos sólidos agroalimentarios (Mata-Alvarez et al., 2000).

1.4.3. Inconvenientes y desafío para la mejora de la digestión anaerobia

No obstante, la digestión anaerobia presenta ciertas desventajas, ya que frecuentemente se necesita realizar un post-tratamiento para disminuir la carga orgánica a niveles requeridos por la legislación (Lorenzo & Obaya, 2005). También presenta costes de implantación elevados, tiempos de arranque elevados, sensibilidad a las sobrecargas orgánicas y necesidad de formación técnica para su correcta operación (Serrano, 2015).

Existen un gran número de factores que afectan a la digestión anaerobia, tales como el pH, concentración de oxígeno, temperatura, agitación, acidez volátil, factores de crecimiento, alcalinidad, carga orgánica, nutrientes, tiempo de retención de sólidos. Además de los mencionados anteriormente, otro factor que puede afectar a la

digestión anaerobia es la mayor o menor presencia de elementos traza. Las necesidades de elementos traza en la digestión anaerobia varían mucho dependiendo del contenido de los mismos en el sustrato y en el inóculo escogido. Actualmente, sigue siendo un desafío determinar si un reactor es deficiente en elementos traza. En particular identificar aquellos que son requeridos y el rango de concentraciones adecuado para una óptima operación de estos reactores (Jiang et al., 2017).

1.5. Importancia de los elementos traza

Todos los seres vivos dependen de los nutrientes para su supervivencia y crecimiento. Además de los macronutrientes, como C, N, P, S, K, los elementos traza también son esenciales en la actividad enzimática de la metanogénesis (Demirel & Scherer, 2011; Kida et al., 2001; Osuna et al., 2008; Pereda et al., 2007) y en procesos de respiración microbiana (Zandvoort et al., 2006).

Un elemento traza puede definirse como "cualquier elemento químico que se produce en cantidades muy pequeñas en organismos, pero es esencial para muchos procesos fisiológicos y bioquímicos" (Jiang et al., 2017). Muchos de estos elementos traza esenciales son metales. Estos pueden ser estimulantes, inhibidores o incluso tóxicos en reacciones bioquímicas, dependiendo de sus concentraciones (Li & Fang, 2007). Los metales son necesarios en cantidades traza, es decir en cantidades muy pequeñas, para la activación y funcionamiento de muchas enzimas y coenzimas (Altaş, 2009). Sin embargo, en cantidades excesivas pueden provocar inhibición o toxicidad (Juliastuti et al., 2003). La falta de disponibilidad de estos elementos en los reactores anaerobios es probablemente la primera razón, sin ninguna otra razón obvia, de la pobre eficiencia del proceso a pesar de la gestión y el control adecuados de otros parámetros operativos y ambientales (Demirel & Scherer, 2011).

Se lleva mucho tiempo investigando la adición de elementos traza con el fin de mejorar el proceso de digestión anaerobia, existiendo muchos estudios sobre esta práctica. Aunque aún existe una falta de comprensión de las complicadas reacciones biológicas y bioquímicas involucradas en el proceso de digestión anaerobia, así como de los requisitos de elementos traza para mantener las funciones microbiológicas óptimas (Jiang et al., 2017). El requerimiento y los efectos de un elemento traza varían dependiendo del elemento traza y de la biodisponibilidad de los mismos. Además, se debe tener en cuenta el contenido de estos elementos traza en el sustrato y en el inóculo escogido.

La falta de conocimiento de los requerimientos de elementos traza que necesitan los microorganismos metanógenos, ha obstaculizado el desarrollo de la digestión anaeróbica durante décadas (Zhang et al., 2003). Dada esta falta de conocimiento, en muchas plantas comerciales de digestión anaerobia se tiende a añadir sales con todos los elementos traza (Pereda et al., 2007). Esto presenta problemas ya que, como se ha comentado anteriormente, muchos de estos metales no son necesarios e incluso son dañinos para los procesos de digestión anaerobia (Juliastuti et al., 2003). Por lo tanto, es importante comprender los requisitos específicos de cada

reactor, con el objetivo de añadir sólo los elementos traza necesarios para mejorar el rendimiento y reducir los costes operativos.

Los elementos traza a menudo están presentes en el sistema de enzimas como parte de un cofactor o son de vital importancia para el sistema de enzimas (Zandvoort et al., 2006). En la **Tabla 3**, se pueden ver algunos elementos trazas esenciales en varias enzimas que catalizan las reacciones y transformaciones anaerobias.

Tabla 3. Papel de algunos elementos traza esenciales en varias enzimas que catalizan las reacciones y transformaciones anaerobias (Fermoso et al., 2009).

Elementos traza	Función enzimática	Elementos traza	Función enzimática
Cu	Superóxido dismutasa	Mn	Estabilizar la metiltransferasa en bacterias productoras de metano. Reacciones redox
	Hidrogenasa (anaerobios facultativos)		
	Nitrito reductasa		
	Acetil-CoA sintetasa		
Co	Enzimas-B ₁₂	Ni	CO-deshidrogenasa Acetil-CoA sintetasa Metil-CoM reductasa (F ₄₃₀) Ureasa Estabilizar ADN, ARN Hidrogenasa
	CO-deshidrogenasa		
	Metiltransferasa		
Fe	Hidrogenasa	Zn	Hidrogenasa Formiato deshidrogenasa Superóxidodismutasa
	CO-deshidrogenasa		
	Metano monooxigenasa		
	NO-reductasa		
	Superóxidodismutasa		
	Nitrito y nitrato reductasa		
Nitrogenasa			

Como ya se ha comentado en el presente trabajo, los elementos traza están involucrados en el crecimiento de los microorganismos y su metabolismo. Se consideran especialmente importantes el cobalto (Co), hierro (Fe) y níquel (Ni). Otros metales como el calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), el sodio (Na) y el zinc (Zn) son considerados importantes en diversos procesos celulares (Mancillas-Salas et al., 2012). Debido a que los elementos traza presentan un papel fundamental en las actividades enzimáticas de la gran diversidad de microorganismos que puede haber en un reactor anaerobio, se han realizado muchos estudios en este sentido.

Según algunos autores, el cobalto, hierro y níquel son necesarios para la etapa metanogénica y la estabilidad del proceso anaerobio (Fermoso et al., 2009; Jiang et al., 2017; Osuna et al., 2008; Patidar y Tare, 2006; Zhang et al., 2003). Patidar y Tare (2006) observaron que las combinaciones de ciertos elementos traza tienen efectos sinérgicos o antagónicos en la formación de metano. En el estudio de Patidar y Tare (2006) se evaluó las combinaciones de Fe / Co, Fe / Ni / Zn, Ni / Zn / Co y Zn, llegando a la conclusión de que los ensayos en que se añadieron combinaciones de Fe/ Co y Ni/Zn/Co condujeron al máximo de la actividad metanogénica total en un estudio en discontinuo. Por otro lado, también se observó que el Ni afecta la captación de Co y Zn en microorganismos metanógenos (Patidar & Tare, 2006).

Estos últimos años se han realizado varios estudios sobre digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019; Serrano, 2015; Trujillo-Reyes et al., 2019). La fresa presenta una gran proporción de Ca, K, Mg y P (Hakala et al., 2003; Michenaud-Rague et al., 2012; Zhang et al., 2014), aunque, en la digestión anaerobia del extrusionado de fresa residual, no se sabe con exactitud qué cantidad de elementos traza son necesarios para que este proceso se dé a pleno rendimiento. Por tanto, en el presente Trabajo de Fin de Máster se ha evaluado el efecto de la adición de seis elementos traza (Co, Ni, Fe, Cu, Mn y Zn) sobre la producción máxima de metano y sobre la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es la evaluación del efecto de la adición de metales traza para mejorar el rendimiento de producción de metano a partir de extrusionado de fresa residual mediante digestión anaerobia.

Para la consecución de este objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos específicos con su alcance:

-Caracterización del extrusionado de fresa residual e inóculo que se han empleado en el estudio. Se ha empleado extrusionado de fresa residual de una industria real ubicada en Huelva y, como inóculo, lodo de tratamiento de aguas procedente de la cervecera Heineken (Sevilla). Los parámetros que se han seleccionado para la caracterización son: pH, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y sólidos minerales (SM) (para extrusionado de fresa residual e inóculo) y $DQO_{soluble}$, DQO_{total} , fenoles totales, fenoles solubles, azúcares (únicamente para el extrusionado de fresa residual). Adicionalmente, se han medido los metales presentes en muestras de ambas sustancias (estos análisis se han realizado en un laboratorio externo).

-Realización de ensayos de Potencial Bioquímico de Metano (PBM) de muestras de extrusionado de fresa residual procedente de una industria real con adición de los siguientes metales: Co, Fe, Ni, Cu, Mn, Zn. Los ensayos se han realizado en modo de operación discontinuo a escala de laboratorio. Para ello, se ha llevado a cabo el montaje del ensayo PBM de un laboratorio específico. El diseño estadístico experimental se ha llevado a cabo de manera previa a la ejecución del presente Trabajo Fin de Máster por el grupo de Procesos Biológicos de la escuela de ingeniería de São Carlos (Universidad de São Paulo, Brasil).

-Análisis y discusión de resultados de los ensayos PBM. Los resultados experimentales obtenidos se han discutido empleando el diseño estadístico de Plackett-Burman en base a la producción máxima de metano y a la velocidad máxima de producción de metano.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Extrusionado de fresa residual e inóculo

La empresa que ha suministrado el extrusionado de fresa residual utilizado en el ensayo es HUDISA S.A, establecida en Lepe (Huelva), al sudoeste de España. HUDISA S.A es una empresa creada por un consorcio de 19 empresas productoras de fresa para procesar y comercializar toda su fresa con destino industrial.

En nuestro estudio se ha empleado como fuente de inóculo un lodo proveniente del tratamiento anaerobio de aguas residuales de la industria cervecera de Heineken España, S.A., la cual se encuentra situada en finca de La Caridad – Cañada de Pero Mingo, municipio de Sevilla.

3.2. Toma de muestra y conservación de extrusionado de fresa residual e inóculo

El extrusionado de fresa residual (**Figura 3**) se obtuvo el 13 de febrero de 2018 de la campaña de 2017-2018. En el proceso industrial, la fresa se ha extrusionado con un tamiz de 0,5 mm. Este extrusionado se ha realizado para obtener un concentrado de fresa con el que procesar productos secundarios de la fresa como mermeladas, yogures y helados. El extrusionado de fresa residual que se ha generado en el proceso industrial, se ha usado en el presente ensayo como sustrato (**Figura 3**).



Figura 3. Extrusionado de fresa residual.

Tras su recogida en la planta de tratamiento de fresa, el extrusionado se ha transvasado a bolsas de plástico herméticas. Estas bolsas se han mantenido congeladas a -20 °C hasta el día de su uso, para evitar el deterioro del producto. Después de la caracterización del extrusionado de fresa residual y de la alimentación de los reactores con el mismo, se ha guardado la bolsa en una cámara frigorífica a 4 °C para preservarla y evitar fermentaciones indeseables que alterasen de manera significativa su composición.

La toma de inóculo se ha realizado el 28 de julio de 2018 de un reactor de tratamiento anaerobio de aguas residuales de la industria cervecera de Heineken. La toma de muestra se ha realizado trasvasando el lodo anaerobio desde el reactor hasta una garrafa de 20 L. Después de la caracterización del inóculo y la adición del mismo en los PBM, se ha guardado la garrafa en una cámara frigorífica a 4 °C para conservar la muestra.

3.3. Técnicas analíticas empleadas en la caracterización de extrusionado de fresa residual, inóculo y PBM

3.3.1 pH

Se ha utilizado un pH-metro Crison provisto de un electrodo de vidrio que se sumerge en un volumen adecuado de muestra: la lectura digital da el valor de pH con dos cifras decimales. Diariamente se ha procedido a la calibración del mismo con patrones comerciales tampón de la marca Crison de pH 4,01; 7,00 y 9,21.

3.3.2 Alcalinidad

La alcalinidad de un agua es una medida de su capacidad para amortiguar cambios de pH. El valor medio puede variar significativamente con el pH del punto final utilizado.

La determinación se ha realizado tomando un volumen conocido de muestra, en un vaso de precipitado y se le ha añadido lentamente una disolución de ácido sulfúrico 0,02 N desde una bureta, hasta alcanzar pH 4,5. Este punto corresponde a la conversión de la mayor parte del HCO_3^- a H_2CO_3 . Se ha medido el volumen gastado de ácido y el resultado se expresa en mg CaCO_3/L (APHA, 2012).

La alcalinidad de la muestra viene dada por la expresión:

$$Alc = \frac{V \times N \times 50 \times 1000}{V_m}$$

donde:

Alc = alcalinidad expresada en mg CaCO_3/L .

V = volumen gastado de ácido sulfúrico, mL.

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

50 = peso equivalente del CaCO_3 .

V_m = volumen tomado de muestra, mL.

3.3.3 Sólidos totales (ST)

La determinación de los sólidos totales incluye tanto los sólidos orgánicos como los inorgánicos presentes en la muestra.

Se ha pesado una cantidad de muestra bien homogeneizada en una balanza de precisión, conteniéndose la misma en un crisol de porcelana cuyo peso vacío se conoce previamente. La muestra se ha secado en estufa a 103-105 °C hasta peso constante. El incremento de peso experimentado por el crisol representa el contenido en sólidos totales de la muestra. La siguiente fórmula permite expresar los resultados en mg/kg.

$$ST\left(\frac{mg}{kg}\right) = \frac{(A - B) \times 10^6}{m}$$

donde:

ST= sólidos totales presentes en la muestra, mg/kg.

