

ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

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



ECONOMIA CIRCULAR EN EFLUENTES DE UNA INDUSTRIA OLEÍCOLA



MANUEL HERNANDEZ ESCAÑO

2023



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza al alumno **D. Manuel Hernández Escaño**, a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Economía circular en efluentes de una industria oleícola”, bajo la dirección de D. Jose Luis García Morales de la Universidad de Cádiz y de D. Juan Cubero Cardoso del Instituto de la Grasa CSIC (Sevilla), debiendo cumplir las normas establecidas para la redacción del mismo que están a su disposición en la página Web específica del Master.

Orihuela, 5 de septiembre de 2023

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

CONCEPCION |
PAREDES | GIL

Firmado digitalmente por
CONCEPCION | PAREDES | GIL
Fecha: 2023.09.05 12:48:30
+02'00'

Fdo.: Concepción Paredes Gil

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

ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

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



ECONOMIA CIRCULAR EN EFLUENTES DE UNA INDUSTRIA OLEÍCOLA

José Luís García Morales

Departamento de Tecnologías
del Medio Ambiente. Facultad
de Ciencias del Mar y
Ambientales. Universidad de
Cádiz (UCA), Puerto Real
(Cádiz), España.

Juan Cubero Cardoso

Departamento de Biotecnología
de los Alimentos. Grupo de
Bioprocesos Aplicados a la
Economía Circular. Instituto de la
Grasa (CSIC). Sevilla, España

ALUMNO

Manuel Hernández Escaño

Estudiante del Máster Gestión,
Tratamiento y Valorización de Residuos
Orgánicos en la Universidad Miguel
Hernández (Orihuela) en colaboración
con Instituto de la Grasa (C.S.I.C).
Sevilla, España

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MASTER

IDENTIFICACIONES

Autor: Manuel Hernández Escaño

Título: Economía circular en efluentes de una industria oleícola

Title: Circular economy in effluents from an olive oil industry

Director/es del TFM: José Luís García Morales / Juan Cubero Cardoso

Año: 2023

Titulación: Máster Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos

Tipo de proyecto: Trabajo Fin de Máster

Palabras claves: aceituna de mesa, salmuera, digestión anaerobia, potencial bioquímico de metano, compuestos fenólicos, azúcares.

Keywords: table olives, brine, anaerobic digestion, biochemical methane potential, phenolic compounds, sugars.

Nº citas bibliográficas: 70

Nº de planos: 0

Nº de tablas: 8

Nº de figuras: 32

Nº de anexos: 0

RESUMEN

Durante la elaboración de aceitunas mesa se genera una gran cantidad de efluentes acuosos que contienen una gran cantidad de compuestos de interés. Estos efluentes normalmente se tratan como un residuo y actualmente se desechan o se eliminan mediante evaporación en balsas, produciendo problemas de contaminación en las zonas cercanas. Una de las opciones interesantes para su posible valorización sería la extracción de compuestos de alto valor añadido como compuestos fenólicos o azúcares para su aprovechamiento. Sin embargo, tras la extracción de estos componentes, sigue habiendo materia orgánica que tiene un gran potencial contaminante y una vía de solucionar este problema podría ser mediante la digestión anaerobia.

El objetivo principal de este estudio es evaluar la extracción de compuestos fenólicos y azúcares a partir de efluentes que provienen de la industria de la aceituna de mesa y su posterior estudio en un ensayo de digestión anaerobia. Los efluentes utilizados fueron agua acidificada y salmuera, a partir de los cuales se extrajeron los compuestos fenólicos presentes con la ayuda de una columna de resina iónica. Posteriormente se realizó un procedimiento de ultrafiltración para poder retirar de los efluentes los azúcares con un tamaño mayor a 3000 Daltons.

Finalmente, con los efluentes obtenidos en los procesos anteriores, se ha realizado el estudio de digestión anaerobia mediante un ensayo de potencial bioquímico de metano. En él se ha observado que, al retirar los compuestos fenólicos del sustrato utilizado, la producción de metano aumenta hasta un 20,2%. Sin embargo,

la eliminación de los azúcares no ha tenido un efecto significativo en la producción de metano. Finalmente, la adición de un 25% de un efluente con una gran cantidad en sales provocó una disminución considerablemente mayor en la producción de metano llegando a obtener un 72,5% de biodegradabilidad. Por lo que se puede observar que la producción de metano está influenciada por el contenido en compuestos fenólicos, azúcares y la concentración en sales que hay en el sustrato utilizado.

Por tanto, el uso de estos efluentes que normalmente se tratan como residuos son una buena alternativa para la extracción de compuestos fenólicos y azúcares, además, el uso de éstos como sustrato en procesos de digestión anaerobia es una buena alternativa para aprovechar estos subproductos y obtener compuestos de alto valor añadido.

ABSTRACT

During the processing of table olives, a large amount of aqueous effluents containing a large number of compounds of interest are generated. These effluents are normally treated as a waste and are currently disposed of by evaporation in ponds, causing pollution in nearby areas. One interesting option for their possible valorization would be the extraction of high value-added compounds such as phenolic compounds or sugars. However, after the extraction of these components, there is still organic matter that has a great potential as a pollutant and a way to solve this problem could be through anaerobic digestion.

The main objective of this study is to evaluate the extraction of phenolic - compounds and sugars from effluents coming from the table olive industry and their subsequent study in an anaerobic digestion process. The effluents used were acidified water and brine, from which the phenolic compounds present were extracted with the aid of an ionic resin column. Subsequently, an ultrafiltration procedure was carried out to remove sugars larger than 3000 Daltons from the effluents.

Finally, with the effluents obtained in the previous processes, the study of anaerobic digestion was carried out by means of a biochemical methane potential test. We report that, when phenolic compounds were removed from the substrate used, methane production increased by up to 20,2%. However, the removal of sugars had no significant effect on methane production in this assay. Finally, the addition of 25% of an effluent with a large amount of salts caused a statistically significant decrease in methane production, reaching 72,5% biodegradability. Thus, methane production is influenced by the content of phenolic compounds, sugars and the concentration of salts in the substrate used.

Therefore, the use of these effluents that are normally treated as waste is a good alternative for the extraction of phenolic compounds and sugars; in addition, the use of these as a substrate in anaerobic digestion processes is an excellent alternative to take advantage of these by-products and obtain compounds with high added value.



EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 2. TFM (Trabajo Fin de Máster)

Elche, a 16/03/2023

Nombre del tutor/a	Jose Luis García Morales
Nombre del alumno/a	Manuel Hernández Escaño
Tipo de actividad	Sin implicaciones ético-legales
Título del 2. TFM (Trabajo Fin de Máster)	"Economía circular en efluentes de una industria oleícola"
Evaluación Riesgos Laborales	No procede
Evaluación Ética	No procede
Registro provisional	230311085234
Código de Investigación Responsable	TFM.MGT.JLGM.MHE.230311
Caducidad	2 años

Se considera que el presente proyecto carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: "**Economía circular en efluentes de una industria oleícola**" ha sido realizada en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere ninguna evaluación adicional. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, **se autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Secretario del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Domingo L. Orozco Beltrán
Presidente del CEII
Vicerrectorado de Investigación



La información descriptiva básica del presente trabajo será incorporada al repositorio público de Trabajos fin de Grado y Trabajos Fin de Máster autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/tfg-tfm/>



ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- EL OLIVO Y SUS FRUTOS	1
1.2.- LA ACEITUNA DE MESA.....	2
1.2.1.- PROCESO DE LA OBTENCIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA.....	4
1.3.- PROBLEMÁTICA CON LAS AGUAS RESIDUALES DE LA ACEITUNA DE MESA	5
1.4.- ECONOMÍA CIRCULAR Y SU LEGISLACIÓN	7
1.5.- DIGESTIÓN ANAEROBIA.....	9
2.- OBJETIVOS	12
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1.- REACTIVOS USADOS.....	13
3.2.- MUESTREO DE LOS EFLUENTES E INÓCULO UTILIZADOS.....	13
3.3.- EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	13
3.4.- EXTRACCIÓN DE AZÚCARES	14
3.5.- POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO.....	14
3.6.- ESTUDIO ESTADÍSTICO Y CINÉTICO DEL ENSAYO.....	15
3.7.- MÉTODOS ANALÍTICOS	17
3.7.1.- CALIDAD DE LAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS	17
3.7.2.- DETERMINACIÓN DEL PH, CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA Y ALCALINIDAD	17
3.7.3.- DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES SOLUBLES.....	18
3.7.4.- DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES INDIVIDUALES MEDIANTE HPLC	19
3.7.5.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIRADICAL	20
3.7.6.- DETERMINACIÓN DEL PODER REDUCTOR	21
3.7.7.- DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES SOLUBLES EN AGUA.....	22
3.7.8.- DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES, VOLÁTILES Y MINERALES	23
3.7.9.- DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO SOLUBLE	23
3.7.10.- DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO TOTAL	24
3.7.11.- DETERMINACIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO TOTAL.....	24
3.7.12.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES	24
3.7.13.- DETERMINACIÓN DE IONES MEDIANTE CROMATOLOGRAFÍA IÓNICA	24
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS EFLUENTES.....	25
4.1.1.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA	25
4.1.2.- ESTUDIO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	27
4.1.3.- ESTUDIO DE EXTRACCIÓN DE AZÚCARES	31
4.2.- ESTUDIO DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO.....	33
4.3.- ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE IONES EN LOS REACTORES.....	35
4.4.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
4.4.1.- ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	36
4.4.2.- ESTUDIO DE LA CINÉTICA DEL PROCESO DE BIOMETANIZACIÓN	37
5.- CONCLUSIONES	39
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

1.1.- El olivo y sus productos.....	1
1.2.- Imagen de diferentes variedades de aceitunas más utilizadas para la obtención de aceitunas de mesa. (A) Aceituna Gordal sevillana, (B) aceituna Hojiblanca, (C) aceituna Manzanilla (AceitesdeolivadeEspaña, 2023)	2
1.3.- Diferentes tipos de aderezo de aceitunas. (A) Aceitunas verdes al estilo español, (B) aceitunas negras al natural en salmuera, (C) aceitunas negras maduras al estilo californiano (Elaboración propia).....	3
1.4.- Esquema de la elaboración de la aceituna de mesa.....	4
1.5.- Balsa de evaporación de aguas residuales (elDíadeCórdoba, 2022)	5
1.6.- Esquemas de los modelos de economía lineal y circular	8
1.7.- Objetivos de Desarrollo Sostenible propuesto por las Naciones Unidas (Unidas, 2023).....	8
1.8.- Esquema del proceso de la digestión anaerobia. 1: Bacterias fermentativas o acidogénicas; 2: Bacterias acetogénicas que producen hidrógeno; 3: Bacterias homoacetogénicas; 4: Bacterias metanogénicas acetoclásticas; 5: Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas (Elaboración propia).....	10
2.1.- Esquema general del proceso (Elaboración propia)	12
3.1.- Imagen del procedimiento utilizado para la extracción de compuestos fenólicos de los diferentes efluentes	13
3.2.- Imagen del montaje realizado para la extracción de azúcares de los diferentes efluentes	14
3.3.- Montaje general del ensayo de potencial bioquímico de metano.....	15
3.4.- Esquema de la reacción de la determinación de polifenoles totales (Muñoz-Bernal et al., 2017).....	18
3.5.- Recta de calibrado y estimación lineal de la determinación de polifenoles totales solubles	18
3.6.- Imagen del HPLC usado en la experimentación	19
3.7.- Esquema de la reacción de la determinación de la actividad radical (Alam et al., 2013)....	20
3.8.- Recta de calibrado y estimación lineal de la determinación de la actividad antiradical.....	20
3.9.- Esquema de la reacción del proceso de determinación del poder reductor (Elaboración propia).....	21
3.10.- Recta de calibrado y estimación lineal de la determinación del poder reductor.....	21
3.11.- Esquema de la reacción del proceso de azúcares totales solubles en agua (Mokrash, 1954).....	22
3.12.- Recta de calibrado y estimación lineal de la determinación de azúcares totales solubles en agua.....	22
3.13.- Recta de calibrado y estimación lineal de la determinación de la demanda química de oxígeno soluble.....	23
4.1.- Concentración en mg O ₂ /L de ácidos grasos volátiles presentes en los sustratos utilizados	26
4.2.- Concentración en mg/L de polifenoles totales presentes en los sustratos utilizados.....	28
4.3.- Cromatogramas de los efluentes iniciales utilizados en la experimentación	29
4.4.- Concentración en mg/L del poder reductor presentes en los sustratos utilizados	30
4.5.- Concentración en mg/L de la actividad antiradical presentes en los sustratos utilizados ...	31
4.6.- Concentración en mg/L de azúcares totales solubles en agua presentes en los sustratos utilizados	32
4.7.- Gráfico de la producción de metano (mL CH ₄ /g SV) del ensayo de potencial bioquímico de metano.....	33
4.8.- Concentración en mg O ₂ /L de ácidos grasos volátiles presentes en los diferentes reactores	35
4.9.- Gráfico de la producción final de metano (mL CH ₄ /g SV) de los diferentes reactores en comparación con la producción media.....	36
4.10.- Gráfico de los modelos cinéticos que se ajustan al comportamiento de los diferentes reactores.....	38

Tablas

1.1.- Rendimiento de la producción de aceitunas en la temporada 2019-2020 según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (M.A.P.A, 2020).....	3
3.1.- Datos de la caracterización general del inóculo utilizado	14
4.1.- Datos de la caracterización fisico-química de los sustratos utilizados	25
4.2.- Datos de la concentración de iones en los sustratos utilizados	27
4.3.- Datos de concentración de compuestos fenólicos individuales presentes en los diferentes efluentes	29
4.4.- Caracterización de los diferentes reactores tras en el proceso de potencial bioquímico de metano.....	34
4.5.- Datos de la cantidad de iones acumulados teóricos y presentes en los diferentes reactores	36
4.6.- Datos de los diferentes parámetros relacionados con la cinética de los reactores de biometanización	37



1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- EL OLIVO Y SUS FRUTOS

El olivo (*Olea Europaea*) es un árbol de hoja perenne perteneciente a la familia de las Oleáceas, que crece generalmente en la rivera del mediterráneo, estimándose una población aproximada de 890 millones de olivos en todo el mundo. Existen multitud de variedades de esta especie dependiendo del clima y de otros factores asociados a la zona. En España se pueden encontrar algunas variedades como la Cornicabra, abundante en el centro de la península, ya que destaca por su gran resistencia a las bajas temperaturas. Las variedades Hojiblanca y Picual, abundantes en la zona de Andalucía, o la Verdial de Badajoz, la cual produce aceitunas de mesa de excelente calidad y se puede encontrar en la zona de Extremadura (Agriculture, 2021).

La aceituna es el fruto proveniente del olivo (**Figura 1.1**), es muy valorado en todo el mundo por su sabor y sus propiedades nutricionales. Generalmente la drupa de olivo contiene una baja concentración de azúcares, un alto contenido en aceite y una fracción de compuestos fenólicos.



Figura 1.1.- El olivo y sus productos (Elaboración propia).

A partir de la aceituna se obtiene el aceite de oliva, componente principal de la dieta mediterránea, el cual tiene muchísimas propiedades beneficiosas para la salud. Otro producto alimenticio obtenido de este fruto son las aceitunas de mesa, consideradas las hortalizas fermentadas que mayor difusión tienen en el área del mediterráneo, y cuya propagación se está extendiendo mundialmente. Estas pequeñas frutas ovaladas, originarias de la región del Mediterráneo, se han utilizado durante siglos en la cocina de muchos países y se pueden encontrar en una amplia variedad de platos (Martín-Peláez et al., 2017; Vaccalluzzo et al., 2020).

En España existen más de 200 tipos diferentes de aceitunas que se destinan tanto a la elaboración de aceites como a la obtención de aceitunas de mesa. Dentro de estas variedades las más utilizadas para la obtención de aceitunas de mesa son las variedades Gordal Sevillana, Hojiblanca y Manzanilla (AceitesdeolivadeEspaña, 2023).

La variedad Gordal Sevillana (**Figura 1.2A**) es una de las aceitunas más famosas del mundo, destaca por su gran tamaño y se cultiva fundamentalmente en Sevilla, se emplea para la obtención de aceituna de mesa debido a que su rendimiento graso es muy bajo para la elaboración de aceite.

La variedad Hojiblanca (**Figura 1.2B**) se cultiva fundamentalmente en las provincias de Málaga, Córdoba, Granada y Sevilla, caracterizándose por su sabor y aroma a hierba recién cortada y plantas aromáticas, se utiliza tanto para la elaboración de aceite, como para la obtención de aceitunas de mesa.

La variedad Manzanilla (**Figura 1.2C**) se cultiva principalmente en Sevilla, Huelva y Badajoz, es la más importante dentro de la producción de aceitunas de

mesa, destacando por sus relativamente elevados contenidos en polifenoles, principalmente la oleuropeína (Ruiz-Barba et al., 2023).

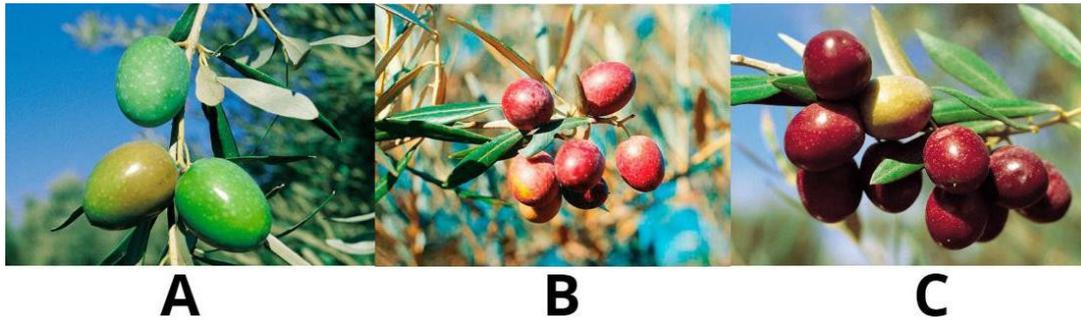


Figura 1.2.- Imagen de diferentes variedades de aceitunas más utilizadas para la obtención de aceitunas de mesa. (A) Aceituna Gordal sevillana, (B) aceituna Hojiblanca, (C) aceituna Manzanilla (AceitesdeolivadeEspaña, 2023).

1.2.- LA ACEITUNA DE MESA

Los alimentos fermentados como las aceitunas de mesa son productos obtenidos a través de reacciones enzimáticas de algunos compuestos alimentarios mediante la acción de una serie de microorganismos. Este tipo de alimentos han ido ganando popularidad a lo largo de los años, siendo hoy en día un tipo de alimento bastante importante en algunas dietas. Dentro de éstos, las aceitunas fermentadas o aceitunas de mesa es un producto bastante importante debido a su alto valor nutricional y contenido en compuestos bioactivos como compuestos fenólicos o triterpenos pentacíclicos, minerales, ácidos grasos y vitaminas, lo que lo convierte en un alimento que contribuye a nuestra salud y bienestar (Vaccalluzzo et al., 2020; Galeote et al., 2022)

España es uno de los principales productores y exportadores de aceitunas de mesa en el mundo, llegando a ser el líder mundial en producción y exportación de este producto gastronómico, con un 62% de la producción a nivel de la unión europea, y un 17% mundial. La producción de aceitunas de mesa en España es especialmente importante en la región de Andalucía siendo la principal productora nacional de aceitunas de mesa, llegando a producir hasta un 58% de la producción total a nivel nacional, seguida por la producción de las comunidades autónomas de Extremadura y Cataluña. Estas regiones tienen un clima ideal para el cultivo de aceitunas y producen algunas de las variedades más conocidas de aceitunas de mesa, como la hojiblanca, la cual presenta un 46% de la producción total nacional, la manzanilla con un 36% o la gordal sevillana con un 7% entre otras variedades (M.A.P.A, 2023).

