

**VALORIZACIÓN DEL EXTRUSIONADO
DE FRAMBUESA RESIDUAL:
EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE
ALTO VALOR AÑADIDO Y DIGESTIÓN
ANAEROBIA**



Ángeles Trujillo Reyes

Orihuela, 2019

**VALORIZACIÓN DEL EXTRUSIONADO
DE FRAMBUESA RESIDUAL:
EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE
ALTO VALOR AÑADIDO Y DIGESTIÓN
ANAEROBIA**

Vº Bº DIRECTOR

VºBº CODIRECTOR

Concepción Paredes Gil

Fernando González Feroso

ALUMNO

Ángeles Trujillo Reyes

Curso 2018/2019



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza a la alumna **D^a. Ángeles Trujillo Reyes**, a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Valorización del extrusionado de frambuesa residual: Extracción de compuestos de alto valor añadido y digestión anaerobia”, bajo la dirección de D^a. Concepción Paredes Gil y D. Fernando González Feroso (Instituto de la Grasa-CSIC), debiendo cumplir las normas establecidas para la redacción del mismo que están a su disposición en la página Web específica del Master.

Orihuela, 23 de julio de 2019

La Directora del Máster Universitario de Investigación en Gestión, Tratamiento y Valoración de Residuos Orgánicos

Fdo.: Concepción Paredes Gil

TRIBUNAL	
FECHA:	
PRESIDENTE:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

IDENTIFICACIONES

Autor: Ángeles Trujillo Reyes

Título: Valorización del extrusionado de frambuesa residual: Extracción de compuestos de alto valor añadido y digestión anaerobia

Title: Valorization of residual raspberry extrudate: Extraction of high added value compounds and anaerobic digestion

Director/es del TFM: Concepción Paredes Gil / Fernando González Feroso

Año: 2019

Titulación: Máster Universitario de Investigación en Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos

Tipo de proyecto: Trabajo Experimental

Palabras claves: Aquenios de frambuesa; tratamientos mecánicos; antocianinas; ácido elágico; digestión anaerobia

Keywords: Raspberry achenes; mechanical treatments; anthocyanins; ellagic acid; anaerobic digestion

Nº citas bibliográficas: 87

Nº de planos: 0

Nº de tablas: 8

Nº de figuras: 30

Nº de anexos: 1

RESUMEN

En este trabajo, se propone estudiar la valorización del extrusionado de frambuesa residual generado en la industria agroalimentaria de frutos rojos en la zona de Huelva (Andalucía). Para ello, se han aplicado diferentes tratamientos mecánicos, con los que se pretende estudiar el grado de rotura de los aquenios, que componen aprox. el 95 % del extrusionado de frambuesa residual, y con ello, liberar y posteriormente extraer compuestos de alto valor añadido. También, se ha estudiado la valorización del extrusionado de frambuesa, empleando los mismos tratamientos mecánicos, pero sin previa extracción de compuestos de alto valor añadido, aplicando un proceso de digestión anaerobia mediante ensayos de BMP (Biochemical Methane Potential) para el estudio de la biodegradabilidad de este residuo. El tratamiento mecánico produjo la rotura de la

estructura de los aquenios, y con ello, la reducción del tamaño de las partículas. Los tratamientos mecánicos con molino de cuchillas (TMC) y la combinación de este con mortero (TCM) fueron con los que hubo mayor reducción. Con los tratamientos TMC y TCM, mediante la extracción de compuestos de alto valor añadido, se obtuvo un 32 % más que para el extrusionado de frambuesa residual sin tratar (EFR) de ácido elálgico libre, que fue uno de los compuestos de alto valor añadido más interesante de los determinados. Otro compuesto de alto valor añadido también muy interesante, y que se ha cuantificado, son las antocianinas cuyo contenido total disminuyó con el aumento del número de partículas. La digestión anaerobia del EFR y de la biomasa generada tras la aplicación del tratamiento mecánico condujo a una producción de metano entre 18 y 236 mL CH₄/g SV, una mejora del 1.211 % con TMC respecto al EFR.

ABSTRACT

In this work, it is proposed to study the valorization of residual raspberry extrudate generated in the berries agri-food industry in the area of Huelva (Andalusia). To this effect, different mechanical treatments have been applied to study the degree of breakage of the achenes, which make up approximately 95 % of residual raspberry extrudate, and thereby release and subsequently extract of high value-added compounds. Also, the valorization of residual raspberry extrudate has been studied, using the same mechanical treatments, but without previous extraction of high value-added compounds, applying an anaerobic digestion process through BMP test (Biochemical Methane Potential) for the study of the biodegradability of this waste. The mechanical treatment resulted in the rupture of the achenes structure, and with it, the reduction of the particle size. Mechanical treatments with a blade mill (TMC) and the combination of this with mortar (TCM) were the ones with the greatest reduction. With the TMC and TCM treatments, by extracting of high value-added compounds, 32 % more was obtained than for the untreated residual raspberry extrudate (EFR) of free ellagic acid, which was one of the most interesting high value-added compounds determined. Another very interesting compounds of high value-added compounds, which has been quantified, are anthocyanins, whose total content of decreased with the increase in the number of particles. Anaerobic digestion of EFR and biomass generated after mechanical treatments led to methane production between 18 and 236 mL CH₄/g SV, an improvement of 1211 % with TMC as compared to EFR.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Frutos rojos: Definición y producción	1
1.2. Composición general de la frambuesa	2
1.3. Generación del extrusionado de frambuesa residual	4
1.4. Normativa sobre la gestión de los residuos agroindustriales	6
1.5. Alternativas para la gestión del extrusionado de frambuesa residual.....	9
1.6. Valorización del extrusionado de frambuesa residual	10
1.6.1. Estudios previos y posibles pretratamientos.....	10
1.6.2. Extracción de compuestos de alto valor añadido	11
1.6.3. Digestión anaerobia	12
2. Objetivos	15
3. Material y métodos	16
3.1. Sustrato	16
3.2. Tratamientos mecánicos.....	17
3.3. Cuantificación del efecto del tratamiento mecánico.....	20
3.4. Extracción de compuestos solubles	21
3.5. Extracción de compuestos polifenólicos.....	21
3.5.1. Método 1.....	21
3.5.2. Método 2.....	23
3.6. Ensayo de digestión anaerobia	23
3.6.1. Inóculo.....	23
3.6.2. Sustratos.....	24
3.6.3. Condiciones experimentales	24
3.6.4. Procedimiento operativo.....	26
3.7. Estudio cinético	27
3.8. Métodos analíticos.....	27
3.8.1. pH.....	27
3.8.2. Alcalinidad.....	27
3.8.3. Sólidos totales (ST), minerales (SM) y volátiles (SV).....	28
3.8.4. Demanda química de oxígeno total y soluble (DQO _T y DQO _S).....	29
3.8.5. Determinación de azúcares totales solubles en agua.....	31
3.8.6. Determinación de ácidos urónicos solubles en agua.....	31

3.8.7. Determinación de polifenoles totales	32
3.8.8. Determinación de compuestos polifenólicos individuales mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	33
4. Resultados y discusión.....	34
4.1. Efecto del tratamiento mecánico en la distribución de partículas	34
4.2. Efecto del tratamiento mecánico en la composición del extrusionado de frambuesa residual.....	36
4.2.1. Materia orgánica.....	37
4.2.2. Azúcares totales y ácidos urónicos.....	39
4.2.3. Polifenoles totales	41
4.3. Efecto del tratamiento mecánico en la extracción de compuestos de alto valor añadido.....	42
4.4. Efecto del tratamiento mecánico en el proceso de digestión anaerobia	48
5. Conclusiones	52
6. Bibliografía	53
7. Anexos	62
7.1. Anexo I: Legislación.....	62

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FRUTOS ROJOS: DEFINICIÓN Y PRODUCCIÓN

Los frutos rojos, también denominados frutas del bosque o “berries”, son un grupo de frutas pequeñas y carnosas, generalmente comestibles. Los frutos rojos son característicamente jugosos, de colores brillantes, dulces o agrios, y no tienen hueso, aunque pueden contener muchas pepitas o semillas, llamadas aquenios. Dentro del grupo de frutos rojos se pueden incluir: arándanos, frambuesas, fresas, fresones, grosellas o moras, entre otros. Además, los frutos rojos son una fuente rica de compuestos bioactivos, como antocianinas, flavonoles, y otros polifenoles, que contribuyen a su actividad antioxidante y diferentes funciones biológicas (Gagneten et al., 2019).

Debido a las propiedades que presentan y, dado su buen sabor y apariencia, la demanda de este tipo de frutas, por parte de los consumidores, ha ido en aumento (Gagneten et al., 2019). Según la base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT), la producción mundial de frutos rojos desde el año 2000 hasta la actualidad ha ido creciendo significativamente (FAOSTAT, 2019). En el siguiente gráfico (**Figura 1**), se observa que los frutos rojos con mayor producción son las fresas, aunque en los últimos años está aumentando la producción de otros frutos como las frambuesas, arándanos rojos y azules, grosellas y berries nes (otros frutos rojos no identificados por separado).

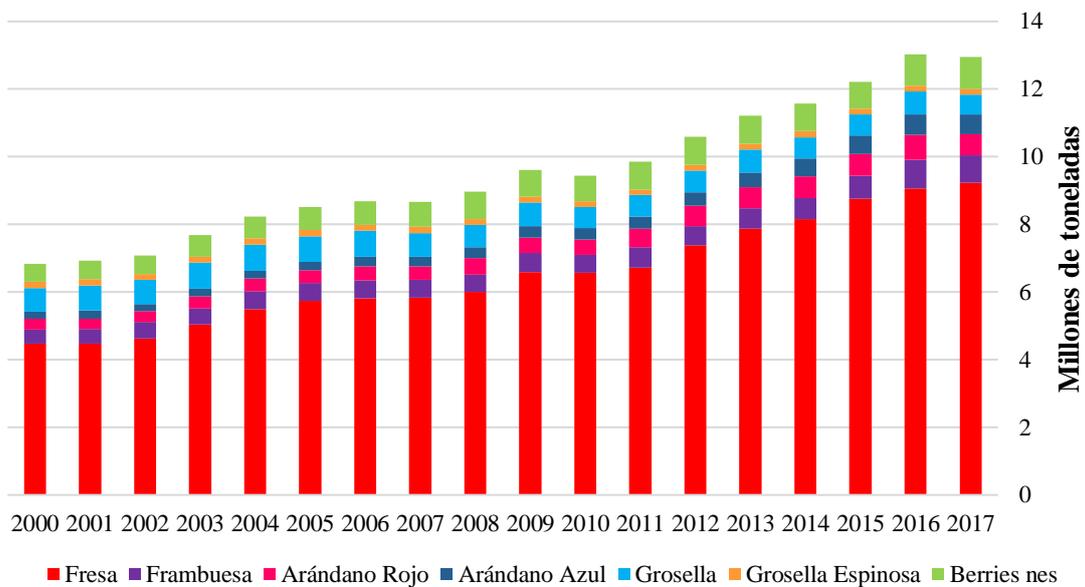


Figura 1. Producción mundial de frutos rojos 2000-2017 (FAOSTAT, 2019).

Durante la temporada 2017, se obtuvieron aproximadamente 13 millones de toneladas de frutos rojos en el mundo, de las cuales un 15,5 % fueron producidas en Europa. De hecho, de la producción total de frutos rojos en Europa, un 22,5 % se obtuvo en España, concentrándose la mayor producción en Huelva (Andalucía) con un 96,9 % (FAOSTAT, 2019; MAPA, 2019).

En Huelva, el fruto rojo con mayor producción es la fresa (349.143 toneladas en 2017). Sin embargo, con el fin de disminuir el monocultivo de fresa y conseguir una diversificación en esta industria, los agricultores onubenses decidieron incluir otros tipos de frutos rojos en sus cultivos, como frambuesas, arándanos o moras, cuyas producciones han ido aumentando en los últimos años. Estos cultivos suponen, entre otros beneficios, un aumento de la duración de la campaña de recogida de los frutos rojos en Huelva, la cual hoy día puede considerarse prácticamente anual, como es el caso de la frambuesa (septiembre-junio) (Freshuelva, 2019). De este modo, la producción de frambuesa deja de ser estacional y está disponible prácticamente todo el año.

1.2. COMPOSICIÓN GENERAL DE LA FRAMBUESA

Como se ha señalado anteriormente, uno de los frutos rojos cuya producción ha aumentado significativamente en los últimos años en Huelva es la frambuesa (42.534 toneladas en 2017). La frambuesa (*Rubus Idaeus*) es el fruto del frambueso. Es una fruta pequeña, con forma cónica o redondeada y aspecto aterciopelado de color rojo o amarillento. La pulpa es muy aromática y su sabor es agri dulce. La frambuesa es un fruto complejo del tipo agregado, ya que proviene de una sola flor y se forma a partir de un gineceo apocárpico que se hace concrecente. Está compuesto por numerosas **drupas** (de ovario súpero con una sola **semilla** (aquenio), exocarpo y mesocarpo carnosos y endocarpo duro) pequeñas y redondeadas, agrupándose en un pequeño **receptáculo** cónico (**Figura 2**).

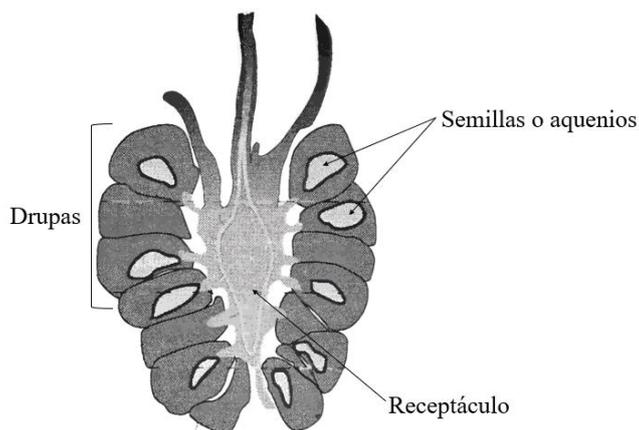


Figura 2. Diagrama de la fruta de frambuesa seccionada longitudinalmente (Adaptada de: Williamson et al., (1992)).

Las frambuesas, como las fresas y el resto de los frutos rojos, son una buena fuente de compuestos beneficiosos, que incluyen minerales esenciales, vitaminas y ácidos grasos, así como una amplia gama de compuestos polifenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y taninos). Son ricas en fibra dietética (6,5g/100g) y fructosa (> 50 % de azúcares totales) (Bobinaite et al., 2015), y, también, una buena fuente de manganeso y vitamina C (Rao and Snyder, 2010), y de riboflavina, ácido fólico, niacina, magnesio, potasio, cobre e hierro (Bobinaite et al., 2015).

El contenido de compuestos polifenólicos en los frutos rojos está determinado por muchos factores, como el genotipo, las condiciones de cultivo, las condiciones climáticas la madurez, el tiempo de almacenamiento y las condiciones de almacenamiento (Bobinaite et al., 2015). Las estructuras polifenólicas se caracterizan por la presencia de uno o más anillos aromáticos de seis carbonos, y dos o más grupos fenólicos hidroxilo. Existen cuatro clases principales de polifenoles: los flavonoides, los ácidos fenólicos, los lignanos y los taninos. Los polifenoles de la frambuesa consisten principalmente en antocianinas y taninos hidrolizables (Rao and Snyder, 2010). Las antocianinas son los pigmentos solubles en agua que se encuentran en las flores y las frutas, y que son responsables de sus intensos colores rojo y azul (Melo et al., 2000). Más específicamente, las frambuesas son una fuente particularmente rica de glucósidos de cianidina y son únicas entre las “berries” por su alto contenido en elagitanino (Rao and Snyder, 2010). El ácido elágico es un compuesto polifenólico, derivado dimérico del ácido gálico, que en los frutos que lo contienen se puede encontrar en forma libre, glicosilado o como simple o complejos elagitaninos (ésteres de ácido hexahidrosidifénico). La hidrólisis ácida o

básica de estos últimos provoca la liberación de unidades de hexahidroxidifenilo (HHDP), las cuales espontáneamente por lactonización forman ácido elágico libre (**Figura 3**). El ácido elágico se encuentra en diferentes tejidos de las frutas (piel, pulpa, semillas, aquenios en fresas) y a distintas concentraciones (Salinas-Moreno et al., 2014).

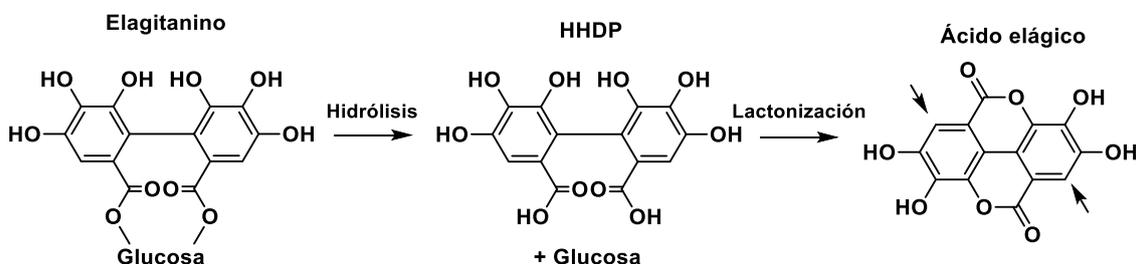


Figura 3. Hidrólisis de elagitanino para formar ácido elágico a través de la producción de ácido hexahidroxidifénico (HHDP), que lactoniza espontáneamente al ácido elágico (Häkkinen et al., 2000).

En los últimos años se ha desarrollado un particular interés en determinar el contenido de compuestos tales como antocianinas y ácido elágico, principalmente, por su efecto positivo en la salud humana y por sus propiedades fisiológicas, tales como antitumoral, antiperoxidativo, antioxidante, patógenos antialimentarios, y actividades antimutagénicas. Industrialmente, el ácido elágico se utiliza en cremas, perfumes y otros productos cosméticos que tienen un efecto de limpieza en la piel (Aguilera-Carbo et al., 2008). Además, el ácido elágico ya está incluido en la Lista de Aditivos Alimentarios existentes como antioxidante natural en algunos países, incluido Japón (Tasaki et al., 2008).

1.3. GENERACIÓN DEL EXTRUSIONADO DE FRAMBUESA RESIDUAL

La mayor parte de la producción de frutos rojos se vende en el mercado fresco, pero en los últimos años, una parte importante de esta producción está siendo destinada a la creación de productos transformados como mermeladas, yogures, helados, zumos, etc. Estos productos se elaboran principalmente a partir del concentrado de la fruta, que se obtiene mediante la extrusión de dicha fruta. Debido a su alta tasa de respiración, los frutos rojos exhiben una vida poscosecha muy corta. Por esta razón, hay un interés creciente en el desarrollo de productos transformados de frutos rojos que se puedan consumir como tales o se puedan incorporar como ingredientes en diferentes tipos de alimentos (Gagneten et al., 2019).

Durante el proceso industrial para la obtención del concentrado de frambuesa, el fruto es sometido a un tratamiento térmico de inactivación enzimática a 65 °C y, también, es extrusionado mediante varios tamices con diferente luz de malla (1,5 y 0,5 mm). Los tamices retienen una fracción residual formada por la parte fibrosa y los aquenios, denominada extrusionado de frambuesa residual (**Figura 4**). En España, en el 2017, alrededor de 2000 toneladas de frambuesa, es decir, aproximadamente un 5 % de la producción total, se destinaron a la fabricación de productos transformados según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2019).



Figura 4. Diagrama de flujo del proceso industrial de obtención del concentrado de frambuesa (Adaptada de: HUDISA (2019)).