A= peso de la muestra desecada más el peso del crisol, g.

B= peso del crisol, g.

m= masa inicial de muestra, g.

3.3.4 Sólidos minerales (SM)

El crisol con el residuo seco procedente de la determinación de los sólidos totales, de peso conocido, se lleva a un horno a 550 °C donde se ha calcinado hasta peso constante. Las cenizas que quedan en el crisol coinciden con la fracción mineral de la muestra. La siguiente fórmula permite expresar los resultados en mg/kg.

$$SM\left(\frac{mg}{kg}\right) = \frac{(A - B) \times 10^6}{m}$$

donde:

SM= sólidos minerales presentes en la muestra, mg/kg.

A= peso de la muestra calcinada más el peso del crisol de porcelana, g.

B= peso del crisol, g.

m= masa inicial de muestra, g.

3.3.5 Sólidos volátiles (SV)

Los sólidos volátiles se han calculado como la diferencia entre los sólidos totales y los sólidos minerales. La siguiente fórmula permite expresar los resultados en mg/kg.

$$SV = ST - SM$$

donde:

SV = sólidos volátiles, mg/kg.

ST = sólidos totales, mg/kg.

SM = sólidos minerales, mg/kg.

3.3.6 Demanda química de oxígeno total y soluble (DQO_{total} y DQO_{soluble})

La demanda química de oxígeno es una medida de la materia orgánica contenida en una muestra determinada a través del oxígeno requerido para oxidar dicha materia orgánica.

El método utilizado para la determinación de la DQO_{total} es el de oxidación con dicromato (K₂Cr₂O₇) a reflujo abierto. La muestra se somete a una oxidación química en caliente (150 °C), por adición de un exceso de oxidante (K₂Cr₂O₇) de concentración conocida, en un medio ácido fuerte (H₂SO₄) y con la presencia de un catalizador (Ag₂SO₄). Con el objetivo de reducir interferencias como cloruros se ha añadido HgSO₄. Tras el periodo de digestión (2 horas), el exceso de dicromato que no ha reaccionado se ha valorado frente a SFA (Sulfato ferroso amónico hexahidratado, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O), con ferroina como indicador. Para cuantificar la cantidad de dicromato añadida y posibles interferencias de materia orgánica aportadas con el agua de dilución a las muestras, se ha incluido junto a la muestra un blanco con agua destilada. Por diferencia con el blanco, se ha determinado la cantidad de dicromato consumido en la oxidación de la muestra (Raposo et al., 2008). La siguiente fórmula permite expresar los resultados en mg O₂/kg.

$$DQO\left(\frac{mg}{kg}\right) = \frac{(B - M) \times 8 \times 1000 \times N_{FAS}}{m}$$

donde:

DQO = demanda química de oxígeno total, mg O₂/kg.

B = volumen de FAS gastado en la valoración del blanco, mL.

M = volumen de FAS gastado en la valoración de la muestra, mL.

NFAS = normalidad exacta del FAS.

m = peso de muestra, g.

8 = peso equivalente del oxígeno.

Para la determinación de la $DQO_{soluble}$ el procedimiento es similar que el que se ha utilizado para la DQO_{total} , pero en este caso, el exceso de dicromato se ha medido espectrofotométricamente. Tras la digestión de la muestra a 150 °C (2 horas) se ha medido la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo electron corporation: Genesys 10 Vis) a 600 nm. Para la obtención del valor de la $DQO_{soluble}$, la absorbancia obtenida se ha interpolado en una recta de calibrado que se ha obtenido previamente con disoluciones de ftalato ácido de potasio preparadas por dilución de una disolución patrón cuyo valor teórico de $DQO_{soluble}$ es conocido (1,1796 mg O_2 /mg) (**Figura 4**). En este caso, el resultado se ha expresado en mg O_2 /L (APHA, 2012).

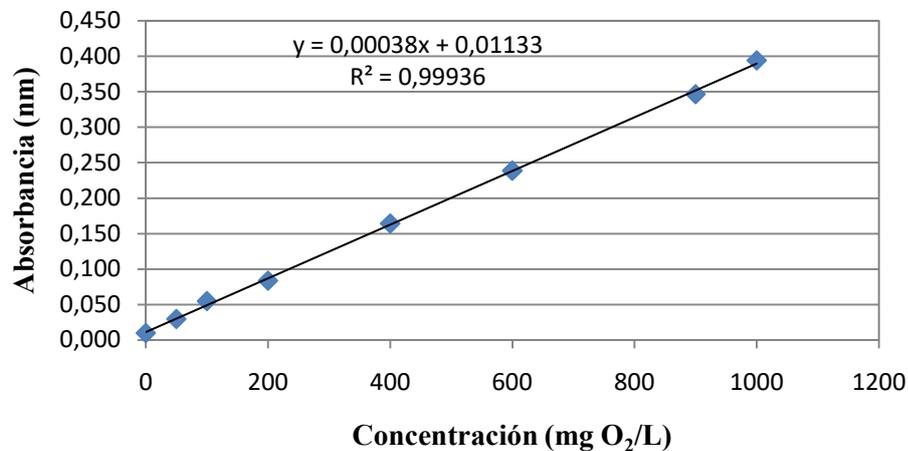


Figura 4. Recta de calibrado de $DQO_{soluble}$ con ftalato ácido de potasio.

3.3.7 Fenoles totales y solubles

El método que se ha utilizado es un método colorimétrico, conocido como el método de Folin-Ciocalteu. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad a 655 nm es la que se ha medido para evaluar el contenido en fenoles (**Figura 5**) (Obied et al., 2005; Singleton & Rossi, 1965).

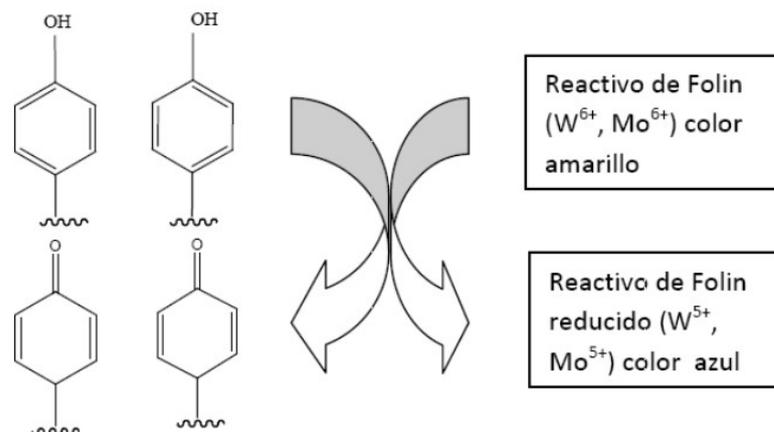


Figura 5. Reacción de Folin-Ciocalteu (Gómez, 2014).

Para la obtención de los fenoles totales, se ha realizado una extracción con Metanol-Agua al 80%. Para ello, a 10 g de muestra se añaden 20 mL de una mezcla Metanol-Agua 80%, manteniéndose durante una hora a 70°C en un baño de agua. Transcurrido este tiempo, el líquido obtenido se ha centrifugado y microfiltrado con microfiltros de nailon de 0,45 µm. Los fenoles solubles se han hecho a partir de los compuestos solubles que se han extraído con anterioridad.

Para realizar el análisis de las muestras, se han tomado alícuotas de la muestra diluida por triplicado, se ha añadido carbonato sódico (Na₂CO₃) y el reactivo Folin-Ciocalteu, y se ha dejado estabilizar durante 10 minutos. Por último, se ha medido la absorbancia a 655 nm en un lector de microplacas Bio-Rad modelo *iMark* (Hércules, CA, EE. UU). La absorbancia dada se ha interpolado en una recta de diluciones de una disolución patrón de ácido gálico, conociendo el peso exacto de ácido gálico de la disolución patrón. En este caso, el resultado se ha expresado en mg ácido gálico eq/L (**Figura 6**).

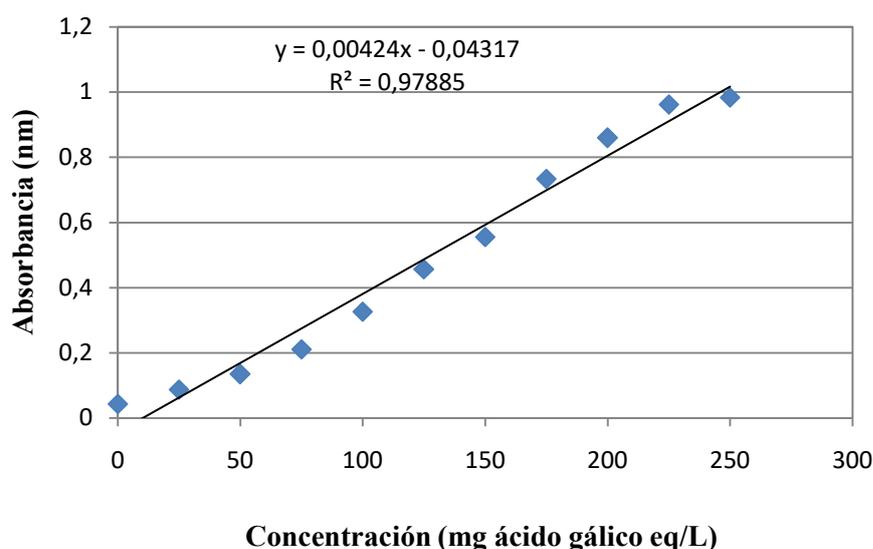


Figura 6. Recta de calibrado de fenoles con ácido gálico.

3.3.8 Azúcares solubles

La determinación de estos compuestos se ha llevado a cabo mediante una colorimetría de azúcares neutros por el método de “la Antrona” (9,10-dihidro-9-oxoantraceno). Se aprovechan las propiedades específicas de los monosacáridos, produciendo la deshidratación en medio ácido caliente de los grupos hidroxilos, que conducen a la formación de compuestos intermedios como el furfural para las pentosas y el hidroximetilfurfural para las hexosas, los cuales reaccionan con la antrona formando un complejo de color azul verdoso que se puede cuantificar colorimétricamente midiendo su absorbancia a 630 nm (**Figura 7**) (Dische, Z., 1962; Mokrash, L., 1954).

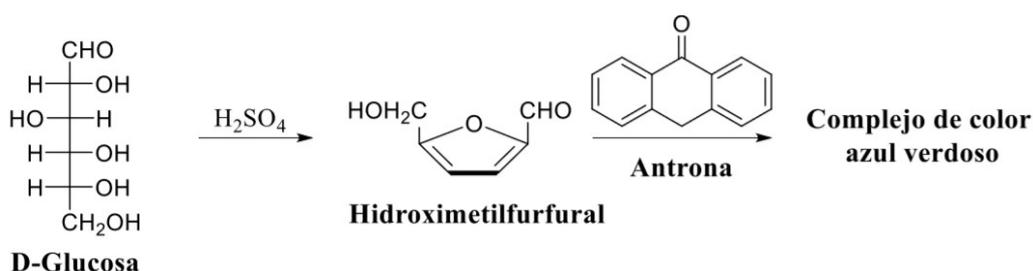


Figura 7. Formación de hidroximetilfurfural a partir de glucosa en medio ácido y su reacción con la antrona.

Se han tomado alícuotas de la muestra diluida por triplicado, se ha añadido el reactivo antrona-sulfúrico, se han agitado en el vortex y se han calentado en un baño de agua a 100 °C durante 5 minutos. Por último, se mide la absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas Bio-Rad modelo *iMark* (Hercules, CA, EE. UU). La absorbancia dada se ha interpolado en una recta de diluciones de una disolución patrón de glucosa, conociendo el peso exacto de glucosa de la disolución patrón. En este caso, el resultado se ha expresado en mg glucosa eq/L (**Figura 8**).

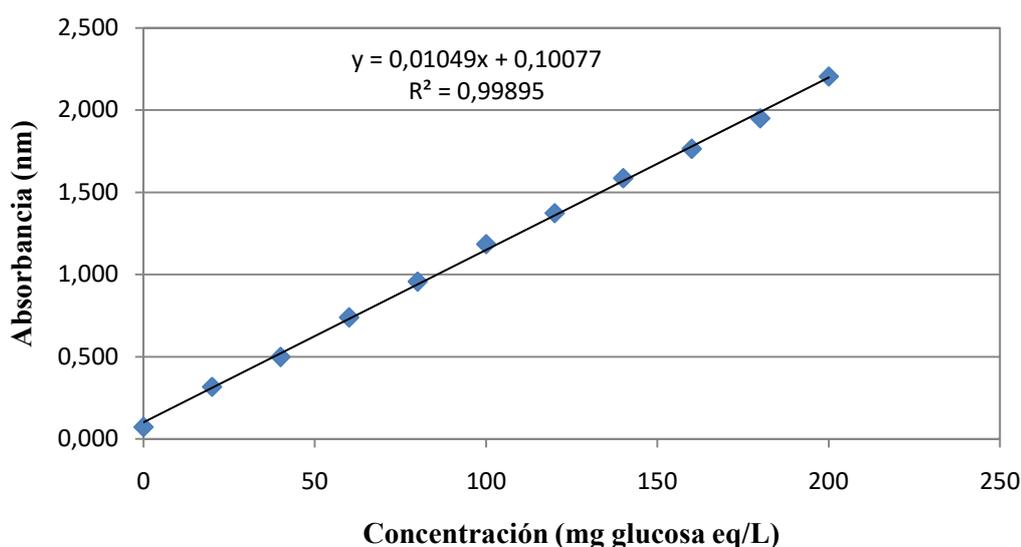


Figura 8. Recta de calibrado de azúcares con glucosa.