Según los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, en la temporada 2019-2020 (**Tabla 1.1**), España produjo un total de 5.965,1 miles toneladas de aceitunas, de las cuales se obtuvieron 489,7 miles de toneladas de aceitunas de mesa y 5.475,4 miles de toneladas restantes se destinaron a la producción de aceite de oliva (M.A.P.A, 2020).

Tabla 1.1.- Rendimiento de la producción de aceitunas en la temporada 2019-2020 según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (M.A.P.A, 2020).

Cultivo	Rendimiento			Producción total de aceituna (tonelada)	Destino de la producción (toneladas)	
	De la superficie en producción (kg/ha)		De árboles diseminados (kg/árbol)		Aceituna para aderezo (destino mesa)	Aceituna para almazara (destino aceite)
	Secano	Regadío				
Olivar de aceituna de mesa	1.625	3.306	3	323.021	298.517	24.504
Olivar de aceituna de almazara	1.814	4.737	6	5.642.056	191.204	5.450.852
Olivar total	1.801	4.645	5	5.965.077	489.721	5.475.356

El aderezo de las aceitunas es un proceso clave en la producción de aceitunas de mesa y es un aspecto importante de la cultura gastronómica española. El proceso de aderezo es fundamental para transformar las aceitunas crudas y amargas que no son aptas para el consumo en un producto alimenticio comestible. Se conocen varios métodos de procesamiento de la aceituna de mesa, cuya elección puede depender de la variedad de aceituna, su grado de madurez y la tecnología de procesamiento de éstas. Algunos de los métodos de aderezo de aceitunas más importantes a nivel mundial son las aceitunas de mesa verdes al estilo español (**Figura 1.3A**), aceitunas negras al natural en salmuera (**Figura 1.3B**) y aceitunas negras maduras estilo californiano (**Figura 1.3C**) (Vaccalluzzo et al., 2020).

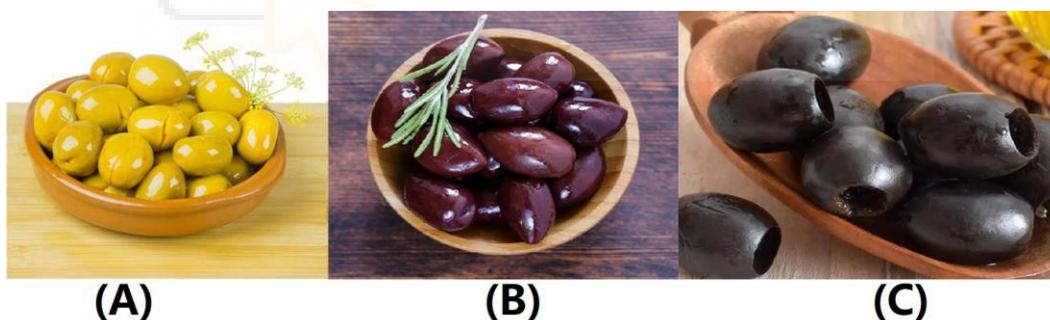


Figura 1.3.- Diferentes tipos de aderezo de aceitunas. (A) Aceitunas verdes al estilo español, (B) aceitunas negras al natural en salmuera, (C) aceitunas negras maduras al estilo californiano (Elaboración propia).

1.2.1.- PROCESO DE LA OBTENCIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA

El proceso de aderezo de la aceituna de mesa consta de varios pasos, y puede variar según el tipo de aceituna y la región productora, por ejemplo, en la obtención de la aceituna de mesa verde al estilo español, tras la obtención de los frutos se lleva a cabo un proceso de lavado y clasificación de la aceituna, tras ello se produce el proceso de “cocido” y una fermentación posterior en salmuera. Una última opción, sería realizar otros procedimientos como el deshuesado y relleno para finalmente envasarlas en salmuera para su consumo (**Figura 1.4**).

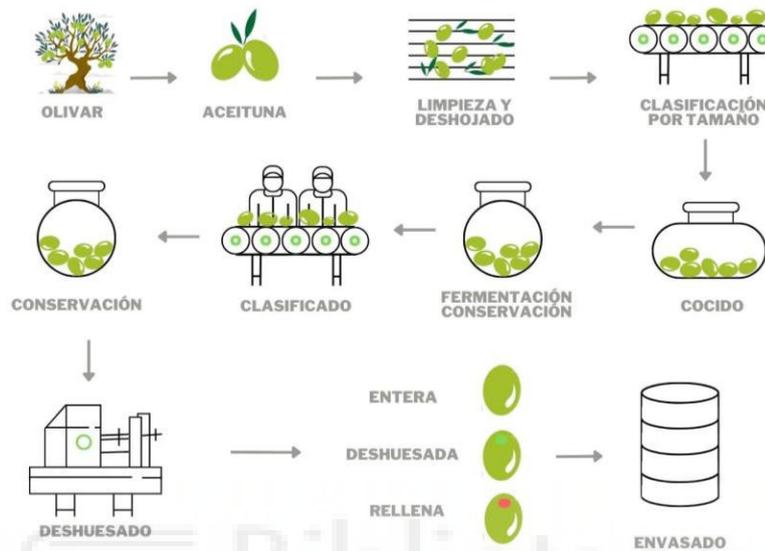


Figura 1.4.- Esquema de la elaboración de la aceituna de mesa (Elaboración propia).

La etapa de cocido es un proceso fundamental en el proceso de aderezo de aceitunas de mesa, en este paso el fruto se coloca en unos depósitos denominados “cocederas” en los cuales se tratan con una solución de legía alcalina que contiene una solución de hidróxido sódico 2,5-5,5% aproximadamente, a temperatura ambiente. En este paso del procedimiento principalmente se provoca la hidrólisis de la oleuropeína, compuesto el cual provoca el amargor de las aceitunas, aunque también sirve para favorecer el proceso fermentativo de éstas debido a la permeabilización de la piel y para la inactivación de las enzimas polifenoloxidasas y β -glucosidasas responsables del color de los frutos y la formación de compuestos antimicrobianos. Debido a este paso de cocido, se producen grandes cantidades de aguas residuales, los cuales contienen una gran concentración de NaOH, por lo que finalmente se obtiene un líquido con un pH muy alto y un gran contenido en materia orgánica (Núñez, 2007; Serrano, 2021).

Tras ello, se realiza el paso de lavado, en el cual se trata de eliminar el exceso de sosa que se encuentran sobre las aceitunas y en su interior mediante el lavado del fruto con agua y/o también mediante la adición de un ácido fuerte. Este procedimiento también consume grandes cantidades de agua y favorece la extracción de azúcares, polifenoles y otros compuestos que estén presentes en la pulpa del fruto (Cifuentes-Cabezas et al., 2023).

Finalmente, tras el lavado se somete al fruto a un proceso de fermentación en salmuera en el que se introducen las aceitunas en recipientes que se encuentran enterrados para mantener la temperatura constantemente entre 22 y 25 °C con una salmuera de NaCl en torno a 30 días. En este proceso se favorece el desarrollo de una población microbiana, principalmente bacterias lácticas y levaduras que disminuyen el pH de los frutos (el cual inicialmente es superior a 10) hasta valores menores a 4,3 y proporcionan a las aceitunas de mesa las características habituales de las aceitunas aderezadas al estilo español, mejorando así sus propiedades organolépticas. Las

bacterias del ácido láctico y las levaduras son microorganismos muy importantes, los cuales impulsan adecuadamente las fermentaciones de estos frutos y permiten determinar el sabor, calidad y seguridad del producto final, por lo que juegan un papel fundamental en el proceso, transformando los azúcares presentes en la pulpa de la aceituna en ácido láctico, lo que provoca esa acidificación o bajada de pH en las salmueras (Izquierdo et al., 2023).

Los azúcares presentes en los tejidos del olivo juegan un papel de gran importancia en el proceso de aderezo de la aceituna de mesa, ya que estos compuestos que se encuentran en la pared celular de los frutos proporcionan la energía necesaria para los cambios metabólicos que se generan en el proceso de fermentación, además estos compuestos también están relacionados con las propiedades texturales del fruto, y, por tanto, del producto final (Marsilio et al., 2001).

En este paso de fermentación también se generan grandes cantidades de aguas residuales, que suelen ser aguas fuertemente ácidas, con un elevado contenido en sal y materia orgánica, que resultan complicadas de reutilizar debido a que la actividad microbiana que se lleva a cabo en el proceso de fermentación genera metabolitos que dificultan y pueden inhibir el crecimiento microbiano en posteriores reutilizaciones.

Tras estos pasos anteriores los frutos están listos para los procesos finales, en los que se clasifica por tamaño, se deshuesa o rellena para su posterior envasado y comercialización. En este último proceso de envasado también se generan aguas residuales como resultado del lavado de envases, su esterilización o enfriamiento, las cuales pueden contener detergentes, sólidos en suspensión y materia orgánica (Núñez, 2007; Carmona et al., 2011).

1.3.- PROBLEMÁTICA CON LAS AGUAS RESIDUALES DE LA ACEITUNA DE MESA

Durante todas estas fases del proceso de aderezo de la aceituna de mesa, se emplean volúmenes considerables de agua limpia y se generan aguas residuales que oscilan entre 3,9 y 7,5 metros cúbicos por cada tonelada de aceitunas procesadas.

Generalmente, se vertían sin tratar en arroyos, riachuelos o directamente al mar, aunque el gobierno español prohibió estas descargas de aguas residuales provenientes de la industria de la aceituna en 1981 subvencionando la construcción de 1000 balsas de evaporación (**Figura 1.5**) (García & Hodaifa, 2017). Actualmente es la práctica más utilizada en el tratamiento de estos efluentes, sin embargo, esto genera la ocupación de grandes hectáreas de terreno en las que también se generan problemas de malos olores a poblaciones vecinas, inundaciones, proliferaciones de insectos y existe un riesgo de contaminación de aguas superficiales o subterráneas por infiltraciones (Parinos et al., 2007).



Figura 1.5.- Balsa de evaporación de aguas residuales (eIDíadeCórdoba, 2022).

Estas aguas residuales tampoco pueden ser vertidas directamente a plantas de tratamiento de aguas residuales municipales debido a la elevada demanda de agua para la dilución de éstas, ya que poseen un carácter bastante corrosivo debido a la cantidad tan elevada de sales que contienen, las cuales son particularmente difíciles de eliminar.

Estos efluentes procedentes de la industria de la aceituna de mesa generan una gran preocupación medioambiental, ya que, debido a sus características son aguas altamente contaminantes, que contienen compuestos fenólicos, lo que le confiere propiedades antimicrobianas, ecotóxicas y fitotóxicas, que unido a sus elevadas concentraciones de NaCl y NaOH hacen que puedan afectar negativamente a la vida microbiana, plantas y pequeños vertebrados, por lo que es de suma importancia tratar este residuo tras su generación, reduciendo su alto contenido en materia orgánica y la presencia de compuestos fenólicos, que pueden perjudicar la vida del ecosistema acuático y el correcto crecimiento vegetal (Marone et al., 2016; Arévalo et al., 2021).

El fruto del olivo es muy rico en estos compuestos fenólicos, aunque ya que éstos tienen una mayor solubilidad en agua que en ácidos grasos, dentro de la industria del aceite solo un 2% de la cantidad total de este tipo de compuestos pasan a la fase oleosa, mientras que el resto de éstos pasan a contenerse en las aguas residuales que provienen de este tipo de industria (Scalia et al., 2017) de la misma forma ocurre con la industria de la aceituna de mesa, donde estos tipos de compuestos tan interesantes se encuentran en mayor cantidad en los residuos que se generan como en el caso del alperujo.

Entre los fenoles que se puede destacar se encuentran la oleuropeína el hidroxitirosol y tirosol, presentes en este fruto principalmente en la pulpa, tienen una función protectora frente a insectos patógenos o incluso a la radiación ultravioleta. La piel también es rica en compuestos como triterpenos pentacíclicos que actúan como antialimentadores de insectos y agentes microbianos. Estos tipos de compuestos que podemos encontrar en las aceitunas tienen propiedades bastante beneficiosas ya que poseen carácter antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiana, cardioprotectora y antitumorales, haciendo que estos compuestos presentes en este tipo de fruto lo conviertan en un excelente alimento (González et al., 2020). Desde hace tiempo se han estudiado con el objetivo de añadirlos en la industria alimentaria y farmacéutica, debido a que este tipo de compuestos, dentro de los que se pueden destacar el hidroxitirosol, tirosol e oleuropeína, han sido estudiados para el tratamiento de multitud de enfermedades, manifestando multitud de beneficios para la salud como propiedades ante enfermedades neurodegenerativas y cáncer, mejora de la diabetes tipo 2 y prevención de enfermedades cardíacas.

Por tanto, estos efluentes, que habitualmente se desechan y se utilizan como un residuo son una excelente fuente de compuestos fenólicos cuya extracción y concentración podría tener grandes beneficios ya que por un lado se obtienen productos con alto valor añadido y por otro se evita una potencial contaminación a efluentes acuáticos y ecosistemas (Cifuentes-Cabezas et al., 2023).

Otras de las características de estos efluentes provenientes de la industria de la aceituna de mesa son su contenido en azúcares, ácidos orgánicos y compuestos nitrogenados. También presentan una DQO y sólidos en suspensión notablemente más baja que las aguas residuales de almazara, aunque presentan una conductividad eléctrica normalmente superior a $10 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ debido a la alta concentración de sales que contienen (Aldana et al., 2021).

La reutilización de estas aguas residuales provenientes de la industria del procesado de las aceitunas de mesa ha sido estudiada en algunas investigaciones, diluyendo este efluente y adicionándolo de nuevo en el paso de la fermentación o en el proceso de envasado. Sin embargo, el contenido en metabolitos presentes en este residuo interfiere con el nuevo proceso de fermentación afectando a las propiedades

organolépticas que presenta el producto final, haciendo que esta reutilización no sea del todo efectiva (Polonio et al., 2017).

Otros estudios como (Serrano et al., 2020) han tratado de buscar un tratamiento alternativo en el proceso del aderezo de las aceitunas de mesa verdes a la española, utilizando la adición de KOH en vez del uso de NaOH durante el proceso de desamargado de los frutos, permitiendo así reutilizar los orujos alcalinos como biofertilizantes en plantaciones de tomate.

Debido a los compuestos fenólicos que contienen, estas aguas poseen propiedades antimicrobianas, ecotóxicas y fitotóxicas que provocan que no sea adecuado utilizar un tratamiento biológico para su eliminación, ya sea anaeróbico o aeróbico, debido a que pueden inhibir la actividad celular (Marone et al., 2016). Algunos estudios como (Kargi & Dinçer, 1998) han tratado de realizar un tratamiento biológico a aguas residuales salinas, obteniendo como resultado un bajo rendimiento en la eliminación de DBO debido a los efectos que provoca la sal en la vida microbiana, causando la plasmólisis y/o la pérdida de actividad celular.

Se han registrado algunos autores que han tratado efluentes provenientes de la industria de la aceituna con tratamientos biológicos mediante el uso de microorganismos halófilos cuya característica principal es que pueden habitar ambientes muy extremos y vivir en sustratos que contienen altísimas concentraciones de sales. En Woolard & Irvine (1995) se utilizaron estos microorganismos para desarrollar un lodo para el tratamiento de aguas residuales hipersalinas con reactores semicontinuos, logrando la eliminación promedio de fenoles de más de 99,5%. En Kargi & Dinçer (1998) se trataron aguas residuales salinas con un contenido 0-10% en sal mediante un cultivo de lodos activados a los que se le suplementaron con microorganismos halófilos, consiguiendo un aumento en la eficiencia de la eliminación de la DQO.

Otros trabajos prueban diferentes tipos de metodologías para la eliminación o aprovechamiento de estas aguas y la reducción de su contaminación, como la electrocoagulación, oxidación, la coagulación-floculación, ultrafiltración, tratamiento electroquímico y otros procesos combinados, aunque hasta el momento la mayoría de propuestas para el tratamiento de estos efluentes se basan en sistemas que requieren altas demandas energéticas, altos costos de operación y mantenimiento, y personal especializado (Yay et al., 2012; Rifi et al., 2022).

1.4.- ECONOMÍA CIRCULAR Y SU LEGISLACIÓN

El tratamiento actual de estos efluentes provenientes de la industria de la aceituna de mesa, al igual que el que proviene de la elaboración de aceite, están influidos por un modelo de economía lineal, en el que a partir de las materias primas se generan los productos que son consumidos y los residuos, sin tener en cuenta la huella medioambiental y sus consecuencias, son desechados.

En la actualidad cada vez más se le está dando mucha importancia al cambio de este modelo de consumo para pasar a un modelo de economía circular (**Figura 1.6**) en el que los productos se generan y se trata de reducir al mínimo la generación de residuos, reutilizando o reciclando los que se produzcan, obteniendo a partir de ellos compuestos de alto valor añadido. De esta forma el ciclo de vida de los productos se extiende y se minimiza la contaminación asociada a la producción de estos residuos (Europarl.europa.eu/, 2023).



Figura 1.6.- Esquemas de los modelos de economía lineal y circular (Elaboración propia).

Esta estrategia también se puede enmarcar dentro del conjunto de objetivos globales que en 2015 se establecieron por parte de las Naciones Unidas en todo el mundo para erradicar la pobreza, proteger el planeta y asegurar la prosperidad, todo ello mediante la creación de una agenda de desarrollo sostenible en el que existen 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), dentro de los cuales podemos destacar el 6.- Agua limpia y saneamiento, 11.- Ciudades y comunidades sostenibles, 12.- Producción y consumo responsable, 13.- Acción por el clima. (Figura 1.7) (Unidas, 2023). La Estrategia Española de Economía Circular “España 2030” se ha aprobado por el Acuerdo del Consejo de Ministros en 2020, en él se han sentado las bases para impulsar este nuevo modelo de economía para contribuir así a los esfuerzos de España para mantener una economía sostenible, descarbonizada y eficiente en el uso de los recursos. Para ello se establecen unos objetivos que se deben cumplir para el año 2030, cinco ejes y tres líneas de actuación que se deben desarrollar, de entre las que podemos destacar en este contexto el eje de actuación “Gestión de los Residuos” y “Reutilización y depuración del agua” (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico de España, 2021).

Concretamente en Andalucía se ha aprobado recientemente la nueva Ley de Economía Circular de Andalucía (LECA), en la que se pretende facilitar la reutilización de los residuos regulando su reintroducción en los ciclos productivos, reduciendo así la cantidad de materia prima necesaria y también los residuos que finalmente acaban en los vertederos, además de reducir los gastos de producción y abrir nuevas oportunidades de empleo verde (BOE, 2023).



Figura 1.7.- Objetivos de Desarrollo Sostenible propuesto por las Naciones Unidas (Unidas, 2023).

Por tanto, es importante buscar una forma efectiva de tratar estos efluentes para poder minimizar la contaminación asociada a su producción, o poder aprovechar este subproducto para la obtención de otros productos o compuestos de valor añadido gracias a su gran potencial y compuestos con propiedades tan interesantes.

1.5.- DIGESTIÓN ANAEROBIA

Una de las opciones de tratamiento biológico para estos efluentes que tantos problemas medioambientales están causando es la digestión anaerobia. En este proceso se aprovechan los desechos orgánicos y se recupera energía renovable mediante la producción de biogás, el cual se ha convertido rápidamente en una de las opciones más prometedoras desde el punto de vista energético y ambiental, ya que puede reemplazar parcialmente a los combustibles fósiles (Yellezuome et al., 2023).