El extrusionado de frambuesa residual generado durante el proceso industrial, debería ser procesado para maximizar su explotación. Además, la gestión de estos residuos debería ser resuelta con el fin de cumplir con las legislaciones pertinentes.

1.4. NORMATIVA SOBRE LA GESTIÓN DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

La gestión y el tratamiento de los residuos están regulados normativamente a todos los niveles institucionales. En el área de estudio existen tres poderes legislativos ordinarios referentes al ámbito de la gestión de residuos: el comunitario, el estatal y el autonómico. De acuerdo con el concepto de jerarquía legislativa, las leyes estatales deben recoger y aplicar las normativas establecidas por la Unión Europea (UE) a través de las distintas Directivas Marco, que son de obligado cumplimiento para todos los países miembros. Dichas leyes estatales podrán desarrollar la normativa e incluso aumentar los niveles de restricciones establecidas por la Unión Europea. En España, la gestión de residuos está directamente regulada por la legislación autonómica, que también debe recoger los supuestos establecidos por la legislación comunitaria y estatal.

La Unión Europea comienza regulando los residuos en general en 1975 con la Directiva 75/442/CEE pretendiendo proteger al mismo tiempo la salud del hombre y el medio ambiente a través del establecimiento de un régimen jurídico comunitario para la gestión de los residuos. Tres años más tarde, constatada la especialidad de ciertos residuos de origen industrial, se empieza a diferenciar del resto de los residuos un determinado tipo denominado en un primer momento: “residuos tóxicos y peligrosos”. En fechas posteriores, una serie de normas se adentran a regular, cada vez con mayor precisión, el régimen jurídico comunitario de los residuos según sus características. De este modo, en 1991 se publica la Directiva 91/156/CEE, conocida como la “Directiva Marco”, relativa a residuos, por la que se modifica la Directiva 75/442/CEE. El Consejo de las Comunidades Europeas considera preciso, además de garantizar la eliminación y valorización de los residuos, adoptar todas aquellas medidas encaminadas a la limitación en la producción de residuos. Estas normativas quedan derogadas con la Directiva 2006/12/CE relativa a los residuos, que a su vez fue derogada por la Directiva 2008/98/CE, modificada en gran parte por la Directiva (UE) 2018/851. En la Directiva 2008/98/CE modificada se indican las operaciones de eliminación y de valorización.

El ordenamiento jurídico español relativo a la gestión de los residuos sólidos arranca en 1975 mediante la publicación de la Ley 42/1975 sobre desechos y residuos sólidos urbanos. No obstante, esta ley, por su antigüedad, no recoge las disposiciones emanadas del Consejo de las Comunidades Europeas. Por lo tanto, se elabora la Ley 10/1998 en la que se traspone la Directiva 91/156/CEE, relativa a residuos, derogándose las leyes nacionales publicadas hasta el momento sobre este tema. Sin embargo, esta Ley nacional sobre residuos ha sido recientemente derogada por la Ley 22/2011, de 28 de

julio, de residuos y suelos contaminados, para incluirse en la legislación nacional a la nueva Directiva 2008/98/CE sobre residuos. Además, el Estado Español ha elaborado diferentes planes nacionales de residuos (Plan Nacional de Residuos Urbanos (2000-2006); Plan Nacional de Lodos de Depuradoras de Aguas Residuales (2001-2006); Plan Nacional Integrado de Residuos (PNIR) (2008-2015)); mediante “la integración de los respectivos planes autonómicos en los que se fijan los objetivos específicos de reducción, reutilización, reciclado y otras formas de valorización y eliminación”. Así, para el periodo 2016-2022, se ha elaborado el Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR), donde se incluyen los residuos domésticos y comerciales, los industriales, los residuos con legislación específica, los agrarios y los sanitarios.

En el caso de Huelva (Andalucía), en el suroeste de España, y área objeto de estudio, la gestión de residuos es competencia de la Junta de Andalucía, por lo que es la legislación autonómica la que se aplica en este ámbito. En 1999 la Junta de Andalucía, cumpliendo con el Decreto 283/1995, de 21 de noviembre, por el que se aprueba el Reglamento de Residuos de Andalucía, impulsó la planificación de la gestión de residuos urbanos con objetivos renovados. Se concretó con la aprobación del Decreto 218/1999, de 26 de octubre, por el cual se aprobó el Plan Director Territorial de Gestión de Residuos Urbanos de Andalucía (PDTGRUA) para el período 1999-2008. Sobre esta base, se ha redactado el “Plan Director Territorial de Gestión de Residuos No Peligrosos de Andalucía 2010-2019”, modificado mediante la Orden de 30 de diciembre de 2016, con el que se pretende orientar la gestión de residuos no peligrosos hasta el año 2019, adaptándola a las tendencias más actualizadas en relación con la prevención en la generación y gestión sostenible de residuos. Dicho plan constituye el marco que deberá regir la política en materia de residuos no peligrosos en Andalucía hasta el año 2019. Para ello se han tenido en cuenta, por un lado, las estrategias establecidas por la Unión Europea para integrar el desarrollo socioeconómico con la conservación del medio ambiente, así como la normativa vigente en materia de residuos en los ámbitos europeo, estatal y autonómico; y por otro, la situación real de los residuos no peligrosos en Andalucía. El Plan aborda la generación y gestión de los siguientes residuos:

1. Los clasificados por la Ley 10/1998, de 21 de abril, de residuos como los “generados en los domicilios particulares, comercios, oficinas y servicios, así como todos aquellos que no tengan la clasificación de peligrosos y que, por su naturaleza o composición, puedan asimilarse a los producidos en los anteriores lugares o actividades”. También considera residuos urbanos los siguientes:

- Residuos procedentes de la limpieza de vías públicas, zonas verdes, áreas recreativas y playas.
 - Animales domésticos muertos, así como muebles enseres y vehículos abandonados.
 - Residuos y escombros procedentes de obras menores de construcción y reparación domiciliaria.
2. Los residuos no peligrosos que se generan en un proceso de fabricación, transformación, utilización, consumo, limpieza o mantenimiento de una instalación, industria o actividad, cuya gestión no compete a los entes locales. Dentro de los grupos anteriores, se distinguen en el presente Plan los siguientes residuos:
- Residuos de envases.
 - Residuos biodegradables.
 - Residuos industriales no peligrosos (RINP).
 - Neumáticos fuera de uso (NFU).
 - Residuos de aparatos eléctricos y electrónicos (RAEE).
 - Residuos agrícolas no peligrosos (RANP).
 - Residuos de construcción y demolición (RCD).
 - Lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales (LD).
 - Pilas y acumuladores que no contienen sustancias peligrosas.

Por tanto, el residuo objeto de estudio en este trabajo se englobaría dentro la categoría de residuos industriales no peligrosos, extrusionado de frambuesa residual.

Entre los principios rectores del Plan se encuentra la aplicación del principio de jerarquía en la gestión de residuos donde se prioriza, en orden descendente, la prevención en la generación de residuos, la preparación para la reutilización, el reciclaje, otras recuperaciones como la recuperación de energía y, finalmente, el depósito en vertederos. En el caso de residuos agroindustriales, siguiendo la jerarquía anterior, la prevención es la mejor opción seguida del tratamiento biológico y la desintegración térmica, y como última alternativa, la eliminación en vertederos. Sin embargo, la deposición de residuos de la industria agroalimentaria en vertederos es un método de eliminación muy común en los países desarrollados hoy en día. Es por ello, que se están probando diferentes alternativas para aumentar su rentabilidad o gestión (Parthiba Karthikeyan et al., 2018).

1.5. ALTERNATIVAS PARA LA GESTIÓN DEL EXTRUSIONADO DE FRAMBUESA RESIDUAL

En la siguiente tabla (**Tabla 1**), se recogen algunos métodos de gestión de residuos alimenticios, así como algunos datos a tener en cuenta para la selección de éstos.

Tabla 1. Métodos de gestión de residuos alimenticios y hechos a considerar para su selección
(Adaptada de: Parthiba Karthikeyan et al., (2018)).

Opciones de tratamiento	Coste (€/t)	Rango de impacto del cambio climático (kg CO ₂ -eq/t)	Consideraciones del proceso	Ventajas/Desventajas
Compostaje	40-110	-50 (min.) 850 (máx.)	<ul style="list-style-type: none"> - Diseños centralizados o descentralizados - Compostadores abiertos o embarcados - Aceleración del proceso mediante añadidos especiales de cultivos o de agentes de carga, etc 	<p style="text-align: center;">Ventajas</p> Reciclaje de nutrientes esenciales y carbono <p style="text-align: center;">Desventajas</p> Tiempo de proceso largo y cuidado crítico requerido
Digestión Anaerobia (DA)	45-140	-400 (min.) 400 (máx.)	<ul style="list-style-type: none"> - Requisitos previos y posteriores al tratamiento - Procesos de una, dos o múltiples etapas - Variables operacionales por ej. Temperatura, regulaciones de presión, pH, etc 	<p style="text-align: center;">Ventajas</p> Reciclaje de materia orgánica en energía y biofertilizantes <p style="text-align: center;">Desventajas</p> Conocimientos técnicos y fallos de proceso en condiciones de funcionamiento deficientes
Incineración	50-250	-250 (min.) 600 (máx.)	<ul style="list-style-type: none"> - Con o sin recuperación energía/calor - Pre-procesamiento y post-eliminación de materiales - Calidad del aire y normativa 	<p style="text-align: center;">Ventajas</p> Proceso rápido y destrucción masiva; requisitos de espacio <p style="text-align: center;">Desventajas</p> Coste y operación altamente cualificada
Vertederos	40-65	400 (min.) 1200 (máx.)	<ul style="list-style-type: none"> - Con o sin recuperación de metano - Ingeniería de vertederos o vertidos abiertos 	<p style="text-align: center;">Ventajas</p> Barato y fácil de ejecutar; equipos simples <p style="text-align: center;">Desventajas</p> Requerimientos de suelo, emisiones de GEI y contaminaciones ambientales

Es importante destacar que el extrusionado de frambuesa residual, generado tras la extracción del concentrado de la fruta, puede contener gran cantidad de los compuestos de alto valor añadido contenidos en la fruta (Gagneten et al., 2019; Sójka et al., 2016). Por lo tanto, una opción de gestión interesante, que podría ser complementaria con las opciones mostradas en la **Tabla 1**, podría ser la extracción de compuestos de alto valor añadido del extrusionado de frambuesa residual.

1.6. VALORIZACIÓN DEL EXTRUSIONADO DE FRAMBUESA RESIDUAL

1.6.1. ESTUDIOS PREVIOS Y POSIBLES PRETRATAMIENTOS

Como se indicó anteriormente, el extrusionado de frambuesa residual generado en el proceso industrial para la obtención del concentrado de frambuesa está formado por una parte fibrosa y por los aquenios de dicha fruta. En estudios anteriores, se ha determinado que los aquenios representan casi el 80 % en peso de la torta de prensa (Sójka et al., 2016). Los aquenios son una materia prima valiosa, ya que contienen una amplia variedad de compuestos como los aceites etéricos y los ácidos grasos, nutrientes esenciales para la alimentación animal, polifenoles, lípidos y lipoproteínas, y tienen propiedades antioxidantes (Samoraj et al., 2019).

En un estudio anterior, se determinó el porcentaje de aquenios presentes en el extrusionado de frambuesa residual, obteniéndose, aproximadamente, un 90 % en peso seco. Con el fin de romper la estructura del aquenio, liberar los compuestos de alto valor añadido contenidos en ellos y solubilizarlos, se aplicaron al residuo un total de 6 tratamientos hidrotérmicos en un rango de temperatura entre 60 y 210 °C (con un incremento de 30 °C), aplicándose, además, en el caso del pretratamiento a 210 °C, una explosión de vapor. Como resultado se obtuvo que, aproximadamente, un 94 % en peso seco de la fase sólida obtenida estaba compuesta por aquenios. Además, como puede observarse en la **Figura 5**, los aquenios después de cada tratamiento hidrotérmico tienen la misma forma y tamaño, mientras que su color es lo único que varía. Finalmente, se concluyó que los tratamientos hidrotérmicos y el tratamiento hidrotérmico con explosión de vapor no fueron lo suficientemente severos para romper la estructura de los aquenios.

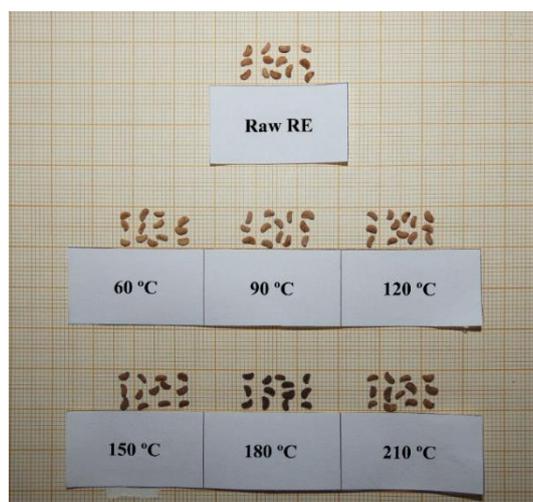


Figura 5. Aspecto de los aquenios del extrusionado de frambuesa residual sin tratar (*Raw RE*) y tras la aplicación de tratamientos hidrotérmicos a diferentes temperaturas.

Por tanto, una alternativa interesante podría ser la aplicación de otro tipo de tratamiento, como por ejemplo un tratamiento mecánico, con el que poder romper la estructura del aquenio, y liberar así los compuestos contenidos en ellos. En estudios anteriores, donde se aplicaron diferentes tipos de tratamientos sobre residuos ricos en material celulósico, como es el caso de este residuo, el tratamiento mecánico fue el más efectivo (Bong et al., 2018).

1.6.2. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE ALTO VALOR AÑADIDO

La extracción de compuestos de alto valor añadido, como compuestos polifenólicos, permitiría considerar el extrusionado de frambuesa residual como un subproducto, en lugar de un residuo sin ningún valor económico. Como ya se ha mencionado, los aquenios contienen una amplia variedad de compuestos entre los cuales se encuentran los compuestos polifenólicos (Samoraj et al., 2019). Resultados de investigaciones anteriores han demostrado que los componentes principales de la fracción polifenólica de los aquenios de fresa y frambuesa son elagitaninos y proantocianidinas, y que los contenidos de antocianinas y flavonoles son insignificantes en comparación con los valores analizados en frutos de estas especies (Kosmala et al., 2015).

Con la finalidad de romper la estructura del aquenio y conseguir liberar los compuestos polifenólicos contenidos en ellos, una alternativa interesante podría ser la aplicación previa de un tratamiento mecánico al residuo generado en la obtención del concentrado de frambuesa, para posteriormente aplicar un proceso de extracción de compuestos de alto valor añadido. En estudios anteriores, se ha demostrado que los procesos de reducción del tamaño de partículas, como la molienda con bolas y nanobolas y la molienda ultrafina, aumentan el contenido fenólico extraíble con disolventes en los granos de cereales, principalmente porque aumentan la superficie específica de los materiales de las partículas y, por lo tanto, la accesibilidad de los compuestos fenólicos a los disolventes de extracción (Wang et al., 2014).

La extracción de compuestos de alto valor añadido del extrusionado de frambuesa residual sería una de las opciones que podrían proponerse para valorizar dicho residuo, sin embargo, tras su aplicación seguiría quedando un volumen de residuo, el cual necesitaría más tratamiento y estabilización.

1.6.3. DIGESTIÓN ANAEROBIA

A fin de tratar, valorizar y estabilizar la biomasa generada tras el proceso de obtención del concentrado de frambuesa, como segunda propuesta se podría implementar un proceso que permita la obtención de energía o subproductos de interés, y la estabilización de la biomasa final, como el proceso de digestión anaerobia. La digestión anaerobia (DA) es un proceso biológico en el cual la materia orgánica, en ausencia de oxígeno, y mediante la acción de un grupo de bacterias específicas, se transforma en productos gaseosos o “biogás” (CH_4 , CO_2 , H_2 , H_2S , etc.), y en digestato, que es una mezcla de productos minerales (N, P, K, Ca, etc.) y compuestos de difícil degradación (Serrano, 2015). La composición del biogás depende del material digerido y del funcionamiento del proceso, pero normalmente tiene un contenido de CH_4 entre 45-85 % y 15-45 % de CO_2 , con otros gases en pequeñas cantidades (H_2 , H_2S , NH_3 y N_2) (Schnürer and Jarvis, 2018).

Los estudios bioquímicos y microbiológicos realizados hasta el momento dividen el proceso de descomposición por digestión anaerobia en cuatro fases o etapas principales (**Figura 6**): Hidrólisis, fermentación o acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

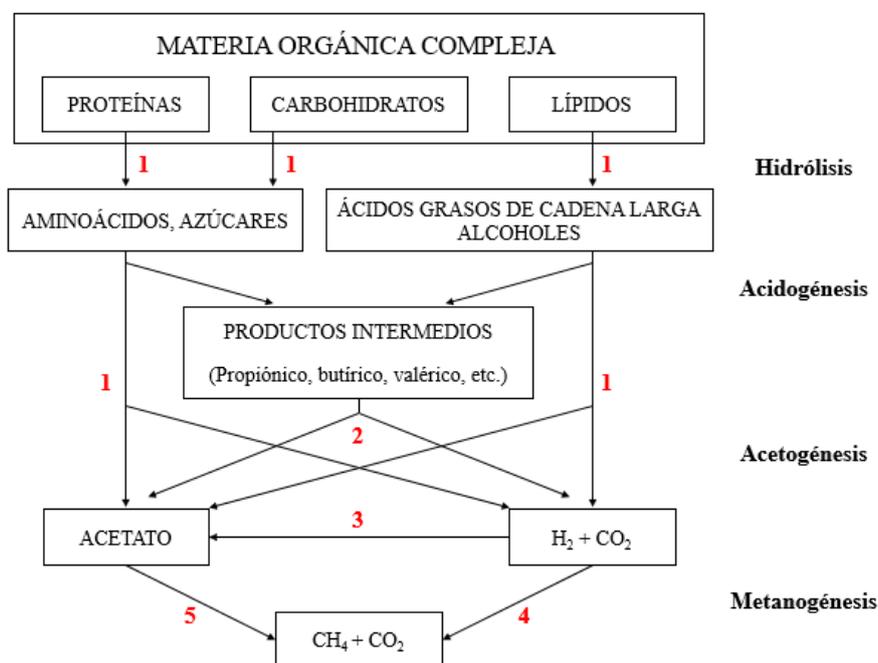


Figura 6. Esquema de reacciones y grupos microbianos implicados en el proceso de digestión anaerobia (Adaptado de: Pavlostathis y Giraldo-Gomez (1991)). Los números indican la población bacteriana responsable del proceso: 1: bacterias fermentativas o acidogénicas; 2: bacterias acetogénicas que producen hidrógeno; 3: bacterias homoacetogénicas; 4: bacterias metanogénicas hidrogenotróficas; 5: bacterias metanogénicas acetoclásticas.

La primera etapa del proceso de digestión anaerobia es la hidrólisis de partículas y moléculas complejas (proteínas, carbohidratos y lípidos) que son hidrolizadas por enzimas extracelulares producidas por los microorganismos acidogénicos o fermentativos. Como resultado, se producen compuestos solubles más sencillos (aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga) que serán metabolizados por las bacterias acidogénicas dando lugar, principalmente, a ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, hidrógeno, dióxido de carbono y otros productos intermedios. Los ácidos grasos de cadena corta son transformados en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, mediante la acción de los microorganismos acetogénicos. Por último, en la etapa final del proceso de digestión anaerobia, la etapa de metanogénesis, los microorganismos metanogénicos producen metano a partir del ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono.