3.3.9 Ácidos grasos volátiles (AGV)

Los ácidos grasos volátiles (AGV) se han medido para realizar un seguimiento del metabolismo de los grupos de microorganismos presentes en el reactor anaerobio. La acumulación de AGV se ha debido a la inestabilidad en las reacciones de producción y eliminación de estos compuestos. Los AGV pueden actuar como inhibidores de la etapa metanogénica y por lo tanto el metabolismo anaerobio. En un reactor maduro y estable, la concentración de AGV es inferior a 500 mg/L. La inhibición no se alcanza hasta valores próximos a 5.000 mg/L (ONUDI, 2015).

Los AGV que se han analizado de forma individual son ácido acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico y caproico. La determinación se ha llevado a cabo utilizando un cromatógrafo de gases modelo GC-2010 (marca Shimadzu) equipado con una columna Stabilwax-DA (Crossbond Carbowaxpolyethylene glycol) de 30 m x 250 µm x 0,25 µm y un detector de ionización de llama (FID). Se ha utilizado el ácido 2-Etilbutírico como patrón interno a una concentración de 1500 mg/L. La temperatura de horno se ha incrementado gradualmente de 120 a 170 °C durante 11 minutos. Se ha utilizado hidrógeno (500 kPa) como gas portador de una velocidad de flujo de 50 mL/min. Para la ignición de la llama del FID se han empleado nitrógeno (500 kPa) y aire (500 kPa).

3.3.10 Plasma acoplado inductivamente (ICP)

La determinación de las concentraciones de metales en el extrusionado de fresa residual y en el inóculo se ha llevado a cabo en el laboratorio de recursos naturales (I.R.N.A.S.) mediante el plasma acoplado inductivamente (ICP). Previamente a la entrega de las muestras al laboratorio de recursos naturales, se ha pesado una cierta cantidad de extrusionado de fresa residual y de inóculo en una balanza de precisión (ambas muestras bien homogeneizadas) y se han secado en la estufa a 103-105°C.

Para la determinación de las concentraciones de elementos traza totales en muestras sólidas se ha realizado una digestión de la muestra con agua regia en un horno de microondas y posteriormente se ha realizado una filtración de la muestra líquida con un filtro de 0.2 µm en una atmósfera libre de oxígeno y se ha medido por plasma acoplado inductivamente con espectrofotómetro de emisión óptico (ICP-OES) (Thermo Fisher Scientific, modelo IRIS Advantage) (Pinto-Ibieta et al., 2016).

3.4. Diseño estadístico de Plackett-Burman

En colaboración con el laboratorio de procesos biológicos de la escuela de ingeniería de São Carlos (Universidad de São Paulo, Brasil) se ha realizado un diseño factorial fraccionado de Plackett-Burman. Se ha elegido un diseño factorial fraccionado de 2 niveles con el fin de analizar el máximo número de factores o, en este caso, elementos traza con el menor número de experimentos y por lo tanto optimizando el coste de los experimentos. Según el diseño estadístico de Plackett-Burman se han determinado 9 combinaciones diferentes elementos traza estudiados, a estas diferentes agrupaciones de elementos traza se les ha llamado **condiciones de estudio**. En cada una de las condiciones de estudio, se ha adicionado experimentalmente una combinación específica de elementos traza con el fin de evaluar el efecto individual de cada metal sobre la producción máxima de metano y sobre la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual.

La elección de estos metales traza se ha realizado, previamente al diseño estadístico, en base a la bibliografía debido a que son metales esenciales en el proceso de digestión anaerobia. La concentración de metales traza que se ha adicionado, se determinó en base a la bibliografía (ya que se pretendía adicionar un rango en el que favoreciera el proceso de digestión anaerobia sin causar efectos tóxicos o inhibitorios) y en base a la concentración de estos elementos traza en el inóculo y sustrato. El diseño experimental estadístico de Plackett-Burman se ha realizado para determinar cuales de los elementos traza entre los seis probados (Co, Fe, Ni, Cu, Mn y Zn) tienen un efecto individual significativo sobre alguno de los parámetros de estudio (producción máxima de metano y velocidad máxima de producción de metano) en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual. Dicho diseño estadístico ha generado una matriz formada por tres diferentes niveles de concentración de elementos traza estudiados, un nivel bajo (-1), un punto central (0) y un nivel alto (+1). El nivel bajo (-1) corresponde a la suma de las concentraciones de elementos traza presentes en el inóculo y en el sustrato, es decir, el nivel bajo (-1) corresponde a la concentración inicial, sin adición de elementos traza. El punto central (0) corresponde a 2,5 veces la concentración del nivel bajo (-1), este valor de 2,5 dado se seleccionó en base a la bibliografía y teniendo en cuenta un rango de concentraciones en el que estos elementos traza favorezcan la digestión anaerobia sin llegar a ser inhibitorios o tóxicos. Por último, el nivel alto (+1) corresponde a la suma de la concentración del punto central (0) más la diferencia entre las concentraciones del punto central (0) y el nivel bajo (-1). En la **Tabla 4** se muestra la matriz experimental de un diseño de Plackett-Burman para cada una de las condiciones de estudio en las que ha adicionado diferentes combinaciones de elementos traza.

Tabla 4. Matriz experimental de un diseño factorial fraccionado de Plackett-Burman para cada condición de estudio.

Condiciones	Co	Fe	Ni	Cu	Mn	Zn
1	-1	-1	-1	1	1	1
2	1	-1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1
4	1	1	-1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1
8	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0

3.5. Digestión anaerobia

Para evaluar el potencial de recuperación de energía en forma de metano mediante digestión anaerobia se ha realizado un ensayo de Potencial Bioquímico de Metano (PBM), que es ampliamente utilizado para la estimación de la biodegradabilidad anaerobia o el potencial de producción de metano, así como para el estudio cinético del tratamiento de residuos por digestión anaerobia en el régimen batch o discontinuo (Raposo et al., 2012).

En el ensayo de PBM pueden influir diferentes factores (Angelidaki et al., 2009; Cárdenas et al., 2016; Raposo et al., 2011) que pueden agruparse en grupos relacionados con el inóculo, con el sustrato, con los factores experimentales y con el procedimiento operativo. A continuación, se detallan los 4 grandes grupos que pueden influir durante el desarrollo del presente estudio.

3.5.1 Inóculo

En la digestión anaerobia es importante tanto la calidad como la cantidad de inóculo disponible, siendo recomendable emplear un inóculo activo con el fin de reducir el tiempo para la estabilización de los sustratos (Neves et al., 2004). Por ello en nuestro estudio se ha empleado como fuente de inóculo un lodo proveniente del tratamiento anaerobio de aguas residuales de la industria cervecera de Heineken España, S.A.

3.5.2 Sustrato

El sustrato seleccionado para este ensayo ha sido extrusionado de fresa residual. La composición y la concentración del sustrato pueden ocasionar fenómenos de inhibición que influyen sobre el metabolismo de los microorganismos y por lo tanto afectan la cantidad de CH₄ generado. Por esta razón, se debe caracterizar el sustrato previo al ensayo, tanto en términos de parámetros fisicoquímicos como de su composición elemental (Angelidaki et al., 2009; Raposo et al., 2011). En cuanto a la cantidad de sustrato a adicionar, ésta se estima a partir de las recomendaciones para la concentración de inóculo y la relación Inóculo/Sustrato (RIS) (Cárdenas et al., 2016).

3.5.3 Factores experimentales

3.5.3.1 Relación entre el inóculo y el sustrato (RIS)

La RIS es uno de los parámetros más importantes en los ensayos de PBM (Chudoba et al., 1991). Además, las unidades utilizadas (Sólidos totales, sólidos volátiles o DQO; Demanda Química de Oxígeno) deben ser claramente indicadas. Se ha resaltado la importancia de usar una RIS adecuada para controlar el proceso de biodegradación en los ensayos de PBM. La RIS puede ser baja o alta. Trabajos de investigación anteriores sugirieron el uso de una alta RIS, ≥ 2 (Raposo et al., 2011). En este ensayo, para saber la cantidad de sustrato que se introduce en los PBM se hace una relación de los sólidos volátiles (SV) entre el inóculo y el sustrato con ratio de 2, y se ha decidido que la RIS en los PBM es de 3:1,5 g de SV.

3.5.3.2 Sistema de medición de gas

En estos ensayos, para medir la producción de metano se han empleado gasómetros de 0,5 y 1,0 L sumergidos en una disolución de NaOH 2N, por su propiedad de reaccionar con el CO₂ presente en el biogás, permitiendo una medición correcta del volumen de metano por desplazamiento del mismo volumen de la disolución. El biogás se desplaza de los reactores a los gasómetros a través de mangueras de goma, de modo que se eviten pérdidas del mismo o la entrada de oxígeno en el sistema.

3.5.3.3 Condiciones físicas de operación

Para llevar a cabo los ensayos, se han empleado a modo de reactor, matraces Erlenmeyer de 250 mL (por triplicado) con un volumen de trabajo de 240 mL, sumergidos en un baño con agua termostata en un rango mesófilo. Concretamente, se ha mantenido la temperatura a 35 °C mediante un baño con un termostato de inmersión que contiene una manguera para homogeneizar la temperatura del agua en todas las zonas del baño. La agitación se ha mantenido constante en los reactores mediante agitadores magnéticos para favorecer la transferencia de materia. El tiempo de duración del ensayo ha sido 26 días.

3.5.3.4 Condiciones de estudio

En este ensayo, la presencia de oxígeno en los reactores ha sido eliminada mediante una corriente de nitrógeno gaseoso al inicio del experimento.

Los ensayos en discontinuo deben realizarse a valores de pH entre 6,8 y 7,8. La alcalinidad controla la capacidad del sistema para neutralizar los ácidos y proporciona resistencia a cambios significativos y rápidos en el pH, lo que también se conoce como “capacidad de amortiguación” (Raposo et al., 2011). Para regular el pH del medio y dotar al sistema de la alcalinidad necesaria para asegurar la estabilidad del mismo, se ha adicionado al inóculo una cantidad conocida (10 mL) de carbonato de sodio diluido (Na_2CO_3). Está bien documentado que todos los microorganismos que participan en la digestión anaerobia requieren macronutrientes durante el proceso de biodegradación de materia orgánica, además se necesitan elementos traza en cantidades muy pequeñas o trazas (Pereda et al., 2007; Raposo et al., 2006). Sin embargo, no está claro si en las condiciones normales de un ensayo de PBM se dispone de suficientes nutrientes del inóculo y/o del sustrato orgánico, o si se necesitan suplementos adicionales (Raposo et al., 2011). Por esta razón, se ha añadido una disolución de macronutrientes similar a la descrita en Raposo et al., (2006) (**Tabla 5**). Sin embargo, en muchas plantas comerciales, se tiende a añadir sales de elementos traza con una concentración superior a la necesaria, que además de suponer mayor coste económico puede presentar problemas de toxicidad en el proceso de digestión anaerobia. Por ello, en este estudio se va a tratar de evaluar si ciertos elementos traza (Co, Fe, Ni, Cu, Mn y Zn) favorecen la digestión anaerobia del extrusionado de fresa residual (**Tabla 6**). La selección de estos metales traza, como se ha comentado previamente en el presente trabajo, se ha realizado en base a la bibliografía debido a que son metales esenciales en el proceso de digestión anaerobia.

Tabla 5. Preparación de una disolución para 1 L de macronutrientes.

	NH_4Cl	K_2HPO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Extracto Levadura
Concentración (g/L)	7,00	6,25	5,00	2,50	-
Cantidad	333 mL	333 mL	167 mL	33 mL	1 g

Tabla 6. Concentraciones de las diluciones de elementos traza preparados.

	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	ZnCl_2
Concentración (g/L)	1,76	882,22	7,25	5,05	9,52	30,45

En el presente trabajo, se ha trabajado con 9 combinaciones de diferentes elementos traza para evaluar el efecto individual de cada elemento traza sobre la producción máxima de metano y sobre la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual.

En la **Tabla 7** se puede observar las cantidades de inóculo, sustrato, macronutrientes, Na₂CO₃ y agua destilada que se han adicionado a las condiciones de estudio hasta alcanzar el volumen final de 240 mL, variando únicamente las combinaciones de elementos traza añadidos y su concentración.

Tabla 7. Cantidades de inóculo, sustrato, macronutrientes, Na₂CO₃ y agua destilada que se ha adicionado a las condiciones de estudio.

	Inóculo	Sustrato	Macronutrientes	Na ₂ CO ₃	Agua destilada
Cantidad	58,4 g	10,1 mL	50 mL	10 mL	111,5 mL

Las concentraciones de elementos traza a añadir se han determinado en base a la bibliografía y a la concentración de estos elementos traza en el inóculo y sustrato. A partir de la matriz experimental de un diseño de Plackett-Burman (**Tabla 4**), se ha realizado una matriz con las concentraciones de metales traza iniciales, añadidas, y finales para cada condición de estudio (**Tabla 8**).

Tabla 8. Matriz de las concentraciones de elementos traza inicial, añadido y final en cada condición.