La digestión anaerobia es un proceso bioquímico mediante el cual los microorganismos descomponen la materia orgánica presente en el sustrato en un entorno libre de oxígeno, produciendo así biogás y un digestato. El biogás producido está formado por una mezcla de metano (CH_4) (50–70 % v/v), dióxido de carbono (CO_2) (30–50 % v/v) y otros gases como amoníaco (NH_4) o sulfuro de hidrógeno (H_2S) (Gordo et al., 2020).

Además de producir biogás, este proceso también produce un subproducto húmedo denominado digestato o digerido, el cual se compone de una mezcla de materia orgánica parcialmente estabilizada, biomasa microbiana y compuestos inorgánicos. Este digestato ha sido estudiado para su posible uso en la agricultura como fertilizante, debido a su elevado contenido en carbono, nitrógeno y fósforo (Rodríguez et al., 2022).

Este proceso biológico consta generalmente de 4 etapas diferenciadas (**Figura 1.8**), la primera de ellas se denomina hidrólisis, en esta etapa las bacterias convierten a los compuestos moleculares más complejos como pueden ser las proteínas, polisacáridos o lípidos en moléculas más pequeñas como aminoácidos, azúcares, ácidos grasos o alcoholes. La siguiente fase del proceso se denomina acidogénesis, en ella, los ácidos grasos de cadena larga se convierten en ácidos grasos volátiles de cadena corta, ácido láctico, alcoholes y otros gases. En la etapa de acetogénesis las bacterias acéticas convierten mediante fermentación los ácidos grasos volátiles de cadena corta en H_2 , acetato y dióxido de carbono. Finalmente, en la etapa de la metanogénesis las bacterias convierten los productos anteriores como acetatos, hidrógeno y dióxido de carbono en metano, CO_2 y H_2S , reduciéndose en esta etapa tanto la biomasa como la demanda química de oxígeno (Li et al., 2023; Phan et al., 2023). Esta última fase puede producirse mediante dos vías, la vía acetoclástica en la que las bacterias metanogénicas acetoclásticas utilizan ácido acético, metanol y algunas aminas para producir los productos finales. También puede producirse mediante la vía hidrogenotrófica, en la cual las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas utilizan el hidrógeno y dióxido de carbono para formar el metano. Aproximadamente el 70% del metano producido en este proceso se genera mediante la vía acetoclástica, tras la descomposición del ácido acético (Castillo, 2019).

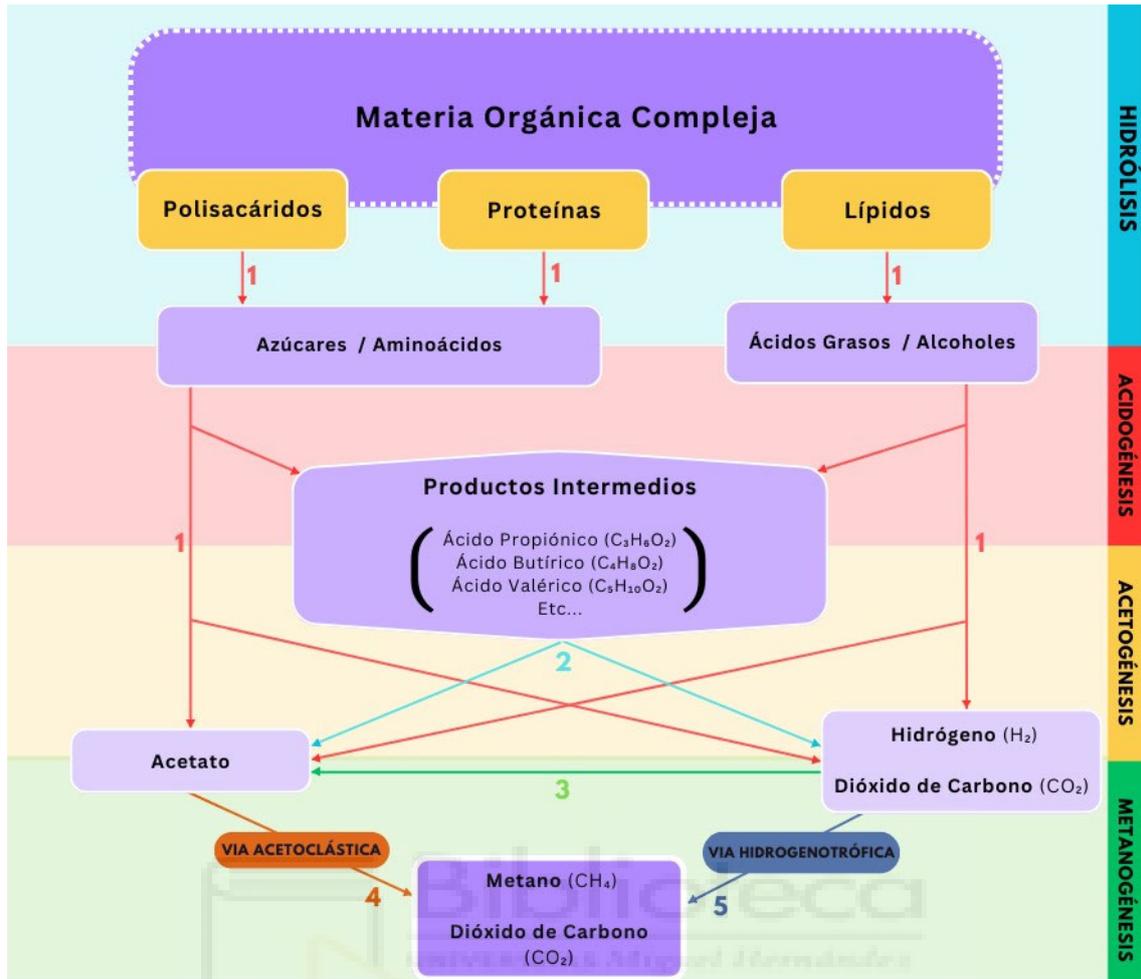


Figura 1.8.- Esquema del proceso de la digestión anaerobia. 1: Bacterias fermentativas o acidogénicas; 2: Bacterias acetogénicas que producen hidrógeno; 3: Bacterias homoacetogénicas; 4: Bacterias metanogénicas acetoclásticas; 5: Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas (Elaboración propia).

Esta sucesión de reacciones está influida por varios factores como pueden ser la concentración de sal, fenoles y composición en general del sustrato, la configuración del sistema y parámetros operativos como pueden ser el tiempo de retención hidráulica, la tasa de carga orgánica, la temperatura o el pH (Ali et al., 2019).

Esta tecnología de tratamiento de residuos orgánicos se ha convertido en una técnica muy prometedora, sin embargo, la aplicación de este tipo de tratamiento a efluentes provenientes de la industria de la aceituna tiene algunos inconvenientes debido a la naturaleza y composición de este tipo de subproducto. La existencia de altas concentraciones de compuestos fenólicos en este tipo de efluente puede provocar la inhibición de la metanogénesis en el proceso de la digestión anaerobia. Esta inhibición se puede contrarrestar diluyendo el sustrato que se va a utilizar, ya sea con agua o por co-digestión con otro tipo de desecho, o mediante un pretratamiento para eliminar las elevadas concentraciones de compuestos fenólicos que actúan como inhibidores (Micoli et al., 2023).

Sin embargo, la limitación fundamental del tratamiento biológico anaerobio con este tipo de aguas residuales es la alta concentración de sal que poseen. Esta elevada cantidad de sales puede provocar la inhibición del crecimiento microbiano debido a que se provoca un aumento significativo de la presión osmótica inducido por la sal, lo cual finalmente conduce a la plasmólisis de las células, es decir, las células se deshidratan ya que pierden el agua de su interior, provocando la muerte celular (Ali et al., 2019; Hu et al., 2021).

Aunque la concentración de sal de estos efluentes puede ser un problema muy grave a la hora de realizar un tratamiento biológico, existen algunos estudios que han realizado digestión anaerobia utilizando aguas residuales salinas como sustrato, por ejemplo en el de Guo et al. (2023), se realizó una experimentación en la que se evaluó la producción de biogás en función del estrés salino, concluyendo en que el aumento de la cantidad de sal en el proceso de digestión anaerobia disminuía la producción de biogás debido a la inhibición de la etapa metanogénica.

En el estudio realizado por Che et al. (2022), se realizó la digestión anaerobia de aguas residuales salinas sintéticas utilizando biocarbón sintético a base de hierro mediante pirólisis a diferentes temperaturas, y se llegó a la conclusión que usando este biocarbón en el proceso se mejoró la producción de metano. En otro ensayo que realizó Hu et al. (2021) se estudió el efecto de la adición de estos biochar a base de hierro en el proceso de formación de biopelículas en el tratamiento anaeróbico de aguas con alta salinidad, logrando mayor eficiencia en la eliminación de compuestos orgánicos solubles y una mayor producción de metano.

Por último, varios estudios han probado los efectos en la adición de materiales conductores a base de hierro, más concretamente la magnetita, llegando a la conclusión de que la magnetita podría aliviar estos efectos negativos causados por ambientes de estrés en el proceso de la digestión anaerobia, ya sea por altos niveles de amoníaco, sulfato, ácidos volátiles o incluso altas concentraciones de sales. En el estudio realizado por Ma et al. (2021) se demostró que el reactor estimulado con magnetita logró una mayor eficiencia en la eliminación de la demanda química de oxígeno y aumentó la producción de metano entre un 8% y 36,3% en el tratamiento de efluentes residuales con alta salinidad.



2.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de fin de máster consiste en aplicar el concepto de biorrefinería mediante la obtención de compuestos de interés y, adicionalmente, mediante un proceso de digestión anaerobia biogás en efluentes provenientes de la industria de la aceituna de mesa (**Figura 2.1**).

Para cumplir este objetivo principal se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Estudio del proceso de extracción de azúcares y fenoles como compuestos de interés industrial en efluentes de la fermentación de la aceituna de mesa.
- 2.- Evaluación del proceso de biometanización de las diferentes fases resultantes de los procesos de extracción de compuestos de interés.

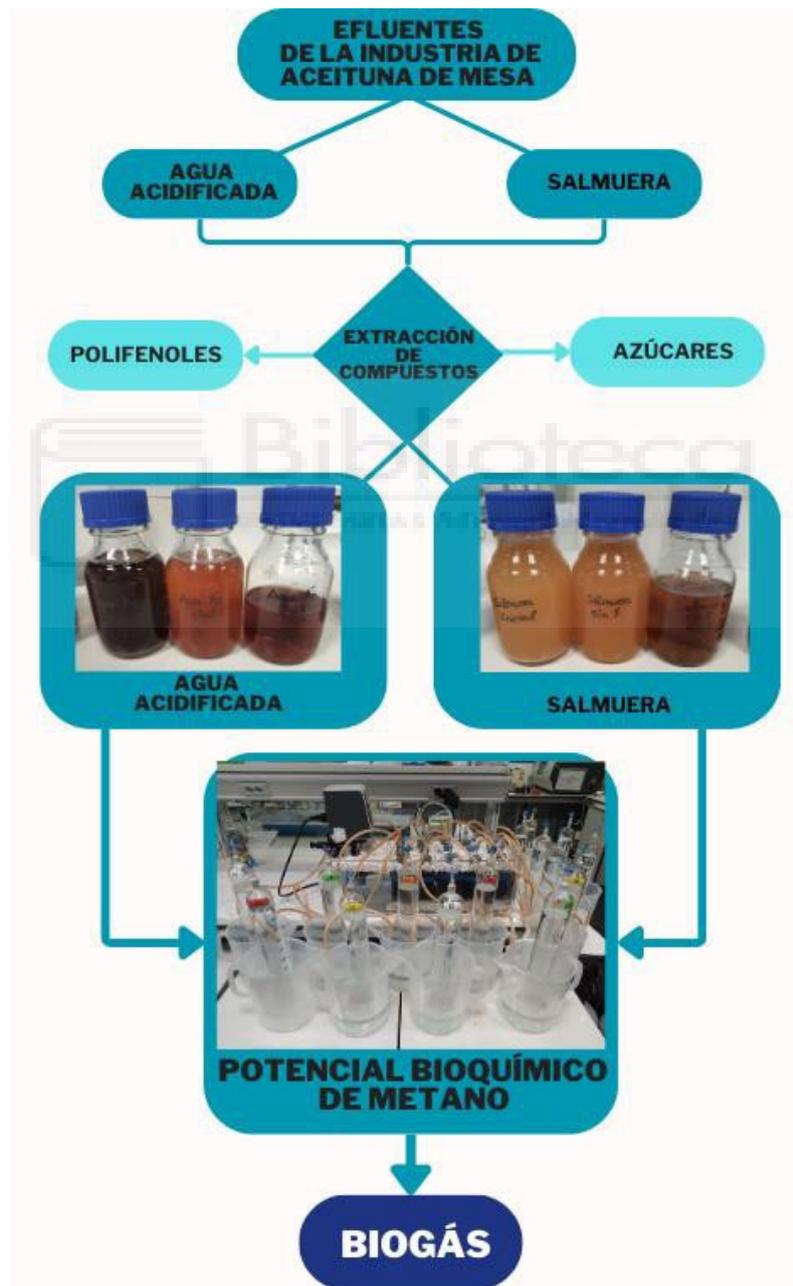


Figura 2.1.- Esquema general del proceso (Elaboración propia).

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- REACTIVOS USADOS

Los reactivos que se han usado para llevar a cabo toda la experimentación son: Etanol 96%(v/v) (*Panreac*); Na_2CO_3 (*Panreac*); Reactivo de Folin-Ciocalteu (*Panreac*); Metanol (*Panreac*); Ácido Gálico (*Sigma Aldrich*); H_2SO_4 / AgSO_4 10g/L (*Panreac*); Ftalato hidrógeno de potasio (*Sigma Aldrich*); $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,2084 N (*Panreac*); $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)$ (*Panreac*); $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ comercial 1N (*Panreac*); DPPH (*Sigma Aldrich*); Trolox (*Sigma Aldrich*); Ácido Cítrico anhidro para análisis (*Panreac*); Cloruro de Hierro (III) (*Sigma Aldrich*); Ácido Tricloroacético (*Fisher Chemical*); 2,2-Bipiridilo (*Sigma Aldrich*); Ácido Sulfúrico 96% (*Carlo Erba Reagents*); D(+)-Glucosa Anhidra (*Panreac*); Antrona 97% (*Sigma Aldrich*); Hidróxido de sodio 99% (*Honeywell Fluka*); Solución tampón pH 4 (*Panreac*); Solución tampón pH 7 (*Hach*); Solución tampón pH 10 (*Hanna*); Patrón estándar de conductividad eléctrica 12,88 mS/cm (*Hach*).

3.2.- MUESTREO DE LOS EFLUENTES E INÓCULO UTILIZADOS

El inóculo utilizado para toda la experimentación se obtuvo el 5 de junio de 2023 de la estación depuradora de aguas residuales El Copero (EMASESA) en Dos Hermanas (Sevilla). Posteriormente se dejó decantar para eliminar el exceso de agua que contenía.

El agua acidificada y salmuera utilizada para toda la experimentación se obtuvieron de la empresa agroalimentaria DCOOP (Sección Aceituna de Mesa en Monturque, Córdoba, España) el 23 de mayo de 2023.

3.3.- EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La extracción de los compuestos fenólicos se ha realizado con una columna de 4,1 cm de diámetro y 92 cm de altura, rellena con 800 mL de una resina comercial aniónica fuerte modificada por la que se han pasado 2 litros de efluente. Esta resina retiene un gran porcentaje de fenoles (**Figura 3.1**) ya que contienen polímeros altamente reticulados con gran superficie y numerosos poros.



Figura 3.1.- Imagen del procedimiento utilizado para la extracción de compuestos fenólicos de los diferentes efluentes (Elaboración propia).

3.4.- EXTRACCIÓN DE AZÚCARES

Una vez realizado el tratamiento de extracción de compuestos fenólicos se aplica a los diferentes efluentes un procedimiento de ultrafiltración para extraer los azúcares (**Figura 3.2**). En este proceso se pasó 1 litro de muestra con ayuda de una bomba peristáltica Masterflex L/S Easy-Load II por una columna de ultrafiltración de celulosa (millipore prep/scale-TFF 2.5ft² cartridge CDUF002LH Ultrafiltration module) a una velocidad en la que la presión del sistema alcance un valor aproximado de 1 bar. Mediante este procedimiento se obtuvo 0,7 litros de un efluente que contenía solo los compuestos que tienen un tamaño inferior a 3000 Daltons como fenoles simples y azúcares con bajo grado de polimerización.



Figura 3.2.- Imagen del montaje realizado para la extracción de azúcares de los diferentes efluentes (Elaboración propia).

3.5.- POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO

Para evaluar la biodegradabilidad anaeróbica y el potencial de producción de metano de los diferentes sustratos se ha realizado un ensayo BMP (Biochemical Methane Potencial).

Los sustratos seleccionados para este ensayo han sido efluentes que provienen de la industria de la aceituna de mesa: Agua acidificada inicial (A_i), Agua acidificada sin fenoles (A_f), Agua acidificada sin fenoles y sin azúcares (A_A) y una disolución 75:25, agua acidificada sin fenoles y sin azúcares con salmuera sin fenoles y sin azúcares (D). Tanto estos sustratos, como el inóculo han sido caracterizados para conocer sus propiedades más relevantes y su biodegradabilidad.

Algunas de las características generales del inóculo utilizado en el ensayo se recogen en la siguiente tabla (**Tabla 3.1**):

Tabla 3.1.- Datos de la caracterización general del inóculo utilizado.

Muestra	pH	Conductividad Eléctrica (mS/cm)	Alcalinidad (mg/L)	DQO _{soluble} (mg O ₂ /L)	DQO _{total} (mg O ₂ /L)	Fenoles totales (mg/L)	Azúcares totales (mg/L)
Inóculo	7,60	7,18	5.303,53	336,0	32.015	41,6	21,6
			±31,76	±13,2	±1.379	±2,4	±1,2

DQO: Demanda Química de Oxígeno

Para conocer que cantidad de inóculo y sustrato que es necesario introducir en cada reactor se establece una relación inóculo sustrato de 2:1 en gramos de sólidos volátiles (SV) (3 g SV de inóculo). También se le añadió una disolución de carbonato de sodio (Concentración 50 g/L) para regular el pH del medio y aportar al medio una alcalinidad que asegure su estabilidad. La presencia de oxígeno en el espacio de cabeza de los reactores fue eliminada mediante una corriente de nitrógeno aplicada a cada reactor al inicio del ensayo. Para llevar a cabo este ensayo se han utilizado como

reactores matraces Erlenmeyer de 250mL, de los cuales se ha utilizado un volumen de trabajo de 240mL (**Figura 3.3**). Cada reactor con volumen final de 240 mL contenía: 123,2 mL de inóculo, la cantidad correspondiente de sustrato previamente neutralizado, 10 mL de NaCO₃ y agua destilada hasta alcanzar el volumen final de 240mL.

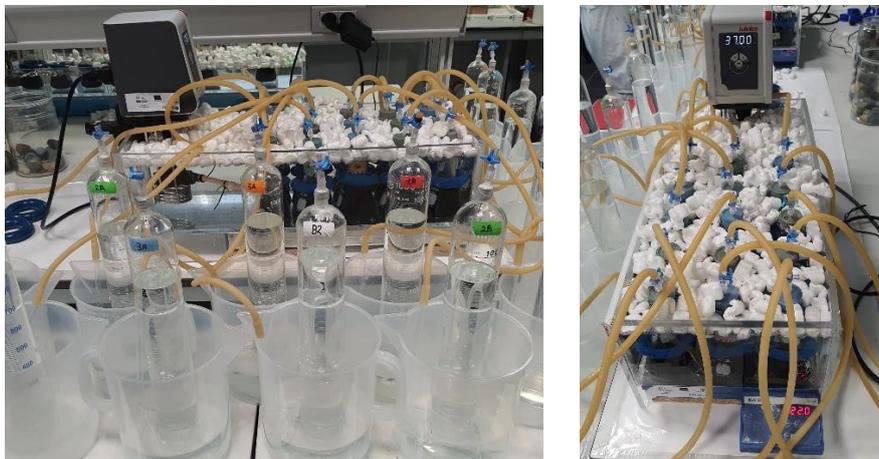


Figura 3.3.- Montaje general del ensayo de potencial bioquímico de metano (Elaboración propia).