La digestión anaerobia presenta algunas ventajas fundamentales en comparación con otras tecnologías de tratamiento, como la posibilidad de trabajar en diferentes rangos de temperatura (psicrofílico, mesofílico y termofílico), altas tasas de carga orgánica, alta eficiencia y, también, el metano producido puede ser utilizado como fuente de energía para calefacción y electricidad debido a su valor calorífico ($35,793 \text{ kJ/m}^3$; a 1 atm y 0°C), que equivale a 1 kg de carbón crudo o 0,76 kg de carbón estándar (Fermoso et al., 2018; Serrano, 2015; Wheatley, 1990; Zeng et al., 2007). El uso del biogás para el suministro energético reduce la deforestación, la erosión del suelo y la contaminación ambiental, y también puede mejorar la eficiencia energética de varios procesos de producción debido a la contribución energética que proporciona (Bozym et al., 2015). Además, después del proceso de digestión anaerobia, se produce un residuo húmedo llamado digestato. El digestato es una mezcla de materia orgánica parcialmente estabilizada, biomasa microbiana y compuestos inorgánicos. Debido a su elevado contenido en carbono, nitrógeno y fósforo, varios autores han propuesto que el digestato podría emplearse como fuente de nutrientes para la agricultura (Alburquerque et al., 2012; Fermoso et al., 2018; Kaparaju et al., 2012; Tsachidou et al., 2019; Vaneekhaute et al., 2017). No obstante, existen una serie de parámetros ambientales y operacionales que deben controlarse para que el desarrollo del proceso de digestión anaerobia sea correcto. Estos parámetros son: el pH, alcalinidad, potencial redox, nutrientes, sustancias tóxicas o inhibidores, temperatura, agitación, tiempo de retención hidráulica (TRH) o la velocidad de carga orgánica (VCO) (Schnürer and Jarvis, 2018).

El extrusionado de frambuesa residual debe ser tratado y estabilizado. Para esto, una opción interesante podría ser la combinación de un tratamiento mecánico y una posterior digestión anaerobia, cuyo objetivo sería degradar y estabilizar la materia orgánica resultante del tratamiento. El pretratamiento para reducir el tamaño de las partículas tiene dos efectos: primero, si el sustrato tiene un alto contenido en fibra y baja degradabilidad, la trituración del sustrato aumenta la producción de gas; segundo, puede conducir a una digestión más rápida. Las partículas más pequeñas aumentan la superficie disponible para los microorganismos, lo que resulta en una mayor disponibilidad de alimentos para las bacterias; por lo tanto, la biodegradabilidad anaeróbica aumenta (Izumi et al., 2010; Jain et al., 2015).

En varios estudios se ha sugerido que un mayor tamaño de partícula produce una menor producción de metano debido a la disminución de la degradación de la demanda química de oxígeno (DQO), lo que significa que el tamaño de partícula es inversamente proporcional a la tasa de utilización máxima del sustrato (Esposito et al., 2011; Jain et al., 2015). En un estudio realizado por Palmowski y Müller (2003), se trataron varios sustratos orgánicos, entre ellos el heno y las semillas de girasol, aplicando molino de cuchillas y molino de bolas, lo que dio lugar a la reducción del tamaño de las partículas, así como a la solubilización de la DQO (Demanda Química de Oxígeno), acompañada de una mayor biodegradabilidad, sobre todo a partir de sustratos con un alto contenido en fibra.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de investigación se centra en el estudio de la viabilidad de dos alternativas que permitirían tratar el residuo de frambuesa generado en la industria agroalimentaria como un subproducto, en lugar de un residuo sin ningún valor económico: la extracción de compuestos de alto valor añadido y la aplicación de un proceso de digestión anaerobia, ambas aplicadas tras la realización de un tratamiento mecánico, con el cual se consiguiese liberar los compuestos contenidos en el interior de los aquenios para extraerlos o mejorar la digestión anaerobia. Para ello, se han realizado los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluación de la rotura de la estructura de los aquenios y de la reducción del tamaño de las partículas que conlleva la aplicación de diferentes tratamientos mecánicos.
2. Evaluación del efecto de diferentes tratamientos mecánicos aplicados al extrusionado de frambuesa residual sobre la extracción de compuestos de alto valor añadido.
3. Evaluación del efecto de diferentes tratamientos mecánicos aplicados al extrusionado de frambuesa residual en el proceso de digestión anaerobia.

En la **Figura 7** se muestra un esquema general del trabajo que se ha realizado para alcanzar estos objetivos.

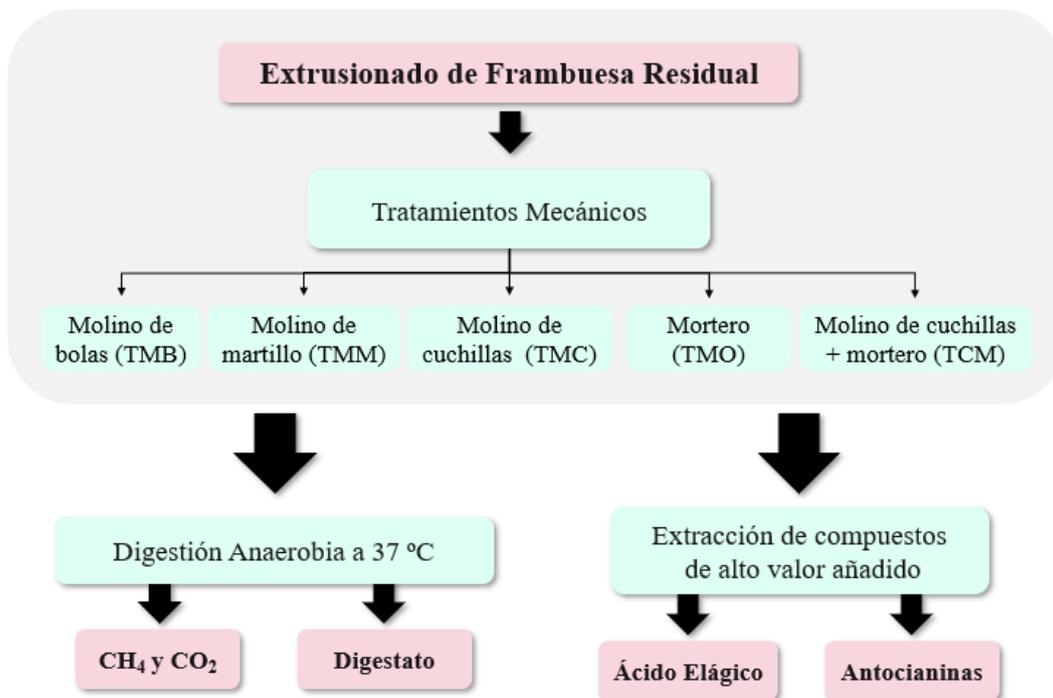


Figura 7. Esquema general de trabajo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SUSTRATO

La empresa suministradora del extrusionado de frambuesa residual utilizado en los ensayos ha sido **HUDISA**, establecida en Lepe (Huelva), sudoeste de España. HUDISA la conforman las 19 cooperativas productoras de frutos rojos más importantes; procesa y comercializa fruta congelada, purés y concentrados de fresa, frambuesa, mora y arándano, con origen en la provincia de Huelva.

El extrusionado de frambuesa residual (**EFR**) (**Figura 8**), se obtuvo en la campaña 2018-2019, cuya toma de muestra tuvo lugar el 19 de febrero de 2019. En el proceso industrial, el extrusionado de frambuesa residual fue cribado con un tamiz de 0,5 mm, y, además, fue sometido a un tratamiento térmico de inactivación enzimática a 65 °C.



Figura 8. *Extrusionado de frambuesa residual (EFR).*

El muestreo se llevó a cabo en las propias instalaciones de HUDISA donde se encuentra almacenado dicho residuo. Se utilizó el método del cuarteo para obtener una muestra representativa del sustrato (50 kg), el cual fue trasvasado a bolsas de plástico herméticas que se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta el día de su uso, para evitar el deterioro del producto. Una vez realizados los tratamientos mecánicos, las fracciones resultantes se guardaron en una cámara frigorífica a 4 °C, para preservarlas y evitar fermentaciones no deseadas que alterasen de manera significativa su composición.

3.2. TRATAMIENTOS MECÁNICOS

Se llevaron a cabo un total de cinco tratamientos mecánicos diferentes, para los cuales se utilizaron distintos equipos o sistemas. En cada uno de ellos se trataron 60 g de sustrato, que se dividieron en tres partes equitativas (aprox. 20 g) con el fin de facilitar el funcionamiento de los equipos. Los tratamientos realizados, son los siguientes:

1. Tratamiento con molino de bolas (TMB).
2. Tratamiento con molino de martillo (TMM).
3. Tratamiento con molino de cuchillas (TMC).
4. Tratamiento con mortero (TMO).
5. Combinación: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero (TCM).

En el **tratamiento mecánico con molino de bolas (TMB)** se utilizó un molino de bolas planetario *Retsch* modelo *S1* (Haan, Alemania) (**Figura 9.A**). La muestra fue vertida en un recipiente de molienda de piedra (50 mL) junto a un total de cuatro bolas de 1 cm de diámetro del mismo material (**Figura 9.B**). El recipiente de molienda fue colocado en el interior del equipo de forma excéntrica sobre la rueda principal (**Figura 9.C**). La rueda principal gira en sentido contrario que el recipiente de molienda con una relación de velocidad de 1:-2. El movimiento de las bolas dentro del recipiente es afectado por un efecto Coriolis debido al movimiento giratorio diferente de éstos con respecto a la rueda principal. La diferencia de velocidad entre las bolas y el recipiente se traduce en una acción combinada de fuerzas de choque y fricción que libera gran cantidad de energía dinámica. La gran interacción entre dichas fuerzas es responsable del alto grado de trituración de los molinos de bolas planetarios. El equipo se puso en funcionamiento durante 20 minutos a la máxima velocidad (velocidad de giro de la rueda principal: $100 - 650 \text{ min}^{-1}$).



Figura 9. A) Molino de bolas planetario *Retsch* modelo *S1*; B) Recipiente de molienda y bolas utilizados; C) Rueda principal giratoria y espacio para el recipiente de molienda.

En el **tratamiento mecánico con molino de martillo (TMM)** se utilizó un molino de martillo de micro impacto *Culatti A*, modelo *DFH 48* (Steinen, Suiza) (**Figura 10.A y 10.B**). La muestra fue colocada en un recipiente de almacenamiento situado en la parte superior del equipo, que se encuentra separada de la cámara interna del molino (cámara de molienda) mediante un separador metálico. Cuando el separador es retirado, la muestra pasa al interior de la cámara de molienda, la cual está constituida por un borde dentado y unas aspas con terminaciones dentadas (**Figura 10.C**). El equipo se puso en funcionamiento durante 30 segundos a la máxima velocidad (velocidad de rotación controlable entre 50 y 6.000 min^{-1}). Pasados los 30 segundos, en un período de 10-20 segundos, se fue disminuyendo la velocidad poco a poco hasta detener el funcionamiento del equipo. El equipo se puso en funcionamiento siguiendo estas indicaciones 3 veces. El giro de las aspas dentadas alrededor del borde dentado y las fuerzas de impacto y fricción que ejerce un aquenio con otro, provocan la rotura de éstos.

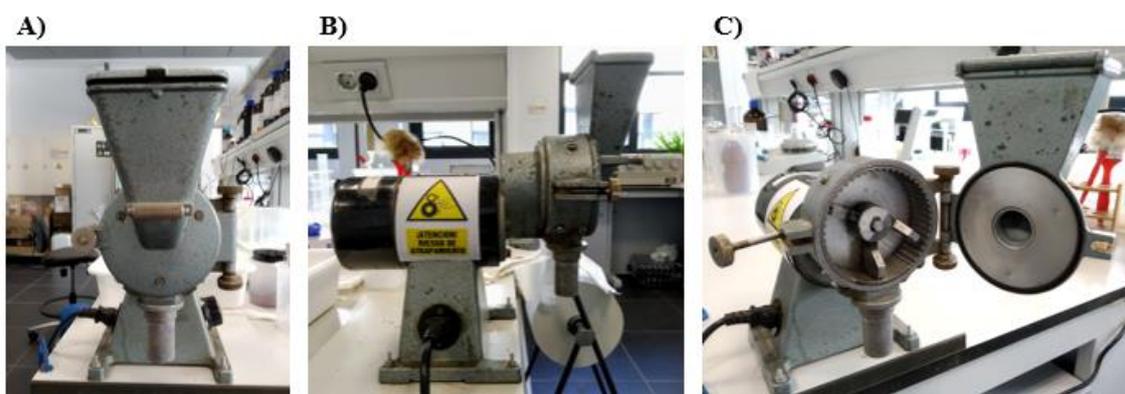


Figura 10. A) y B) Molino de martillo de micro impacto *Culatti AG* modelo *DFH 48*; C) Interior de la cámara de molienda.

En el **tratamiento mecánico con molino de cuchillas (TMC)** se utilizó un molinillo de café de acero inoxidable *Taurus* modelo *Aromatic* (Oliana, Barcelona) (**Figura 11.A y 11.B**). Dos cuchillas afiladas y de acero inoxidable giran en el centro del contenedor de molienda. El equipo se puso en funcionamiento durante 5 minutos en 3 períodos diferentes, es decir, un total de 15 minutos. Una velocidad preseleccionada que se mantiene electrónicamente garantiza resultados reproducibles. La reducción del tamaño del aquenio en este caso dependerá de la velocidad de giro que tengan las cuchillas, y del corte que estas provocan sobre el aquenio.

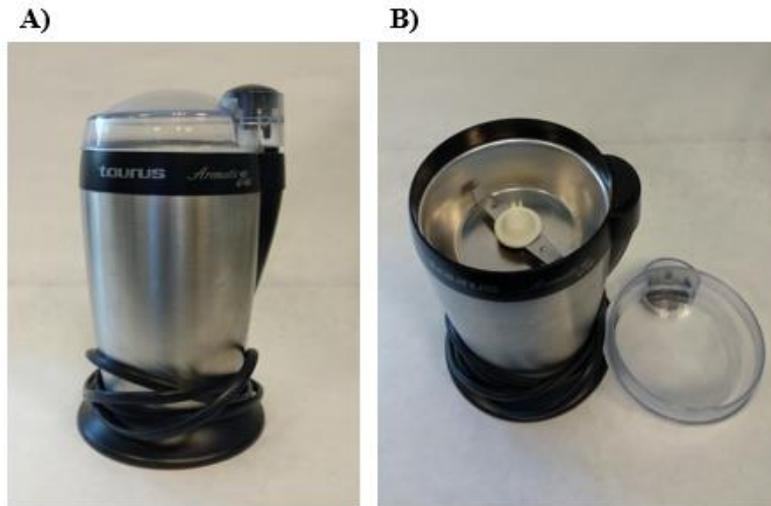


Figura 11. A) y B) Molinillo de café de acero inoxidable Taurus modelo Aromatic.

En el **tratamiento mecánico con mortero (TMO)** se utilizó un mortero de porcelana con mano de 550 mL de la marca *HDN ceramics* (**Figura 12**). El trabajo manual se realizó durante 10 minutos. Las fuerzas de impacto y fricción ejercidas sobre los aquenios con la mano y la misma fricción entre un aquenio y otro son las responsables de la reducción de su tamaño.

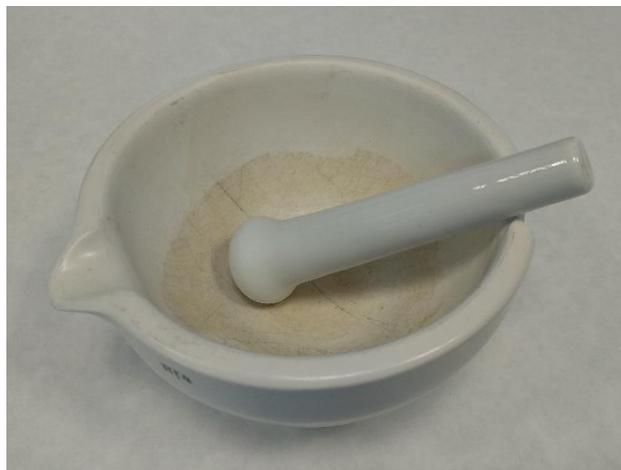


Figura 12. Mortero de porcelana con mano HDN ceramics.

Por último, para llevar a cabo la **combinación de los tratamientos mecánicos con molino de cuchillas y mortero (TCM)** se realizó, en primer lugar, la molienda de la muestra con el molinillo de café antes descrito y posteriormente, la muestra fue trasvasada al mortero donde se aplicó el trabajo manual. Para ambos tratamientos fueron aplicados los tiempos descritos en los tratamientos individuales correspondientes.

3.3. CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO MECÁNICO

Con el fin de cuantificar el grado de rotura provocado en el sustrato por los diferentes tratamientos mecánicos aplicados, se determinó el tamaño de las partículas del extrusionado de frambuesa residual sin tratar (EFR) y de las muestras obtenidas tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, utilizando un contador de colonias automático Ultra-HD Scan 4000 (*Interscience*, Saint Nom (Francia)) (**Figura 13**). Para llevar a cabo este proceso, se secó aproximadamente 1 g de EFR y de cada una de las muestras obtenidas tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, en una estufa a 105 °C durante 24 horas. Posteriormente, las muestras secas se distribuyeron individualmente (0,05 g aprox.), por triplicado, en placas Petri, las cuales contenían una pequeña cantidad de una solución semisólida de agar al 7 %, con el fin de evitar el movimiento de las partículas.



Figura 13. Contador de colonias automático Ultra-HD Scan 4000, versión 8.0.10.0 (*Interscience*).

El contador de colonias automático Ultra-HD Scan 4000 detecta partículas con un tamaño mínimo de 0,05 mm, y placas Petri con un diámetro entre 55 y 150 mm. El equipo consta de una cámara Ultra-HD con una resolución de 5 Mpx, realiza el conteo de forma automática, pero, además, es posible el control manual. Las partículas detectadas se resaltan y marcan con un cuadrado de color rosa (**Figura 14**). En este trabajo, se utilizó un rango de detección de partículas de 0 a 3 mm, el número total de partículas se contó cada 0,25 mm y se utilizó un diámetro de detección para las placas Petri de 82,6 mm.

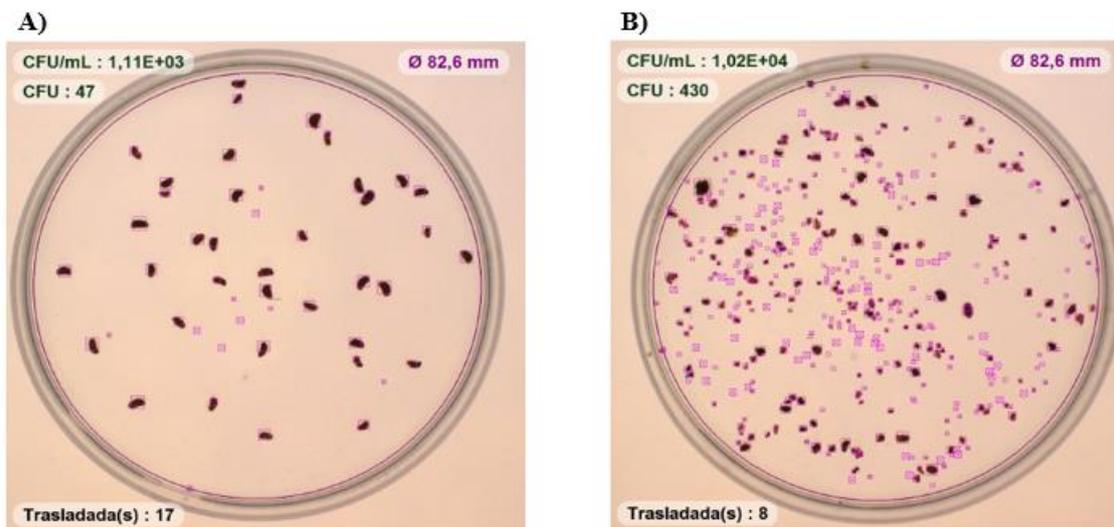


Figura 14. Cuantificación del número total de partículas (0 mm) con el contador de colonias automático Ultra-HD Scan 400 de diferentes muestras: A) Molino de bolas y B) Molino de cuchillas.