		Elementos traza (mg/L en cada PBM)					
Condiciones		Co	Fe	Ni	Cu	Mn	Zn
1	Inicial	0,18	103,36	0,75	0,78	1,10	6,09
	Añadido	0	0	0	2,34	3,31	18,26
	Final	0,18	103,36	0,75	3,12	4,41	24,35
2	Inicial	0,18	103,36	0,75	0,78	1,10	6,09
	Añadido	0,55	0	0	0	0	18,26
	Final	0,73	103,36	0,75	0,78	1,10	24,35
3	Inicial	0,18	103,36	0,75	0,78	1,10	6,09
	Añadido	0	310,08	0	0	3,31	0
	Final	0,18	413,44	0,75	0,78	4,41	6,09

Elementos traza (mg/L en cada PBM)							
Condiciones		Co	Fe	Ni	Cu	Mn	Zn
4	Inicial	0,18	103,36	0,75	0,78	1,10	6,09
	Añadido	0,55	310,08	0	2,34	0	0
	Final	0,73	413,44	0,75	3,12	1,10	6,09
5	Inicial	0,18	103,36	0,75	0,78	1,10	6,09
	Añadido	0	0	2,24	2,34	0	0
	Final	0,18	103,36	2,99	3,12	1,10	6,09
6	Inicial	0,18	103,36	0,75	0,78	1,10	6,09
	Añadido	0,55	0	2,24	0	3,31	0
	Final	0,73	103,36	2,99	0,78	4,41	6,09
7	Inicial	0,18	103,36	0,75	0,78	1,10	6,09
	Añadido	0	310,08	2,24	0	0	18,26
	Final	0,18	413,44	2,99	0,78	1,10	24,35
8	Inicial	0,18	103,36	0,75	0,78	1,10	6,09
	Añadido	0,55	310,08	2,24	2,34	3,31	18,26
	Final	0,73	413,44	2,99	3,12	4,41	24,35
9	Inicial	0,18	103,36	0,75	0,78	1,10	6,09
	Añadido	0,27	155,04	1,12	1,17	1,66	9,13
	Final	0,45	258,40	1,87	1,95	2,76	15,22

3.5.4 Procedimiento operativo

El sistema de PBM a escala laboratorio que se ha utilizado en este ensayo se puede observar en la siguiente imagen (**Figura 9**).



Figura 9. Sistema experimental para la determinación del Potencial Bioquímico de Metano (PBM).

Una vez montado el sistema experimental, se han realizado unos ensayos de puesta a punto del inóculo. Con el objetivo de asegurar la estabilidad del sistema y la activación del inóculo se han mantenido los PBM durante 24 horas con una alimentación de glucosa, es decir, no se han alimentado con el sustrato objeto de estudio hasta el día siguiente. Al observar que los microorganismos estaban produciendo metano con la alimentación de glucosa y así comprobar que el inóculo estaba activo, se alimentaron los reactores con extrusionado de fresa residual. Diariamente se ha medido el volumen de metano generado. Posteriormente, se han realizado las correcciones de volumen necesarias para llevar los registros a condiciones normales de presión y temperatura (1 atm, 25°C). Se ha trabajado con triplicados en todas las condiciones de estudio, excepto con un sextuplicado en la condición 9, además se ha trabajado con reactores blancos (sin sustrato). Se ha realizado un triplicado de reactores blancos por batea para obtener la producción no debida al sustrato, y así restarle esta producción con el fin de obtener sólo la producción de metano generada a partir del sustrato en estudio. Los volúmenes de metano acumulado se han representado gráficamente en función del tiempo de digestión.

3.6. Estudio de la cinética

Los parámetros cinéticos y el ajuste matemático para cada condición de estudio se han determinado numéricamente a partir de los datos experimentales obtenidos, mediante una regresión no lineal utilizando el Software SigmaPlot (versión 12.0). El modelo cinético que más se ajusta a la curva de este ensayo es el modelo Logístico (Parámetro Sigmoidal 4). En la curva de producción de metano del ensayo experimental de los PBM pueden diferenciar 2 etapas, una primera etapa con una producción exponencial de metano de 1 día y una segunda etapa que se ajusta al modelo Logístico (Parámetro Sigmoidal 4). La ecuación del modelo Logístico (Parámetro Sigmoidal 4) se muestra a continuación:

$$B_2 = B_0 + P/[1 + \exp(-4 \cdot R_m \cdot (t - \lambda)/(P + 2))]$$

donde B_2 es la producción acumulativa de metano durante la segunda etapa (mL CH₄/g SV), B_0 es la producción acumulativa de metano en el inicio de la segunda etapa (mL CH₄/g SV), P es la producción máxima de metano obtenida en la segunda etapa (mL CH₄/g SV), R_m es la velocidad máxima de producción de metano (mL CH₄/g SV·d), t (d) es el tiempo y λ (d) es el tiempo de retardo.

Adicionalmente, R^2 , error (%) y el error estándar de estimación (σ_{est}) se han determinado para evaluar el ajuste y la precisión de los resultados. El error se ha definido como la diferencia en porcentaje entre la producción experimental acumulativa final de metano y $P+B_0$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de extrusionado de fresa residual e inóculo

En este apartado se muestran los resultados de las determinaciones analíticas realizadas al extrusionado de fresa residual y al inóculo. En la **Tabla 9** se muestran diferentes determinaciones analíticas que se han realizado al extrusionado de fresa residual, tales como pH, humedad, los sólidos totales (ST), minerales (SM) y volátiles (SV), demanda química de oxígeno de los componentes totales y solubles (DQO_T y DQO_S), los fenoles totales (FT) y los azúcares.

Tabla 9. Caracterización analítica: pH, humedad, sólidos, DQO_{total}, DQO_{soluble}, fenoles totales y azúcares de extrusionado de fresa residual (EFR) con sus desviaciones estándar.

pH	Humedad (%)	ST (mg ST/kg EFR)	SM (mg SM/kg EFR)	SV (mg SV/kg EFR)	DQO _T (mg O ₂ /kg EFR)	DQO _S (mg O ₂ /kg EFR)	FT (mg ácido gálico eq/kg EFR)	Azúcares (mg glucosa eq/kg EFR)
3,8±0,1	84,4±0,1	156.953±1.414	6908±134	149.045±1.307	196.543±1288	73.193±529	1118±35	46.615±792

Como muestra la **Tabla 9**, el extrusionado de fresa residual presenta un pH menor de 4, valor que se deberá tener en cuenta en los posteriores procesos biológicos. Este valor se puede deber al elevado contenido en compuestos ácidos que presenta este sustrato. La humedad en el extrusionado de fresa residual es un 84%, ya que este sustrato presenta gran contenido en agua.

La **Tabla 9** muestra que en torno al 95% de los sólidos totales son sólidos volátiles. Los pocos sólidos minerales que se han determinado pueden corresponder a sales y/o carbonatos.

La demanda química de oxígeno, al igual que los sólidos volátiles, indica la cantidad de materia orgánica que se encuentra en el sustrato. En la **Tabla 9** se puede observar que el 37% de la materia orgánica total (DQO_{total}) corresponde a la parte soluble (DQO_{soluble}).

En la **Tabla 9** también se observa que no hay gran contenido en fenoles, ya que 1118 mg ácido gálico eq/kg fresa de fresa residual no es un valor importante comparado con una concentración mayor de 5000 mg ácido gálico eq/kg de extrusionado de fresa residual que se han obtenido en otros estudios realizados con extrusionado de fresa residual de otra temporada (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019; Trujillo-Reyes et al., 2019). Esta variación en el contenido de fenoles puede deberse a los procesos de la industria fresera. La gran diferencia en la cantidad de compuestos fenólicos debe ser un aspecto a tener en cuenta, ya que los fenoles tienen gran interés a la hora de obtener compuestos de alto valor añadido y así generar un beneficio económico. También se debe tener en cuenta en el posterior tratamiento biológico, ya que una alta concentración de fenoles puede ser inhibitoria para los microorganismos responsables del proceso (Borja et al., 1997, 1996; Ghasimi et al., 2016).

La **Tabla 9** muestra que una concentración de azúcares de 46.615 mg glucosa eq/kg de extrusionado de fresa residual, valores similares a los reportados en Rodríguez-Gutiérrez et al. (2019) y Trujillo-Reyes et al. (2019) en los que también se ha trabajado con extrusionado de fresa residual pero de otra temporada. Estos azúcares son muy beneficiosos para el tratamiento biológico, mediante digestión anaerobia, ya que son compuestos fácilmente biodegradables por los microorganismos.

En la **Tabla 10** se muestran los resultados de las determinaciones analíticas realizadas para caracterizar el inóculo: pH, alcalinidad, los sólidos totales (ST), minerales (SM) y volátiles (SV).

Tabla 10. Caracterización analítica: pH, alcalinidad y sólidos del inóculo con sus desviaciones estándar.

pH	Alcalinidad (mg carbonato/L inóculo)	ST (mg ST/kg inóculo)	SM (mg SM/kg inóculo)	SV (mg SV/kg inóculo)
8,1±0,1	7183±89	69.596±1381	18.223±122	51.373±1480

La **Tabla 10** muestra que en torno al 74% de los sólidos totales presentes en el inóculo son sólidos volátiles, resultando un 36% correspondiente a sólidos minerales que pueden corresponder a sales y/o carbonatos. Esta concentración de sólidos minerales puede deberse a que se hayan depositado estos compuestos en el fondo del reactor anaerobio. También se aprecia que inóculo presenta un pH ligeramente superior a 8 y una alcalinidad de 7183 mg carbonato/L.

En la **Tabla 11** se puede observar las concentraciones de metales en el extrusionado de fresa residual y en el inóculo que se ha llevado a cabo en el laboratorio de recursos naturales (I.R.N.A.S.) mediante plasma acoplado inductivamente (ICP).

Tabla 11. Caracterización analítica: concentración de metales (mg de metal/kg de sólidos totales) en el extrusionado de fresa residual (EFR) y en el inóculo.

Metales	EFR (mg/kg ST)	Inóculo (mg/Kg ST)	Metales	EFR (mg/kg ST)	Inóculo (mg/kg ST)
Al	22,80	2432,62	% MgO	0,27	0,39
As	1,85	1,26	Mn	96,32	27,92
B	21,76	0,07	Mo	2,36	38,86
Ba	28,17	28,13	Na	216,36	43.797,45
Ca	4067,16	8963,16	% Na	0,02	4,38
% CaO	0,57	1,25	Ni	2,14	43,37
Cd	0,04	0,67	P	2922,92	7656,88
Co	0,20	10,63	% P ₂ O ₅	0,67	1,76
Cr	3,38	53,24	Pb	0,03	2,32
Cu	6,66	43,52	S	1177,40	9510,71
Fe	109,66	6061,33	% SO ₃	0,29	2,38
Hg	0,32	0,49	Sn	0,61	5,40
K	5688,93	9734,12	Sr	24,19	33,81
% K ₂ O	0,69	1,17	V	-0,28	76,56
Mg	1642,33	2353,48	Zn	23,60	350,31

En la **Tabla 11** se observa que el extrusionado de fresa residual presenta gran contenido de Ca, K, Mg, P y S, siendo todos estos valores mayores a 1000 mg metal/kg de extrusionado de fresa residual. Sin embargo, los metales que se han estudiado en el presente trabajo tienen bajas concentraciones, siendo Fe y Mn los que presentan mayores concentraciones con 109,6 y 96,3 mg de metal/kg de extrusionado de fresa residual, respectivamente (**Tabla 11**). Los metales estudiados que presentan menores concentraciones son Co y Ni con 0,202 y 2,143 mg de metal/ kg de extrusionado de fresa residual, respectivamente (**Tabla 11**). Dado que el Co y Ni presentan las concentraciones más bajas de los metales estudiados, pueden ser estos los metales que limiten el proceso de digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual.

En el caso del inóculo también se puede apreciar que presentan gran contenido de Ca, K, Mg, P y S, siendo estas concentraciones mayores a 2000 mg metal/ kg de inóculo frente a los 1000 mg metal/ kg de extrusionado de fresa residual (**Tabla 11**). Además, existen concentraciones elevadas de Al, Fe y Na, siendo especialmente alta la concentración de Na con 43.797 mg metal/ kg de inóculo (**Tabla 11**). Los iones metálicos ligeros que incluyen Na, K, Ca y Mg están presentes en el influente de los reactores anaeróbicos, esto puede deberse a que se liberen en la descomposición de la materia orgánica o porque se añadan como productos químicos para ajuste del pH (Chen et al., 2008). En la **Tabla 11** se puede observar que el metal de estudio que presenta una mayor concentración con respecto a los otros metales estudiados es el Fe, con una concentración de 6061,3 mg metal/kg de inóculo. El hecho de que la concentración de Fe que se ha obtenido en el inóculo sea más elevada que el resto de los metales estudiados puede ser porque se haya producido una acumulación de Fe en el fondo del reactor anaerobio o porque el reactor presente Fe en su material de fabricación. Por otro lado, los metales estudiados que presentan menores concentraciones son Co, Mn y Ni con 10,6; 27,9 y 43,4 mg metal/kg de inóculo, respectivamente (**Tabla 11**).

4.2. Digestión anaerobia

En este apartado se estudian la producción de metano (mL CH₄/g SV), la biodegradabilidad, la estabilidad y la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual para las 9 condiciones de estudio ya mencionadas en el apartado 3.4. (Diseño estadístico de Plackett-Burman).

4.2.1 Caracterización analítica de las condiciones de estudio

Para evaluar la valorización energética del extrusionado de fresa residual en condiciones anaerobias se ha llevado a cabo el ensayo de PBM. La estabilidad del proceso ha sido evaluada a través del pH y alcalinidad. Los valores de pH se han mantenido en un rango cercano al recomendado para una actividad metanogénica adecuada, entre 6,8 y 7,8 (Wheatley, 1990) (**Tabla 12**). Aunque, las condiciones 4, 5, 6, 7, 8 y 9 presentan un pH en torno a 8,1 que puede ser debido a la adición de los metales (**Tabla 12**). En la **Tabla 12** también se puede observar que la alcalinidad presenta unos valores en torno a 7000 mg de carbonato/L de PBM, siendo esta alcalinidad suficiente para amortiguar cambios de pH. En torno al 60% de los sólidos totales presentes en el los PBM son sólidos volátiles tras el proceso de digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual (**Tabla 12**).