Cada reactor se encontraba sumergido en un baño con agua termostataza a 37°C con la ayuda de un termostato de inmersión Julabo Corio C y con agitación constante mediante agitadores magnéticos (IKA RO15) para favorecer la homogeneización y transferencia de materia. Para poder medir el biometano producido en cada reactor se conectaron mediante mangueras de látex a gasómetros de 1 L, los cuales estaban sumergidos en una disolución de NaOH 2N con el objetivo de que el CO₂ producido en los reactores reaccione con esta disolución permitiendo así la medición solo de metano. De esta forma, la cantidad de metano producido por cada reactor es posible medirla mediante desplazamiento del volumen de disolución en cada gasómetro.

Tras introducir todos los componentes en los reactores y alimentar se ha procedido a medir diariamente el volumen de gas generado mediante desplazamiento de la disolución en los gasómetros, para posteriormente realizar las correcciones de volumen necesarias para llevar los datos a condiciones normales de presión y temperatura (1 atm, 25°C). Se ha trabajado con triplicados de cada reactor y con reactores control en los que no se le ha añadido sustrato, de esta forma se puede obtener la producción de metano generado en el proceso de biometanización, sin tener en cuenta el biogás producido por el inóculo. Por último, se representan gráficamente los resultados del volumen de metano generado por gramo de sólido volátil de sustrato en función al tiempo de gestión del ensayo.

3.6.- ESTUDIO ESTADÍSTICO Y CINÉTICO DEL ENSAYO

Para realizar el estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor de las diferentes producciones finales de los ensayos de potencial bioquímico de metano con un intervalo de confianza del 95%. Realizando posteriormente una prueba de Tukey para comparar las medias individuales de las diferentes muestras provenientes del análisis de varianza para determinar cuáles de estas medias poblacionales son diferentes entre sí con un nivel de significancia de 0,05.

Los parámetros cinéticos y el ajuste matemático de la cinética de los procesos de digestión anaerobia se determinaron numéricamente mediante una regresión no lineal a partir de los datos experimentales obtenidos en este estudio, utilizando el software SigmaPlot (Versión 15). Según el comportamiento de los diferentes ensayos

en el tiempo se utilizaron dos modelos cinéticos diferentes. Se utilizó un modelo cinético de primer orden (Exponential Rise to Maximum; Single, 2 Parameter) (Trujillo-Reyes et al., 2022) para el comportamiento de todos los reactores en los primeros días de ensayo, de acuerdo con las siguientes expresiones (Ecuaciones [1] y [2]):

$$G = G_m \cdot (1 - e^{-kt}) \quad [1]$$

$$R_m = G_m \cdot k \quad [2]$$

Donde G es la producción acumulada de metano durante esta primera etapa (mL CH₄/g SV), G_m es la producción específica final de metano (mL CH₄/g SV), k (d⁻¹) es la constante de velocidad específica o la constante cinética aparente, t es el tiempo (d) y R_m es la tasa máxima de producción de metano (mL CH₄/g SV · d).

Tras ello, los diferentes ensayos comienzan a mostrar un comportamiento diferente al de la primera etapa del proceso, empezando a seguir una cinética que puede describirse con el modelo sigmoideal de 4 parámetros (Sigmoideal; Sigmoid, 4 Parameter) (Trujillo-Reyes et al., 2019), de acuerdo con las siguientes expresiones (Ecuaciones [3] y [4]):

$$B = \frac{B_0 + P}{\left[1 + e^{\left(\frac{-4 \cdot R_m \cdot (t - \lambda)}{P + 2} \right)} \right]} \quad [3]$$

$$B_m = B_0 + P \quad [4]$$

Donde B es la producción acumulada de metano durante esta etapa (mL CH₄/g SV), B₀ es la producción acumulada de metano en el inicio de esta etapa (mL CH₄/g SV), B_m es la producción final de metano (mL CH₄/g SV), P es la producción máxima de metano durante esta etapa (mL CH₄/g SV), R_m es la tasa máxima de producción de metano (mL CH₄/g SV · d), t es el tiempo (d) y, por último, λ (d) es el tiempo de retraso.

También se determinaron los parámetros r², error estándar de estimación (S.E.E) y el error (%) el cual se definió como la diferencia en porcentaje entre la producción final de metano acumulada experimental y G_m (exponencial) o B_m (sigmoideal).

3.7.- MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1.- CALIDAD DE LAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Para determinar la calidad de las determinaciones analíticas realizadas en la experimentación se ha determinado la función estimación lineal, que consta de varios componentes como la pendiente de la recta (b), la desviación estándar de la pendiente (Sb), la ordenada en el origen (a), la desviación estándar de la ordenada en el origen (Sa), el coeficiente de determinación ($r^2 > 0,99$), el coeficiente de correlación (r), la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$), la suma de los residuales al cuadrado (SSres) la suma de los cuadrados de la regresión (SSreg).

También se encuentran la linealidad (L%) o linealidad online, la cual consiste en la desviación estándar relativa de la pendiente y se calcula con la siguiente fórmula:

$$L(\%) = \left(1 - \frac{S_b}{b}\right) \cdot 100$$

El límite de detección (LD), nos da un valor de la cantidad o concentración mínima de un analito que puede detectarse mediante un proceso analítico con una certeza razonable y se calcula con la siguiente fórmula:

$$LD = 3 \cdot \frac{S_{y/x}}{b}$$

El límite de cuantificación (LC), nos da un valor de la cantidad o concentración mínima de un analito que puede determinarse cuantitativamente mediante un proceso analítico con una cantidad metrológica preestablecida y se calcula con la siguiente fórmula:

$$LC = 10 \cdot \frac{S_{y/x}}{b}$$

3.7.2.- DETERMINACIÓN DEL PH, CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA Y ALCALINIDAD

Para determinar el pH y la conductividad eléctrica de la muestra se ha utilizado un Multímetro portátil HACH Sension+ MM150 para pH, ORP y conductividad provisto de un electrodo Multisensor Sension+ 5059 con cuerpo de plástico que se sumerge en un volumen adecuado de muestra, dando como resultado una lectura digital que da el valor de pH con dos cifras decimales. Diariamente se ha procedido a la calibración de este con soluciones tampón comerciales de pH 4,00; 7,00; 10,00 y conductividad eléctrica 18,88 mS/cm.

La alcalinidad de una muestra consiste en su capacidad para amortiguar cambios de pH. Este valor es importante en muchos usos y tratamientos de aguas tanto naturales como residuales porque depende fundamentalmente del contenido en carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, aunque también incluyen la contribución de boratos, fosfatos, silicatos y otras bases presentes en la muestra. La determinación de este valor se realizó mediante el uso de un titrador potenciométrico HI 901 HANNA en el cual se le suministra un volumen conocido de nuestra muestra en un vaso de precipitado al que se le añade lentamente una disolución de ácido sulfúrico 0,02 N hasta que se alcanza un pH de 4,5. En este punto el aparato nos muestra la alcalinidad de nuestra muestra en mg/L correspondiendo a la conversión de la mayor parte de HCO_3^- a H_2CO_3 .

3.7.3.- DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES SOLUBLES

Para la determinación de polifenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu en el que se realiza un ensayo colorimétrico cuyo principal reactivo es el “reactivo de Folin”, un líquido de color amarillo que consiste en una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico a partir de los cuales se producen iones molibdato y tungsteno. Con este método se produce una reacción óxido/reducción entre el reactivo de Folin y el ácido gálico (**Figura 3.4**) que genera un complejo de molibdeno (Mo(V)) que posee una coloración azul intensa la cual es posible medir mediante el uso de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 655nm, lo que finalmente nos da como resultado una medida de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en nuestra muestra (Singleton & Rossi, 1965).

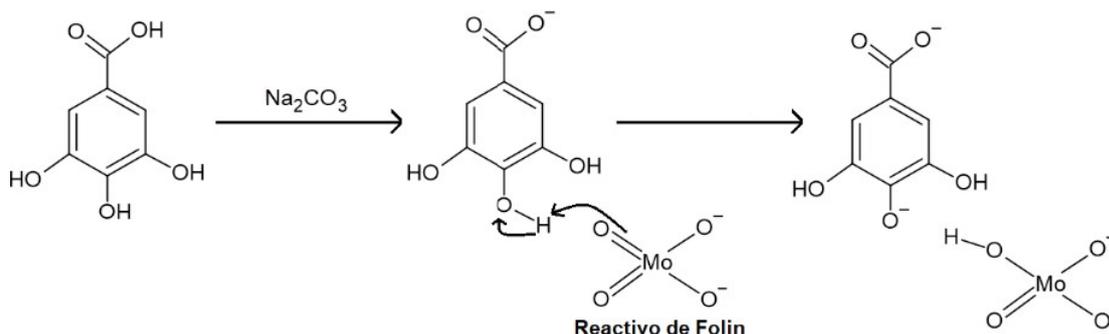


Figura 3.4.- Esquema de la reacción de la determinación de polifenoles totales (Muñoz-Bernal et al., 2017).

Para la determinación de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en nuestra muestra se añaden a una microplaca una alícuota de la muestra por triplicado, añadiéndole posteriormente carbonato sódico (Na_2CO_3) y el reactivo de Folin. Finalmente se deja estabilizar por 10 minutos para medir la absorbancia a 655nm (**Figura 3.5**) con un espectrofotómetro lector de microplacas *iMark Bio-rad Microplate Absorbance Reader* (Hércules, CA, EE.UU). La concentración de compuestos fenólicos presente en la muestra se determina mediante interpolación de la absorbancia en una recta de calibrado, obteniendo los resultados en mg equivalentes de ácido gálico/L.

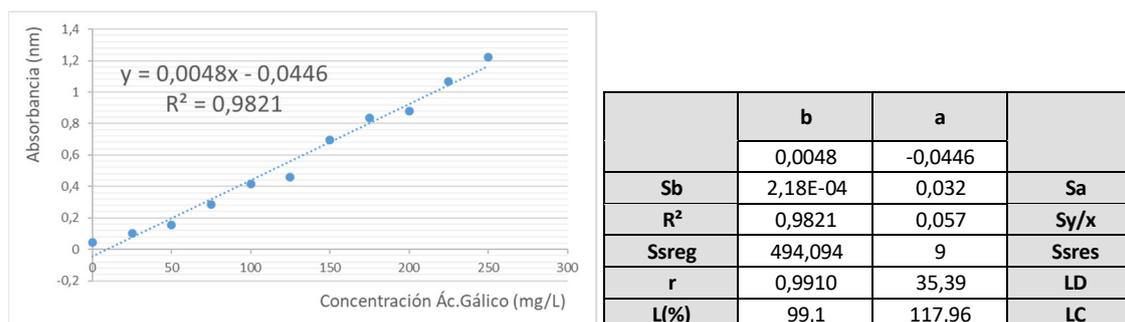


Figura 3.5.- Recta de calibrado y estimación lineal de la determinación de polifenoles totales solubles.

3.7.4.- DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES INDIVIDUALES MEDIANTE HPLC

Se determinó el perfil de los compuestos fenólicos individuales mediante el uso de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Hewlett-Packard 1100 series (**Figura 3.6**), equipado con un detector de díodos de matriz y un inyector automático Agilent 1200 series que introduce 20 μ L de muestra. Se usó la columna cromatográfica Teknokroma Mediterranea SEA 18 de 5 μ m de tamaño de partícula que posee unas dimensiones de 25 \times 0,46 de diámetro interno. Como eluyente se utilizó acetonitrilo grado HPLC (B) y agua mill-Q 0,01% en ácido trifluoroacético (TFA). El caudal fue de 1 ml/min y los cromatogramas se registraron a 280nm. Los compuestos fenólicos se separaron utilizando el siguiente gradiente: 0–30 min, 5% B; 30–45 min, 25% B; 45–47 min, 50% B; 47–50 min, 0% B. La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se basó en la comparación de los tiempos de retención (RT) y valores de absorbancia de los picos detectados en solventes con los obtenidos por la inyección de los estándares puros de cada análisis.



Figura 3.6.- Imagen del HPLC usado en la experimentación (Elaboración propia).

3.7.5.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIRADICAL

Para la determinación de la actividad antiradical se utilizó el método de DPPH en el que se realiza un ensayo colorimétrico cuyo principal reactivo es el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), un líquido de color violeta. En este método se produce una reacción entre el reactivo DPPH, el cual es susceptible a aceptar un protón de un compuesto antioxidante y formar la 2,2-difenil-1-picrilhidrazina, la cual deja de tener el color violeta y pasa a tener un color amarillento (**Figura 3.7**). Este cambio de color es posible medirlo mediante el uso de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490nm, lo que finalmente nos da como resultado una medida de la actividad antiradical presente en nuestra muestra (Larrauri, 1998).

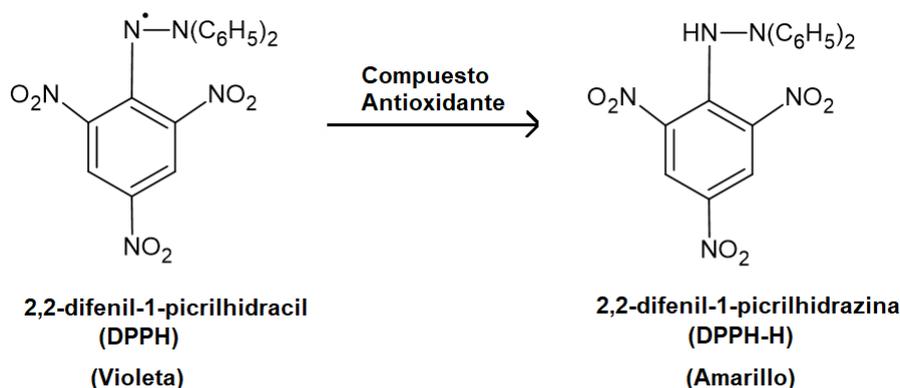


Figura 3.7.- Esquema de la reacción de la determinación de la actividad radical (Alam et al., 2013).

Para la determinación de la actividad antiradical presente en nuestra muestra se añaden a una microplaca una alícuota de la muestra por triplicado, añadiéndole posteriormente DPPH. Finalmente se deja estabilizar por 30 minutos para medir la absorbancia a 490nm (**Figura 3.8**) con un espectrofotómetro lector de microplacas *iMark Bio-rad Microplate Absorbance Reader* (Hércules, CA, EE.UU). La actividad antiradical presente en la muestra se determina mediante interpolación de la absorbancia en una recta de calibrado, obteniendo los resultados en mg equivalentes de trolox/L.

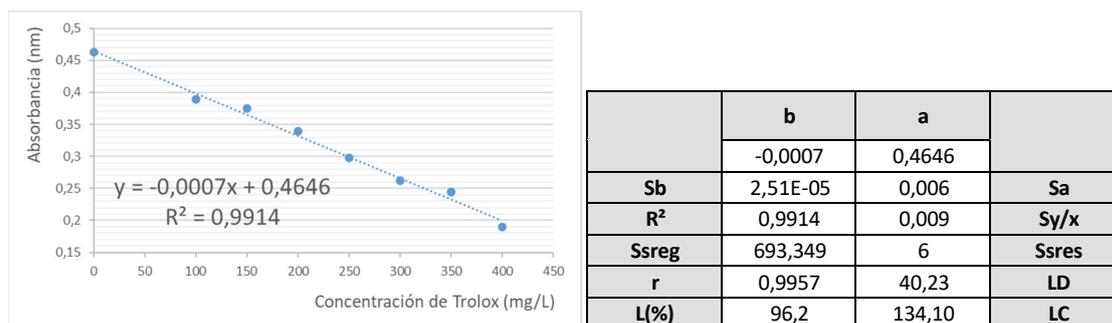


Figura 3.8.- Recta de calibrado y estimación lineal de la determinación de la actividad antiradical.

3.7.7.- DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES SOLUBLES EN AGUA

Para la determinación de los azúcares totales solubles en agua se utilizó el método de método colorimétrico en el que el reactivo principal es la Antrona. En este método se produce una reacción entre los grupos hidroxilos de los monosacáridos en el que se deshidratan al encontrarse en un medio ácido y caliente, formándose compuestos intermedios como el furfural si es una pentosa, o el hidroximetilfurfural si es una hexosa (**Figura 3.11**). Estos compuestos intermedios reaccionan con la Antrona formando un complejo que posee un color azul verdoso. Este cambio de color es posible medirlo mediante el uso de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 630nm, lo que finalmente nos da como resultado una medida de la cantidad de azúcares totales solubles presente en nuestra muestra (Dische, 1962).

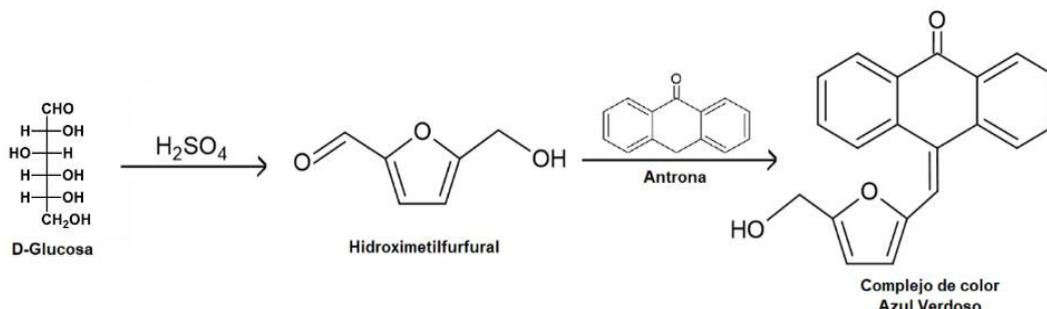


Figura 3.11.- Esquema de la reacción del proceso de azúcares totales solubles en agua (Mokrash, 1954).

Para la determinación de los azúcares totales solubles presentes en nuestra muestra se añaden a una microplaca una alícuota de la muestra por triplicado, añadiéndole posteriormente la disolución de Antrona 0,2% en H₂SO₄. A continuación, se agitan los tubos en un vortex y se deja estabilizar por 5 minutos en un baño de agua a 100°C para posteriormente añadir 200 µL de cada tubo en la microplaca una vez que ya están fríos. Finalmente se mide la absorbancia a 630nm (**Figura 3.12**) con un espectrofotómetro lector de microplacas *iMark Bio-rad Microplate Absorbance Reader* (Hércules, CA, EE.UU). Los azúcares totales solubles presentes en la muestra se determinan mediante interpolación de la absorbancia en una recta de calibrado, obteniendo los resultados en mg equivalentes de glucosa/L.

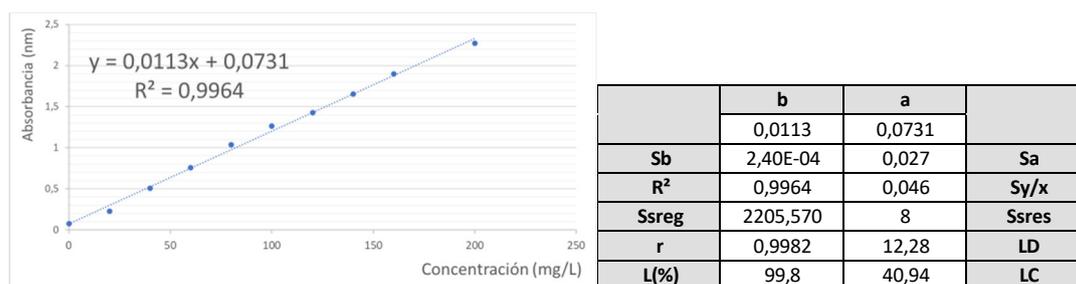


Figura 3.12.- Recta de calibrado y estimación lineal de la determinación de azúcares totales solubles en agua.