3.4. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS SOLUBLES

Para analizar la fracción soluble del sustrato sin tratar y de las diferentes fracciones obtenidas tras la aplicación de los distintos tratamientos mecánicos, se ha realizado una extracción con agua de los compuestos solubles. Para ello, a 20 g de muestra se han añadido 160 g de agua destilada, manteniéndose en agitación durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, el líquido obtenido ha sido centrifugado y filtrado con microfiltros de nailon de 0,45 μm . Este método permite cuantificar los compuestos solubles en las muestras sólidas de este trabajo y también es ampliamente utilizado para el análisis de compuestos solubles en materiales compostados (Thompson et al., 2001). La muestra obtenida se utilizará para la realización de las siguientes determinaciones analíticas: Demanda química de oxígeno soluble (DQOs), azúcares totales solubles en agua y ácidos urónicos solubles en agua.

3.5. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

3.5.1. MÉTODO 1

La extracción y posterior fraccionamiento de los compuestos polifenólicos utilizando el **método 1** se ha llevado a cabo de acuerdo con el método descrito por Pérez et al. (2017), ligeramente modificado.

En primer lugar, para llevar a cabo la extracción se pesaron 10 g de muestra (dos replicados por cada muestra) y se les adicionó 20 mL de una mezcla de Metanol/Agua al

80 % (v/v). Esta mezcla se ha mantenido en agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente, y en ausencia de luz con el fin de evitar la degradación de estos compuestos que son fotosensibles (Aguilera-Carbo et al., 2008). Transcurrido este tiempo, la mezcla ha sido filtrada en un embudo Buchner utilizando filtros de microfibra de vidrio de 47 mm al vacío.

En segundo lugar, para llevar a cabo el fraccionamiento del extracto obtenido, una alícuota de 5 mL del filtrado se colocó en una miniplaca Petri de vidrio y fueron evaporados en la oscuridad hasta sequedad en un horno ventilado a una temperatura inferior a los 40 °C, con el fin de evitar la degradación de algunos compuestos polifenólicos que son termosensibles (Struck et al., 2016). El residuo seco se redisolvió con 1 mL de una disolución de H₂SO₄ 0,2 N que contenía 0,05 % de EDTA, y se cargó en una columna SPE C₁₈ (50 mg) (**Figura 15**) previamente acondicionada con un volumen de metanol puro (6 mL) y tres volúmenes de agua desionizada (Supelco, Bellefonte, PA). Los pasos de redisolver y carga se repiten tres veces más, asegurándose que no queda color en la placa Petri. Las antocianinas y otros compuestos polifenólicos fueron absorbidos en la columna mientras que los azúcares, ácidos orgánicos y otros compuestos se eluyeron con hasta 4 mL de la misma disolución. Después del secado completo de la columna, los compuestos polifenólicos se eluyeron con 2 o 3 mL de metanol (dependiendo de la concentración de estos compuestos en la columna), fracción que se considera polifenoles totales. Los extractos fueron filtrados a través de filtros de nailon de 0,45 µm antes de realizar el ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu, y a través de filtros de nailon de 0,22 µm antes del análisis con HPLC.



Figura 15. Columna SPE C₁₈ (Supelco, 50 mg) utilizada en el fraccionamiento del extracto obtenido en la extracción.

3.5.2. MÉTODO 2

La extracción de los compuestos polifenólicos utilizando el **método 2** se ha llevado a cabo de acuerdo con el método descrito en García et al. (2016) para el aceite de oliva virgen, ligeramente modificado.

Para la obtención de la fracción de compuestos polifenólicos totales, a 10 g de muestra se han adicionado 20 mL de una mezcla de Metanol/Agua al 80 % (v/v), manteniéndose durante 1 hora a 70 °C en un baño de agua. Transcurrido este tiempo, la mezcla ha sido filtrada en un embudo Buchner utilizando filtros de microfibra de vidrio de 47 mm al vacío, considerando esta fracción polifenoles totales. Los extractos fueron filtrados a través de filtros de nailon de 0,22 µm antes del análisis con HPLC.

3.6. ENSAYO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA

Para evaluar el potencial de recuperación de energía en forma de metano mediante digestión anaerobia se ha realizado un ensayo BMP (Biochemical Methane Potencial), 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 BMP pueden influir diferentes factores (Angelidaki et al., 2009; Cárdenas Cleves et al., 2016; Raposo et al., 2011) que pueden agruparse en cuatro grandes grupos: los relacionados con el inóculo, con el sustrato, con las condiciones experimentales y con el procedimiento operativo. A continuación, se detallan las condiciones experimentales empleadas durante el desarrollo del presente estudio.

3.6.1. INÓCULO

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.**, que se encuentra situada en el paraje La Caridad – Cañada de Pero Mingo, s/n – 41020, Sevilla (Sevilla). Tras caracterizar dicho inóculo, se obtuvieron los siguientes resultados (**Tabla 2**):

Tabla 2. Caracterización del inóculo.

	pH	Sólidos Totales (mg/kg)	Sólidos Minerales (mg/kg)	Sólidos Volátiles (mg/kg)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)
Inóculo	7,3 ± 0,1	63.000 ± 820	17.400 ± 470	45.605 ± 420	2.73040

3.6.2. SUSTRATOS

Los sustratos seleccionados para este ensayo han sido: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar (EFR), y las muestras obtenidas tras la aplicación del tratamiento mecánico con molino de bolas (TMB), del tratamiento mecánico con molino de martillo (TMM) y del tratamiento mecánico con molino de cuchillas (TMC). Estos sustratos, han sido caracterizados de acuerdo a sus propiedades relevantes y su idoneidad para la degradabilidad.

3.6.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Relación entre el inóculo y el sustrato (RIS)

Chudoba et al. (1991) expuso claramente que la RIS es uno de los parámetros más importantes en los ensayos de BMP. Además, las unidades utilizadas (ST; Sólidos Totales, SV; Sólidos Volátiles o DQO; Demanda Química de Oxígeno) deben ser claramente indicadas. Las determinaciones de BMP se establecieron resaltando la importancia de usar una RIS adecuada para controlar el proceso de biodegradación. La RIS puede ser baja o alta. Trabajos de investigación anteriores sugirieron el uso de una alta $RIS \geq 2$ (Raposo et al., 2011). En este ensayo, para conocer la cantidad de sustrato a introducir en los reactores en el ensayo de BMP, se establece una relación de sólidos volátiles (SV) entre el inóculo y el sustrato con una ratio de 2 (3:1,5 g de SV).

Condiciones de operación

Para llevar a cabo el ensayo, 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 termostatzada en un rango mesofílico. Concretamente, se mantuvo la temperatura entre 35 y 37 °C, utilizando un termostato de inmersión “Termotronic II” (JP Selecta S.A., Abrera (Barcelona)) colocado en el interior del baño con agua. La agitación se ha mantenido constante (300 rpm) en los reactores mediante agitadores magnéticos para favorecer la transferencia de materia. El tiempo de duración del ensayo han sido un total de 33 días.

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

Los ensayos en discontinuo deben realizarse a valores de pH entre 7,0 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”. Un rango óptimo de alcalinidad para amortiguar los cambios de pH producidos por la presencia de ácidos grasos volátiles sería entre 2.500 y 5.000 mg CaCO₃/L (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 (20 mL) de una disolución 0,6 M de bicarbonato sódico (NaHCO₃).

Está bien documentado que todos los procesos microbianos requieren nutrientes y oligoelementos (metales y vitaminas) durante la biodegradación orgánica (Angelidaki and Sanders, 2004). Sin embargo, no está claro si en las condiciones normales de un ensayo de BMP 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, la mezcla de inóculo y sustrato se complementó con un 20 % (v/v) de un medio que contiene micro y macronutrientes descrita en Raposo et al. (2006) (**Tablas 3 y 4**).

Tabla 3. *Disolución de micronutrientes o elementos trazas.*

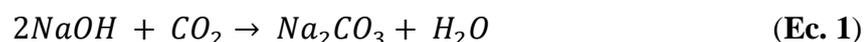
FeCl ₂ ·4H ₂ O	2.000 mg/L	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	50 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.000 mg/L	H ₃ BO ₃	50 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	500 mg/L	ZnCl ₂	50 mg/L
AlCl ₃ ·6H ₂ O	90 mg/L	CuCl ₂ ·2H ₂ O	38 mg/L

Tabla 4. *Disolución de macronutrientes (cinco veces concentrada).*

NH ₄ Cl	1,40 g/L	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,50 g/L
KH ₂ PO ₄	1,25 g/L	Extracto levadura	0,50 g/L
MgSO ₄ ·H ₂ O	1,00 g/L	Micronutrientes	5,00 mL/L

Sistema de medición de gas

En este ensayo, 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 absorber químicamente el CO₂ presente en el biogás (**Ec. 1**), 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 tubos de goma, de modo que se eviten pérdidas de este o la entrada de oxígeno al sistema.



3.6.4. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

El sistema BMP a escala laboratorio que se ha utilizado en este ensayo se puede observar en la siguiente imagen (**Figura 16**).

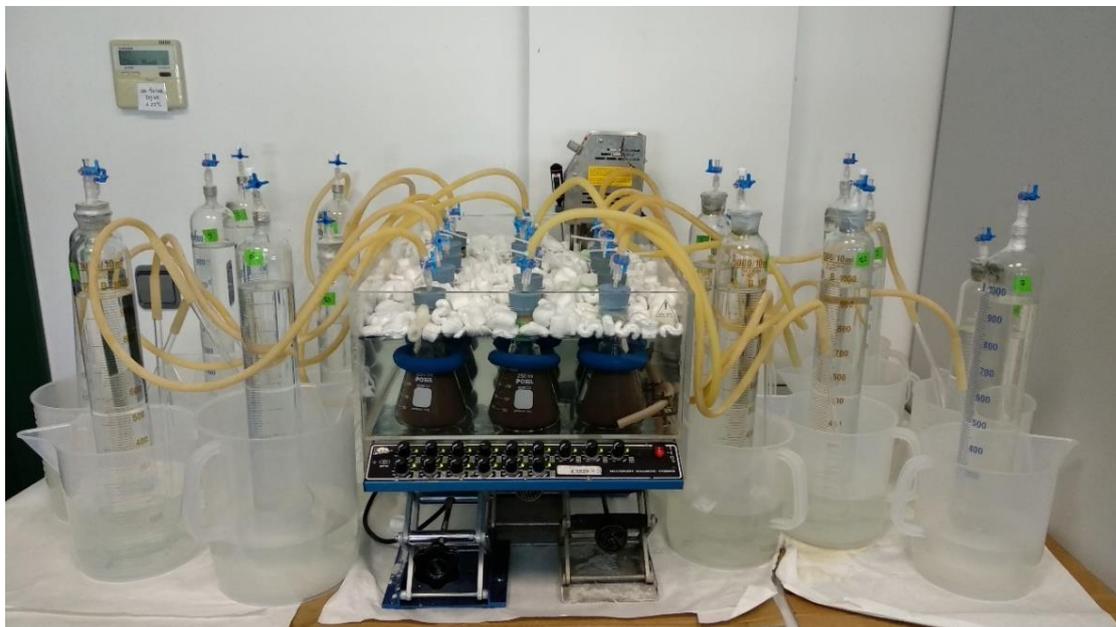


Figura 16. *Sistema experimental utilizado para el ensayo de BMP (Biochemical Methane Potencial).*

Una vez montado el ensayo, los reactores se mantuvieron durante 24 horas con una alimentación de glucosa, es decir, no fue alimentado con el sustrato objeto de estudio, con el objetivo de asegurar la estabilidad del sistema.

Después de alimentar los reactores, se ha medido diariamente el volumen de gas generado. Posteriormente, se hicieron 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 de cada muestra y con reactores blancos, sin sustrato, para obtener la producción no debida al sustrato. Los volúmenes de metano acumulado se representaron gráficamente en función del tiempo de digestión.

Cada reactor con volumen final de 240 mL contenía: la cantidad correspondiente de inóculo y de sustrato, 50 mL de la disolución de nutrientes, 20 mL de NaHCO_3 y agua destilada hasta alcanzar el volumen final de 240 mL.

3.7. ESTUDIO CINÉTICO

Los parámetros cinéticos y el ajuste matemático de los procesos anaeróbicos se determinaron numéricamente a partir de los datos experimentales obtenidos, mediante una regresión no lineal utilizando el *software SigmaPlot* (versión 11.0). El modelo cinético utilizado ha sido el **modelo de Función de Transferencia (TF)**, el cual ha sido aplicado por otros autores para extrusionados de fresa y frambuesa (Trujillo-Reyes et al., 2019), así como para otros residuos agroindustriales (Donoso-Bravo et al., 2010; Pinto-Ibieta et al., 2016; Serrano et al., 2017), usando la siguiente expresión (**Ec. 2**):

$$B = B_m * \left(1 - \exp \left[\frac{R_m(t-\Lambda)}{B_m} \right] \right) \quad (\text{Ec. 2})$$

donde B (mL CH₄/g SV) es la producción acumulativa específica de metano, B_m (mL CH₄/g SV) es la producción máxima de metano, R_m (mL CH₄/g SV d) es la velocidad máxima de producción de metano, t (d) es el tiempo y Λ (d) es el tiempo de retardo.

Adicionalmente, R², error (%) y el error estándar de estimación (σ_{est}) fueron determinados para evaluar el ajuste y la precisión de los resultados. El error fue definido como la diferencia en porcentaje entre la producción experimental acumulativa final de metano y B_m,

3.8. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.8.1. pH

Para la determinación del pH, se ha utilizado un multímetro portátil Sension+ MM150 marca HACH 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 decimales. Diariamente se ha procedido a la calibración de este con soluciones tampón de la marca *HACH* de pH: 4,01; 7,00 y 9,21.

3.8.2. ALCALINIDAD

La alcalinidad de un agua es una medida de su capacidad para amortiguar cambios de pH. El valor medido puede variar significativamente con el pH del punto final utilizado. Además, es importante en muchos usos y tratamientos de aguas naturales y residuales porque es función fundamentalmente del contenido en carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, si bien los valores medios de alcalinidad incluyen también la contribución de boratos, fosfatos, silicatos y otras bases presentes en la muestra analizada.

Para determinar la alcalinidad se ha utilizado un equipo de titración automático *Crison* modelo *pH-Burette 24 IS*, constituido por un medidor de pH con bureta de 10 mL. Se ha tomado un volumen conocido de muestra en un vaso de precipitado, y se le ha ido añadiendo lenta y automáticamente una disolución de ácido sulfúrico 0,02 N, hasta alcanzar un punto final con pH 4,50. Este punto corresponde a la conversión de la mayor parte del HCO_3^- a H_2CO_3 . Se mide 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 siguiente expresión:

$$Alcalinidad (mg CaCO_3/L) = \frac{V \cdot N \cdot 50 \cdot 1000}{V_m}$$

donde:

V = volumen gastado de ácido sulfúrico, mL.

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

50 = peso equivalente del $CaCO_3$.

V_m = volumen tomado de muestra, mL.

3.8.3. SÓLIDOS TOTALES (ST), MINERALES (SM) Y VOLÁTILES (SV)

Sólidos Totales (ST)

La determinación de los sólidos totales incluye tanto los sólidos orgánicos como los inorgánicos presentes en la muestra. Para su determinación, se pesa 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 seca en estufa a 103-105 °C hasta alcanzar 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 (APHA, 2012).

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

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 la muestra, g.

Sólidos Minerales (SM)

El crisol con el residuo seco procedente de la determinación de sólidos totales, de peso conocido, se lleva a un horno mufla a 550 °C donde se calcina 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 (APHA, 2012).

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

donde:

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

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

B = peso del crisol, g.

m = masa inicial de la muestra, g.

Sólidos Volátiles (SV)

Los sólidos volátiles se calculan como la diferencia entre los sólidos totales y los sólidos minerales. La siguiente fórmula permite expresar los resultados en mg/kg (APHA, 2012).

$$SV(mg/kg) = ST - SM$$

donde:

SV = sólidos volátiles presentes en la muestra, mg/kg.

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

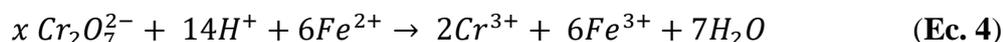
SM = sólidos minerales presentes en la muestra, mg/kg.

3.8.4. DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO TOTAL Y SOLUBLE (DQO_T Y DQO_S)

La demanda química de oxígeno (DQO) 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_T es el de la 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) (**Ec. 3**). Además, con el objetivo de reducir interferencias como cloruros, se añade HgSO₄. Tras el período de digestión (2 horas), el exceso de dicromato que no ha reaccionado se

valora frente a FAS (sulfato de hierro (II) y amonio hexahidratado, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, conocido como sal de Mohr) (Ec. 4), con ferroína 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 incluye junto a la muestra, un blanco con agua destilada. Por diferencia con el blanco, se determina la cantidad de dicromato consumido en la oxidación de la muestra (Raposo et al., 2008). Los resultados son expresados en $\text{mg O}_2/\text{kg}$.

La siguiente fórmula permite expresar los resultados en $\text{mg O}_2/\text{kg}$:

$$DQO_T \left(\frac{\text{mg O}_2}{\text{kg}} \right) = \frac{(B - M) \cdot 8 \cdot 1000 \cdot N_{FAS}}{m}$$

donde:

DQO_T = demanda química de oxígeno total, $\text{mg O}_2/\text{kg}$.

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

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

N_{FAS} = normalidad exacta del FAS.

m = peso de la muestra, g.

8 = peso equivalente del oxígeno.

Para la determinación de la DQO_S el procedimiento es similar al utilizado con la DQO_T , pero en este caso, se realiza una previa solubilización y filtración de la muestra, la digestión tiene lugar a reflujo cerrado y el exceso de dicromato se mide espectrofotométricamente. Tras la digestión de la muestra a 150°C (2 horas), se mide la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo electron corporation: Genesys 10 VIS) a 600 nm. Para la obtención del valor de DQO_S , la absorbancia resultante se interpola en una recta de calibrado realizada previamente. Para la realización de la recta de calibrado, se preparan un cierto número de disoluciones de ftalato ácido de potasio por dilución de una disolución madre cuyo valor teórico de DQO_S es conocido ($1,1796 \text{ mg O}_2/\text{kg}$). El resultado se ha expresado en $\text{mg O}_2/\text{L}$ (APHA, 2012).

3.8.5. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES SOLUBLES EN AGUA

Uno de los métodos más comúnmente usados para cuantificar azúcares totales es el 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 17**) (Dische, Z., 1962; Mokrash, L., 1954; Scaramboni et al., 2015).

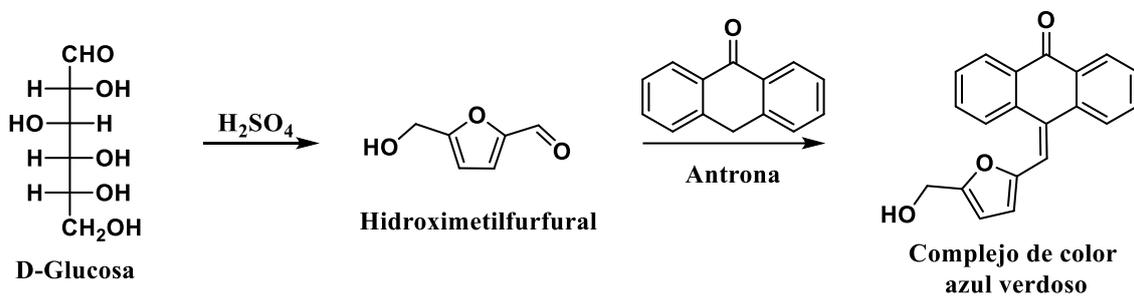


Figura 17. Reacción del método de la Antrona.