Tabla 12. Caracterización analítica de los efluentes del proceso de digestión anaerobia al finalizar el ensayo de PBM con sus desviaciones estándar: pH, humedad, sólidos totales, minerales y volátiles de las condiciones de estudio.

Condición	pH	Alcalinidad (mg carbonato/L PBM)	ST (mg ST/kg PBM)	SM (mg SM/kg PBM)	SV (mg SV/kg PBM)
1	7,6±0,1	8332±40	22.077±9	8449±20	13.627±12
2	7,6±0,1	7751±402	21.783±509	8642±67	13.141±441
3	7,5±0,1	7019±197	19.818±140	8292±137	11.526±277
4	8,2±0,1	6885±213	19.784±479	8120±70	11.664±521
5	8,2±0,1	7144±211	19.426±560	7414±191	12.011±579
6	8,2±0,1	7030±186	19.294±947	7517±676	11.776±271
7	8,1±0,1	6353±544	18.062±2046	7692±988	10.370±1059
8	8,1±0,1	6482±271	21.042±305	8866±233	12.176±524
9	8,0±0,1	7205±274	21.786±1794	8380±629	13.405±1325

En la **Tabla 13** se puede observar que el valor de DQO_{soluble} de las condiciones es en torno a 1200 mg O_2/L de PBM. Por otro lado, el contenido de AGV presenta valores alrededor de 100 mg O_2/L de PBM. La condición 3 es la que presenta mayor contenido en AGV con un valor de 154 mg O_2/L PBM, representando un 15% de la DQO_{soluble} (**Tabla 13**). Dado que los AGV se producen fuera del rango óptimo de pH para la digestión anaerobia, tanto en condiciones ácidas como básicas, este contenido de ácidos puede deberse a que el pH en algunas condiciones es ligeramente básico. También puede ser por la influencia de los metales añadidos o porque los microorganismos metanogénicos presentes en el inóculo no están en condiciones óptimas para degradar estos ácidos. Por tanto, no se degradarían suficientemente rápido los ácidos y se produciría su acumulación.

En la **Tabla 13** también se puede observar que la concentración de fenoles totales es en torno a 200 mg ácido gálico eq/L PBM y la de fenoles solubles es menor de 100 mg ácido gálico eq/L PBM en todos los casos. Estas concentraciones de fenoles solubles son inferiores a las descritas para varios fenoles individuales como inhibidores del proceso de digestión anaerobia (Borja et al., 1997, 1996; Ghasimi et al., 2016).

Tabla 13. Caracterización analítica de los efluentes del proceso de digestión anaerobia al finalizar el ensayo de PBM con sus desviaciones estándar: DQO_{soluble} , AGV, relación entre AGV y DQO_{soluble} , fenoles totales y fenoles solubles de las condiciones de estudio.

Condición	DQO_s (mg O_2/L PBM)	AGV (mg O_2/L PBM)	Relación AGV/ DQO_s (%)	FT (mg ácido gálico eq/L PBM)	FS (mg ácido gálico eq/L PBM)
1	1288±8	81±0	6,3	210±5	99,4±4,5
2	1215 ±90	90±14	7,4	212±1	90,5±10,7
3	1027± 23	154±0	15,0	176±6	85,2±1,5
4	1110±113	63±31	5,7	203±6	79,8±11,9
5	1313±91	80±57	6,1	176±12	92,1±3,5
6	1217±111	118±77	9,7	177±10	90,3± 5,9
7	983±127	80±27	8,1	155±23	66,7±11,6
8	1217±220	152±115	12,5	158±3	77,6±4,0
9	1291±192	149±56	11,5	182±26	86,9±14,6

4.2.2 Producción de metano experimental para cada condición de estudio

En las Figuras 10a, 10b y 10c se muestra los gráficos correspondientes a las producciones de metano (mL CH_4/g SV) de las diferentes condiciones que se han estudiado frente al tiempo de duración del ensayo (días).

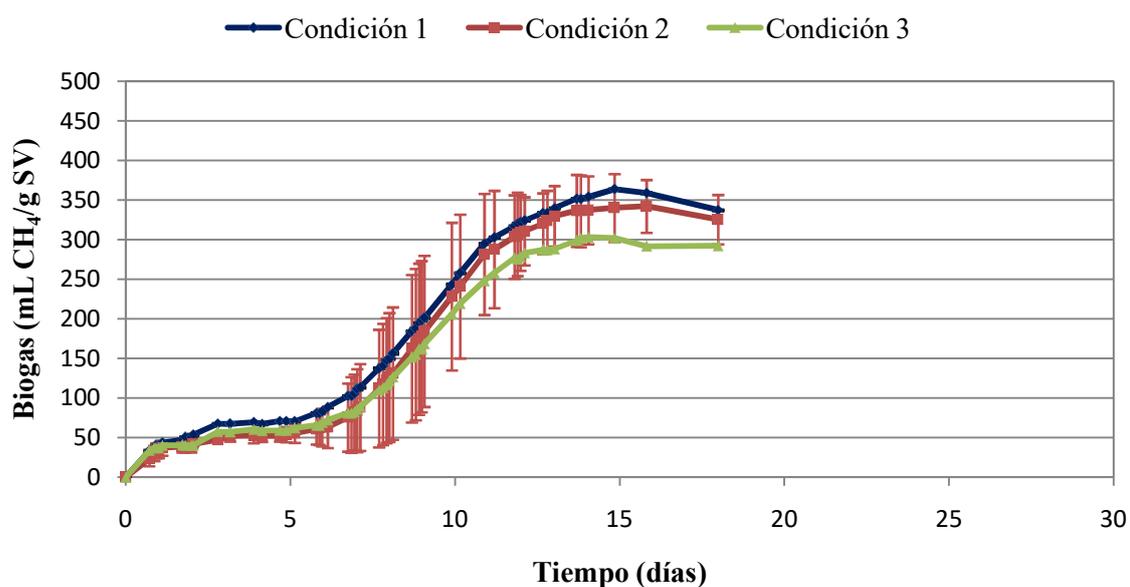


Figura 10a. Producción de metano (mL CH_4/g SV) de las condiciones 1, 2 y 3 con sus desviaciones estándar.

Al principio del ensayo, desde el día 0 al día 1, se puede observar que las condiciones 1, 2 y 3 tienen una producción exponencial de metano en la primera etapa que puede ser debida a la presencia de compuestos fácilmente degradables por los microorganismos, como son los azúcares. Seguidamente, desde el día 1 hasta el día 5 aproximadamente, se puede observar una fase lag (período de latencia o adaptación) debido a que los microorganismos se estarían adaptando al medio (**Figura 10a**). Trascurrido este período de adaptación se observa otra etapa exponencial, desde el día 5 hasta el final del ensayo, con una producción máxima de 364, 340 y 303 mL CH₄/g SV de las condiciones 1, 2 y 3, respectivamente (**Figura 10a**).

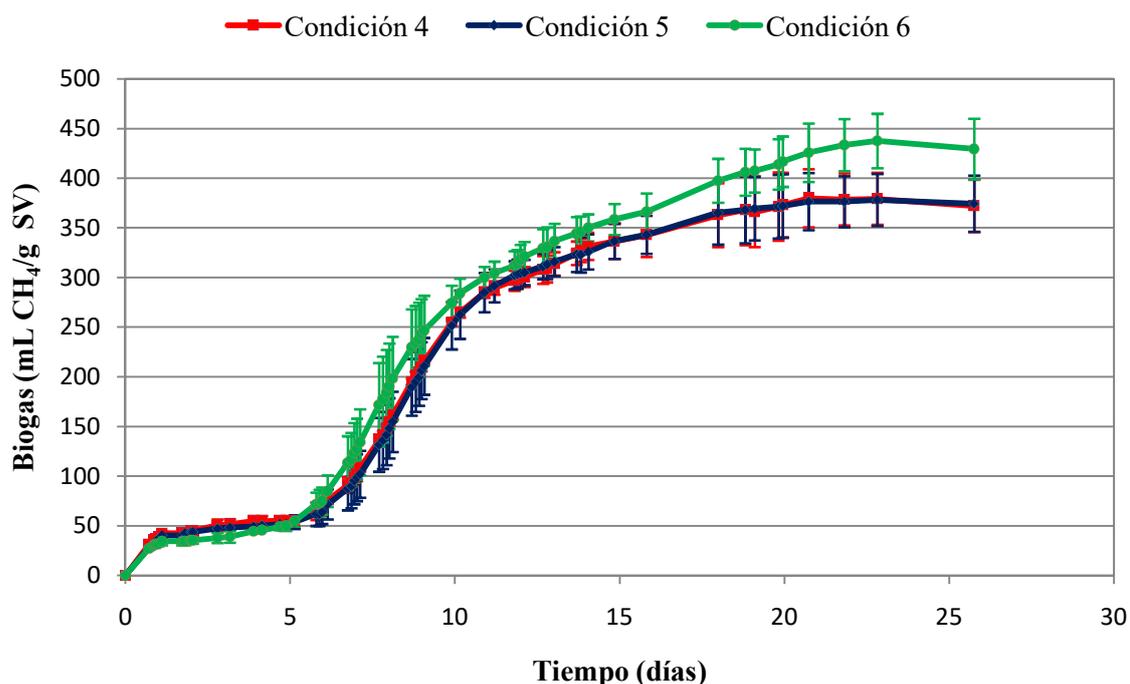


Figura 10b. Producción de metano (mL CH₄/g SV) de las condiciones 4, 5 y 6 con sus desviaciones estándar.

Al principio del ensayo, desde el día 0 al día 1, se puede observar que las condiciones 4, 5 y 6 tienen una producción exponencial de metano en la primera etapa que puede ser debida a la presencia de compuestos fácilmente degradables por los microorganismos, como son los azúcares. Seguidamente, desde el día 1 hasta el día 5 aproximadamente, se puede observar una fase lag (período de latencia o adaptación) debido a que los microorganismos se estarían adaptando al medio (**Figura 10b**). Trascurrido este período de adaptación se observa otra etapa exponencial, desde el día 5 hasta el final del ensayo, con una producción máxima de 437, 378 y 377 mL CH₄/g SV de las condiciones 6, 5 y 4, respectivamente (**Figura 10b**).

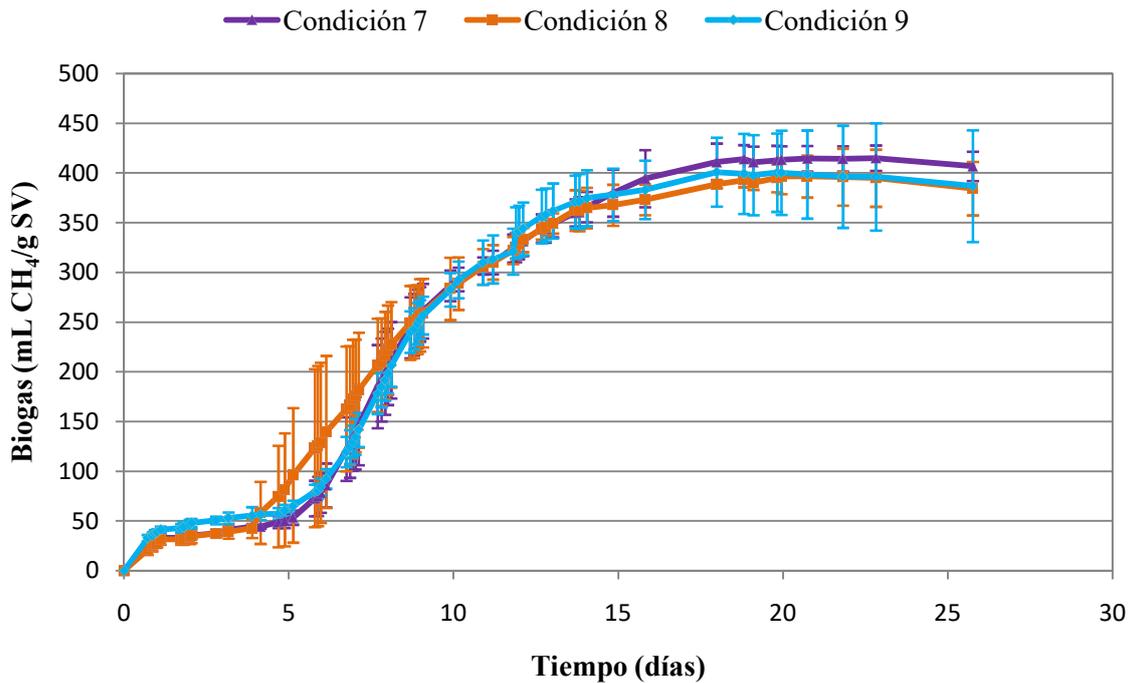


Figura 10c. Producción de metano (mL CH₄/g SV) de las condiciones 7, 8 y 9 con sus desviaciones estándar.

Al principio del ensayo, desde el día 0 al día 1, se puede observar que las condiciones 7, 8 y 9 tienen una producción exponencial de metano en la primera etapa que puede ser debida a la presencia de compuestos degradables por los microorganismos, como son los azúcares. Seguidamente, desde el día 1 hasta el día 5 aproximadamente, se puede observar una fase lag (período de latencia o adaptación) debido a que los microorganismos se estarían adaptando al medio (**Figura 10c**). Trascurrido este período de adaptación se observa otra etapa exponencial, desde el día 5 hasta el final del ensayo, con una producción máxima de 411, 401 y 389 mL CH₄/g SV de las condiciones 7, 9 y 8, respectivamente (**Figura 10c**).