3.7.8.- DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES, VOLÁTILES Y MINERALES

La determinación de sólidos totales, volátiles y minerales (Bridgewater, 2012) se realiza pesando una cantidad de muestra en un crisol el cual previamente se ha pesado vacío. Este crisol con la muestra se seca en una estufa *JPSelecta* modelo *digiheat-TFT* (Barcelona, España) que se encuentra a 105°C durante 24 horas, anotando el peso cuando la muestra esté seca.

Para la determinación de sólidos minerales se introduce el crisol que previamente se ha introducido en la estufa, en un horno mufla a 550°C donde se calcina la muestra un mínimo de dos horas, quedando solo los sólidos minerales para finalmente volver a pesar el crisol.

Con estos datos se calcula la cantidad de sólidos totales (ST), sólidos minerales (SM) y humedad de la muestra. La cantidad de sólidos volátiles (SV) que presenta la muestra se obtiene realizando la diferencia entre la masa de sólidos totales y los minerales.

3.7.9.- DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO SOLUBLE

Para determinar la demanda química de oxígeno soluble de nuestra muestra previamente filtrada para la eliminación de sólidos, se someten a un reflujo cerrado con un exceso de reactivo oxidante ($K_2Cr_2O_7$) en un medio ácido fuerte (H_2SO_4), añadiendo un catalizador ($AgSO_4$). Los compuestos orgánicos oxidables actúan y reducen el dicromato Cr^{+6} a ión crómico Cr^{+3} permitiendo en este caso medir el exceso de dicromato que no ha reaccionado mediante espectrofotometría. Tras añadir los reactivos se introducen las muestras en un digestor a 150°C durante dos horas, para posteriormente medir la absorbancia con un espectrofotómetro (Multiparameter Photometer HI83399 HANNA) a 600nm (Raposo et al., 2008).

Para conocer el valor real de la $DQO_{soluble}$ de nuestra muestra se interpola el valor de la absorbancia obtenida en una recta de calibrado (**Figura 3.14**) obtenida mediante disoluciones de ftalato hidrógeno de potasio (FHP) preparadas por la disolución de un patrón cuyo valor teórico de $DQO_{soluble}$ es 1000 mg O_2/L , obteniendo finalmente el resultado expresado en mg O_2/L .

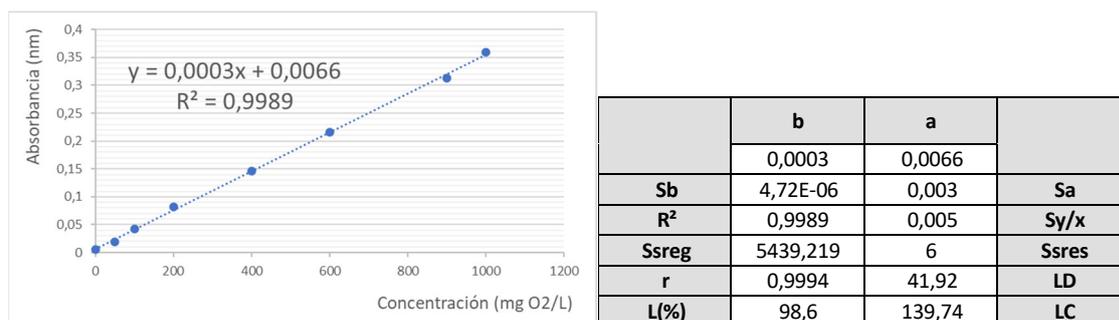


Figura 3.13.- Recta de calibrado y estimación lineal de la determinación de la demanda química de oxígeno soluble.

3.7.10.- DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO TOTAL

El método utilizado para la determinación de la DQO_{total} es similar al utilizado en la determinación de la $DQO_{soluble}$ solo que en este caso la muestra se somete a un reflujo abierto y se determina la cantidad de dicromato que no ha reaccionado mediante la valoración frente a SAF (Sulfato de amonio y hierro (II) hexahidratado 0,5N) $((NH_4)_2Fe(SO_4)_6)$ 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 dos blancos con agua destilada. Para factorizar y cuantificar la normalidad real del SAF realizado, se realiza por duplicado una valoración con $K_2Cr_2O_7$ 1N comercial, obteniendo la normalidad real mediante la siguiente fórmula:

Finalmente, por diferencia del volumen consumido de SAF en la valoración de las muestras y en la valoración del blanco, se determina la cantidad de dicromato consumido en la oxidación de la muestra, obteniendo los resultados en $mg\ O_2/kg$.

3.7.11.- DETERMINACIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO TOTAL

El carbono orgánico total es una medida de la cantidad de compuestos orgánicos presentes en nuestra muestra, para su determinación se utiliza un analizador de carbono orgánico total modelo TOC-L CSN, con automuestreador ASI de la marca Shimadzu en el que se introduce una dilución conocida de nuestra muestra previamente filtrada para obtener como resultado la cantidad de carbono total, carbono orgánico total y carbono inorgánico.

3.7.12.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES

Para la determinación de los ácidos grasos volátiles (AGV) se añade una alícuota de la muestra junto al patrón interno (ácido etilbutírico y ácido fosfórico al 30%) para posteriormente centrifugar la muestra y recuperar el sobrenadante el cual finalmente se utiliza en la determinación. Durante el estudio se ha analizado el ácido acético (C2), el ácido propiónico (C3), el ácido isobutírico (i-C4), el ácido butírico (n-C4), el ácido isovalérico (i-C5) y el ácido valérico (n-C5). Estos, se han determinado a través de la cromatografía gaseosa con detector de ionización de flama (FID) a 250 °C, cuyo modelo es GC-2010, marca shimadzu, equipado con una columna Stabilwax-Da (Crossbond Carbowax polyethylene glycol, RESTEK) con unas dimensiones de 0,25 mm x 30m. La temperatura del horno aumenta gradualmente de 100 a 170 °C a 5 °C/min. Se utilizó nitrógeno (30 mL/min), hidrógeno (40 mL/min) y aire (400 mL/min) como gas portador a un caudal de 40,0 mL/min a 504 kPa.

3.7.13.- DETERMINACIÓN DE IONES MEDIANTE CROMATOGRFÍA IÓNICA

Los aniones y cationes se determinaron mediante cromatografía iónica con un sistema Advanced Compact IC (861, Metrohm) equipado con un supresor de CO_2 (MCS 853, Metrohm) y un procesador de muestras (AG 838, Metrohm).

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS EFLUENTES

4.1.1.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

En la **Tabla 4.1** se muestran los valores de pH, conductividad eléctrica, sólidos volátiles (SV) y totales (ST), la demanda química de oxígeno de los componentes totales y solubles (DQO_{Total} y DQO_{soluble}) de los diferentes sustratos que se han utilizado en el ensayo.

Tabla 4.1.- Datos de la caracterización físico-química de los sustratos utilizados.

Sustrato	pH	Conductividad Eléctrica (mS/cm)	ST (mg/kg)	SV (mg/kg)	DQO _{total} (mg O ₂ /L)	DQO _{soluble} (mg O ₂ /L)	Rat. DQO _{soluble} /DQO _{total}	AGV/DQO _{soluble}	AGV Totales (mg O ₂ /L)
A _I	3,6±0,1	10±1	34.600 ±1.458	28.214 ±1.485	67.436 ±2.112	52.050 ±866	0,77	0,27	14.019±253
A _F	3,5±0,1	11±1	225.870 ±438	19.364 ±199	59.052 ±153	47.800 ±1.520	0,81	0,42	20.251±134
A _A	3,4±0,1	14±1	222.577 ±280	17.372 ±75	52.539 ±1.059	38.883 ±803	0,74	0,16	6.290±37
S _I	3,8±0,1	99±1	1.107.159 ±1.207	29.260 ±1.852	48.252 ±1.488	32.300 ±661	0,67	0,14	4.445±46
S _F	3,9±0,1	94±1	1.103.945 ±287	26.025 ±373	44.613 ±420	29.883 ±1.664	0,67	0,18	5.353±151
S _A	3,9±0,1	93±1	1.101.469 ±603	27.157 ±1.253	39.163 ±733	30.050 ±1.060	0,77	0,17	5.080±107
D	3,5±0,1	36±1	442.480 ±187	18.913 ±249	48.289 ±603	37.175 ±176	0,77	0,16	5.910±216

La **Tabla 4.1** refleja que los valores de pH de los diferentes sustratos oscilan entre 3,4 y 3,8, teniendo un pH ácido que puede afectar negativamente en el proceso de biometanización. Para realizar el estudio de digestión anaerobia se neutralizaron los sustratos utilizados en el ensayo a un pH aproximado de 7. Estos valores de pH tan bajos son similares en estos tipos de efluentes que provienen de la fermentación de la aceituna de mesa como el agua acidificada o la salmuera (Ballesteros-Gómez et al., 2023). Los altos valores de conductividad eléctrica en las muestras de salmuera reflejan el elevado contenido en sales que contienen este tipo de efluentes, lo cual puede afectar negativamente en el proceso de biometanización, produciendo plasmólisis celular en los microorganismos encargados del proceso. Para el ensayo de biometanización se decidió realizar una disolución 75:25 para reducir la cantidad de sales que se introducen en el reactor, consiguiendo reducir su conductividad eléctrica a 36 mS/cm. Otros estudios como (Mohamadi et al., 2023) realizaron ensayos con efluentes similares en los que obtuvieron valores de conductividad equivalentes debido a su alta salinidad. También, se observa que en el caso del agua acidificada en torno al 77% de los sólidos totales son sólidos volátiles, sin embargo, este valor disminuye en el caso de las salmueras hasta un valor de 26%, indicando que este tipo de efluente contiene una menor cantidad de materia orgánica. Al igual que los sólidos volátiles, la demanda química de oxígeno es una medida que indica la cantidad de materia orgánica contenida en una muestra. El ratio DQO_{soluble}/DQO_{Total} determinada indica que aproximadamente el 25 % de la materia orgánica no es soluble para todos los casos estudiados. Como se puede observar en el ratio AGV/DQO_{soluble}, la cantidad de ácidos grasos volátiles que forman parte de la DQO soluble de los sustratos aumenta cuando se someten al proceso de extracción de compuestos fenólicos, sin embargo, en la extracción de azúcares ese valor disminuye.

En la **Figura 4.1** se representa la concentración de ácidos grasos volátiles presentes en los sustratos en mg O₂/L. Se puede observar que los efluentes de agua acidificada presentan una mayor concentración de este tipo de compuestos que los efluentes de salmuera, contando con una composición mayoritariamente de ácido acético (C2) que aproximadamente ocupa el 75% del total, por lo que el bajo pH que

muestra este tipo de efluente puede ser debido a la elevada concentración de ácido acético que contiene. Se puede destacar que tras el proceso de extracción de compuestos fenólicos los ácidos grasos presentes en los diferentes sustratos han llegado a aumentar, sin embargo, el proceso de extracción de azúcares provocó su posterior disminución.

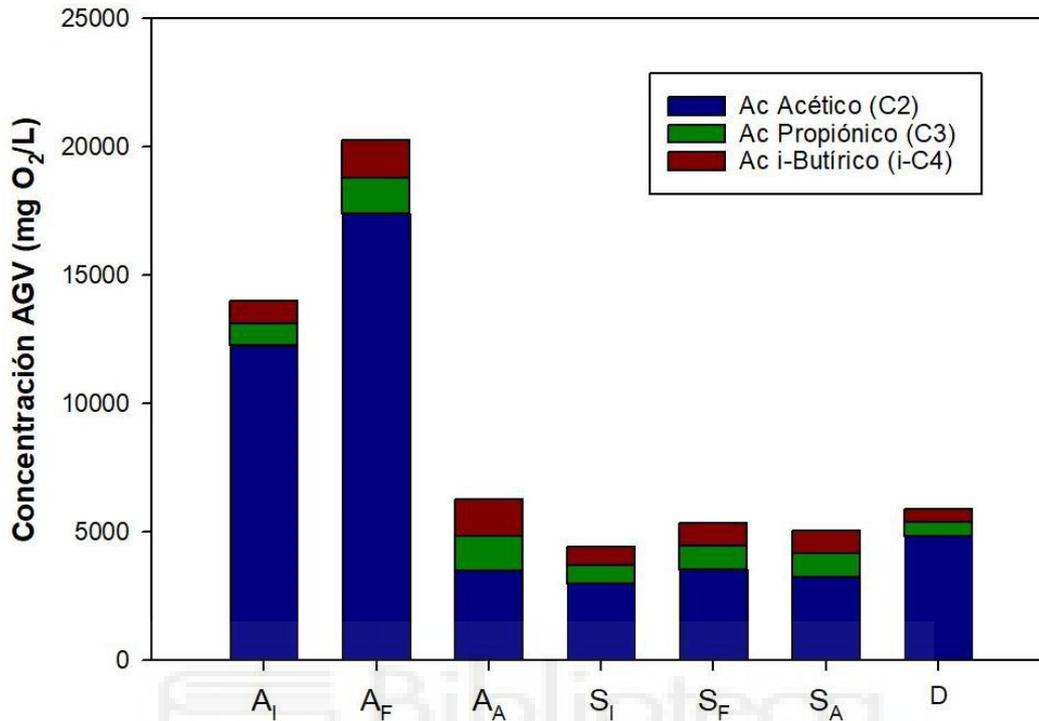


Figura 4.1.- Concentración en mg O₂/L de ácidos grasos volátiles presentes en los sustratos utilizados.

En la **Tabla 4.2** se representan los datos obtenidos de las concentraciones de iones presentes en los diferentes sustratos utilizados, los cuales se han obtenido mediante cromatografía iónica. En ella se puede destacar la alta concentración de iones Na⁺ y Cl⁻ en los efluentes que contienen sales, debido a que el principal ingrediente en la elaboración de este tipo de efluentes es el cloruro de sodio (NaCl) (Maricel & Lopez Toro, 2020). Se puede observar que, tras los diferentes procesos de extracción en el sustrato de agua acidificada, la concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻ aumenta en ambos procesos. Sin embargo, en la concentración de este tipo de iones en los sustratos que provienen de salmuera disminuye en cada proceso de extracción.

Tabla 4.2.- Datos de la concentración de iones en los sustratos utilizados.

Concentración Iones presentes (mg/L)	I	A _I	A _F	A _A	S _I	S _F	S _A	D
Na ⁺	50,222	55,922	60,683	164,721	2.990,566	2.963,718	2.834,351	761,888
NH ₄ ⁺	17,138	***	***	***	24,941	24,938	24,905	***
K ⁺	33,452	281,084	275,658	264,427	176,913	172,446	167,325	225,286
Mg ²⁺	6,857	17,852	20,502	16,848	51,663	52,678	41,616	32,036
Ca ²⁺	1,293	13,837	13,677	13,052	12,239	12,282	11,844	12,574
Cl ⁻	125,085	110,944	210,271	219,193	4.222,059	4.061,253	3.950,492	1.167,862
NO ₂ ⁻	2,072	***	***	***	***	***	***	***
NO ₃ ⁻	1,948	***	1,961	1,941	2,017	2,963	2,938	2,044
PO ₄ ³⁻	16,771	44,892	30,279	25,22	21,93	30,08	26,774	24,039
SO ₄ ²⁻	4,297	22,619	8,268	6,568	132,252	233,253	224,052	58,056

4.1.2.- ESTUDIO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

En la **Figura 4.2** se representa la concentración de compuestos fenólicos expresados como mg equivalentes de ácido gálico por litro en los diferentes efluentes de aguas ácidas y salmueras que se han utilizado en la experimentación. Se puede observar que se ha logrado una eficiencia de extracción de este tipo de compuestos de hasta un 49% sobre el total de compuestos fenólicos solubles.

Estos compuestos fenólicos que han sido extraídos pueden utilizarse en multitud de aplicaciones debido a que son muy interesantes ya que poseen propiedades antioxidantes y beneficiosas salud (Wang et al., 2019). Además, tiene distintos usos en la industria alimentaria actuando como aditivos en algunos alimentos, incluso para preservarlos y evitar su oxidación (Banerjee et al., 2017), pudiéndose usar para aumentar la calidad y la vida útil de los productos cárnicos y retrasar el deterioro microbiológico del pescado (Oliveira et al., 2021). Otra de las características de este tipo de compuestos con respecto al proceso de digestión anaerobia es que una concentración elevada de éstos puede afectar al proceso ya que puede inhibir parcialmente a los microorganismos encargados de llevar a cabo la biometanización (Borja et al., 1997).

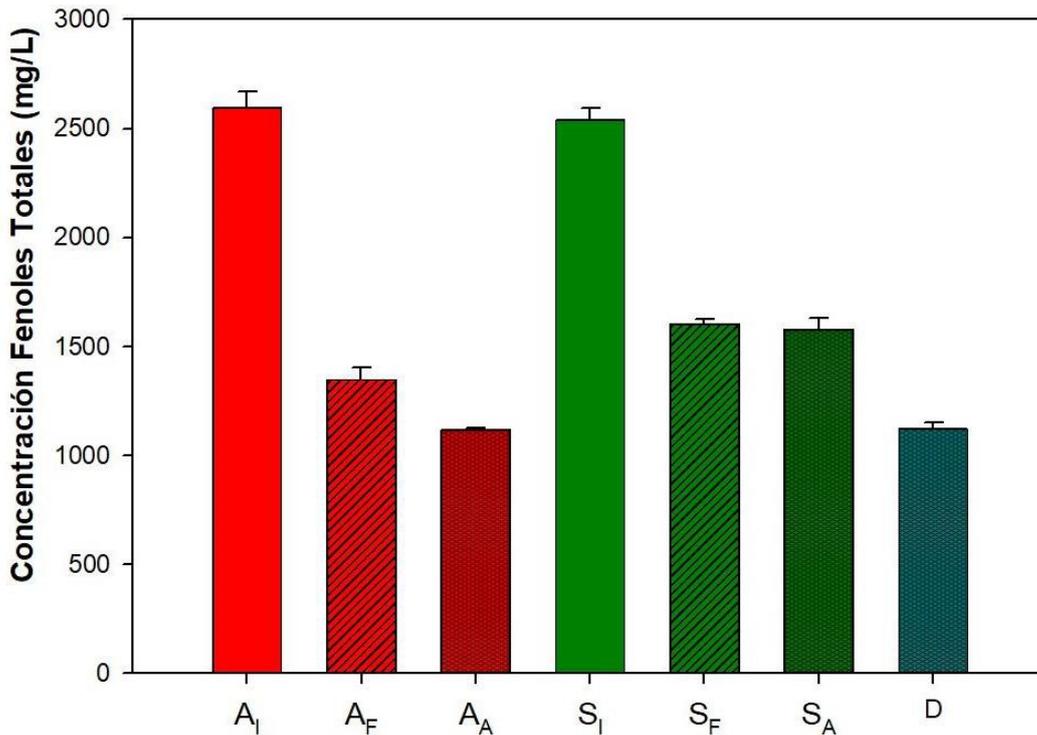


Figura 4.2.- Concentración en mg/L de polifenoles totales presentes en los sustratos utilizados.

En la **Tabla 4.3** se muestra la concentración de los compuestos fenólicos individuales presentes en los diferentes efluentes obtenidos a lo largo de la experimentación, en la que se puede observar el descenso de la concentración de este tipo de compuestos tras el tratamiento para su extracción. En el caso del efluente agua ácida se consiguió extraer hasta un 48% del total de fenoles iniciales y un 37% en el caso de la salmuera. Tras el proceso de extracción de azúcares también se consiguió extraer compuestos fenólicos, llegando hasta un 17% en el caso del agua ácida y a un 1,6% en el caso de la salmuera. Esto puede deberse a que durante este proceso se han podido extraer compuestos fenólicos más complejos o incluso unidos a azúcares. Estas interacciones entre polisacáridos y compuestos fenólicos ya han sido estudiadas en extractos relacionados con la aceituna, donde se han encontrado una fuerte interacción en este complejo de polisacáridos pécticos y fenoles que, además, exhibe propiedades antioxidantes y antiproliferativas (Bermúdez-Oria et al., 2023).