Para realizar el análisis de las muestras, se han tomado alícuotas de la muestra diluida por triplicado, se les ha añadido el reactivo Antrona-sulfúrico, han sido agitadas en el vórtex y calentadas 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 Microplate Absorbance Reader* (Hércules, CA, EE. UU). La absorbancia obtenida se ha interpolado en una recta de calibrado obtenida a partir de diferentes diluciones de una disolución patrón de glucosa, cuyo peso exacto es conocido. En este caso, el resultado se ha expresado en mg glucosa equivalente/L.

3.8.6. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS URÓNICOS SOLUBLES EN AGUA

El contenido de ácidos urónicos solubles en agua se cuantifica colorimétricamente según el método del cromógeno *m*-hidroxibifenilo con alguna modificación (**Figura 18**) (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1974). La presencia de ácidos urónicos es una señal indicativa de la existencia de carbohidratos ácidos o pectinas (Côté and Hahn, 1994), ya que es el ácido galacturónico el componente principal de las pectinas.

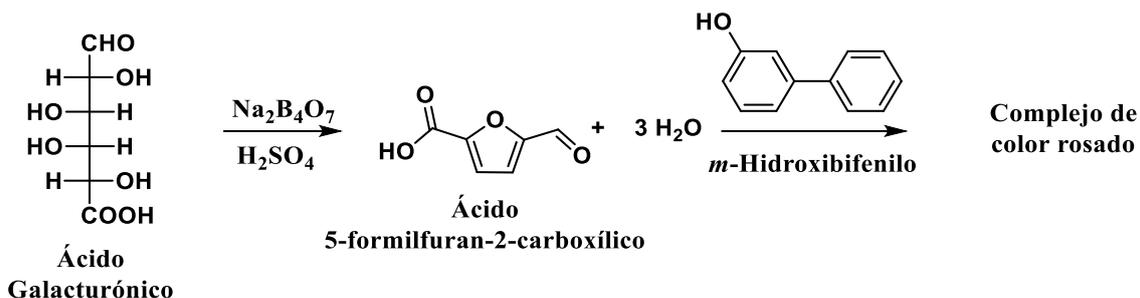


Figura 18. *Reacción del método del cromógeno m-hidroxibifenilo modificado.*

En tubos de ensayo, se dosifica por triplicado la muestra más un blanco de muestra con el que se corrigen posibles interferencias de carbohidratos no urónicos. Estos se colocan en un baño de hielo, y ya en frío, se adiciona una cantidad conocida de una disolución de tetraborato sódico. Los tubos son agitados en el vórtex, y a continuación, son calentados a 100 °C durante 5 minutos en un baño de agua. Una vez se enfrían los tubos, se añade *m*-hidroxibifenilo, reactivo sensible y específico de los anhídridos de los ácidos urónicos. El color desarrollado por agitación vigorosa se mide a 450 nm en un lector de microplacas *Bio-Rad* modelo *iMark Microplate Absorbance Reader* (Hércules, CA, EE. UU). Se utiliza ácido galacturónico como patrón externo de calibración. La absorbancia obtenida se ha interpolado en una recta de calibrado obtenida a partir de diferentes diluciones de una disolución patrón de ácido galacturónico, cuyo peso exacto es conocido. En este caso, el resultado se ha expresado en mg ácido galacturónico equivalente/mL.

3.8.7. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Para la determinación de los polifenoles totales se ha utilizado un método colorimétrico, conocido como el método de Folin-Ciocalteu. El reactivo principal del ensayo consiste en una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo comúnmente denominado “reactivo de Folin”, y es a partir de la mezcla de ambos ácidos que se producen iones de molibdato y tungsteno. La reacción se lleva a cabo en condiciones básicas (pH 10), con la finalidad de que se genere un ion fenolato que reduce al reactivo de Folin mediante una reacción de tipo óxido/reducción (**Figura 19**) y genera la formación de un complejo de Mo(V) que presenta una coloración azul intensa, cuya intensidad a 655 nm es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles (Muñoz-Bernal et al., 2017; Singleton et al., 1999).

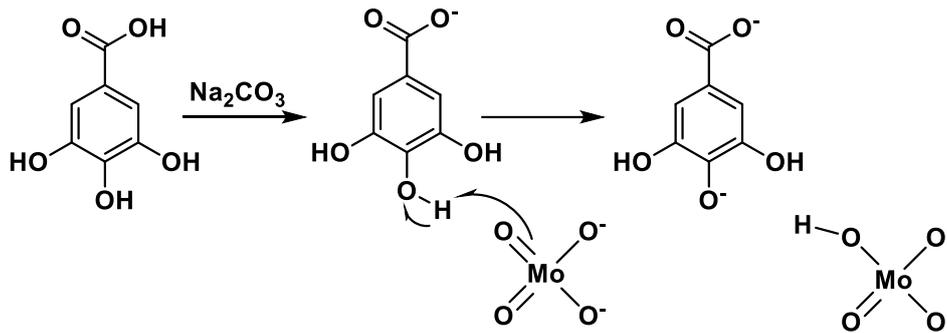


Figura 19. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin (Muñoz-Bernal et al., 2017).

Para realizar el análisis de las muestras, se han tomado alícuotas de la muestra por triplicado, se ha añadido carbonato sódico (Na_2CO_3) y el reactivo Folin, 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 Microplate Absorbance reader* (Hércules, CA, EE. UU). La absorbancia obtenida se ha interpolado en una recta de calibrado obtenida a partir de diferentes diluciones de una disolución patrón de ácido gálico, cuyo peso exacto es conocido. En este caso, el resultado se ha expresado en mg ácido gálico equivalente/mL.

3.8.8. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS INDIVIDUALES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

Los compuestos fenólicos individuales se analizaron de acuerdo con el método de Gil et al. (1997) ligeramente modificado por Pérez et al. (2017).

La separación de los compuestos polifenólicos se realizó en un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) *Beckman Coulter* equipado con un detector diodo array 168, un módulo de bomba 126 y una columna de fase reversa Merck Superspher RP-18 (250 mm x 4 mm, tamaño de partícula 4 μm) usando agua acidificada (ácido fórmico al 2,5 %) (disolvente A) y metanol acidificado (ácido fórmico al 2,5 %) (disolvente B) como fases móviles. La detección se llevó a cabo a 350 y 510 nm, y el *loop* de inyección de muestra fue de 20 μL .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO MECÁNICO EN LA DISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULAS

En este apartado se muestran los resultados obtenidos tras la cuantificación de partículas según su tamaño, realizada en un rango de 0 a 3 mm utilizando un contador de colonias automático tanto del extrusionado de frambuesa sin tratar (EFR), como de los sustratos obtenidos tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos propuestos.

En la **Figura 20** se muestra el número total de partículas cuantificadas por gramo de sustrato, obtenidas tras la utilización del contador de colonias automático para EFR y cada uno de los tratamientos mecánicos propuestos.

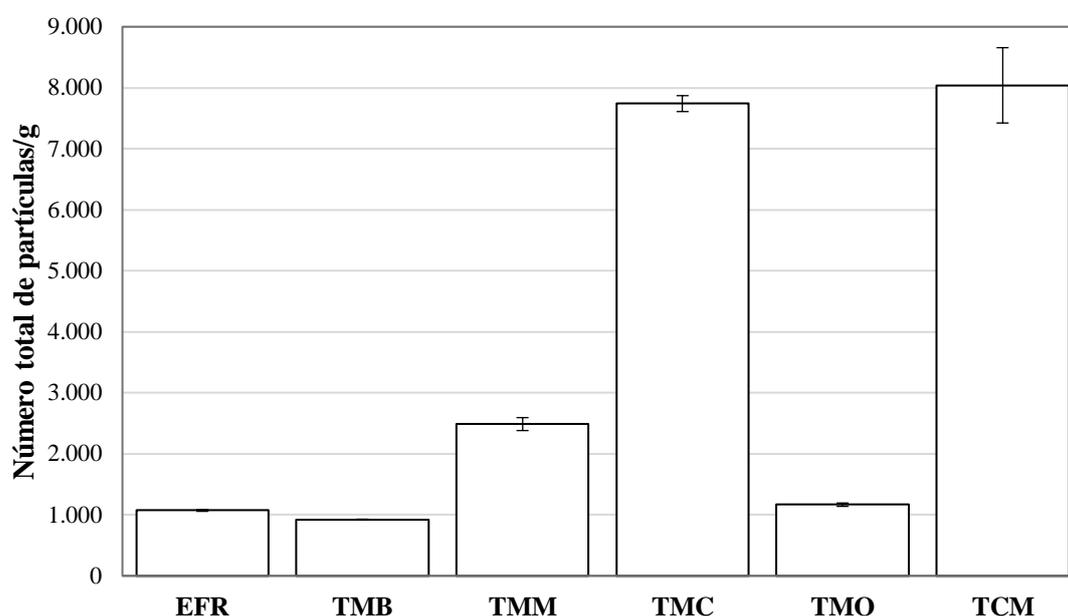


Figura 20. Número total de partículas cuantificadas por gramo de sustrato tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

En la **Figura 20**, en referencia a la rotura de la estructura del aquenio tras la aplicación de los tratamientos mecánicos, pueden distinguirse tres efectos diferentes: bajo medio y alto. El efecto bajo se observa al comparar el EFR con los tratamientos mecánicos TMB y TMO, ya que en estos se cuantifica aproximadamente el mismo número de partículas totales por gramo de sustrato, lo que muestra que estos tratamientos no han tenido efecto significativo en cuanto a la rotura de la estructura del aquenio. El efecto medio se da al comparar el EFR con el tratamiento mecánico TMM, donde se cuantifica

aproximadamente dos veces más el número de partículas totales por gramo de sustrato, es decir, tiene un efecto significativo en cuanto a la rotura de la estructura del aquenio. Por último, el efecto alto es el que se observa al comparar el EFR con los tratamientos mecánicos TMC y TCM, puesto que se cuantifica el mayor número de partículas totales por gramo de sustrato, siendo estos tratamientos los que han causado el mayor efecto en cuanto a la rotura de la estructura del aquenio.

A continuación, en la **Figura 21** se muestra la distribución de partículas obtenida tras la cuantificación realizada, es decir, el número de partículas por gramo de sustrato cuantificadas por tamaño de partícula en un rango de 0 a 3 mm, cada 0,25 mm.

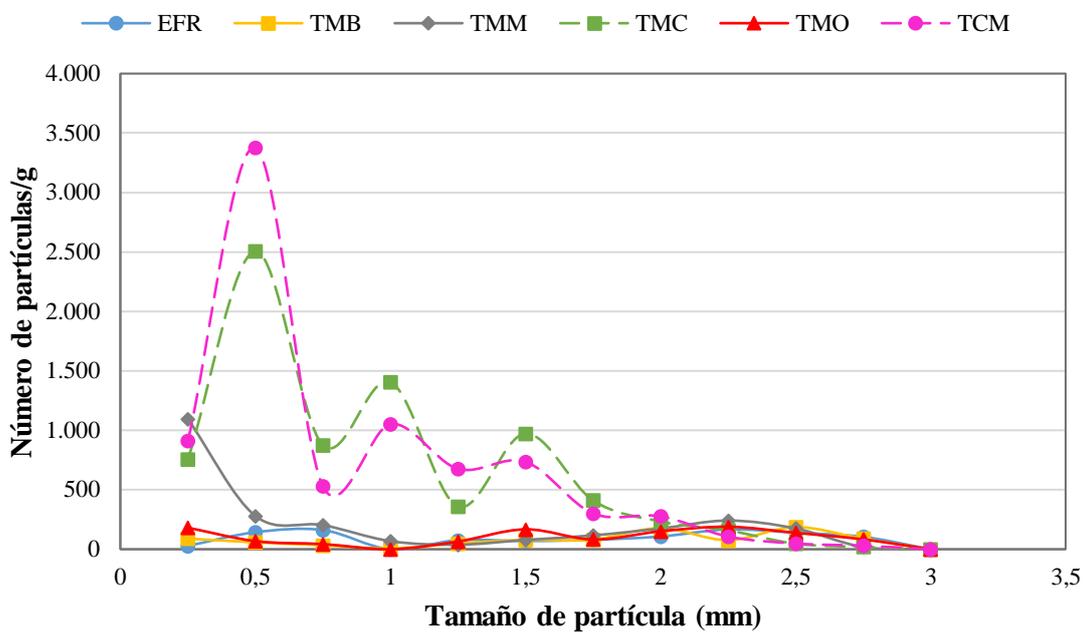


Figura 21. Distribución de partículas tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

En la **Figura 21** queda reflejado que la distribución de partículas en los tratamientos mecánicos TMB, TMO y TMM es prácticamente igual que en el EFR; a excepción del TMM, que en el rango comprendido entre los tamaños de 0 y 0,25 mm tiene mayor número de partículas por gramo de sustrato que los ya mencionados. Debido a esta diferencia, en la **Figura 20** puede observarse el doble del número de partículas totales por gramo de sustrato con el TMM. Sin embargo, en los tratamientos mecánicos TMC y TCM, de los que ya se dijo que provocaban mayor efecto en la rotura de la estructura del aquenio, se observa que el mayor número de partículas por gramo de

sustrato cuantificadas tienen tamaños comprendidos entre 0 y 1,75 mm, siendo el rango comprendido entre los tamaños de 0,25 y 0,50 mm en el que mayor número de partículas por gramo han sido cuantificadas, el 32 % en TMC y el 42 % en TCM. El hecho de que las partículas se hayan reducido a tamaños tan inferiores es consecuencia de la rotura de la estructura del aquenio y justifica que aparezcan en la **Figura 20** un mayor número de partículas totales por gramo de sustrato en estos tratamientos.

Según los resultados mostrados en las **Figuras 20 y 21**, con los tratamientos mecánicos TMB y TMO, se deduce que las fuerzas de impacto y fricción aplicadas no han sido suficiente para conseguir la rotura de la estructura del aquenio, y su consecuente reducción de tamaño. Mientras que, con el TMM, se han observado resultados reseñables, puesto que el 44 % de las partículas totales cuantificadas, es decir, casi la mitad de estas partículas, tienen tamaños comprendidos entre 0 y 0,25 mm, mientras que el tamaño de las partículas restantes es similar a las cuantificadas en el EFR, el TMB y el TMO. Este hecho se debe a que algunos de los aquenios, por su tamaño y humedad, pueden quedar retenidos entre la estructura dentada que conforma los bordes de la cámara de molienda del molino de martillo, por lo que no se rompen ni muelen en el proceso. El resto de los aquenios se rompen y reducen debido a los impactos y la fricción que se produce entre ellos provocado por el giro de las aspas dentadas internas. Por último, comparando los resultados obtenidos con el TMC y la combinación de tratamientos mecánicos (TCM), se puede observar que con esta última mejora la rotura del aquenio y la reducción del tamaño de sus partículas. En ambos casos, TMC y TCM, la acción de las cuchillas ha beneficiado la ruptura de la estructura de los aquenios, y también la reducción del tamaño de las partículas. Además, las fuerzas de impacto y fricción aplicadas con el brazo del mortero en el TCM también han mejorado los resultados.

4.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO MECÁNICO EN LA COMPOSICIÓN DEL EXTRUSIONADO DE FRAMBUESA RESIDUAL

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en las determinaciones analíticas realizadas al extrusionado de frambuesa residual sin tratar (EFR) y a las fases obtenidas tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos propuestos, con el fin de analizar el efecto de dichos tratamientos mecánicos en la composición del extrusionado de frambuesa residual.

4.2.1. MATERIA ORGÁNICA

En la **Tabla 5** se muestran los valores de pH, humedad, sólidos totales (ST), minerales (SM) y volátiles (SV), la demanda química de oxígeno de los componentes totales y solubles (DQO_T y DQO_S) y la ratio DQO_S/DQO_T.

Tabla 5. Caracterización analítica de la materia orgánica tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

	EFR	TMB	TMM	TMC	TMO	TCM
pH	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,9 ± 0,1
Humedad (%)	43,1 ± 2,0	39,6 ± 0,2	32,1 ± 0,1	37,1 ± 1,0	39,1 ± 0,3	34,3 ± 0,0
ST (mg/kg)	569.105 ± 19.790	604.060 ± 2.215	678.895 ± 615	628.845 ± 10.060	609.330 ± 2.795	656.825 ± 320
SM (mg/kg)	9.415 ± 220	9.995 ± 455	11.040 ± 270	10.615 ± 425	9.915 ± 365	10.935 ± 1.305
SV (mg/kg)	559.685 ± 19.575	594.065 ± 2.220	667.850 ± 535	618.225 ± 9.770	599.415 ± 3.145	645.890 ± 1.410
DQO_T (mg O₂/kg)	944.090 ± 12.045	946.345 ± 32.115	1.073.720 ± 9.685	1.093.170 ± 28.355	1.056.200 ± 18.090	1.121.915 ± 15.535
DQO_S (mg O₂/kg)	43.315 ± 340	43.955 ± 600	63.115 ± 915	71.340 ± 1.040	50.415 ± 1.700	74.942 ± 685
Ratio (DQO_S/DQO_T)	0,05	0,07	0,05	0,07	0,06	0,05

La **Tabla 5** refleja que los valores de pH de las muestras obtenidas tras la aplicación de los tratamientos mecánicos, que oscilan entre 3,4 y 3,9, varían muy poco en comparación con el valor de pH del EFR. Con respecto a los valores de humedad, puede observarse que el EFR es un sustrato relativamente seco, tiene una humedad baja. Aunque cuando se aplican los tratamientos mecánicos estos valores disminuyen, y se obtienen sustratos más secos, ya que el agua contenida en el interior del aquenio puede haberse evaporado al destruir su estructura o a causa de la energía aplicada durante el tratamiento.

También, se observa en la **Tabla 5** que, en todos los casos estudiados, entorno al 98 % de los sólidos totales son sólidos volátiles. Comparando los valores de ST y SV entre los diferentes sustratos, se observa que con respecto al EFR, los tratamientos mecánicos TMM, TMC y TCM liberan una mayor cantidad de materia orgánica, un 16, 10 y 13 % respectivamente. Los resultados obtenidos podrían tener relación con la

reducción del tamaño de las partículas, ya que se observa que cuánto menor es el tamaño de las partículas mayor cantidad de materia orgánica se ha determinado. Los pocos sólidos minerales determinados pueden corresponder a sales y/o carbonatos.

Al igual que los sólidos volátiles, la demanda química de oxígeno es una medida indicativa de la materia orgánica contenida en una muestra (**Tabla 5**). La ratio DQO_s/DQO_T determinada indica que aproximadamente el 90 % de la materia orgánica no es soluble para todos los casos estudiados.

En la **Figura 22** se muestran los valores obtenidos en la determinación de la demanda química de oxígeno de los componentes solubles (DQOs), según el número total de partículas por gramo de sustrato obtenidas tras la cuantificación.