4.2.3 Producción máxima de metano experimental frente a la biodegradabilidad en cada condición de estudio

En la **Tabla 14** se muestra el porcentaje de biodegradabilidad que se ha producido tras la digestión anaerobia del extrusionado de fresa residual en forma de DQO y el porcentaje de biodegradabilidad que se ha producido tras la digestión anaerobia del extrusionado de fresa residual en forma de SV con su desviación estándar. La **Tabla 14** también muestra la producción máxima experimental de las diferentes condiciones de estudio con su desviación estándar.

Tabla 14. Valores de biodegradabilidad en DQO, biodegradabilidad en SV y producción máxima de metano experimental de las diferentes condiciones de estudio con sus desviaciones estándar.

Condición	Biodegradabilidad DQO (%)	Biodegradabilidad SV (%)	Producción máx. experimental (mL CH ₄ /g SV)
1	78,9	81,9±0	363,8±0
2	74,2	89,7±7,1	342,2±33,4
3	65,7	115,6±0	303,1±0
4	82,3	113,4±8,3	379,9±29,3
5	81,9	107,9±9,3	378,2±26,1
6	94,9	111,6±4,4	437,6±27,3
7	89,9	134,1±16,9	415,0±12,8
8	85,9	105,2±8,4	396,6±17,9
9	86,9	85,5±21,2	400,9±34,6

La **Tabla 14** muestra que los porcentajes de biodegradabilidad del extrusionado de fresa residual en forma de DQO para las condiciones 1, 2 y 3 son menores del 80%, para las condiciones 4 y 5 son en torno del 80% y para la condición 6 es del 95%. En las condiciones 7, 8 y 9 los porcentajes de biodegradabilidad son mayores del 85%, siendo 461 mL CH₄/g SV la producción teórica para el extrusionado de fresa residual (**Tabla 14**). Debido a la deficiencia de algunos metales en la digestión anaerobia, las condiciones 1, 2 y 3 presentan una biodegradabilidad menor del 80%, siendo especialmente baja en el caso de la condición 3 con un 66% (**Tabla 14**). En el caso de los porcentajes de biodegradabilidad del extrusionado de fresa residual en forma de SV se puede observar que se ha degradado el 100% de la materia orgánica, exceptuando la condición 1, 2 y 9 cuyos valores son en torno al 80%, 90% y 85%, respectivamente (**Tabla 14**).

En la **Tabla 14** también se muestra que la producción máxima experimental se encuentra entre 437 y 303 mL CH₄/g SV para las condiciones 6 y 3, respectivamente, siendo el valor de la condición 6 un 30,7% mayor que la condición 3.

4.2.4 Parámetros obtenidos del modelo Logístico en cada condición de estudio

En la **Tabla 15** se resumen los parámetros obtenidos de la aplicación del modelo Logístico (Parámetro Sigmoidal 4) a los datos experimentales mostrados en las **Figuras 10a, 10b y 10c**. También se muestran los valores de R^2 , Error (%) y el error estándar de estimación (σ_{est}) para evaluar el ajuste y la precisión de los resultados (**Tabla 15**).

Tabla 15. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos con el modelo Logístico (Parámetro Sigmoidal 4) de las diferentes condiciones de estudio.

Condiciones	P (mL CH ₄ /g SV)	R _m (mL CH ₄ /g SV d)	λ (d)	B ₀ (mL CH ₄ /g SV)	R ²	Error (%)	σ_{est}
1	295,83±3,43	55,17±2,48	9,18	60,76	0,9985	1,99	4,49
2	297,86±2,27	59,40±2,26	9,21	42,23	0,9990	0,62	3,81
3	255,37±2,90	49,83±2,38	9,19	47,54	0,9978	0,07	4,77
4	332,87±6,87	46,39±5,49	9,02	30,12	0,9915	4,45	11,84
5	332,11±6,18	48,61±5,42	9,07	29,97	0,9927	3,84	11,14
6	417,07±14,45	42,42±7,25	8,65	-4,77	0,9857	5,77	17,09
7	398,86±10,98	48,22±7,32	8,32	4,25	0,9889	2,87	15,19
8	403,98±7,79	41,28±3,08	7,42	-12,96	0,9967	1,40	7,45
9	360,97±5,95	52,79±5,31	8,43	29,69	0,9947	2,56	10,06

La **Tabla 15** muestra valores de producción máxima de metano obtenidos en la segunda etapa (P) entre 255 y 417 mL CH₄/g SV para las condiciones 3 y 6, respectivamente. Los valores más elevados de producción máxima de metano obtenidos en la segunda etapa son de 417, 403 y 398 mL CH₄/g SV d para las condiciones 6, 8 y 7, respectivamente (**Tabla 15**).

En la **Tabla 15** se muestra que los valores más elevados de velocidad máxima de producción de metano, designada por R_m, son de 55, 59 y 53 mL CH₄/g SV d para las condiciones 1, 2 y 9, respectivamente, que son también las condiciones que presentar menor biodegradabilidad en SV (**Tabla 14 y 15**). Los valores más bajos de velocidad máxima de producción de metano son de 41 y 42 mL CH₄/g SV d para las condiciones 8 y 6, respectivamente (**Tabla 15**). Es importante mencionar que los valores de velocidad máxima de producción de metano se han encontrado entre 41 y 59 mL CH₄/g SV d para las condiciones 8 y 2, respectivamente, siendo el valor de la condición 2 un 30,6% mayor que la condición 8 (**Tabla 15**).

En la **Tabla 15** también se recogen los datos del tiempo de retardo (λ) que tiene cada una de las condiciones, los cuales han presentado valores en torno a los 9 días para las condiciones 1, 2, 3, 4 y 5. En las condiciones 6, 7, 8 y 9, los datos del tiempo de retardo (λ) disminuyen ligeramente a valores en torno a los 8 días. Se dan algunos casos en los que la producción acumulativa de metano al principio de la segunda etapa es muy pequeña y el modelo da valores de B_0 negativos (**Tabla 15**). Los valores altos de R^2 obtenidos, que fueron superiores a 0,98 en todos los casos, así como los valores bajos de % error indicaron que los datos experimentales se ajustan correctamente al modelo propuesto (**Tabla 15**).

4.3. Correlación lineal entre los metales y los parámetros de estudio

En base al diseño de Placket-Burman y a los parámetros cinéticos obtenidos a partir de los resultados experimentales (**Tabla 4 y 16, respectivamente**), se ha realizado un estudio estadístico en colaboración con el laboratorio de procesos biológicos de la escuela de ingeniería de São Carlos (Universidad de São Paulo, Brasil) para evaluar si la adición de los metales (Co, Fe, Ni, Cu, Mn y Zn) tiene un efecto individual significativo sobre la producción máxima de metano y la velocidad máxima de producción de metano, operando con extrusionado de fresa residual como sustrato en el proceso de digestión anaerobia.

Tabla 16. Valores de los parámetros cinéticos y duplicados seleccionados a partir de los cuales se ha realizado el estudio estadístico.

Condiciones	$P_{\text{máx}} (P+B_0)$ (mL CH ₄ /g SV)	R_m (mL CH ₄ /g SV d)	Condiciones	$P_{\text{máx}} (P+B_0)$ (mL CH ₄ /g SV)	R_m (mL CH ₄ /g SV d)
1	356,59	55,17	6	380,17	54,61
	356,59	55,17		401,49	40,98
2	312,22	67,64	7	391,32	50,04
	361,94	68,44		393,16	50,37
3	302,91	49,83	8	377,7	47,08
	302,91	49,83		383,13	47,36
4	340,54	47,76	9	427,01	49,36
	349,81	49,62		414,75	54,7
5	391,82	42,43			
	364,08	54,05			

En la **Tabla 16** se muestran los parámetros cinéticos obtenidos del modelo Logístico (Parámetro Sigmoidal 4) en base a los que se ha realizado el estudio estadístico para evaluar el efecto de la adición de los elementos traza. La producción máxima de metano del modelo Logístico ($P_{\text{máx}}$) es la suma de la producción máxima de metano obtenida en la segunda etapa (P) más la producción acumulativa de metano al principio de la segunda etapa (designada por B_0) (**Tabla 15 y 16**).

La **Tabla 17** es el resumen del modelo estadístico en el que se muestra el efecto de la adición de los metales estudiados sobre la producción máxima de metano del modelo Logístico ($P_{m\acute{a}x}$), la $P_{m\acute{a}x}$ con una re-parametrización y la velocidad máxima de producción de metano (R_m). También se recogen los valores de R^2 , R-ajustado, significancia del modelo y falta de ajuste para la $P_{m\acute{a}x}$, la $P_{m\acute{a}x}$ con re-parametrización y la R_m . En el presente trabajo se ha realizado una re-parametrización del modelo para $P_{m\acute{a}x}$, eliminando los metales que han presentado valores menos significativos. La de R^2 , el R-ajustado, la significancia del modelo y la falta de ajuste son herramientas para determinar la significancia del modelo estadístico y el ajuste del mismo. Cuanto mayor es el R^2 y más significativo es el modelo (menor p-valor), mejor es el ajuste del modelo. Mientras que cuanto más significativa es la falta de ajuste (menor p-valor), peor es el ajuste del modelo.

Tabla 17. Resumen del modelo estadístico en el que se muestra el efecto de la adición de los metales estudiados sobre la producción máxima de metano del modelo Logístico ($P_{m\acute{a}x}$), la $P_{m\acute{a}x}$ con re-parametrización y la velocidad máxima de producción de metano (R_m). También se recogen los valores de R^2 , R-ajustado, significancia del modelo y falta de ajuste para la $P_{m\acute{a}x}$, la $P_{m\acute{a}x}$ con re-parametrización y la R_m .

Modelo estadístico de Plackett-Burman			
	$P_{m\acute{a}x}$	$P_{m\acute{a}x}$ re-parametrización	R_m
R^2	0,82468	0,81287	0,75573
R-ajustado	0,70195	0,73490	0,62243
Significancia del modelo	Significativo (p-valor: 0,00393)	Significativo (p-valor: 0,00049)	Significativo (p-valor: 0,01626)
Falta de ajuste	Significativo (p-valor: 0,01722)	No significativo (p-valor: 0,075428)	No significativo (p-valor: 0,463752)
Efecto positivo	Ni (p-valor: 0,00009)	Ni (p-valor: 0,00009)	Zn (p-valor: 0,01643)
Efecto negativo	-	-	Fe (p-valor: 0,02743) Ni (p-valor: 0,01102)

La **Tabla 17** muestra el efecto de la adición de los metales estudiados sobre la producción máxima de metano y en la velocidad máxima de producción de metano. Dado que cada metal tiene correlación lineal con los parámetros estudiados, se usa un modelo lineal para correlacionar los metales estudiados con la $P_{m\acute{a}x}$ y la R_m .

En el caso de $P_{m\acute{a}x}$ el p-valor de significancia del modelo es de 0,00393 (menor de 0,05), y por lo tanto es significativo. Sin embargo, el p-valor de la falta de ajuste es significativo con valor de 0,01722 (**Tabla 17**). Por tanto, este modelo es de poca fiabilidad y por ello se ha realizado una re-parametrización del modelo, eliminando el Co y Mn que son los metales que presentan valores menos significativos. Una vez que se ha

realizado la re-parametrización del modelo, se puede observar que el p-valor de significancia del modelo se hace más significativo mientras que el p-valor de la falta de ajuste aumenta (ya siendo no significativo), por lo tanto ya es un modelo fiable (**Tabla 17**).

En el caso de la velocidad máxima de producción de metano o R_m , el p-valor de significancia del modelo es significativo con un valor de 0,00393 y el p-valor de la falta de ajuste no es significativo con un valor de 0,463752. Por lo tanto se puede decir que es un modelo fiable (**Tabla 17**).

Diversos autores informaron sobre la mejora del rendimiento del proceso de digestión anaerobia en términos de producción de CH_4 con el suministro de Co, Ni y Fe (Gustavsson et al., 2013; Hinken et al., 2008). En la **Tabla 17** se puede observar que la adición de Ni en el presente estudio ha tenido un efecto significativamente positivo sobre la $P_{m\acute{a}x}$, con un p-valor de 0,00009. Este valor se ha mantenido tanto antes como después de la re-parametrización del modelo. En varios estudios sobre el proceso de digestión anaerobia, uno operando con residuo de ensilaje y otro operando con maíz, se demostró que la suplementación de Ni mejora el rendimiento del proceso (Gustavsson et al., 2013; Pobeheim et al., 2010). En otro estudio sobre el efecto de la privación de Ni en un reactor UASB (reactor anaerobio de flujo ascendente) alimentado con metanol se observó una clara limitación de la actividad metanogénica específica de los microorganismos (Fermoso, 2008). Kida et al. (2001) observaron que la actividad metanogénica con acetato como sustrato, así como las concentraciones de la coenzima M reductasa (factor F_{430}) en los microorganismos metanogénicos de una planta de tratamiento de aguas residuales disminuyeron con cantidades decrecientes de Ni^{2+} adicionadas. La deficiencia de Ni podría dar como resultado una cantidad reducida del factor F_{430} , disminuyendo así la actividad metanogénica específica de los microorganismos. Por tanto, se puede confirmar que en el presente estudio existe una deficiencia de Ni y por ello la adición de Ni tiene un efecto significativamente positivo sobre la producción máxima de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual en el rango de concentraciones estudiado. En la **Tabla 17** también se puede observar que ningún metal ha presentado efectos significativamente negativos sobre la $P_{m\acute{a}x}$.