También se obtuvieron los diferentes cromatogramas mediante HPLC-UV a 280 nm como se puede observar en la **Figura 4.3**, donde se destaca la presencia de algunos de estos compuestos como el Hidroxitirosol, el cual es un catecol derivado de la oleuropeína que se puede encontrar en las aceitunas o en el aceite de oliva y tiene excelentes propiedades antioxidantes (Erkoç et al., 2003). También se puede destacar la presencia del Tirosol, otro compuesto fenólico muy relevante actualmente debido a la abundancia de estudios ya que posee propiedades beneficiosas para la salud, a causa de sus propiedades cardio y neuro protectoras (Zurob et al., 2020).

Tabla 4.3.- Datos de concentración de compuestos fenólicos individuales presentes en los diferentes efluentes.

Sustrato	Concentración de Hidroxitirosol (mg/L)	Concentración de Tirosoles (mg/L)
AI	1.323,325±16,044	153,260±3,239
AF	668,700±2,814	85,990±0,820
AA	502,005±0,771	65,730±0,382
SI	1.341,175±16,681	112,005±0,742
SF	567,950±5,756	41,815±0,799
SA	532,195±6,569	41,295±5,169
D	368,930±1,768	10,870±0,339

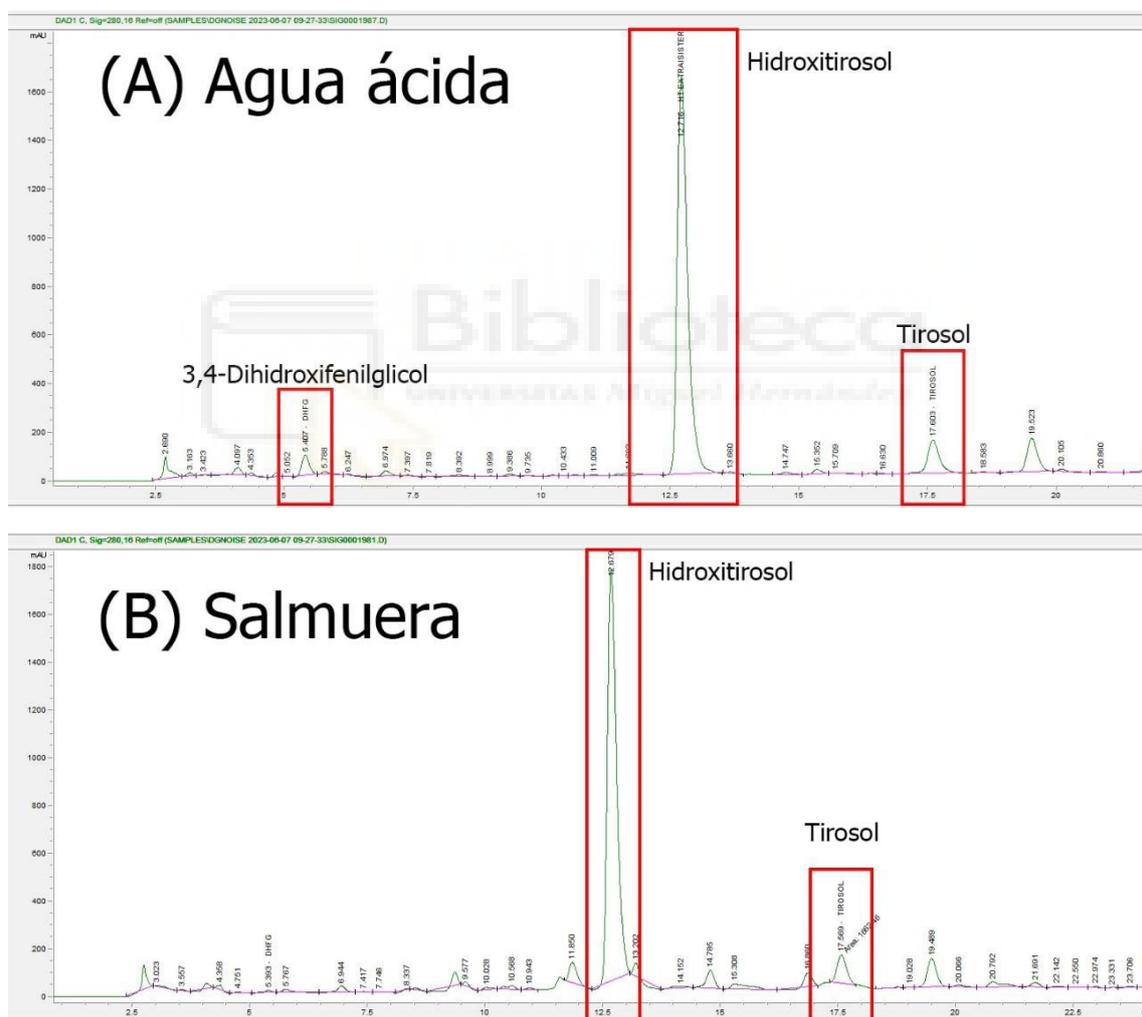


Figura 4.3.- Cromatogramas de los efluentes iniciales utilizados en la experimentación.

En la **Figura 4.4** se muestran los datos obtenidos sobre el poder reductor expresados en mg equivalentes de trolox por litro. Se puede observar que los diferentes efluentes muestran una menor capacidad para donar electrones o actuar como aceptor de protones tras someterlos al tratamiento para la extracción de compuestos fenólicos, disminuyendo su concentración hasta un 50% de media tras el proceso.

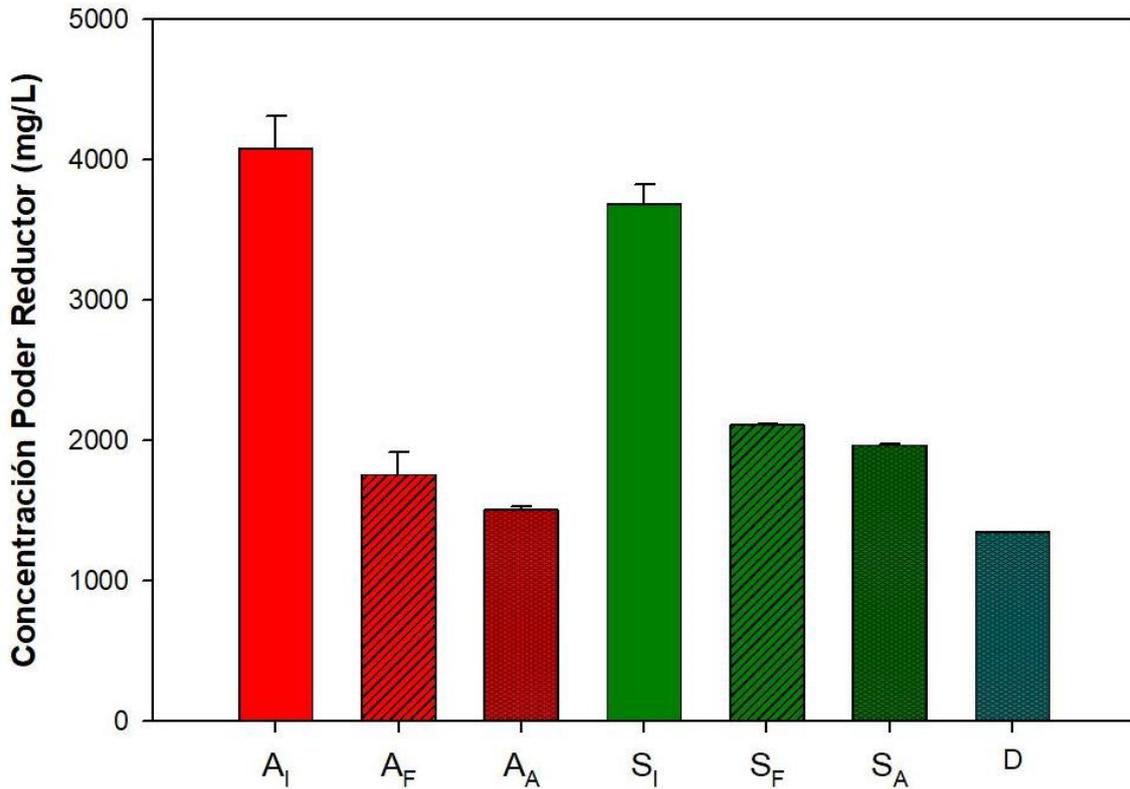


Figura 4.4.- Concentración en mg/L del poder reductor presente en los sustratos utilizados.

En la **Figura 4.5** se recogen los valores de la actividad antiradical expresados en mg equivalentes de trolox por litro. Se puede observar que de la misma forma que ocurre con el poder reductor tras el proceso de extracción de los compuestos fenólicos la capacidad de los diferentes efluentes de captar radicales libres es mucho menor que antes del tratamiento. Esta reducción de actividad antiradical de los efluentes tras la extracción de compuestos fenólicos indica que estos compuestos poseen una gran capacidad antiradical. Se puede observar que tras la extracción de azúcares también se reduce la actividad antiradical de los efluentes, probablemente debido a la eliminación de los compuestos fenólicos que se encuentran unidos a estos azúcares retirados. En algunos estudios como en los de Bakirtzi et al. (2016) se llegó a la conclusión de que existe una correlación bastante significativa entre la actividad antiradical y la concentración de este tipo de compuestos presentes en la muestra.

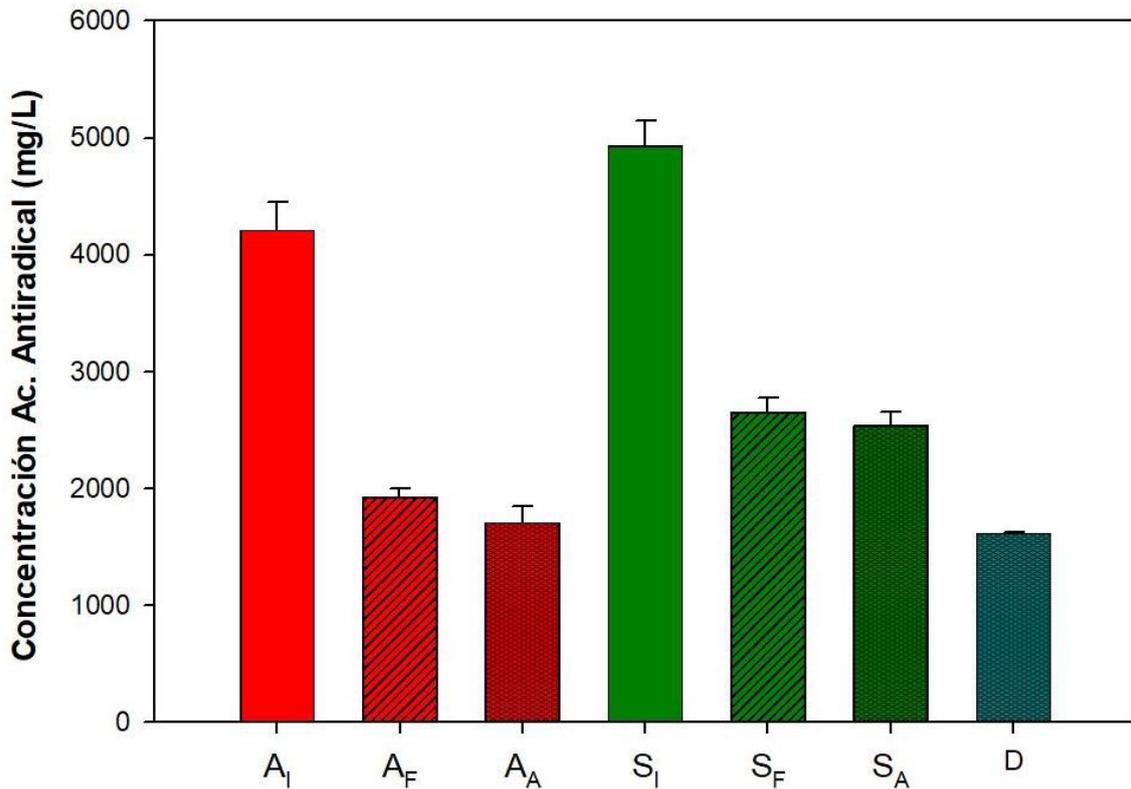


Figura 4.5.- Concentración en mg/L de la actividad antiradical presente en los sustratos utilizados.

4.1.3.- ESTUDIO DE EXTRACCIÓN DE AZÚCARES

En la **Figura 4.6** se representa la concentración de azúcares totales solubles expresados en miligramos equivalentes de glucosa por litro en los diferentes efluentes que se han utilizado en la experimentación. Se observa que la concentración de azúcares del agua acidificada se reduce aproximadamente un 23% tras el proceso de extracción de compuestos fenólicos y tras ello el proceso de extracción de azúcares consigue retirar un 16% de azúcares restantes. De la misma forma en el efluente de salmuera la concentración de azúcares se reduce un 20% en el primer procedimiento y tras él se vuelve a extraer aproximadamente un 6% de azúcares. Este descenso en la concentración de azúcares totales solubles tanto en el proceso de eliminación de compuestos fenólicos como en el de ultrafiltración puede deberse a la eliminación de los polisacáridos con un tamaño mayor a 3.000 Daltons que poseen un alto grado de polimerización y por la eliminación de azúcares que se encuentran enlazados a compuestos fenólicos (Bermúdez-Oria et al., 2023).

La extracción de este tipo de compuestos puede ser interesante debido a su multitud de opciones de uso como suplementos alimenticios o incluso en la industria agrícola como aditivo para los alimentos de animales de granja en los que se ha estudiado sus beneficios para el desarrollo intestinal y crecimiento de éstos (Ao & Choct, 2013).

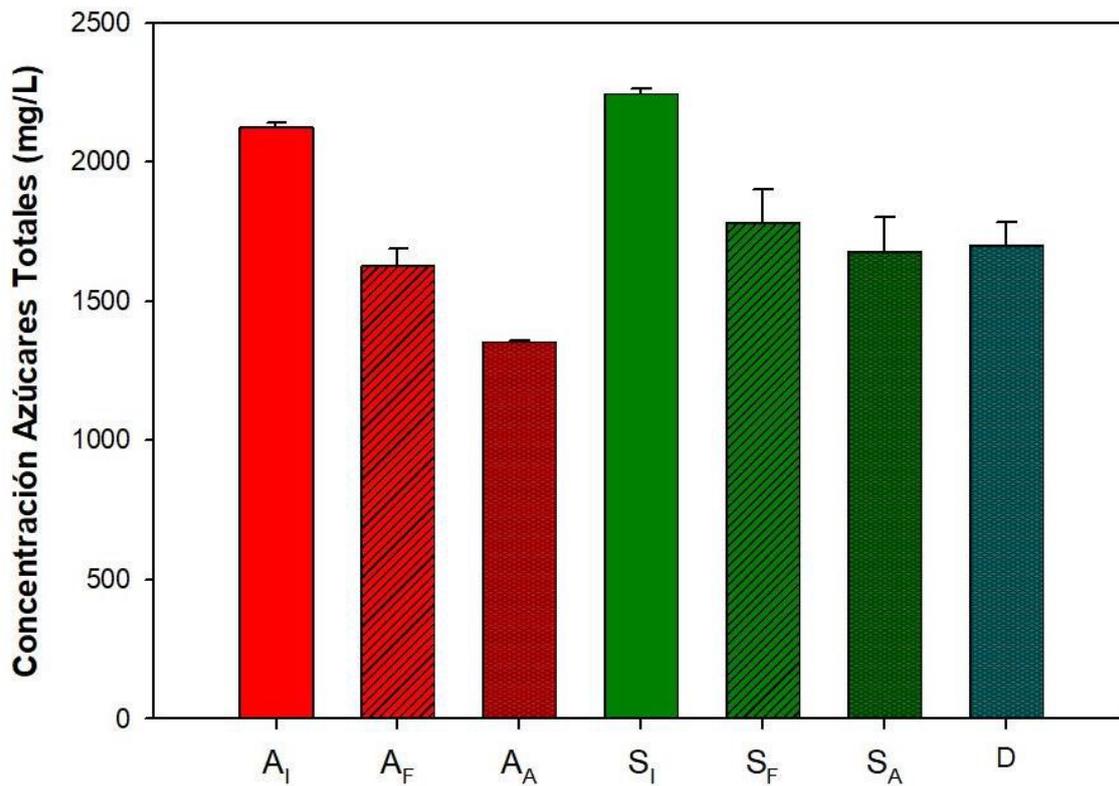


Figura 4.6.- Concentración en mg/L de azúcares totales solubles en agua presente en los sustratos utilizados.



4.2.- ESTUDIO DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO

En este apartado se estudia la producción de metano ($\text{mL CH}_4/\text{g SV}$) (**Figura 4.7**), la biodegradabilidad y estabilidad en el proceso de biometanización del agua acidificada inicial (A_I), agua acidificada sin fenoles (A_F), agua acidificada sin fenoles y sin azúcares (A_A) y la disolución 75:25 de agua acidificada sin fenoles y sin azúcares y salmuera sin fenoles y sin azúcares.

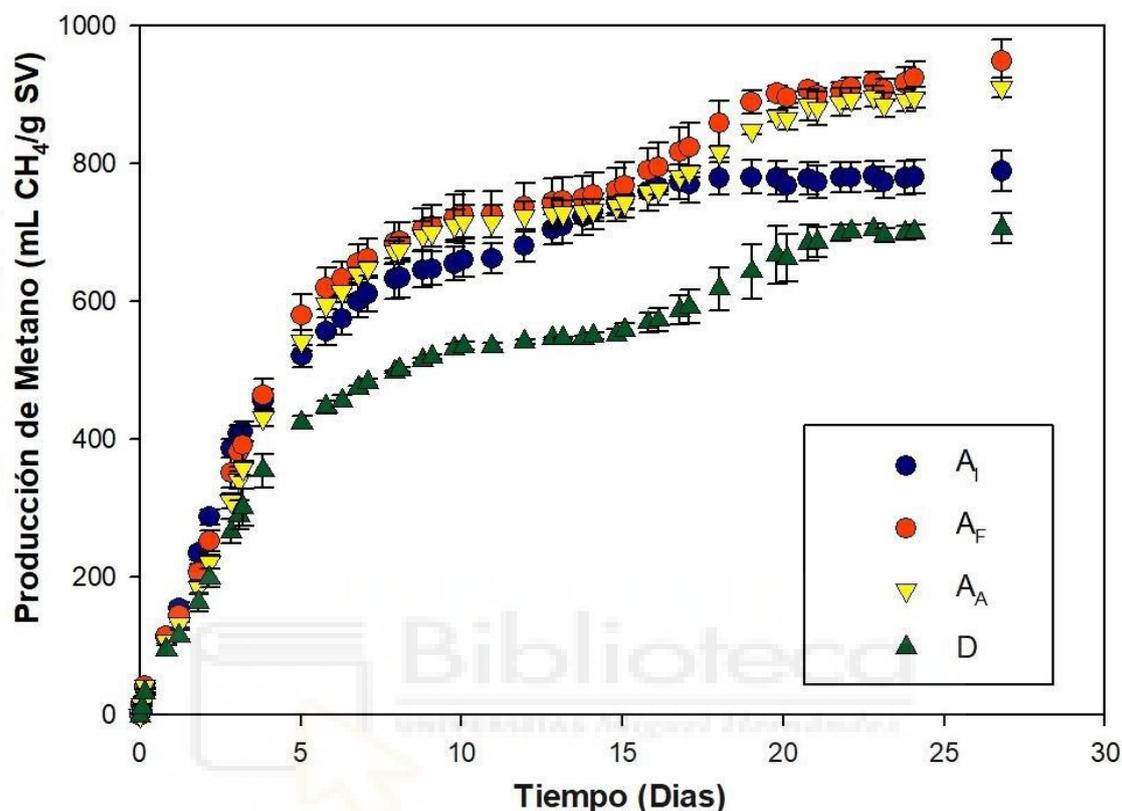


Figura 4.7.- Gráfico de la producción de metano ($\text{mL CH}_4/\text{g SV}$) del ensayo de potencial bioquímico de metano.