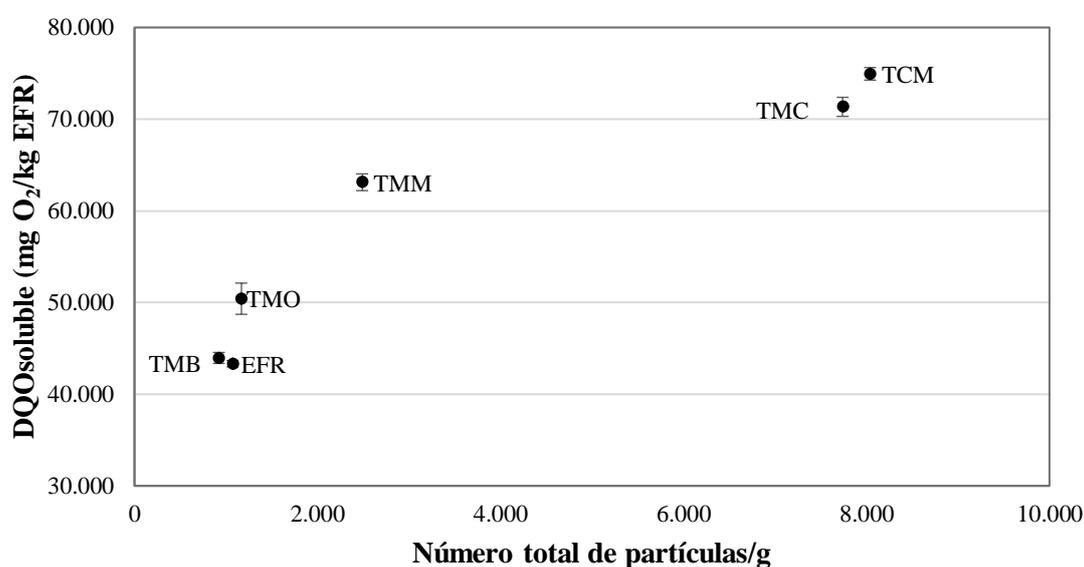


Figura 22. Demanda química de oxígeno de los componentes solubles tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos (EFR: Extrusión de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

En la **Figura 22**, se observa que, tras la rotura de la estructura de los aquenios con la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, además de dar lugar a la reducción del tamaño de las partículas, también dio lugar a la solubilización de la materia orgánica que se observa con la medida de la DQO_s . Esto mismo ha ocurrido en otros estudios, por ejemplo, en el realizado por Palmowski y Müller (2003) con materiales con alto contenido en fibra, heno y semillas de girasol, o en el estudio realizado por Izumi et al. (2010) con residuos alimenticios. Estos resultados se muestran en la **Figura 22** como una tendencia creciente, puesto que cuanto mayor es el número total de partículas por gramo de sustrato,

es decir, cuanto menor es el tamaño de las partículas, se obtiene mayor solubilización de la materia orgánica.

4.2.2. AZÚCARES TOTALES Y ÁCIDOS URÓNICOS

La **Figura 23** muestra los datos obtenidos en la determinación de los azúcares totales solubles en agua, expresados como miligramos de glucosa equivalente por kilogramo de extrusionado de frambuesa residual, según el número total de partículas por gramo de sustrato obtenidas tras la cuantificación.

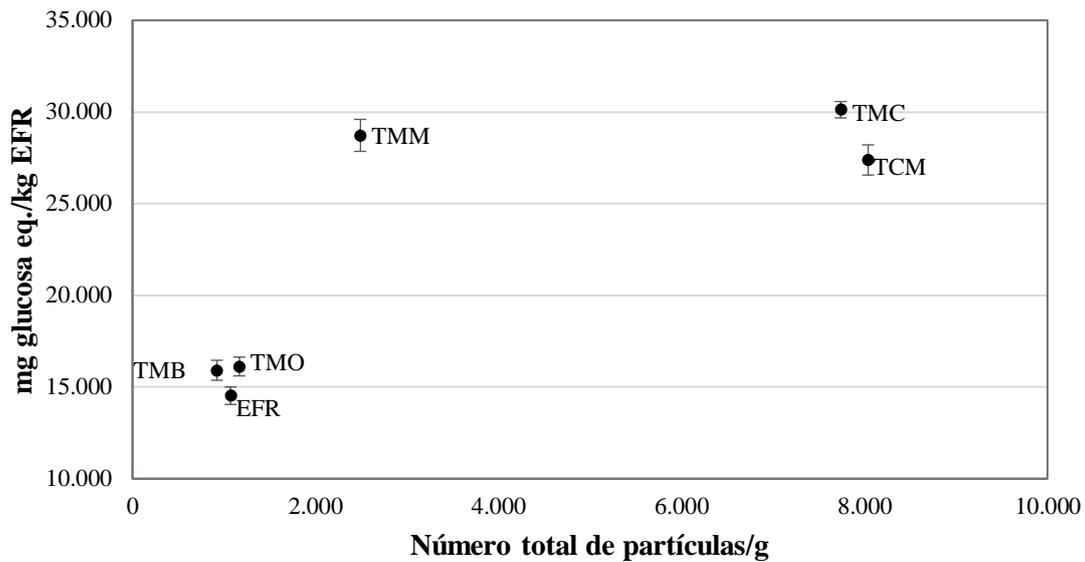


Figura 23. Azúcares totales solubles en agua tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

En la **Figura 23**, al igual que ocurre en el caso de la DQOs, se observa que, tras la rotura de la estructura de los aquenios con la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, además de dar lugar a la reducción del tamaño de las partículas, también consigue una liberación de azúcares totales solubles en agua. Del mismo modo, puede observarse una tendencia creciente: cuanto mayor es el número total de partículas por gramo de sustrato, es decir, cuanto menor es el tamaño de las partículas, se obtiene mayor cantidad de miligramos de glucosa eq. por kilogramo de EFR. Sin embargo, también se muestra que en los tratamientos mecánicos TMM, TMC y TCM se obtienen valores similares, aun teniendo los dos últimos, TMC y TCM, un mayor número total de

partículas por gramo de sustrato. Este hecho puede deberse a que, a partir de cierto tamaño de partícula, la liberación de azúcares totales solubles en agua podría ser insignificante.

Los azúcares totales solubles en agua que han sido liberados tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos podrían utilizarse, por ejemplo, como fuente fermentable para la producción de vino o vinagre (Hornedo-Ortega et al., 2017), para la producción de bioetanol (Goh et al., 2010) o plásticos biodegradables (Cruz et al., 2016), o como sustrato biodegradable en el proceso de la digestión anaerobia (Trujillo-Reyes et al., 2019).

En la **Figura 24** se muestran los datos obtenidos en la determinación de ácidos urónicos solubles en agua, expresados como gramos de ácido galacturónico equivalente por kilogramo de extrusionado de frambuesa residual, según el número total de partículas por gramo de sustrato obtenidas tras la cuantificación.

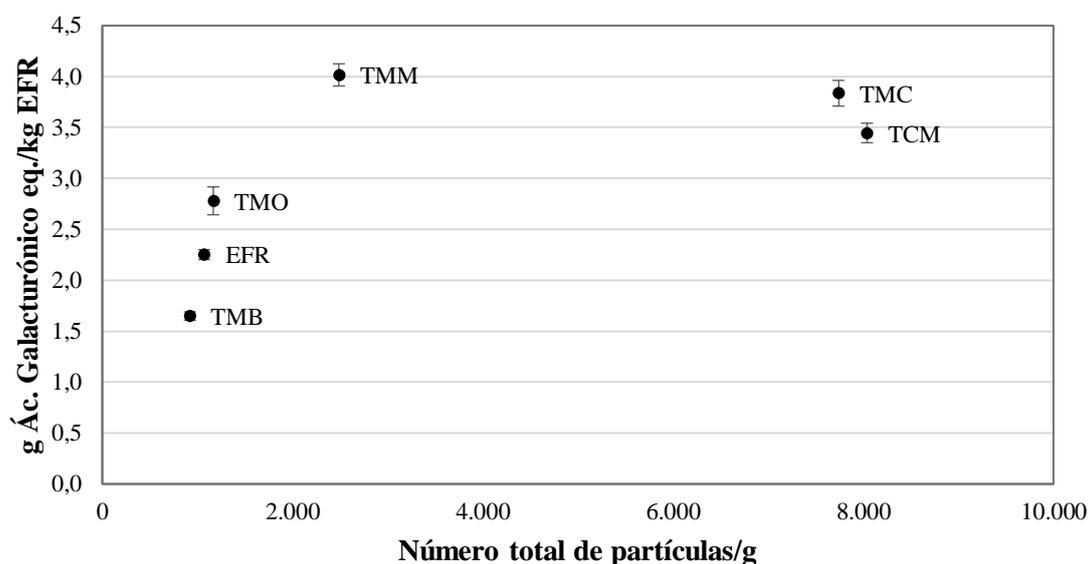


Figura 24. Ácidos urónicos solubles en agua tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

En la **Figura 24**, al igual que ocurre en los casos de la DQOs y los azúcares totales, se observa que, tras la rotura de la estructura de los aquenios con la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, además de dar lugar a la reducción del tamaño de las partículas, también se consigue una liberación de ácidos urónicos solubles en agua. Del mismo modo, puede observarse una tendencia creciente: cuanto mayor es el número total de partículas por gramo de sustrato, es decir, cuanto menor es el tamaño de las partículas,

se obtiene mayor cantidad de gramos de ácido galacturónico eq. por kilogramo de EFR. Sin embargo, a diferencia de lo observado para los azúcares totales, en el caso de los ácidos urónicos (**Figura 24**) se observa que con el TMM se obtienen los valores más altos, es decir, este tratamiento es el más efectivo para su liberación, incluso perteneciendo éste al “efecto de nivel medio” descrito anteriormente. Estos resultados podrían deberse a que con el TMM se ha obtenido el mayor número de partículas por gramo de sustrato en el rango de tamaño comprendido entre 0 y 0,25 mm.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la presencia de ácidos urónicos es una señal indicativa de la existencia de carbohidratos ácidos o pectinas (Côté and Hahn, 1994), puesto que el ácido galacturónico es el componente principal de las pectinas. Por ello, la extracción de estos compuestos podría ser interesante ya que las pectinas son compuestos que tienen uso en la industria alimentaria como agentes gelificantes y espesantes (Silva et al., 2008).

4.2.3. POLIFENOLES TOTALES

Los valores obtenidos en la determinación analítica de polifenoles totales extraídos mediante el **método 1** se muestran en la **Figura 25**, expresados como miligramos de ácido gálico equivalente por kilogramo de extrusionado de frambuesa residual, según el número total de partículas por gramo de sustrato obtenidas tras la cuantificación.

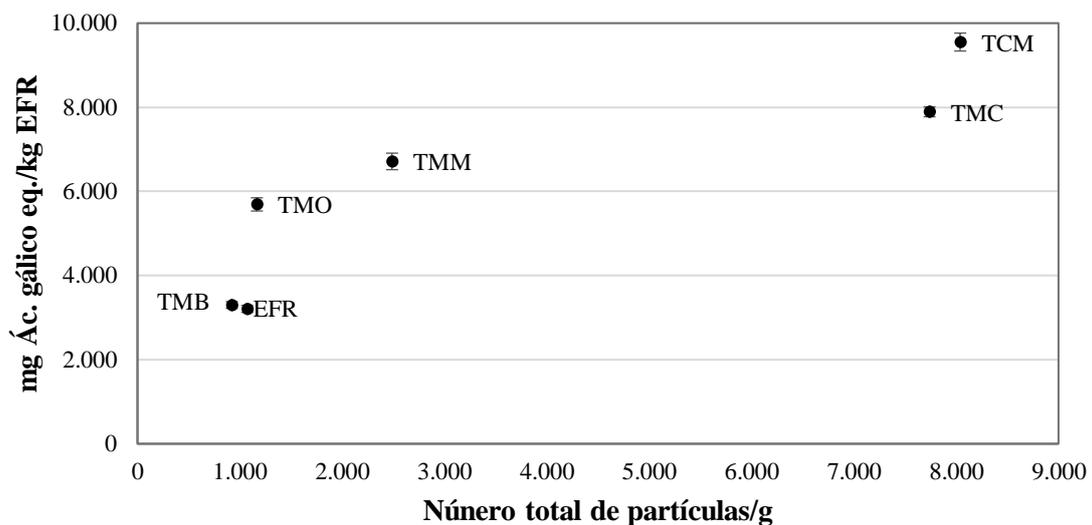


Figura 25. Polifenoles totales tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

En la **Figura 25**, al igual que ocurre en los casos de la DQOs, azúcares totales y ácidos urónicos, se observa que, tras la rotura de la estructura de los aquenios con la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, además de dar lugar a la reducción del tamaño de las partículas también aumenta el contenido fenólico extraíble con disolventes en el extrusionado de frambuesa residual; principalmente, porque aumenta la superficie específica de los materiales de las partículas y, por lo tanto, la accesibilidad de los compuestos fenólicos a los disolventes de extracción. Este hecho también fue recogido por Wang et al. (2014) para los granos de cereales. Del mismo modo, puede observarse una tendencia creciente: cuanto mayor es el número total de partículas por gramo de sustrato, es decir, cuanto menor es el tamaño de las partículas, se obtiene mayor contenido fenólico extraíble con disolventes. Con la combinación de los tratamientos mecánicos con molino de cuchillas y con mortero (TCM), con el que se han cuantificado mayor número de partículas, se obtiene un mayor contenido fenólico extraíble con disolvente, un 66 % con respecto al EFR.

Como ya se ha indicado, los compuestos de alto valor añadido que se proponen como objeto de estudio para posteriormente ser extraídos, son los compuestos polifenólicos. La extracción de estos compuestos podría suponer una elevada rentabilidad, debido al alto valor económico que poseen los mismos ya que pueden aprovecharse de diversas formas en la industria. Actualmente, estos compuestos son muy utilizados por su capacidad antioxidante y por sus beneficios para la salud (Banerjee et al., 2017), también se emplean como aditivos alimentarios para evitar el deterioro oxidativo de grasas y aceites (Balasundram et al., 2006).

Otro aspecto interesante a tener en cuenta sobre los compuestos polifenólicos es su efecto en el proceso de digestión anaerobia, ya que una alta concentración de estos puede ser inhibitoria para los microorganismos responsables del proceso (Borja et al., 1997, 1996; Chen et al., 2008).

4.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO MECÁNICO EN LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE ALTO VALOR AÑADIDO

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en el análisis realizado para identificar y cuantificar los compuestos polifenólicos individuales, mediante HPLC, del extrusionado de frambuesa residual sin tratar (EFR) y de las fases obtenidas tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos propuestos, previamente extraídos con disolvente, utilizando diferentes métodos de extracción.

En la **Tabla 6** se muestran las concentraciones (mg/kg muestra fresca) de los compuestos polifenólicos individuales que han sido identificados, extraídos mediante el **método 1**. Estos compuestos han sido: Cianidina 3-soforósido (**Cyan-1**), cianidina 3-(2-glucosilrutinosido) (**Cyan-2**), cianidina 3-soforósido-5-ramnósido (**Cyan-3**), cianidina 3-glucósido (**Cyan-4**), derivado de ácido elágico (**Derv. Ác. Elágico**) y ácido elágico libre (**Ác. Elágico libre**).

Tabla 6. Composición fenólica (mg/kg muestra fresca) tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

	Cyan-1	Cyan-2	Cyan-3	Cyan-4	Derv. Ác. Elágico	Ác. Elágico libre
EFR	22,69 ± 1,70	2,54 ± 0,50	6,26 ± 0,45	1,30 ± 0,06	10,64 ± 1,04	9,66 ± 0,53
TMB	19,95 ± 0,26	2,03 ± 0,20	5,14 ± 0,21	0,81 ± 0,12	9,73 ± 0,34	8,91 ± 0,06
TMM	16,95 ± 1,25	2,27 ± 0,11	4,35 ± 0,31	0,60 ± 0,03	10,25 ± 2,29	9,74 ± 0,90
TMC	15,75 ± 0,45	3,34 ± 0,54	4,60 ± 0,72	0,73 ± 0,23	13,01 ± 1,27	14,19 ± 0,87
TMO	19,23 ± 0,25	3,89 ± 0,17	5,42 ± 0,30	0,96 ± 0,10	11,27 ± 0,82	9,90 ± 0,77
TCM	13,96 ± 0,20	2,79 ± 0,17	3,50 ± 0,08	0,50 ± 0,03	12,41 ± 0,75	14,10 ± 0,91

En la **Tabla 6** se observa, tanto para el EFR como para las fases obtenidas tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, que las antocianinas mayoritarias y minoritarias identificadas y cuantificadas son Cianidina 3-soforósido y cianidina 3-glucósido, respectivamente. Además, con respecto al EFR, se observa que, tras la rotura de la estructura de los aquenios con la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, disminuye la concentración de las cuatro antocianinas identificadas en todos los casos, excepto en el caso de la cianidina 3-(2-glucosilrutinosido) para el tratamiento TMO. Estos resultados podrían deberse a la degradación térmica de estos compuestos polifenólicos, los cuales son termosensibles y, por ello, susceptibles a este tipo de degradación (Oszmiański et al., 2015). Durante el tratamiento mecánico aplicado se suministra una energía y una fuerza que provocan un aumento de temperatura, lo que podría causarles la degradación térmica. En cuanto a los datos obtenidos para el derivado de ácido elágico y ácido elágico libre, con respecto al EFR, se puede ver cómo, tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, se cuantifica mayor cantidad de estos compuestos en los casos en los que se aplica el tratamiento mecánico con molino de cuchillas (TMC y TCM), es decir, cuando hay corte.

El contenido total de antocianina es uno de los principales criterios utilizados para diferenciar entre las especies de frambuesa roja y negra. Es por esta razón que, para comparar los resultados que se han obtenido en este estudio con resultados de la fruta de frambuesa, se calcula el contenido total de antocianina. En las **Figuras 26 y 27**, se muestra el contenido total de antocianina y el contenido de ácido elágico libre, respectivamente, según el número total de partículas por gramo de sustrato obtenidas tras la cuantificación.

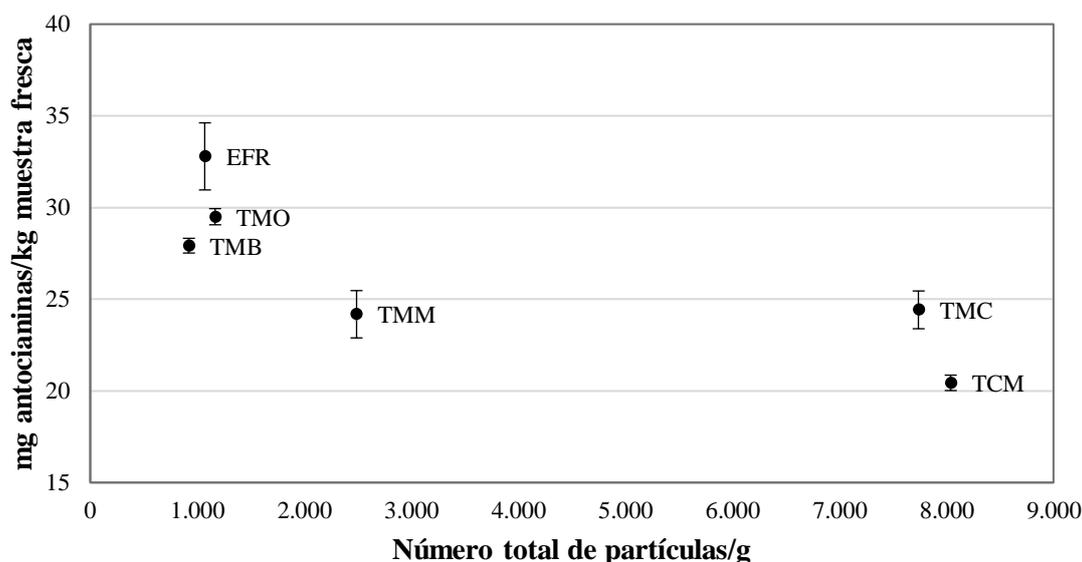


Figura 26. Antocianinas totales cuantificadas tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

Como ya se ha mencionado, en la **Figura 26**, se puede observar que la disminución del tamaño de las partículas en este caso no favorece la extracción de antocianinas, ya que con el EFR se cuantifica mayor contenido total de antocianina. Por otro lado, también se observa que el extrusionado de frambuesa residual sin tratar, empleado en este trabajo, presenta un contenido total de antocianina de 32,79 mg por cada kilogramo de muestra fresca (3,28 mg por cada 100 g de muestra fresca), siendo este valor mucho más bajo que los encontrados en el fruto de frambuesa. Según queda recogido en Bobinaite et al. (2015), en general, el contenido total de antocianina en las frambuesas rojas suele estar entre 20 y 100 mg por cada 100 g de fruta fresca. Estos resultados tan bajos pueden venir dados por la aplicación de temperatura durante la inactivación enzimática que tiene lugar en el proceso industrial donde se genera este residuo.