Varios estudios informaron sobre limitaciones en la digestión anaerobia debido a la falta de Co (Banks et al., 2012; Fermoso et al., 2008; Gustavsson et al., 2013). Aunque, en el presente estudio, la adición de Co no ha tenido un efecto significativo sobre la digestión anaerobia de extrusionado de fresa en el rango de concentraciones estudiado. En otro estudio se informó que la adición de Cu mejora la producción de metano con aguas negras como sustrato (Braga et al., 2017). Aunque, en el presente estudio, la adición de Cu tampoco ha tenido un efecto significativo sobre la digestión anaerobia de extrusionado de fresa en el rango de concentraciones estudiado.

Por otro lado, en la **Tabla 17**, se puede observar que la adición de Ni ha presentado un efecto significativamente negativo sobre la velocidad máxima de producción de metano con un p-valor de 0,01102. Patidar y Tare (2006) observaron que las combinaciones de ciertos elementos traza tienen efectos sinérgicos o antagónicos en la formación de metano. Patidar y Tare (2006) evaluaron las combinaciones de Fe / Co, Fe / Ni

/ Zn, Ni / Zn / Co y Zn, observando que la adición de Ni afecta negativamente a la captación de Co y Zn en microorganismos metanógenos y sulfato reductores, respectivamente, debido al antagonismo de los iones metálicos. Este efecto antagonico del Ni sobre la captación de Co resulta en una actividad metanogénica más baja en comparación con los que no se adicionó Ni (Patidar & Tare, 2006). En un estudio sobre el impacto de los elementos traza en la digestión anaerobia de ácidos grasos volátiles, en modo de operación discontinuo, se observó mediante un diseño experimental factorial fraccional que la adición de 1 mg de Ni/L muestra efectos inhibitorios moderados sobre la degradación de los AGV, posiblemente debido a su toxicidad (Jiang et al., 2017). Por tanto, en el presente estudio la adición de 1,12-2,25 mg de Ni/L (para el punto central y el nivel alto, respectivamente) puede presentar efectos antagonicos o inhibitorios, produciendo así un efecto significativamente negativo sobre la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual en el rango de concentraciones estudiado, no siendo así para la producción máxima de metano.

En la **Tabla 17** también se puede observar que la adición de Fe ha presentado un efecto significativamente negativo sobre la velocidad máxima de producción de metano con un p-valor de 0,02743. Curiosamente, no se han encontrado estudios en los que la adición de Fe sea inhibitoria para el proceso de digestión anaerobia en el rango de concentraciones estudiado. En muchos estudios se comentó el efecto positivo de la adición de Fe, sólo o en combinación con otros metales traza, sobre la digestión anaerobia (Fermoso et al., 2009; Hinken et al., 2008; Jiang et al., 2017; Osuna et al., 2008; Patidar & Tare, 2006; Zhang et al., 2003). En un estudio en modo de operación discontinuo, se observó que la adición de 1 mg de Fe/L estimuló la actividad metanogénica total (Patidar & Tare, 2006). Sin embargo, en el presente estudio se ha observado que la adición de 155-310 mg de Fe/L (para el punto central y el nivel alto, respectivamente) ha presentado un efecto significativamente negativo sobre la velocidad máxima de producción de metano. Algunos autores observaron que la precipitación de sulfuros metálicos hacen que disminuya la biodisponibilidad de los metales para los microorganismos, este es el caso por ejemplo del Fe que aunque suele estar presente en mayores concentraciones que otros metales puede presentar baja biodisponibilidad para los microorganismos metanogénicos (Arakaki & Morse, 1993; Fermoso, 2008; Fermoso et al., 2009). Dado que en el presente estudio no se ha observado concentraciones importantes de azufre en el sustrato o en el inóculo (**Tabla 11**), puede ser que el Fe esté muy biodisponible y la adición de este metal haya tenido un efecto significativamente negativo sobre la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual en el rango de concentraciones estudiado.

En la **Tabla 17**, se puede observar que la adición de Zn ha presentado un efecto significativamente negativo sobre la velocidad máxima de producción de metano con un p-valor de 0,01643. Fermoso (2008) estudió el efecto de la privación de Zn en dos reactores UASB alimentados con metanol y observó que añadiendo una solución completa de metales traza, excepto Zn, la actividad metanogénica específica de los microorganismos fue de 3,4 g de CH₄-DQO/g SVd, comparado con 4,2 g de CH₄-DQO/g SVd en un medio con una adición completa de metales traza (incluido Zn). Posteriormente, Fermoso (2008) adicionó de forma continua 0,033 y

0,33 mg de Zn/L en los reactores 1 y 2, respectivamente. Esta continua adición de Zn se llevó a cabo con el fin de estudiar si los reactores se recuperaban de la deficiencia de zinc, observándose una acidificación del reactor y una inactividad de los microorganismos metanogénicos. En el presente estudio se ha estudiado si la adición de 9,1-18,2 mg de Zn/L (para el punto central y el nivel alto, respectivamente) mejora la actividad metanogénica de los microorganismos, observándose un efecto significativamente positivo sobre la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual en el rango de concentraciones estudiado. El Zn forma parte de proteínas que catalizan reacciones que intervienen en la metanogénesis, como por ejemplo la coenzima M metiltransferasa (Sauer & Thauer, 2000). Dado que el Zn es esencial en varias proteínas que catalizan las reacciones y transformaciones metanogénicas, puede ser que la deficiencia de Zn ocasione que los microorganismos metanogénicos no degraden correctamente la materia orgánica a metano. Sekiguchi et al. (1999) y Fermoso (2008) estudiaron varias poblaciones de microorganismos en dos reactores diferentes y se observó que en el reactor con una continua adición de Zn se formaron grupos densos de microorganismos metanógenos, pero al reactor al que no se adicionó Zn se formaron grupos más pequeños y dispersos de microorganismos metanógenos. Esto sugiere que la adición de Zn estimuló el crecimiento de los microorganismos metanógenos en grupos. Por tanto, se puede confirmar que en el presente estudio existe una deficiencia de Zn y por ello la adición de Zn ha tenido un efecto significativamente positivo sobre la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual en el rango de concentraciones estudiado.

Es importante mencionar que, en el presente estudio, la adición de Ni ha presentado un efecto significativamente positivo sobre la producción máxima de metano y a su vez un efecto significativamente negativo sobre la velocidad máxima de producción de metano en el rango de concentraciones estudiado para la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual (**Tabla 17**). En sistemas de digestión anaerobia a escala industrial, la elección entre una mayor producción máxima de metano o una mayor velocidad máxima de producción de metano se debe estudiar para cada reactor específico. Podría ser interesante mejorar la velocidad máxima de producción de metano, ya que se conseguiría un Tiempo de Residencia Hidráulico (TRH) menor y con ello se podría tratar más volumen de influente en menor tiempo. Además, el TRH afecta al tamaño de reactor, de forma que un TRH menor conllevaría un volumen del reactor menor y a su vez un coste del reactor menor.

Como ya se ha mencionado en el presente trabajo, uno de los factores que puede afectar a la digestión anaerobia son los elementos traza. En reactores anaerobios industriales, es un desafío determinar qué elementos traza y en qué concentración hay que adicionar estos elementos traza ya que es muy difícil conocer el requerimiento de dichos elementos traza en un reactor anaerobio dónde hay gran diversidad de microorganismos con complicadas reacciones biológicas y bioquímicas involucradas. Por lo tanto, es importante estudiar y comprender los requisitos específicos de elementos traza en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual, con el objetivo de añadir sólo aquellos necesarios para mejorar el rendimiento del proceso y reducir los costes operativos.

Dado que en el presente estudio la adición de Ni y Zn ha tenido un efecto significativamente positivo tanto en la producción máxima de metano y la velocidad máxima de producción de metano, respectivamente, puede ser interesante la adición de dichos metales en reactores industriales que operen con extrusionado de fresa residual. Otra alternativa que podría ser interesante estudiar es la co-digestión del extrusionado de fresa residual con otro sustrato que presente una concentración elevada de Ni y Zn, sin llegar a ser inhibitoria, con el fin de mejorar el rendimiento de producción de metano en el proceso de digestión anaerobia. Ramírez (2012) evaluó la obtención de biogás en una co-digestión de residuos agroindustriales (torta de piñón, cascarilla de arroz y rumen de ganado bovino) con estiércol de ganado vacuno. En ese estudio se observó que la co-digestión de cascarilla de arroz con estiércol de ganado vacuno presenta una mejora en el rendimiento de producción de metano (Ramírez, 2012). La alternativa de la co-digestión presenta ventajas como ahorro en costes de operación debido a la no adición de reactivos, la dilución de inhibidores presentes en los residuos y la mejora de la estabilidad del proceso debido a la mayor diversidad de microorganismos. No obstante, es necesario realizar un estudio en profundidad del efecto de la mezcla de diferentes sustratos con el fin de mejorar el rendimiento del proceso de digestión anaerobia, asegurar que el proceso sea lo más rentable posible y garantizar una correcta gestión y protección del medio ambiente.

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha aplicado un diseño factorial fraccionado y se ha trabajado en modo de operación discontinuo para estudiar el efecto de la adición de seis elementos traza (Co, Ni, Fe, Cu, Mn y Zn) sobre la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual. De los resultados se han obtenido las siguientes conclusiones:

- El extrusionado de fresa residual es un sustrato complejo y óptimo para el proceso de digestión anaerobia que ha presentado un rango de producción máxima experimental de metano entre 303 y 437 mL CH₄/g SV y un rango de velocidad máxima de producción de metano entre 41 y 59 mL CH₄/g SV d, produciéndose un aumento en el rendimiento de 30,7% y 30,6%, respectivamente, al adicionar diferentes combinaciones de elementos traza.
- En el estudio de la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual se ha observado que ningún metal ha presentado efectos significativamente negativos sobre la producción máxima de metano en el rango de concentraciones estudiado.
- La adición de Ni ha presentado un efecto significativamente positivo sobre la producción máxima de metano para el rango de concentraciones estudiado. Esto se puede deber a la deficiencia de Ni en los microorganismos metanogénicos, ya que el Ni es un constituyente de la coenzima M reductasa (factor F₄₃₀) que interviene en la etapa metanogénica, disminuyendo así la actividad metanogénica de los microorganismos. Contrariamente, la adición de Ni ha presentado un efecto significativamente negativo sobre la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual para el rango de concentraciones estudiado.
- La adición de Fe ha presentado un efecto significativamente negativo sobre la velocidad máxima de producción de metano en la digestión anaerobia de extrusionado de fresa residual en el rango de concentraciones estudiado.
- La adición de Zn ha presentado un efecto significativamente positivo sobre la velocidad máxima de producción de metano para el rango de concentraciones estudiado.
- El diseño factorial fraccionado ha introducido un enfoque experimental eficiente para identificar los elementos traza deficientes en el extrusionado de fresa residual para el proceso de digestión anaerobia.

En futuras investigaciones en el Instituto de la Grasa (CSIC) se pretende realizar una adición de metales en modo de operación semicontinuo como siguiente paso para la mejora del rendimiento de la producción de metano en el proceso de digestión anaerobia.

REFERENCIAS

- Aaby, K., Ekeberg, D., Skrede, G., 2007. Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity. <https://doi.org/10.1021/jf0702592>
- Aguilera, M., Reza, M. del C., Chew, R.G., Meza, J.A., 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*. <https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Altaş, L., 2009. Inhibitory effect of heavy metals on methane-producing anaerobic granular sludge. *J. Hazard. Mater.* 162, 1551–1556. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2008.06.048>
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., Van Lier, J.B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci. Technol.* <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>
- Appels, L., Baeyens, J., Degève, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 755–781. <https://doi.org/10.1016/J.PECS.2008.06.002>
- Arakaki, T., Morse, J.W., 1993. Coprecipitation and adsorption of Mn(II) with mackinawite (FeS) under conditions similar to those found in anoxic sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 57, 9–14. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(93\)90463-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(93)90463-7)
- Astrid, G., 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión.
- Banks, C.J., Zhang, Y., Jiang, Y., Heaven, S., 2012. Trace element requirements for stable food waste digestion at elevated ammonia concentrations. *Bioresour. Technol.* 104, 127–135. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.10.068>
- Bernstad, A., la Cour Jansen, J., 2012. Review of comparative LCAs of food waste management systems – Current status and potential improvements. *Waste Manag.* 32, 2439–2455. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2012.07.023>
- Bolzonella, D., Pavan, P., Battistoni, P., Cecchi, F., 2005. Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge: influence of the solid retention time in the wastewater treatment process. *Process Biochem.* 40, 1453–1460. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2004.06.036>
- Borja, R., Alba, J., Banks, C.J., 1997. Impact of the main phenolic compounds of olive mill wastewater (OMW) on the kinetics of acetoclastic methanogenesis. *Process Biochem.* 32, 121–133. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00055-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00055-6)
- Borja, R., Banks, C.J., Maestro-Durán, R., Alba, & J., 1996. The Effects of the Most Important Phenolic