La producción de metano de los reactores que contenían agua acidificada (A_I) produjeron un total de $789,5 \pm 28,8 \text{ mLCH}_4/\text{g SV}$, logrando llegar a un valor de biodegradabilidad de 86,6% (**Tabla 4.4**) respecto a la cantidad de metano que teóricamente debería haber producido. La producción en los ensayos en los que el sustrato era agua acidificada sin Fenoles (A_F) presentaron la mayor producción con $949,0 \pm 30,5 \text{ mLCH}_4/\text{g SV}$, llegando a producir un 20,2% más de biometano tras el pretratamiento para la eliminación parcial de los fenoles en el efluente, logrando alcanzar un 81,5% de biodegradabilidad. Esto puede deberse a que la presencia de este tipo de compuestos puede favorecer la inhibición de la ruta metabólica de la digestión anaerobia, concretamente la fase metanogénica, por lo que retirando parte de estos fenoles se puede favorecer las reacciones que generan el biogás (Borja et al., 1997).

En los reactores en los que se usaron como sustrato el agua acidificada sin fenoles y sin azúcares (A_A) se produjo un total de $910,6 \pm 14,9 \text{ mLCH}_4/\text{g SV}$, un 15,3% más que el efluente inicial, aunque la producción en comparación con el mismo efluente con azúcares ha disminuido debido posiblemente a que la $\text{DQO}_{\text{total}}$ de este sustrato es menor, por tanto, la cantidad de materia orgánica presente también es menor. Aun así, se logró un 78,8% de biodegradabilidad con respecto a la producción de metano teórica.

Por último, el reactor que menos cantidad de biometano produjo fue el ensayo que se alimentó con un sustrato que consistía en una disolución 75:25 (D) de agua

acidificada sin fenoles ni azúcares y salmuera sin fenoles ni azúcares. Se produjo un total de $706,9 \pm 21,9$ mLCH₄/g SV llegando a un porcentaje de biodegradabilidad de 72,5%, sin embargo, la adición del efluente con gran contenido en sales produjo que se redujese la producción total un 22,37%, probablemente debido a que las sales que contiene han producido la inhibición parcial del proceso de biometanización ya que producen la plasmólisis de los microorganismos encargados del proceso de la digestión anaerobia. En otros estudios como (Zupančič et al., 2023) también han realizado ensayos en los que se utiliza efluentes salinos como sustrato para procesos de digestión anaerobia, en el que se han tenido resultados positivos donde los microorganismos encargados del proceso han tolerado concentraciones de NaCl de hasta 39,4 g/L, llegando a la conclusión de que los choques salinos a corto plazo no tienen por qué ser letales para la comunidad microbiana encargada del proceso de biometanización.

La estabilidad de los diferentes ensayos de digestión anaerobia se evaluó mediante el pH y la alcalinidad del digestato obtenido tras el final de la experimentación. Los valores de pH obtenidos se encuentran en el límite del rango recomendado para una actividad metanogénica adecuada, que varía en un rango de 7,3 a 7,8 (Wheatley, 1990). La alcalinidad final del proceso fue suficiente para poder amortiguar los diferentes cambios de pH producidos durante la experimentación, como se puede observar en los favorables valores de pH y los altos grados de biodegradabilidad.

Tabla 4.4.- Caracterización de los diferentes reactores tras en el proceso de potencial bioquímico de metano.

BMP	A _I	A _F	A _A	D
pH	7,7±0,1	7,8±0,1	7,8±0,1	7,7±0,1
Conductividad Eléctrica (mS/cm)	17±1	20±1	21±1	27±1
Alcalinidad (mg/L)	10.947±400	11.712±588	12.347±304	11.001±188
SV (mg/kg)	13.166±349	14.299±1641	14.799±179	14.167±250
ST (mg/kg)	28.568±379	29.974±1650	31.068±1330	355.427±622
DQO _{soluble} (mg O ₂ /L)	1.940±96	2.611±775	4.155±114	3.436±230
TOC (mg/L)	2.718±23	3.303±217	3.600±57	3.144±128
TC (mg/L)	2.821±14	3.416±218	3.707±64	3.243±127
IC (mg/L)	104±11	113±12	107±8	99±5
AGV Totales (mg O ₂ /L)	26±5	895±578	1.332±342	944±455
mL Exp CH ₄ /g SV (mL)	789,5±28,8	949,0 ±30,5	910,6±14,9	706,9±21,9
Biodegradabilidad (%)	86,6±3,2	81,5±2,6	78,8±1,3	72,5±2,2

En la **Figura 4.8** se representa la concentración en mg O₂/L de ácidos grasos volátiles presentes en los diferentes reactores tras el proceso de digestión anaerobia. Se puede observar que en los reactores en los que se utilizaron como sustrato el agua acidificada inicial (A_I) la concentración de ácidos grasos volátiles es prácticamente nula en comparación con el resto de ensayos, en los que la concentración de este tipo de

compuestos es mayor, llegando a presentar una mayor concentración en el caso de los reactores con agua acidificada sin fenoles y azúcares (A_A). A diferencia de los ácidos grasos volátiles presentes en los sustratos, el ácido acético (C2) es minoritario, siendo el ácido propiónico (C3) el que se encuentra en mayor proporción, ocupando aproximadamente un 83% del total.

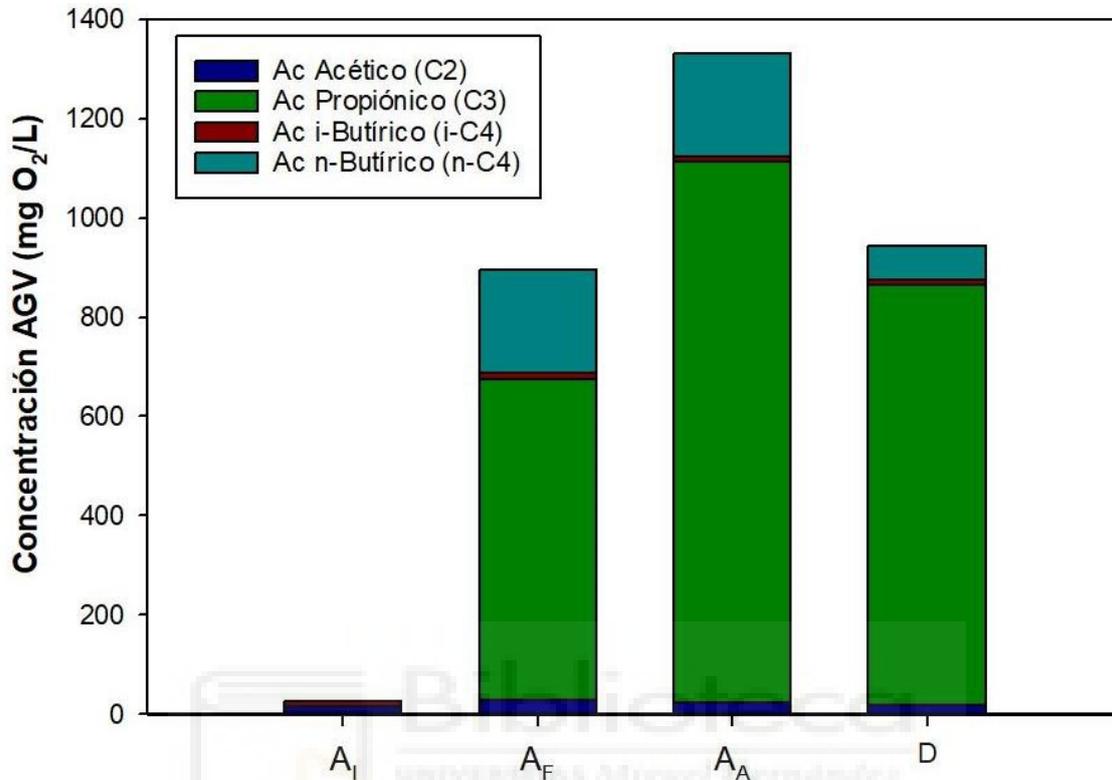


Figura 4.8.- Concentración en mgO_2/L de ácidos grasos volátiles presentes en los diferentes reactores.

4.3.- ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE IONES EN LOS REACTORES

En la **Tabla 4.5** se representa la cantidad de iones presentes en los reactores tras el proceso de digestión anaerobia en comparación con la cantidad de iones que se introdujeron en los diferentes ensayos al inicio de la experimentación. En ella se puede destacar la gran diferencia entre los iones Na^+ , debido a la gran cantidad de este tipo de cationes que proporciona la disolución tampón usada en el ensayo de biometanización. Se puede observar que la cantidad de aniones Cl^- se mantiene constante al principio y al final del ensayo, probablemente debido a que la cantidad de sales presentes en los sustratos se ha acumulado en el proceso de biometanización. También puede destacarse la eliminación parcial de los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} los cuales pueden haberse reducido debido a que los microorganismos encargados del proceso de la digestión anaerobia pueden haberlos consumido como macronutrientes durante el ensayo, haciendo que no se encuentren solubilizados en el medio. Por último, cabe destacar la disminución de la cantidad de iones NO_2^- y el aumento de iones NO_3^- , probablemente debida a la acción de las bacterias nitrificantes quimiolitótrofas (*Nitrobacter*) que pueden encontrarse en suelos y aguas, las cuales oxidan los iones nitrito en un proceso denominado nitrificación (García Rodríguez, 2015).

Tabla 4.5.- Datos de cantidad de iones acumulados teóricos y presentes en los diferentes reactores.

Cantidad Iones presentes (mg)	B		A _I		A _F		A _A		D	
	Teórica	Real	Teórica	Real	Teórica	Real	Teórica	Real	Teórica	Real
Na ⁺	6,192	19,214	9,165	73,412	10,893	87,703	20,415	93,954	66,618	128,369
NH ⁴⁺	2,113	2,687	2,113	2,497	2,113	2,424	2,113	2,326	2,113	2,397
K ⁺	4,125	4,230	19,068	18,819	25,478	24,427	26,957	26,531	21,992	21,618
Mg ²⁺	0,845	0,942	1,795	1,241	2,434	1,211	2,300	1,247	3,386	1,358
Ca ²⁺	0,159	0,325	0,895	0,313	1,219	0,437	1,286	0,497	1,157	0,529
Cl ⁻	15,423	14,487	21,321	21,174	31,711	31,063	34,349	35,114	108,047	113,534
NO ₂ ⁻	0,255	-	0,255	-	0,255	-	0,255	-	0,255	-
NO ₃ ⁻	0,240	0,473	0,240	0,443	0,392	0,429	0,408	0,438	0,402	0,455
PO ₄ ³⁻	2,068	4,159	4,455	5,575	4,413	4,368	4,246	4,299	3,974	4,078
SO ₄ ²⁻	0,530	0,864	1,732	0,882	1,170	0,724	1,097	1,008	5,134	0,935

4.4.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.4.1.- ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Una vez finalizado el ensayo y con los resultados finales del proceso de biometanización, se realizó un estudio estadístico ANOVA de un factor (**Figura 4.9**), donde se llegó a la conclusión de que se debe rechazar la hipótesis nula (H₀) en la que las medias poblacionales son iguales, aceptando por tanto la hipótesis alternativa (H₁) en la que existe una diferencia significativa entre los diferentes resultados obtenidos en al menos dos medias poblacionales.

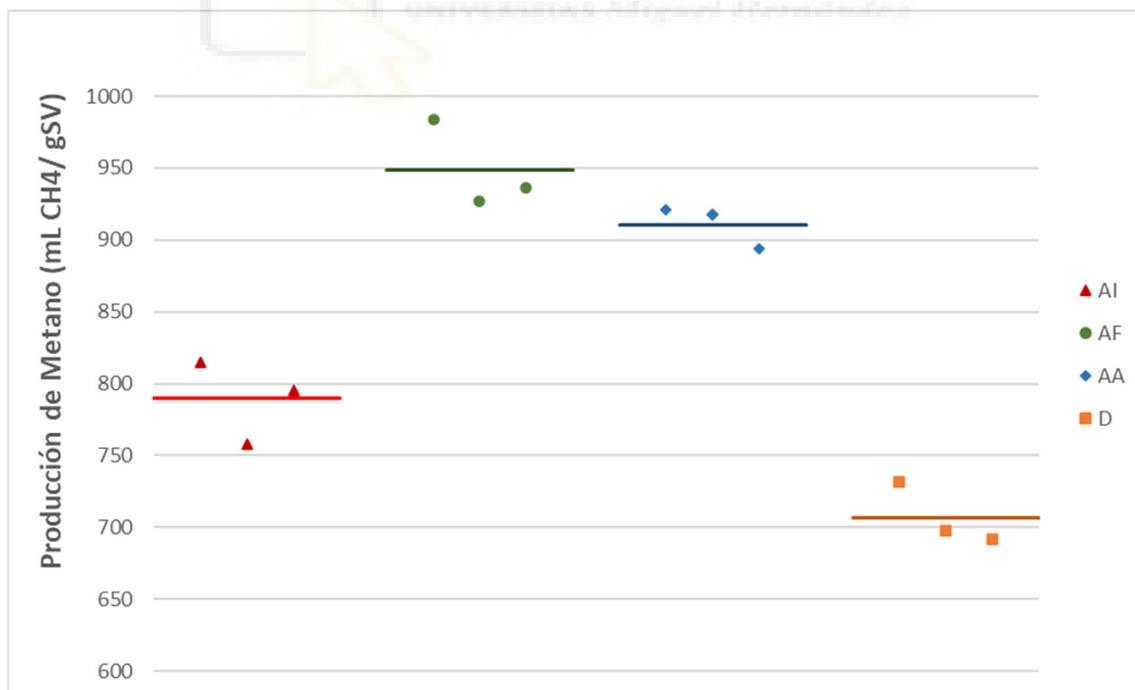


Figura 4.9.- Gráfico de la producción final de metano (mL CH₄/g SV) de los diferentes reactores en comparación con la producción media.

Tras estudiar las medias poblacionales de las producciones de los diferentes reactores se realizó un prueba de Tukey, en la que se llegó a la conclusión que no hay diferencias significativamente importantes entre los resultados obtenidos en los

reactores A_F y A_A , por lo que se puede llegar a la conclusión de que el proceso de extracción de azúcares no afectó significativamente en la producción de biogás de los diferentes reactores. Por lo que la extracción de este tipo de compuestos puede ser interesante desde el punto de vista industrial ya que se pueden obtener compuestos de interés sin afectar negativamente a un posterior tratamiento con digestión anaerobia. Sin embargo, tanto la extracción de compuestos fenólicos, como la presencia de sales proveniente de la salmuera influyeron significativamente en la producción final del proceso de biometanización. Por tanto, la extracción de compuestos fenólicos es una alternativa muy interesante a partir de la cual se pueden obtener compuestos de interés que pueden tener bastantes usos en la industria y, además, la extracción de este tipo de compuestos mejora los resultados de un posterior tratamiento de biometanización, que posibilita la obtención de biogás con este efluente residual.

4.4.2.- ESTUDIO DE LA CINÉTICA DEL PROCESO DE BIOMETANIZACIÓN

En la **Tabla 4.6** se representan los datos de los diferentes parámetros obtenidos tras realizar el estudio de la cinética de los diferentes ensayos de digestión anaerobia realizados en este estudio.

Tabla 4.6.- Datos de los diferentes parámetros relacionados con la cinética de los reactores de biometanización.

		A_I	A_F	A_A	D
G_m Exp	mL CH ₄ /g SV	660±23	747±34	744±11	559±9
G_m	mL CH ₄ /g SV	748±11	865±20	825±17	593±7
k	día ⁻¹	0,235±0,008	0,190±0,009	0,190±0,009	0,219±0,006
R_m	mL CH ₄ /(g SV·día)	176±28	164±46	156±55	130±21
r^2		0,9944	0,9878	0,9814	0,992
Error	%	13,30	15,81	10,93	6,15
S.E.E		16,08	27,79	34,93	16,34
B_m Exp	mL CH ₄ /g SV	789±29	949±31	911±15	707±22
B_m	mL CH ₄ /g SV	780±31	924±73	900±46	707±27
P	mL CH ₄ /g SV	132±5	195±12	172±13	160±8
B_0	mL CH ₄ /g SV	648±5	72±9	728±11	547±7
R_m	mL CH ₄ /(g SV·día)	24,25±0,96	31,61±2,49	31,30±1,59	29,03±1,11
λ	día	13,38±0,14	17,07±0,21	17,91±0,23	18,33±0,16
r^2		0,9914	0,9897	0,9932	0,9977
Error	%	1,20	2,64	1,18	0,19
S.E.E		3,97	7,87	5,08	3,43

S.E.E: Standard Error of Estimate

Error_{Exp} (%): ((G_m Exp - G_m Model)/ G_m Exp) · 100

Error_{Sigm} (%): ((B_m Exp - B_m Model)/ B_m Exp) · 100

En la **Figura 4.10** se observa que las cinéticas generadas a partir de los datos experimentales obtenidos siguen una cinética exponencial los primeros días de ensayo, llegando a alcanzar valores superiores a 0,99 de r^2 . Tras ello, los reactores empiezan a seguir una cinética sigmoideal (Sigmoideal; Sigmoid, 4 Parameter) en una segunda etapa del proceso, alcanzando un valor de r^2 superior a 0,99. Los bajos

valores de los errores y errores estándar de las estimaciones, nos indican que existe un buen ajuste de los datos experimentales a los modelos propuestos para los diferentes ensayos. En la etapa en la que se ajusta con un modelo exponencial se obtuvieron valores de R_m mayores para los ensayos en los que el sustrato era A_I , por lo que la velocidad de producción de metano en la primera etapa es mayor en el caso de este efluente que en los demás, esto puede deberse a que contienen una mayor cantidad de azúcares que son fácilmente asimilables para los organismos encargados del proceso. Sin embargo, en la segunda etapa en la que la cinética se ajusta a un modelo sigmoideal los R_m de los sustratos A_F y A_A presentan valores mayores siendo por tanto los que mayor velocidad de producción poseen en esta segunda fase del proceso. La **tabla 4.6** también recoge los datos del tiempo de retardo (λ) que tiene cada uno de los sustratos, los cuales presentan valores mayores para el sustrato con gran contenido en sales (D) y con los sustratos de agua acidificada aumenta a medida que se le extraen compuestos de interés. Este valor puede indicar el tiempo que tarda cada reactor en dejar de seguir un modelo cinético exponencial para comenzar a describir un comportamiento que se ajusta más a un modelo cinético sigmoideal.