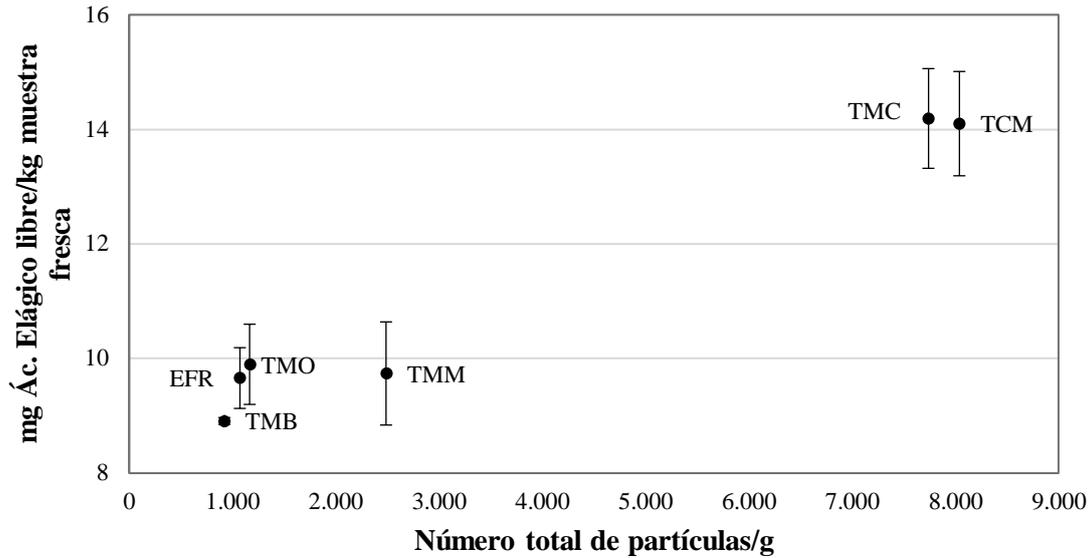


Figura 27. Ácido elágico libre cuantificado tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

En la **Figura 27**, como ya se ha indicado, se muestra que la disminución del tamaño de las partículas ha favorecido la extracción del ácido elágico libre, ya que con los tratamientos mecánicos TCM y TMC (mayor número de partículas) se cuantifica más cantidad de este ácido, 32 % con respecto a EFR. La **Figura 27**, muestra así mismo, que para el EFR el contenido de ácido elágico libre es de 9,66 mg por cada kilogramo de muestra fresca, mientras que para los TMC y TCM el contenido de ácido elágico libre es de 14,19 mg por cada kilogramo de muestra fresca. Estos valores son superiores a los que suele contener el fruto de frambuesa. Según se recoge en trabajos anteriores, el fruto de frambuesa contiene valores de ácido elágico libre comprendidos entre 1,0 y 10 mg por cada kilogramo de fruta fresca (3,8 a 8,8 mg/kg (Anttonen and Karjalainen, 2005; Salinas-Moreno et al., 2014), 10,13 mg/kg (Zafrilla et al., 2001) y 1,1 mg/kg (Rao and Snyder, 2010)). Además, en una investigación reciente realizada por Mildner-Szkudlarz et al. (2019), se ha obtenido que tras el tostado de semillas de frambuesa se ha producido un aumento en las concentraciones de ácido elágico libre, de 5,38 mg/kg a 10,07 mg/kg. El ácido elágico es un compuesto polifenólico fuertemente ligado a las paredes celulares, y su aumento significativo podría explicarse como un efecto del tratamiento mecánico que permitió una mayor degradación de la estructura celular y aumentó su biodisponibilidad. Esto también podría estar relacionado con la liberación de ácido hexahidroxidifénico de los elagitaninos, que son transformados en ácido elágico (Häkkinen et al., 2000).

Según quedó recogido en Zafrilla et al. (2001), el contenido total de ácido elágico libre se favorece cuando los frutos son procesados para obtener mermeladas, aunque el contenido de antocianinas se reduce considerablemente. Al igual que ocurre para la mermelada, tras los resultados obtenidos, se observa que cuando los frutos son procesados también se favorece y desfavorece el contenido de ácido elágico y antocianinas, respectivamente, en los aquenios. Aunque como ya se ha mencionado, en resultados de investigaciones anteriores se demostró que los componentes principales de la fracción polifenólica de los aquenios de fresa y frambuesa son elagitaninos (ácido elágico) y proantocianidinas, y que los contenidos de antocianinas y flavonoles son insignificantes en comparación con los valores analizados en frutos de estas especies (Kosmala et al., 2015).

Debido al particular interés que ha generado en los últimos años la determinación del contenido en ácido elágico, principalmente por su efecto positivo en la salud humana y por sus propiedades fisiológicas, y debido a los resultados obtenidos tras la aplicación del tratamiento mecánico con molino de cuchillas, se decidió aplicar un nuevo método de extracción de compuestos polifenólicos que favoreciera su extracción y degradase el contenido en antocianinas. El ácido elágico es una molécula altamente termoestable (Punto de fusión: 450 °C y punto de ebullición: 796,5 °C (Muthukumaran et al., 2017)) debido a los cuatro anillos de la molécula, los cuales representan la zona hidrofílica. Estas propiedades del ácido elágico dan como resultado una alta insolubilidad en agua, sin embargo es soluble en disolventes como metanol, etanol o dimetilsulfóxido (Aguilera-Carbo et al., 2008). Según queda recogido por Aguilera-Carbo et al. (2008) y por Bobinaite et al. (2015), para la extracción de ácido elágico es importante utilizar temperaturas mayores a 60 °C. Por todas estas razones, se aplican las condiciones elegidas en el **método 2**, utilizado para la extracción de la fracción polifenólica.

A continuación, en las **Figuras 28 y 29**, se muestra los valores del contenido total de antocianina y ácido elágico libre, respectivamente, obtenidos tras la aplicación de los **métodos 1 y 2** de extracción de la fracción de compuestos polifenólicos para el EFR y las fases obtenidas tras la aplicación de los tratamientos mecánicos propuestos.

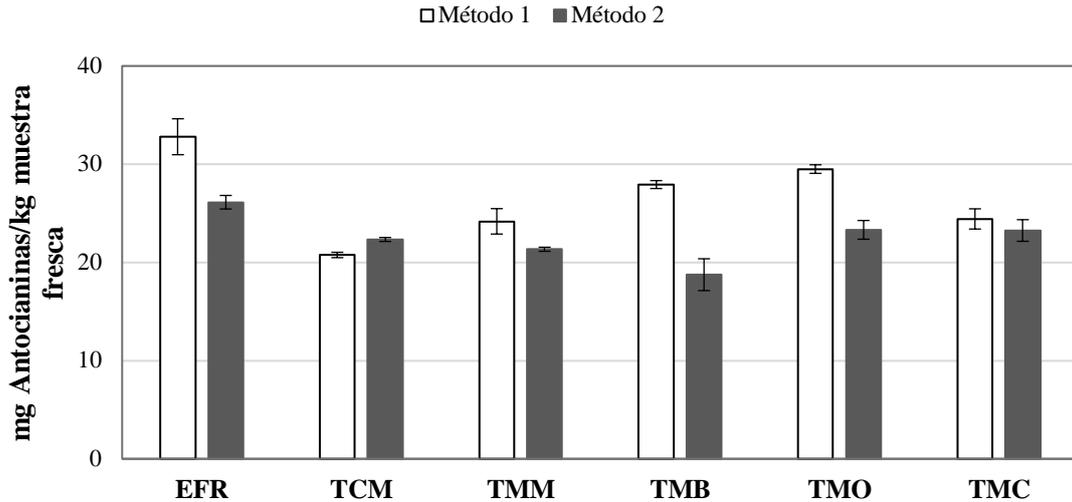


Figura 28. Contenido total de antocianina cuantificado en las extracciones con los métodos 1 y 2 (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

En la **Figura 28** puede observarse que, en casi todos los casos estudiados, el contenido total cuantificado de antocianina disminuye en la extracción con el método 2, con respecto al método 1 (aprox. 20 %). En los casos en los que no se aplica el tratamiento mecánico con molino de cuchillas, la degradación es mayor. Como ya se ha señalado, la degradación de este tipo de compuestos polifenólicos se debe a su elevada termosensibilidad.

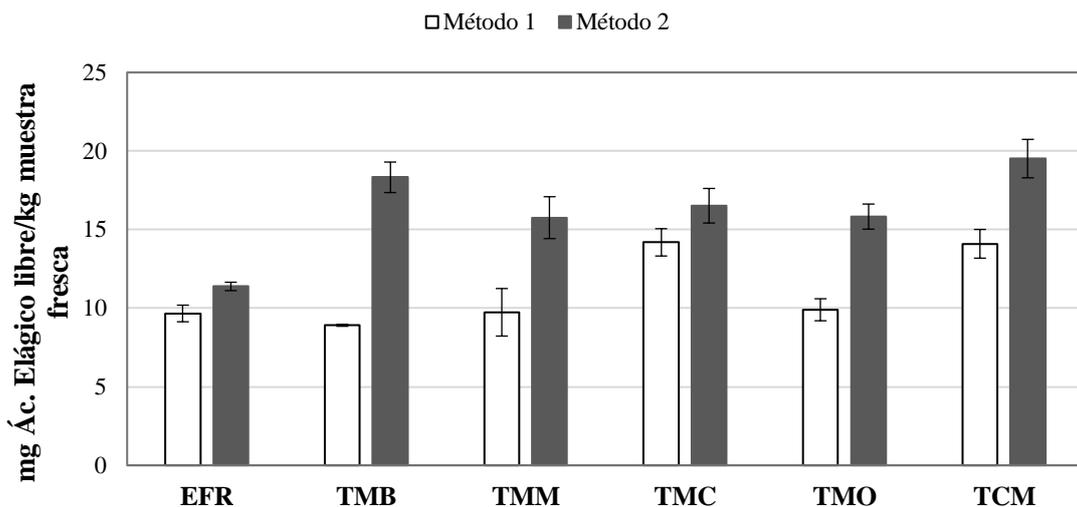


Figura 29. Contenido de ácido elágico libre cuantificado en las extracciones con los métodos 1 y 2 (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas; TMO: Tratamiento con mortero; TCM: Tratamiento con molino de cuchillas + mortero).

En la **Figura 29**, al contrario de lo que se muestra en la **Figura 28**, se observa que el contenido cuantificado de ácido eláxico libre ha aumentado en la extracción con el método 2, con respecto al método 1, debido a la mayor extracción de este compuesto a temperaturas altas, tales como las empleadas en el método 2 (70 °C).

4.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO MECÁNICO EN EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA

En este apartado se estudian la estabilidad, la producción de metano (mL CH₄/g SV) y la cinética del proceso de digestión anaerobia del sustrato sin tratar (EFR) y de las fases obtenidas tras la aplicación de los tratamientos mecánicos con molino de bolas (TMB), molino de martillo (TMM) y molino de cuchillas (TMC), un tratamiento perteneciente a cada uno de los tres efectos descritos en el apartado de distribución de partículas.

Para evaluar la valorización energética de los diferentes sustratos en condiciones anaerobias, se llevó a cabo el ensayo de BMP. La estabilidad del proceso fue evaluada a través del pH y la alcalinidad, datos mostrados en la **Tabla 7**. Los valores de pH se mantuvieron en el rango recomendado para una actividad metanogénica adecuada, que varía en un rango de 7,3 a 7,8 (Wheatley, 1990). La alcalinidad que se observa en la **Tabla 7** ha sido suficiente para amortiguar posibles variaciones de pH, como se puede observar en los valores finales de pH en el proceso de biometanización.

Tabla 7. pH, alcalinidad, producción experimental y teórica de CH₄ y biodegradabilidad obtenidas al finalizar el ensayo de BMP (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas).

	EFR	TMB	TMM	TMC
pH	7,4 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1
Alcalinidad (mg CaCO₃/L)	5.378 ± 35	5.430 ± 68	5.309 ± 49	5.595 ± 117
Producción Exp. (mL CH₄/g SV)	18 ± 5	35 ± 4	128 ± 1	236 ± 11
Producción Teo. (mL CH₄/g SV; basado en DQO)	644	609	614	675
Biodegradabilidad (%; basado en DQO)	3	6	21	35

También, en la **Tabla 7** se muestran los datos de biodegradabilidad (basado en DQO) obtenidos tras la finalización del ensayo de BMP. Se observa que los datos de biodegradabilidad obtenidos con el sustrato de partida sin tratar (EFR) son muy bajos, apenas el 3 %, es decir, se trata de un sustrato muy poco biodegradable. Sin embargo, la biodegradabilidad del sustrato aumenta del mismo modo que aumenta el número total de partículas por gramo de sustrato cuantificadas, o lo que es lo mismo, aumenta a medida que disminuye el tamaño de las partículas. Esto se debe a que las partículas más pequeñas aumentan la superficie disponible para los microorganismos, lo que resulta una mayor disponibilidad de alimentos para las bacterias, por lo tanto, la biodegradabilidad anaerobia aumenta (Bruni et al., 2010; Izumi et al., 2010). Estos resultados también fueron obtenidos por Palmowski y Müller (2003) con materiales con alto contenido en fibra, heno y semillas de girasol, como es el caso del sustrato de estudio.

No obstante, a pesar de que la biodegradabilidad del sustrato aumenta tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, estos valores no son lo suficientemente elevados, ya que el máximo de biodegradabilidad obtenido ha sido de un 35 % con el tratamiento mecánico con molino de cuchillas (TMC).

En la **Figura 30** se muestra el gráfico correspondiente a la producción de metano (mL CH₄/g SV) frente al tiempo de duración del ensayo (días).

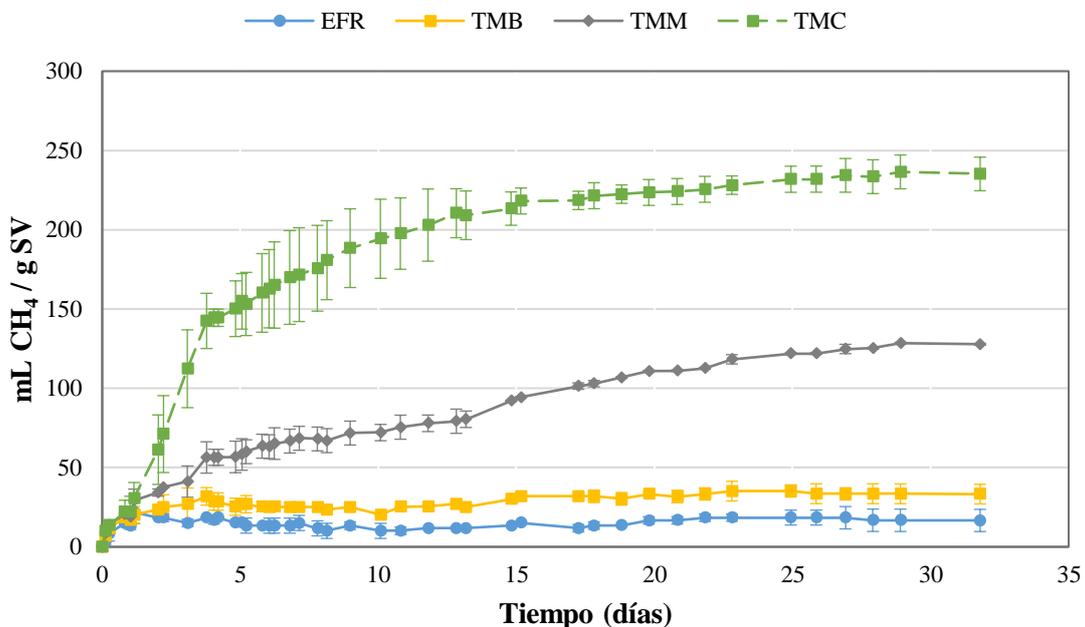


Figura 30. Producción de metano (mL CH₄/g SV) con sus desviaciones estándar (EFR: Extrusionado de frambuesa residual sin tratar; TMB: Tratamiento con molino de bolas; TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas).

Se puede observar, en las primeras horas del ensayo, una producción alta en el caso de todos los sustratos, que puede deberse a la presencia de compuestos que sean fácilmente degradables por los microorganismos. Sin embargo, con el EFR y el TMB, la producción de CH₄ se mantuvo constante durante todo el ensayo, no superando los 50 mL CH₄/g SV. Este hecho se debe a que en estos casos el tamaño de partícula es más grande, el tratamiento mecánico con molino de bolas (TMB), como se ha indicado en ocasiones anteriores, no ha tenido efecto significativo en la rotura del aquenio, de modo que la reducción del tamaño de las partículas ha sido muy baja. Como consecuencia a la baja reducción del tamaño de las partículas, la superficie disponible para los microorganismos no ha aumentado, lo que provoca una menor disponibilidad de los alimentos para las bacterias. Por otro lado, con el TMM y el TMC, se observa un crecimiento exponencial continuo, siendo en este último más pronunciado. En los primeros cinco días se observa un elevado crecimiento en la producción con el TMC, alcanzando aproximadamente los 150 mL CH₄/g SV, siendo con el TMM este crecimiento menos pronunciado, ya que solo se superan los 50 mL CH₄/g SV. Seguidamente puede verse, con el TMM, desde el día 5 hasta el 14 aproximadamente, una fase *lag* (período de latencia o adaptación) debido a que los microorganismos se estarían adaptando al medio tras haber degradado los compuestos más fácilmente degradables para ellos.

Tras los resultados obtenidos con la aplicación de los tratamientos mecánicos, se observa que con el TMB la trituración no ha sido efectiva a pesar de que la producción ha sido un 94 % mayor que la obtenida con el EFR. Sin embargo, con los otros dos tratamientos mecánicos, con los molinos de martillo y de cuchillas, se observa una mayor efectividad en la rotura de la estructura del aquenio, es decir, tamaños de partículas más pequeños, que como consecuencia genera una mayor solubilización de la materia orgánica, como se observó en la **Figura 22**, lo que viene acompañado de una mayor producción de metano. La producción de metano con el TMM y el TMC ha sido un 611 % y un 1.211 %, respectivamente, mayor que la producción obtenida con el EFR.

Sharma et al. (1988) informaron de los efectos del tamaño de las partículas en un estudio realizado con residuos agrícolas y forestales, obteniendo la cantidad máxima de biogás con el menor tamaño de partícula estudiado. En otro estudio realizado por Izumi et al. (2010) con residuos alimentarios, la reducción de tamaño mediante aplicación de tratamientos mecánicos dio como resultado una producción de biogás un 28 % más alta.

De modo que, como se ha sugerido en varios estudios (Esposito et al., 2011; Jain et al., 2015), y se ha corroborado en este, podría considerarse que el tamaño de partícula

es inversamente proporcional a la tasa de utilización máxima del sustrato por los microorganismos.