- Constituents of Olive Mill Wastewater on Batch Anaerobic Methanogenesis. *Environ. Technol.* 17, 167–174. <https://doi.org/10.1080/09593331708616373>
- Braga, A.F.M., Pereira, M.B., Zaiat, M., da Silva, G.H.R., Feroso, F.G., 2017. Screening of trace metal supplementation for black water anaerobic digestion. *Environ. Technol.* <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1340343>
- Cárdenas, L.M., Parra, B.A., Torres, P., Vásques, C.H., 2016. Perspectivas del ensayo de Potencial Bioquímico de Metano - PBM para el control del proceso de digestión anaerobia de residuos 95–108. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18273/revion.v29n1-2016008>
- Ceci, C., Tentori, L., Atzori, M., Lacal, P., Bonanno, E., Scimeca, M., Cicconi, R., Mattei, M., de Martino, M., Vespasiani, G., Miano, R., Graziani, G., Ceci, C., Tentori, L., Atzori, M.G., Lacal, P.M., Bonanno, E., Scimeca, M., Cicconi, R., Mattei, M., De Martino, M.G., Vespasiani, G., Miano, R., Graziani, G., 2016. Ellagic Acid Inhibits Bladder Cancer Invasiveness and In Vivo Tumor Growth. *Nutrients* 8, 744. <https://doi.org/10.3390/nu8110744>
- Cervantes, F.J., Saldívar-Cabrales, J., Yescas, J.F., 2007. Estrategias para el aprovechamiento de desechos porcinos en la agricultura, *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044–4064. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.01.057>
- Chudoba, P., Chevalier, J.J., Chang, J., Capdeville, B., 1991. Effect of anaerobic stabilization of activated sludge on its production under batch conditions at various So/Xo ratios, *Waf. Sci. Tech.*
- 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>
- Directiva 2008/98/CE, 2008. Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre residuos. *Parlam. Eur.*
- FAO, 2019. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) [WWW Document]. FAOSTAT - Base datos la FAO. URL <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> (accessed 2.26.19).
- Feroso, F.G., 2008. Metal supplementation to anaerobic granular sludge bed reactors: An environmental engineering approach. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Feroso, F.G., Bartacek, J., Jansen, S., Lens, P.N.L., 2009. Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application. *Sci. Total Environ.* 407, 3652–3667. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2008.10.043>
- Feroso, F.G., Collins, G., Bartacek, J., O’Flaherty, V., Lens, P., 2008. Acidification of methanol-fed anaerobic granular sludge bioreactors by cobalt deprivation: Induction and microbial community

- dynamics. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 49–58. <https://doi.org/10.1002/bit.21528>
- Fisgativa, H., Tremier, A., Le Roux, S., Bureau, C., Dabert, P., 2017. Understanding the anaerobic biodegradability of food waste: Relationship between the typological, biochemical and microbial characteristics. *J. Environ. Manage.* 188, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.058>
- Ghasimi, D.S.M., Aboudi, K., de Kreuk, M., Zandvoort, M.H., van Lier, J.B., 2016. Impact of lignocellulosic-waste intermediates on hydrolysis and methanogenesis under thermophilic and mesophilic conditions. *Chem. Eng. J.* 295, 181–191. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2016.03.045>
- Gómez, S., 2014. Medida de los fenoles totales y de la capacidad antioxidante y antirradicalaria de los hongos comestibles *Marasmius oreades*, *Lactarius deliciosus* y *Macrolepiota procera* y su degradación a diferentes tiempos y temperaturas. *Fac. Med. Área Nutr. y Bromatol. Dep. Pediatría, Inmunol. Obstet. y Ginecol. Nutr. y Bromatol. Psiquiatr. e Hist. la Cienc. MÁSTER Investig. EN CIENCIAS LA SALUD Farmacol. NEUROBIO.*
- González, L.E., 2015. Evaluación de un sistema de codigestión anaerobia de residuos agropecuario. Tesis Doctoral. Universidad de Veracruz. Facultad de Ciencias Químicas.
- Gustavsson, J., Shakeri Yekta, S., Sundberg, C., Karlsson, A., Ejlertsson, J., Skyllberg, U., Svensson, B.H., 2013. Bioavailability of cobalt and nickel during anaerobic digestion of sulfur-rich stillage for biogas formation. *Appl. Energy* 112, 473–477. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2013.02.009>
- Hakala, M., Lapveteläinen, A., Huopalahti, R., Kallio, H., Tahvonen, R., 2003. Effects of varieties and cultivation conditions on the composition of strawberries. *J. Food Compos. Anal.* 16, 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(02\)00165-5](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(02)00165-5)
- Hinken, L., Urban, I., Haun, E., Weichgrebe, D., Rosenwinkel, K.H., 2008. The valuation of malnutrition in the mono-digestion of maize silage by anaerobic batch tests. *Water Sci. Technol.* 1453–1459. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.491>
- Huelva información, 2018. Suben la facturación y la producción de fresa con menos hectáreas plantadas [WWW Document]. URL https://www.huelvainformacion.es/provincia/Suben-facturacion-produccion-hectareas-plantadas_0_1206179743.html (accessed 2.27.19).
- IDAE, 2007. IDAE (Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía). *Biomasa. Digestores anaerobios.*
- Jiang, Y., Zhang, Y., Banks, C., Heaven, S., Longhurst, P., 2017. Investigation of the impact of trace elements on anaerobic volatile fatty acid degradation using a fractional factorial experimental design. *Water Res.* 125, 458–465. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.09.010>
- Juliastuti, S.R., Baeyens, J., Creemers, C., Bixio, D., Lodewyckx, E., 2003. The inhibitory effects of heavy metals and organic compounds on the net maximum specific growth rate of the autotrophic biomass in activated sludge. *J. Hazard. Mater.* 100, 271–283. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00116-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00116-X)
- Karthikeyan, O.P., Trably, E., Mehariya, S., Bernet, N., Wong, J.W.C., Carrere, H., 2018. Pretreatment of food

- waste for methane and hydrogen recovery: A review. *Bioresour. Technol.* 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. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34, 2495–2504. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.591029>
- Kida, K., Shigematsu, T., Kijima, J., Numaguchi, M., Mochinaga, Y., Abe, N., Morimura, S., 2001. Influence of Ni²⁺ and Co²⁺ on methanogenic activity and the amounts of coenzymes involved in methanogenesis. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 590–595. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80179-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80179-1)
- Klopotek, Y., Otto, K., Böhm, V., 2005. Processing Strawberries to Different Products Alters Contents of Vitamin C, Total Phenolics, Total Anthocyanins, and Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf047947v>
- Lee, S.-H., Choi, K.-I., Osako, M., Dong, J.-I., 2007. Evaluation of environmental burdens caused by changes of food waste management systems in Seoul, Korea. *Sci. Total Environ.* 387, 42–53. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2007.06.037>
- 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, Y., Obaya, M.C., 2005. La digestión anaerobia. Aspectos teóricos parte I. ICIDCA. Sobre los Deriv. la Caña Azúcar.
- Mancillas-Salas, S., Rodríguez-De La Garza, A., Ríos-González, L., 2012. BIOESTIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA. *Rev. Científica la Univ. Autónoma Coahuila* 4, 56–62.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., Llabrés, P., 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour. Technol.* 74, 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7)
- Michenaud-Rague, A., Robinson, S., Landsberger, S., 2012. Trace elements in 11 fruits widely-consumed in the USA as determined by neutron activation analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 291, 237–240. <https://doi.org/10.1007/s10967-011-1266-9>
- Neves, L., Oliveira, R., Alves, M.M., 2004. Influence of inoculum activity on the bio-methanization of a kitchen waste under different waste/inoculum ratios. *Process Biochem.* 39, 2019–2024.
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Stockmann, R., 2005. Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf048569x>
- Ojeda, L.A., Cárdenas, ; R., Lobit, P., Grageda, O., Valencia, E., Macías, L., 2008. Efecto de la nutrición nitrítica y sistemas de riego en el sabor de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 14, 61–70.

- ONUUDI, 2015. Programa de capacitación en energías renovables. Obs. Energía Renov. para América Lat. y el Caribe.
- Osuna, M.B., Zandvoort, M.H., Iza, J.M., Lettinga, G., Lens, P.N.L., 2008. Effects of trace element addition on volatile fatty acid conversions in anaerobic granular sludge reactors. *Environ. Technol.* 24, 573–587. <https://doi.org/10.1080/09593330309385592>
- Panico, A.M., Garufi, F., Nitto, S., Di Mauro, R., Longhitano, R.C., Magri, G., Catalfo, A., Serrentino, M.E., De Guidi, G., 2009. Antioxidant activity and phenolic content of strawberry genotypes from *Fragaria x ananassa*. *Pharm. Biol.* 47, 203–208. <https://doi.org/10.1080/13880200802462337>
- Patidar, S.K., Tare, V., 2006. Effect of nutrients on biomass activity in degradation of sulfate laden organics. *Process Biochem.* 41, 489–495. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2005.07.001>
- Pedrero, F., Kalavrouziotis, I., Alarcón, J.J., Koukoulakis, P., Asano, T., 2010. Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture—Review of some practices in Spain and Greece. *Agric. Water Manag.* 97, 1233–1241. <https://doi.org/10.1016/J.AGWAT.2010.03.003>
- Pereda, I., Irusta, R., Oliva, D., 2007. Uso de los residuos sólidos mineros de la extracción del níquel como estimulantes para la producción de biogás. *Ing. Mecánica* 10.
- Pinto-Ibieta, F., Serrano, A., Jeison, D., Borja, R., Feroso, F.G., 2016. Effect of cobalt supplementation and fractionation on the biological response in the biomethanization of Olive Mill Solid Waste. *Bioresour. Technol.* 211, 58–64. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.03.031>
- Pobeheim, H., Munk, B., Müller, H., Berg, G., Guebitz, G.M., 2010. Characterization of an anaerobic population digesting a model substrate for maize in the presence of trace metals. *Chemosphere* 80, 829–836. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2010.06.011>
- Ramírez, E., 2012. Producción de biogás a nivel de laboratorio, utilizando estiércol de ganado vacuno y residuos agroindustriales (torta de piñón, cascarilla de arroz y rumen de ganado vacuno). Tesis. Universidad Nacional de San Martín. Facultad de de Ingeniería Agroindustrial. Departamento Académico de Ingeniería Agroindustrial.
- Raposo, F., Banks, C.J., Siegert, I., Heaven, S., Borja, R., 2006. Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process Biochem.* 41, 1444–1450. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2006.01.012>
- Raposo, F., de la Rubia, M.A., Borja, R., Alaiz, M., 2008. Assessment of a modified and optimised method for determining chemical oxygen demand of solid substrates and solutions with high suspended solid content. *Talanta* 76, 448–453. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2008.03.030>
- Raposo, F., De La Rubia, M.A., Fernández-Cegri, V., Borja, R., 2012. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renew.*

Sustain. Energy Rev. 16, 861–877. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.008>

- Raposo, F., Fernández-Cegrí, V., De la Rubia, M.A., Borja, R., Béline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernández, B., Fernández-Polanco, M., Frigon, J.C., Ganesh, R., Kaparaju, P., Koubova, J., Méndez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M., Uellendahl, H., Wierinck, I., de Wilde, V., 2011. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1088–1098. <https://doi.org/10.1002/jctb.2622>
- Rodríguez-Gutiérrez, G., Cardoso, J.C., Rubio-Senent, F., Serrano, A., Borja, R., Fernández-Bolaños, J., Feroso, F.G., 2019. Thermally-treated strawberry extrudate: A rich source of antioxidant phenols and sugars. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 51, 186–193. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2018.05.017>
- Salemdeeb, R., Font Vivanco, D., Al-Tabbaa, A., zu Ermgassen, E.K.H.J., 2017. A holistic approach to the environmental evaluation of food waste prevention. *Waste Manag.* 59, 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.09.042>
- Sauer, K., Thauer, R.K., 2000. Methyl-coenzyme M formation in methanogenic archaea Involvement of zinc in coenzyme M activation. *Eur. J. Biochem.* 267, 2498–2504.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H., 1999. Fluorescence In Situ Hybridization Using 16S rRNA-Targeted Oligonucleotides Reveals Localization of Methanogens and Selected Uncultured Bacteria in Mesophilic and Thermophilic Sludge Granules, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.
- Serrano, A., 2015. Tratamiento de residuos y subproductos agroindustriales mediante co-digestión anaerobia. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química.
- Serrano, A., Siles, J.A., Chica, A.F., Martín, M.A., 2014. Improvement of mesophilic anaerobic co-digestion of agri-food waste by addition of glycerol. *J. Environ. Manage.* 140, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.02.028>
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*. American Society of Enologists.
- Trichodex, 2016. Cultivo de la fresa en España: variedades y ciclo de producción [WWW Document]. URL <https://www.trichodex.com/cultivo-de-la-fresa-en-espana-variedades-y-ciclo-de-produccion/> (accessed 2.26.19).
- Trujillo-Reyes, Á., Cubero-Cardoso, J., Rodríguez-Gutiérrez, G., García-Martín, J.F., Rodríguez-Galán, M., Borja, R., Serrano, A., Feroso, F.G., 2019. Extraction of phenolic compounds and production of biomethane from strawberry and raspberry extrudates. *Biochem. Eng. J.* 147, 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2019.03.023>

- 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. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 345–351. <https://doi.org/10.1002/jctb.1401>
- Wang, S.Y., Jiao, H., 2000. Scavenging Capacity of Berry Crops on Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radicals, and Singlet Oxygen. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf000766i>
- WEDODATA, 2019. WEDODATA. Global Carbon atlas [WWW Document]. URL <http://www.globalcarbonatlas.org/en/CO2-emissions> (accessed 2.28.19).
- Zandvoort, M.H., van Hullebusch, E.D., Feroso, F.G., Lens, P.N.L., 2006. Trace Metals in Anaerobic Granular Sludge Reactors: Bioavailability and Dosing Strategies. *Eng. Life Sci.* <https://doi.org/10.1002/elsc.200620129>
- Zhang, H., Wang, Z.-Y., Yang, X., Zhao, H.-T., Zhang, Y.-C., Dong, A.-J., Jing, J., Wang, J., 2014. Determination of free amino acids and 18 elements in freeze-dried strawberry and blueberry fruit using an Amino Acid Analyzer and ICP-MS with micro-wave digestion. *Food Chem.* 147, 189–194. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.09.118>
- Zhang, Y., Zhang, Z., Suzuki, K., Maekawa, T., 2003. Uptake and mass balance of trace metals for methane producing bacteria. *Biomass and Bioenergy* 25, 427–433. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(03)00012-6)