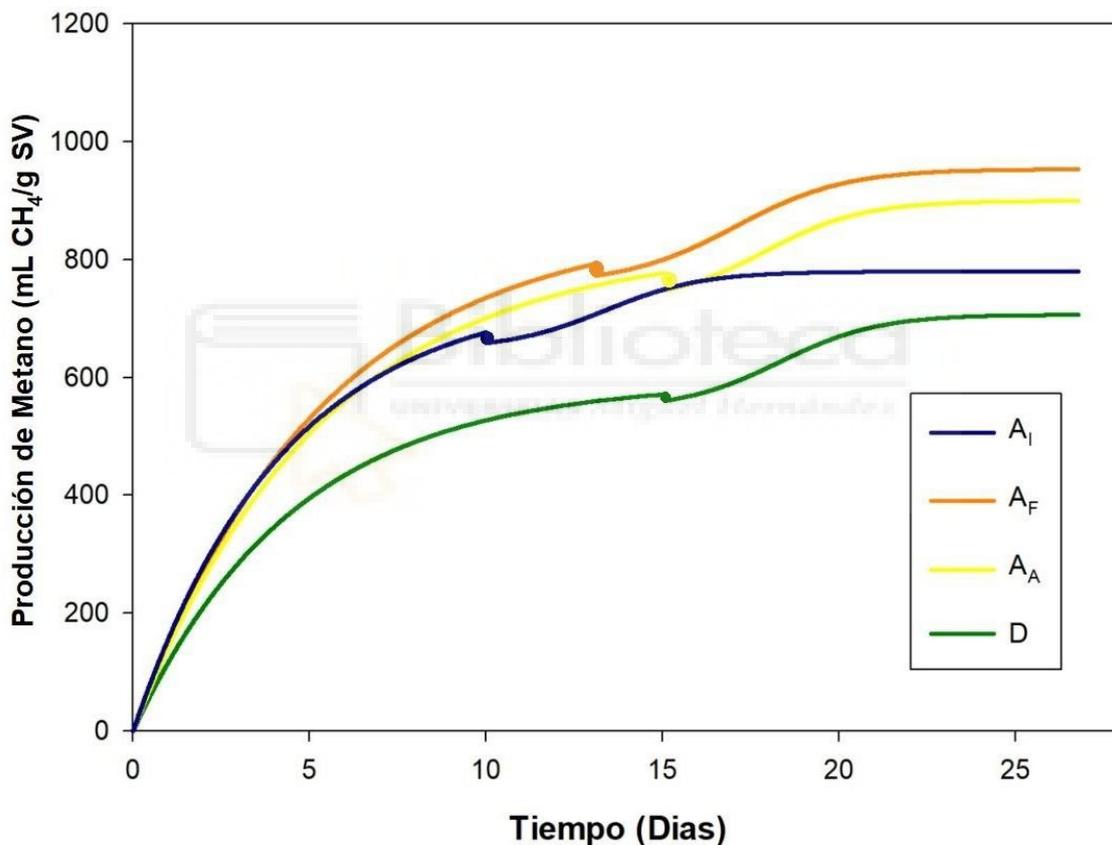


Figura 4.10.- Gráfico de los modelos cinéticos que se ajustan al comportamiento de los diferentes reactores.

5.- CONCLUSIONES

En este trabajo se ha tratado de aplicar el concepto de biorrefinería a distintas corrientes residuales que provienen de la industria de la aceituna de mesa. Para ello, se han tratado los diferentes efluentes para extraer compuestos fenólicos y azúcares con alto grado de polimerización que pueden ser utilizados en la industria como compuestos de alto valor añadido, para posteriormente, estudiar el efecto de la extracción de este tipo de compuestos en el proceso de biometanización de las corrientes resultantes de estos procesos.

Se ha observado que, a partir de estos extractos, que normalmente se tratan como un residuo sin valor, es posible la extracción de compuestos de interés industrial como azúcares o compuestos fenólicos como el hidroxitirosol o tirosol que tienen una importante actividad antioxidante, a partir de los cuales pueden obtenerse compuestos de valor añadido muy interesantes desde el punto de vista de la industria.

Tras el proceso de extracción de compuestos se ha tratado de evaluar el proceso de biometanización de los diferentes efluentes obtenidos, llegando a alcanzar una biodegradabilidad del 86,6%, obteniendo que, el proceso de producción de biometano está influenciado por la presencia de diferentes factores como pueden ser la cantidad de compuestos fenólicos o su concentración salina. Se observó que la extracción de compuestos fenólicos aumentó significativamente la producción de biometano en los reactores hasta un 20,2%, sin embargo, la extracción de azúcares con alto grado de polimerización no produjo una diferencia significativamente mayor en la producción de biogás. Finalmente, la adición en el sustrato de un efluente con una alta carga en sales produjo un descenso bastante notable en la producción de biogás debido a la inhibición de los microorganismos encargados de la producción del biogás.

Por tanto, es posible obtener compuestos de alto valor añadido como compuestos fenólicos o azúcares que pueden ser utilizados en las industrias alimentarias o farmacéuticas. Además, el uso de estos efluentes como sustratos en procesos de digestión anaerobia son una gran alternativa, ya que puede obtenerse biogás que puede ser utilizado como combustible aprovechando subproductos que normalmente se desechan y generan problemas medioambientales.

6.- BIBLIOGRAFÍA

- AceitesdeolivadeEspaña. (2023). *Variedades de aceituna*.
<https://www.aceitesdeolivadeespana.com/la-importancia-de-las-variedades/>
- Agriculture, B. (2021). *Principales variedades de olivo*.
<https://balam.es/principales-variedades-de-olivos/>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 21, Issue 2, pp. 143–152).
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Aldana, J. C., Acero, J. L., & Álvarez, P. M. (2021). Membrane filtration, activated sludge and solar photocatalytic technologies for the effective treatment of table olive processing wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105743.
<https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.105743>
- Ali, M., Elreedy, A., Ibrahim, M. G., Fujii, M., Nakatani, K., & Tawfik, A. (2019). Regulating acidogenesis and methanogenesis for the separated bio-generation of hydrogen and methane from saline-to-hypersaline industrial wastewater. *Journal of Environmental Management*, 250, 109546.
<https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2019.109546>
- Ao, Z., & Choct, M. (2013). Oligosaccharides affect performance and gut development of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(1), 116 – 121. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12414>
- Arévalo, C. M. S., Jiménez, Á. J., Alcaina, C. C., Vela, M. C. V., & Blanco, S. Á. (2021). Effect of the operating conditions on a nanofiltration process to separate low-molecular-weight phenolic compounds from the sugars present in olive mill wastewaters. *Process Safety and Environmental Protection*, 148, 428–436. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2020.10.002>
- Bakirtzi, C., Triantafyllidou, K., & Makris, D. P. (2016). Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), 120–127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.003>
- Ballesteros-Gómez, A., Serrano-Crespín, A., & Rubio, S. (2023). Supramolecular-solvent based extraction of hydroxytyrosol from brines of the processing of table olives. *Separation and Purification Technology*, 322, 124351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.124351>
- 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/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>
- Bermúdez-Oria, A., Fernández-Prior, A., Luisa Castejón, M., Rodríguez-Gutiérrez, G., & Fernández-Bolaños, J. (2023). Extraction of polyphenols associated with pectin from olive waste (alperujo) with choline chloride.

- Food Chemistry*, 419, 136073.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136073>
- BOE. (2023). *Ley 3/2023, de 30 de marzo, de Economía Circular de Andalucía*.
<https://www.boe.es/eli/es-an/l/2023/03/30/3>
- 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(2), 121–133.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00055-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00055-6)
- C. Larrauri, J. A. & S. F. S. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270–276. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199802\)76:2%3C270::AID-JSFA945%3E3.0.CO;2-9](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2%3C270::AID-JSFA945%3E3.0.CO;2-9)
- Carmona, S. J., Castro, A. De, & Navarro, L. R. (2011). Proceso tradicional de aderezo de aceitunas verdes de mesa. Racionalización del cocido. *Grasas y Aceites*, 62(4), 375–382. <https://doi.org/10.3989/gya.114610>
- Castillo, M. C. (2019). *Purificación biológica de biogás por microorganismos metanógenos hidrogenotróficos*. <http://hdl.handle.net/11627/4962>
- Che, L., Yang, B., Tian, Q., & Xu, H. (2022). Iron-based biochar derived from waste-activated sludge enhances anaerobic digestion of synthetic salty organic wastewater for methane production. *Bioresource Technology*, 345, 126465. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126465>
- Cifuentes-Cabezas, M., Pavani, A., Vincent-Vela, M. C., Mendoza-Roca, J. A., & Álvarez-Blanco, S. (2023). Concentration of phenolic compounds from olive washing wastewater by forward osmosis using table olive fermentation brine as draw solution. *Environmental Technology & Innovation*, 30, 103054. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2023.103054>
- Dische, Z. (1962). General color reactions. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1, 478–512.
- E. Makris, D. P. K. S. & K. P. P. (2022). Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 1014–1020. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.1124>
- E. W. Bridgewater, L. & A. P. H. A. R. (2012). Standar Methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association*, 10.
- elDíadeCórdoba. (2022). *AEMO inicia en Lucena unas jornadas sobre la recuperación de balsas de alpechín*. https://www.eldiadecordoba.es/provincia/AEMO-Lucena-jornadas-recuperacion-balsas-alpechin_0_1653734640.html
- Erkoç, F., Keskin, N., & Erkoç, Ş. (2003). Theoretical investigation of hydroxytyrosol and its radicals. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 625(1), 87–94. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(03\)00006-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-1280(03)00006-X)
- Europarl.europa.eu/. (2023). *Economía circular: definición, importancia y beneficios*.

<https://www.europarl.europa.eu/news/es/headlines/economy/20151201ST005603/economia-circular-definicion-importancia-y-beneficios#:~:text=La%20econom%C3%ADa%20circular%20es%20un,de%20los%20productos%20se%20extiende.>

- Galeote, D. C., Ghomari, I., Asehraou, A., & González-López, J. (2022). Revealing the bacterial abundance and diversity in brines from started Spanish-style green table olives. *LWT*, *160*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113212>
- García, C. A., & Hodaifa, G. (2017). Real olive oil mill wastewater treatment by photo-Fenton system using artificial ultraviolet light lamps. *Journal of Cleaner Production*, *162*, 743–753. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2017.06.088>
- García Rodríguez, G. (2015). *Estudio de la influencia de la relación C/N en la desnitrificación y metanogénesis de aguas residuales en un reactor anaeróbico de lecho fluidizado inverso*.
- González, R. M., Juan, M. E., & Planas, J. M. (2020). Profiling of pentacyclic triterpenes and polyphenols by LC-MS in Arbequina and Empeltre table olives. *LWT*, *126*, 109310. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109310>
- Gordo, C. O. L., Mancini, E., Pedersen, P. B., Angelidaki, I., & Fotidis, I. A. (2020). Saline fish wastewater in biogas plants - Biomethanation toxicity and safe use. *Journal of Environmental Management*, *275*, 111233. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2020.111233>
- Guo, H., Ji, M., Du, T., Xu, W., Liu, J., Bai, R., Teng, Z., & Li, T. (2023). Salt stress altered anaerobic microbial community and carbon metabolism characteristics: The trade-off between methanogenesis and chain elongation. *Journal of Environmental Management*, *341*, 118111. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2023.118111>
- Hu, Y., Shi, C., Ma, H., Wu, J., Kobayashi, T., & Xu, K. Q. (2021). Biofilm formation enhancement in anaerobic treatment of high salinity wastewater: Effect of biochar/Fe addition. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *9*(4), 105603. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.105603>
- Izquierdo, G. D. P., López, F. N. A., Valero, A., Cabello, A. B., Gómez, F. R., Díaz, R. J., & Gimeno, R. M. G. (2023). Assessing *Listeria monocytogenes* growth during Spanish-style green table olive fermentation. *Food Control*, *145*, 109489. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2022.109489>
- Kargi, F., & Dinçer, A. R. (1998). Saline Wastewater Treatment By Halophile-Supplemented Activated Sludge Culture in an Aerated Rotating Biodisc Contactor. *Enzyme and Microbial Technology*, *22*(6), 427–433. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00215-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00215-9)
- L Mokrash. (1954). Determination of glucose by the antrone method. *J. Biol. Chem*, *208*(531), 55–59.
- Li, W., Gupta, R., Zhang, Z., Cao, L., Li, Y., Show, P. L., Gupta, V. K., Kumar, S., Lin, K. Y. A., Varjani, S., Connelly, S., & You, S. (2023). A review of high-solid anaerobic digestion (HSAD): From transport phenomena to

- process design. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 180, 113305. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2023.113305>
- Ma, K., Cao, Z., Cui, Y., Chen, T., Shan, S., Shi, Y., Wang, W., & Lv, J. (2021). Effect of magnetite on anaerobic digestion treating saline wastewater: Methane production, biomass aggregation and microbial community dynamics. *Bioresource Technology*, 341, 125783. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125783>
- Maricel, C., & Lopez Toro, C. (2020). *Salmuera en alimentos TECNOLOGIA DE ALIMENTOS UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12158.00324>
- Marone, A., Carmona-Martínez, A. A., Sire, Y., Meudec, E., Steyer, J. P., Bernet, N., & Trably, E. (2016). Bioelectrochemical treatment of table olive brine processing wastewater for biogas production and phenolic compounds removal. *Water Research*, 100, 316–325. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2016.05.008>
- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B., & Angelis, M. De. (2001). Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable for table olive purposes. *Food Chemistry*, 72(4), 485–490. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00268-5)
- Martín-Peláez, S., Mosele, J. I., Pizarro, N., Farràs, M., de la Torre, R., Subirana, I., Pérez-Cano, F. J., Castañer, O., Solà, R., Fernandez-Castillejo, S., Heredia, S., Farré, M., Motilva, M. J., & Fitó, M. (2017). Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: implications of human gut microbiota. *European Journal of Nutrition*, 56(1), 119–131. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1063-2>
- Micoli, L., Simeone, G. D. R., Turco, M., Toscano, G., & Rao, M. A. (2023). Anaerobic Digestion of Olive Mill Wastewater in the Presence of Biochar. *Energies*, 16(7). <https://doi.org/10.3390/en16073259>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (M.A.P.A).(2020). Anuario de estadística 2020. *ESTADISTICAS AGRARIAS*. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2020/default.aspx?parte=3&capitulo=07&grupo=12&seccion=1>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (M.A.P.A).(2023). *Aceituna de mesa*. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/aceituna.aspx>
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico de España. (2021). *ESTRATEGIA ESPAÑOLA DE ECONOMÍA CIRCULAR 21-23*. <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/economia-circular/estrategia/>
- Mohamadi, N., Meraghni, M., Necib, A., Jelaiel, L., El Arbi, M., & Bouaziz, M. (2023). Comparative Study on Chemical Composition of Green and Black Table Olives Brines of the Endemic "Sigoise" Cultivar: Recovery of high-Added Values Compounds. *Chemistry and Biodiversity*, 20(3). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200596>

- 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(2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>
- Núñez, R. L. (2007). CARACTERÍSTICAS y TRATAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA DE ADEREZO DE ACEITUNA DE MESA. *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla - CSIC*.
- Oliveira, A. L. S., Gondim, S., Gómez-García, R., Ribeiro, T., & Pintado, M. (2021). Olive leaf phenolic extract from two Portuguese cultivars – bioactivities for potential food and cosmetic application. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106175>
- Parinos, C. S., Stalikas, C. D., Giannopoulos, T. S., & Pilidis, G. A. (2007). Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *Journal of Hazardous Materials*, 145(1–2), 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.12.061>
- Phan, K.-H., Nguyen, A.-T., Le, S.-L., Ngo, T.-M., Cao, T. N.-D., Nguyen, T.-T., Le, L.-T., Mai, T.-P., & Bui, X.-T. (2023). Thermophilic anaerobic digestion and emerging methods for organic waste treatment: A review. *Bioresource Technology Reports*, 22, 101402. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2023.101402>
- Polonio, E. F., Alcaina, C. C., Roca, J. A. M., Clar, A. I., Blanco, S. Á., Piá, A. B., & Alcañiz, L. P. (2017). Brine recovery from hypersaline wastewaters from table olive processing by combination of biological treatment and membrane technologies. *Journal of Cleaner Production*, 142, 1377–1386. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2016.11.169>
- 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(2), 448–453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.03.030>
- Rifi, S. K., Souabi, S., Fels, L. El, Driouich, A., Nassri, I., Haddaji, C., & Hafidi, M. (2022). Optimization of coagulation process for treatment of olive oil mill wastewater using *Moringa oleifera* as a natural coagulant, CCD combined with RSM for treatment optimization. *Process Safety and Environmental Protection*, 162, 406–418. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2022.04.010>
- Rodríguez, M. J. F., Palenzuela, M. V., Ballesteros, M., Mancilla-Leytón, J. M., & Borja, R. (2022). Effect of different digestates derived from anaerobic co-digestion of olive mill solid waste (omsw) and various microalgae as fertilizers for the cultivation of ryegrass. *Plant and Soil*, 475(1–2), 331–342. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05370-z>
- Ruiz-Barba, J. L., Sánchez, A. H., López-López, A., Cortés-Delgado, A., & Montaña, A. (2023). Microbial community and volatilome changes in brines

- along the spontaneous fermentation of Spanish-style and natural-style green table olives (Manzanilla cultivar). *Food Microbiology*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104286>
- Scalia, G. La, Micale, R., Cannizzaro, L., & Marra, F. P. (2017). A sustainable phenolic compound extraction system from olive oil mill wastewater. *Journal of Cleaner Production*, 142, 3782–3788. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2016.10.086>
- Serrano, P. G. (2021). *Nuevos procesos de elaboración de aceitunas de mesa para el aprovechamiento integral de sus vertidos*. <http://hdl.handle.net/10433/11599>
- Serrano, P. G., de los Santos, B., Sánchez, A. H., Romero, C., Aguado, A., García-García, P., & Brenes, M. (2020). Progress on green table olive processing with KOH and wastewaters reuse for agricultural purposes. *Science of The Total Environment*, 746, 141150. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.141150>
- Singleton, V. L., & Rossi, Jr. J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- 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>
- Trujillo-Reyes, Á., Serrano, A., Cubero-Cardoso, J., Fernández-Prior, Á., & Feroso, F. G. (2022). Does seasonality of feedstock affect anaerobic digestion? *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03336-w>
- Unidas, N. (2023). *Objetivos de Desarrollo Sostenible*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- Vaccalluzzo, A., Pino, A., Russo, N., Angelis, M. De, Caggia, C., & Randazzo, C. L. (2020). FoodOmics as a new frontier to reveal microbial community and metabolic processes occurring on table olives fermentation. *Food Microbiology*, 92, 103606. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2020.103606>
- Wang, W., Wang, M., Huang, J., Zhao, X., Su, Y., Wang, Y., & Li, X. (2019). Formate-assisted analytical pyrolysis of kraft lignin to phenols. *Bioresour Technol*, 278, 464–467. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.078>
- Wheatley, A. (1990). *Anaerobic digestion: a waste treatment technology*.
- Woolard, C. R., & Irvine, R. L. (1995). Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Research*, 29(4), 1159–1168. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00239-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00239-4)
- Yay, A. S. E., Oral, H. V., Onay, T. T., & Yenigün, O. (2012). A study on olive oil mill wastewater management in Turkey: A questionnaire and experimental

approach. *Resources, Conservation and Recycling*, 60, 64–71.
<https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2011.11.009>

Yellezuome, D., Zhu, X., Liu, X., Liu, X., Liu, R., Wang, Z., Li, Y., Sun, C., Abd-Alla, M. H., & Rasmey, A. H. M. (2023). Integration of two-stage anaerobic digestion process with in situ biogas upgrading. *Bioresource Technology*, 369, 128475. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2022.128475>

Zupančič, G. D., Panjičko, M., Marinšek Logar, R., Lavrič, L., Zorec, M., & Fanel, L. (2023). Salinity Inhibition in Thermophilic Anaerobic Digestion of Organic Waste. *Applied Sciences*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/app13116590>

Zurob, E., Cabezas, R., Villarroel, E., Rosas, N., Merlet, G., Quijada-Maldonado, E., Romero, J., & Plaza, A. (2020). Design of natural deep eutectic solvents for the ultrasound-assisted extraction of hydroxytyrosol from olive leaves supported by COSMO-RS. *Separation and Purification Technology*, 248, 117054. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117054>