La **Tabla 8** resume los parámetros obtenidos de la aplicación del modelo Función de Transferencia (TF) a los datos experimentales mostrados en la **Figura 30** (en los casos de los tratamientos mecánicos con molino de martillo (TMM) y molino de cuchillas (TMC)), así como también muestra los valores de R^2 , Error (%) y el error estándar de estimación (σ_{est}) para evaluar el ajuste y la precisión de los resultados. Los valores altos de R^2 obtenidos, que fueron superiores a 0,97 en ambos casos, así como los valores bajos de error y error estándar de estimación (σ_{est}) indicaron que los datos experimentales se ajustan correctamente al modelo propuesto. Debido a la baja producción de metano y a la consecuente variación de los datos de la curva experimental, en los casos del EFR y el TMB, no ha sido posible realizar un ajuste matemático para su estudio cinético debido a la inexistencia de un modelo que se ajuste adecuadamente a la curva.

Tabla 8. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos con el modelo Función de Transferencia de los diferentes sustratos estudiados (TMM: Tratamiento con molino de martillo; TMC: Tratamiento con molino de cuchillas).

	B_m (mL CH ₄ /g SV)	R_m (mL CH ₄ /g SV d)	λ (d)	R^2	Error (%)	σ_{est}
TMM	125 ± 4	13,5 ± 0,9	0,25 ± 0,01	0,974	2,1	8,18
TMC	229 ± 2	47,7 ± 1,5	0,11 ± 0,07	0,994	2,4	8,05

Según la velocidad máxima de producción de metano designada por R_m , la velocidad de producción de metano con el TMC es un 253 % más rápida que la velocidad de producción de metano con el TMM. De igual forma, según la producción máxima de metano designada por B_m , la producción máxima de metano con el TMC es un 83 % mayor que la producción máxima de metano con el TMM. La **Tabla 8** también recoge los datos del tiempo de retardo (λ) que tiene cada uno de los sustratos, los cuales pueden visualizarse también en la **Figura 30**.

Finalmente, se observa que la velocidad de degradación aumenta con la solubilización o la reducción de las partículas de materia orgánica que se habrían hidrolizado lentamente, mientras que el grado de degradación aumenta con la liberación o exposición de material orgánico que originalmente era inaccesible para los microorganismos, o con la transformación de material que originalmente no era biodegradable (Carlsson et al., 2012).

5. CONCLUSIONES

Después del estudio de valorización propuesto, extracción de compuestos de alto valor añadido y digestión anaerobia, ambas aplicadas tras la realización de un tratamiento mecánico, que se ha realizado al residuo de frambuesa generado en la industria agroalimentaria, se ha demostrado que:

La aplicación del tratamiento mecánico produjo la rotura de la estructura de los aquenios, y con ello, el aumento del número de partículas por gramo de sustrato. Después de esto, se distinguieron tres efectos diferentes en cuanto al aumento del número de partículas: bajo (TMB, 0 % y TMO, 8 %), medio (TMM, 57 %) y alto (TMC, 86 % y TCM, 87 %).

Tras el análisis de los compuestos polifenólicos individuales se ha visto que son el ácido elágico y las antocianinas los compuestos más interesantes para su estudio. Al finalizar la extracción de estos compuestos, después de aplicar los diferentes tratamientos mecánicos, se ha obtenido una mejora en la extracción de ácido elágico libre para los tratamientos del efecto alto (aprox. 14,15 mg Ác. elágico libre/kg muestra fresca) con respecto a los tratamientos de los efectos medio y bajo (aprox. 9.70 mg Ác. elágico libre/kg muestra fresca), mientras que el contenido total de antocianinas disminuyó. Además, la aplicación de temperatura en el método de extracción de compuestos polifenólicos mejoró la extracción de ácido elágico libre, y degradó las antocianinas.

El proceso de digestión anaerobia aplicado al extrusionado de frambuesa residual sin tratar (EFR) y a la biomasa generada tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, condujo a una producción de metano entre 18 y 236 mL CH₄/g SV. La producción de metano mostró una mejora del 1.211 % con el TMC, respecto al EFR. No obstante, a pesar de estos resultados, el aumento de la biodegradabilidad del sustrato no ha resultado muy elevado tras la aplicación de los diferentes tratamientos mecánicos, siendo la más alta para el TMC con un 35 %.

Este proyecto no recoge la comparación entre las dos posibilidades propuestas, extracción de compuestos de alto valor añadido y digestión anaerobia, pero sí demuestra que ambas podrían ser de utilidad en un futuro, aunque pueda pensarse que, debido a la baja biodegradabilidad del sustrato, la extracción de compuestos de alto valor añadido sería el camino a seguir para la valorización de este residuo. No obstante, el residuo que genera la extracción podría estudiarse con el objeto de intentar mejorar la biodegradabilidad anaerobia del sustrato.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L.A., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., 2008. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78, 189–199. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1276-2>
- Alburquerque, J.A., de la Fuente, C., Bernal, M.P., 2012. Chemical properties of anaerobic digestates affecting C and N dynamics in amended soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 160, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.03.007>
- 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 Science and Technology* 59, 927–934. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>
- Angelidaki, I., Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 3, 117–129. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>
- Anttonen, M.J., Karjalainen, R.O., 2005. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis* 18, 759–769. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.11.003>
- APHA, 2012. *Standar Methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A.F., Arora, A., 2017. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry* 225, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1974. An automated quantitative assay for uronic

- acids. *Biochemical medicine* 11, 60–66. [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(74\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0006-2944(74)90095-7)
- Bobinaite, R., Viškelis, P., Venskutonis, P.R., 2015. Chemical Composition of Raspberry (*Rubus* spp.) Cultivars, Nutritional Composition of Fruit Cultivars. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00029-5>
- Bong, C.P.C., Lim, L.Y., Lee, C.T., Klemeš, J.J., Ho, C.S., Ho, W.S., 2018. The characterisation and treatment of food waste for improvement of biogas production during anaerobic digestion – A review. *Journal of Cleaner Production* 172, 1545–1558. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.199>
- 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 Biochemistry* 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. *Environmental Technology (United Kingdom)* 17, 167–174. <https://doi.org/10.1080/09593331708616373>
- Bozym, M., Florczak, I., Zdanowska, P., Wojdalski, J., Klimkiewicz, M., 2015. An analysis of metal concentrations in food wastes for biogas production. *Renewable Energy* 77, 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.11.010>
- Bruni, E., Jensen, A.P., Angelidaki, I., 2010. Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. *Bioresource Technology* 101, 8713–8717. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.108>
- Cárdenas Cleves, L.M., Parra Orobio, B.A., Torres Lozada, P., Vásquez Franco, C.H., 2016. Perspectivas del ensayo de Potencial Bioquímico de Metano - PBM para el control del proceso de digestión anaerobia de residuos. *Revista Investigación, Optimización y Nuevos procesos en Ingeniería* 29, 95–108. <https://doi.org/10.18273/revion.v29n1-2016008>
- Carlsson, M., Lagerkvist, A., Morgan-Sagastume, F., 2012. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. *Waste Management* 32, 1634–

1650. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.04.016>
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 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 S(o)/X(o) ratios. *Water Sci Technol* 23:, 917–926. <https://doi.org/https://doi.org/10.2166/wst.1991.0543>
- Côté, F., Hahn, M.G., 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* 26, 1379–1411. <https://doi.org/10.1007/BF00016481>
- Cruz, M. V., Freitas, F., Paiva, A., Mano, F., Dionísio, M., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., 2016. Valorization of fatty acids-containing wastes and byproducts into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates. *New Biotechnology* 33, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.05.005>
- Dische, Z., 1962. Color reactions of carbohydrates. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1, 477–512.
- Donoso-Bravo, A., Pérez-Elvira, S.I., Fdz-Polanco, F., 2010. Application of simplified models for anaerobic biodegradability tests. Evaluation of pre-treatment processes. *Chemical Engineering Journal* 160, 607–614. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.03.082>
- Esposito, G., Frunzo, L., Panico, A., Pirozzi, F., 2011. Modelling the effect of the OLR and OFMSW particle size on the performances of an anaerobic co-digestion reactor. *Process Biochemistry* 46, 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.010>
- FAOSTAT, 2019. Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed 3.25.19).
- Fermoso, F.G., Serrano, A., Alonso-Fariñas, B., Fernández-Bolaños, J., Borja, R., Rodríguez-Gutiérrez, G., 2018. Valuable Compound Extraction, Anaerobic Digestion, and Composting: A Leading Biorefinery Approach for Agricultural

- Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 8451–8468. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02667>
- Freshuelva, 2019. Freshuelva | Asociación Onubense de Productores y Exportadores de Fresas. <http://freshuelva.es/> (accessed 3.27.19).
- Gagneten, M., Corfield, R., Mattson, M.G., Sozzi, A., Leiva, G., Salvatori, D., Schebor, C., 2019. Spray-dried powders from berries extracts obtained upon several processing steps to improve the bioactive components content. *Powder Technology* 342, 1008–1015. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.09.048>
- García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J.J., Fernández-Bolaños, J., 2016. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chemistry* 197, 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.131>
- Gil, M.I., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 1997. Changes in Strawberry Anthocyanins and Other Polyphenols in Response to Carbon Dioxide Treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1662–1667. <https://doi.org/10.1021/jf960675e>
- Goh, C.S., Tan, K.T., Lee, K.T., Bhatia, S., 2010. Bio-ethanol from lignocellulose: Status, perspectives and challenges in Malaysia. *Bioresource Technology* 101, 4834–4841. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.080>
- Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.O., Mykkänen, H.M., Heinonen, I.M., Törrönen, A.R., 2000. Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *European Food Research and Technology* 212, 75–80. <https://doi.org/10.1007/s002170000184>
- Hornedo-Ortega, R., Álvarez-Fernández, M.A., Cerezo, A.B., Garcia-Garcia, I., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C., 2017. Influence of Fermentation Process on the Anthocyanin Composition of Wine and Vinegar Elaborated from Strawberry. *Journal of Food Science* 82, 364–372. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13624>
- HUDISA, 2019. Hudisa. <http://www.hudisa.es/> (accessed 3.25.19).
- Izumi, K., Okishio, Y. ki, Nagao, N., Niwa, C., Yamamoto, S., Toda, T., 2010. Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. *International Biodeterioration and*

- Biodegradation 64, 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.013>
- Jain, Siddharth, Jain, Shivani, Wolf, I.T., Lee, J., Tong, Y.W., 2015. A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.091>
- Kaparaju, P., Rintala, J., Oikari, A., 2012. Agricultural potential of anaerobically digested industrial orange waste with and without aerobic post-treatment. *Environmental Technology* 33, 85–94. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.551839>
- Kosmala, M., Zduńczyk, Z., Juškiewicz, J., Jurgoński, A., Karlińska, E., Macierzyński, J., Jańczak, R., Rój, E., 2015. Chemical composition of defatted strawberry and raspberry seeds and the effect of these dietary ingredients on polyphenol metabolites, intestinal function, and selected serum parameters in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 2989–2996. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00648>
- MAPA, 2019. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/es/> (accessed 3.25.19).
- Melo, M.J., Moncada, M.C., Pina, F., 2000. On the red colour of raspberry (*Rubus idaeus*). *Tetrahedron Letters* 41, 1987–1991. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00080-0)
- Mildner-Szkudlarz, S., Różańska, M., Siger, A., Kowalczewski, P.Ł., Rudzińska, M., 2019. Changes in chemical composition and oxidative stability of cold-pressed oils obtained from by-product roasted berry seeds. *Lwt* 111, 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.080>
- Mokrash, L., 1954. Determination of glucose by anthrone method. *Journal of Biology Chemistry*, 208, 55–59.
- Muñoz-Bernal, Ó.A., Torres-Aguirre, G.A., Núñez-Gastélum, J.A., de la Rosa, L.A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J.F., Álvarez-Parrilla, E., 2017. Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación De Polifenoles Totales. *Tip* 20, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>

- Muthukumaran, S., Tranchant, C., Shi, J., Ye, X., Xue, S.J., 2017. Ellagic acid in strawberry (*Fragaria* spp.): Biological, technological, stability, and human health aspects. *Food Quality and Safety* 1, 227–252. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx023>
- Oszmiański, J., Nowicka, P., Teleszko, M., Wojdyło, A., Cebulak, T., Oklejewicz, K., 2015. Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity in wild blackberry fruits. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 14540–14553. <https://doi.org/10.3390/ijms160714540>
- Palmowski, L.M., Müller, J.A., 2003. Anaerobic degradation of organic materials - Significance of the substrate surface area. *Water Science and Technology* 47, 231–238. <https://doi.org/https://doi.org/10.2166/wst.2003.0651>
- Parthiba Karthikeyan, O., Trably, E., Mehariya, S., Bernet, N., Wong, J.W.C., Carrere, H., 2018. Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. *Bioresource Technology* 249, 1025–1039. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.105>
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E., 1991. Kinetics of Anaerobic Treatment. *Water Science and Technology* 24, 35–59. <https://doi.org/10.2166/wst.1991.0217>
- Pérez, A.G., García-Rodríguez, R., Sanz, C., Refoyo, A., 2017. A10-48-3 and A7-32-10, two strawberry selections with well-balanced nutritional and organoleptic quality. *Acta Horticulturae* 1156, 363–370. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1156.55>
- 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. *Bioresource Technology* 211, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.031>
- Rao, A.V., Snyder, D.M., 2010. Raspberries and human health: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 3871–3883. <https://doi.org/10.1021/jf903484g>
- 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 Biochemistry* 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-Cegrí, V., Borja, R., 2012. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 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. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86, 1088–1098. <https://doi.org/10.1002/jctb.2622>
- Salinas-Moreno, Y., Almaguer-Vargas, G., Peña-Varela, G., Ríos-Sánchez, R., 2014. Ácido elálgico y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15, 97–101. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2009.15.013>
- Samoraj, M., Tuhy, Ł., Chojnacka, K., 2019. Valorization of Biomass into Micronutrient Fertilizers. *Waste and Biomass Valorization* 10, 925–931. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0108-6>
- Scaramboni, C., Urban, R.C., Lima-Souza, M., Nogueira, R.F.P., Cardoso, A.A., Allen, A.G., Campos, M.L.A.M., 2015. Total sugars in atmospheric aerosols: An alternative tracer for biomass burning. *Atmospheric Environment* 100, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.11.003>
- Schnürer, A., Jarvis, A., 2018. Microbiology of the biogas process. SLU (Swedish University of Agricultural Sciences).
- Serrano, A., 2015. Tratamiento de residuos y subproductos agroindustriales mediante co-digestión anaerobia. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba.

Córdoba, España. 9–10.

Serrano, A., Feroso, F.G., Rodríguez-Gutierrez, G., Fernandez-Bolaños, J., Borja, R., 2017. Biomethanization of olive mill solid waste after phenols recovery through low-temperature thermal pre-treatment. *Waste Management* 61, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.12.033>

Sharma, S.K., Mishra, I.M., Sharma, M.P., Saini, J.S., 1988. Effect of particle size on biogas generation from biomass residues. *Biomass* 17, 251–263. [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(88\)90107-2](https://doi.org/10.1016/0144-4565(88)90107-2)

Silva, N.C., Benites, E.A., Gomero, J.C.M., 2008. Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana. *Ingeniería Industrial*, 175–199. <https://doi.org/ISSN 1025-9929>

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Sójka, M., Macierzyński, J., Zaweracz, W., Buczek, M., 2016. Transfer and Mass Balance of Ellagitannins, Anthocyanins, Flavan-3-ols, and Flavonols during the Processing of Red Raspberries (*Rubus idaeus* L.) to Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 5549–5563. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01590>

Struck, S., Plaza, M., Turner, C., Rohm, H., 2016. Berry pomace—a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(6), 1305-1318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.13112>

Tasaki, M., Umemura, T., Maeda, M., Ishii, Y., Okamura, T., Inoue, T., Kuroiwa, Y., Hirose, M., Nishikawa, A., 2008. Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using F344 rats. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1119–1124. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.043>

Thompson, W.H., Legee, P.B., Millner, P.D., Watson, M.E., 2001. Test methods for the examination of composting and compost. The United States Composting Council Research and Education Foundation. The United States Department of Agriculture.

- 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. *Biochemical Engineering Journal* 147, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.023>
- Tsachidou, B., Scheuren, M., Gennen, J., Debbaut, V., Toussaint, B., Hissler, C., George, I., Delfosse, P., 2019. Biogas residues in substitution for chemical fertilizers: A comparative study on a grassland in the Walloon Region. *Science of the Total Environment* 666, 212–225. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.238>
- Vaneckhaute, C., Lebuf, V., Michels, E., Belia, E., Vanrolleghem, P.A., Tack, F.M.G., Meers, E., 2017. Nutrient Recovery from Digestate: Systematic Technology Review and Product Classification. *Waste and Biomass Valorization* 8, 21–40. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9642-x>
- Wang, T., He, F., Chen, G., 2014. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods* 7, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.033>
- Wheatley, A., 1990. *Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology*. Elsevier Applied Science.
- Williamson, B., Goodman, B.A., Chudek, J.A., 1992. Nuclear magnetic resonance (NMR) micro-imaging of ripening red raspberry fruits. *New Phytologist* 120, 21–28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01054.x>
- Zafrilla, P., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A., 2001. Effect of Processing and Storage on the Antioxidant Ellagic Acid.pdf. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3651–3655. <https://doi.org/10.1021/jf010192x>
- Zeng, X., Ma, Y., Ma, L., 2007. Utilization of straw in biomass energy in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11, 976–987. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2005.10.003>

7. ANEXOS

7.1. ANEXO I: LEGISLACIÓN

Unión Europea. Directiva 75/442/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1975, relativa a los residuos (Ed. Especial en español, capítulo 15, vol. 1, pp. 129 a 131).

España. Ley 42/1975, de 19 de noviembre de 1975, sobre desechos y residuos sólidos urbanos (BOE núm. 280, de 21 de noviembre de 1975, pp. 24360 a 24364).

Unión Europea. Directiva 91/156/CEE del Consejo, de 18 de marzo de 1991, por la que se modifica la Directiva 75/442/CEE relativa a los residuos (DOCE núm. 78, de 26 de marzo de 1991, pp. 32 a 37).

Andalucía. Decreto 283/1995, de 21 de noviembre de 1995, por el que se aprueba el Reglamento de Residuos de la Comunidad Autónoma de Andalucía (BOJA núm. 161, de 19 de diciembre de 1995).

España. Ley 10/1998, de 21 de abril de 1998, de Residuos (BOE núm. 96, de 22 de abril de 1998, pp. 13372 a 13384).

Andalucía. Decreto 218/1999, de 26 de octubre de 1999, por el que se aprueba el Plan Director Territorial de Gestión de Residuos Urbanos de Andalucía (BOJA núm. 134, de 18 de noviembre de 1999).

Unión Europea. Directiva 2006/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2006, relativa a los residuos (DOUE núm. 114, de 27 de abril de 2006, pp. 9 a 21)

Unión Europea. Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas (DOUE núm. 312, de 22 de noviembre de 2008, pp. 3 a 30).

España. Ley 22/2011, de 28 de julio de 2011, de residuos y suelos contaminados (BOE núm. 181, de 29 de julio de 2011, pp. 85650 a 85705).

Andalucía. Orden de 30 de diciembre de 2016, por la que se aprueban las modificaciones del Plan Director Territorial de Residuos No Peligrosos de Andalucía (2010-2019), como consecuencia de la revisión intermedia de 2016 (BOJA núm. 6, de 11 de enero de 2017).

Unión Europea. Directiva (UE) 2018/851 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, por la que se modifica la Directiva 2008/98/CE sobre los residuos (DO L 150, de 14 de junio de 2018, pp. 109 a 140).

