



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



GICOM (Grupo de Investigación en Compostaje)

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA, BIOLÒGICA I AMBIENTAL

Escola d'Enginyeria

DEL RESIDUO AL PRODUCTO: RECUPERACIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS  
PRODUCIDAS MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO Y ESTRATEGIAS  
DE RESIDUO CERO

Tesis Doctoral

María Marín Pérez

Supervisado por:

Dr. Antoni Sánchez

Dra. Adriana Artola

Julio 2018



## **Agradecimientos**

Agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad español la financiación recibida para este estudio, englobado en los proyectos “*Del residuo al producto: aplicación de la fermentación en estado sólido para la obtención de enzimas de interés (lipolíticas, proteolíticas y lignocelulósicas) a partir de residuos industriales orgánicos*” (Plan Nacional de I+D+I, Ref. CTM2012-33663, convocatoria 2008-2011) y en el proyecto “*Estrategias de optimización de procesos de obtención de bioproductos a partir de residuos orgánicos mediante fermentación en estado sólido*” (BIOPRO, CTM2015-69513-R, Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad (convocatòria 2015)).

Gracias también a todos mis compañeros del grupo de Gicom, en especial a mis supervisores Adriana y Toni por su paciencia y por darme la oportunidad de realizar este doctorado.

Muchas gracias también a mis compañeros de la hora de comer, por la acogida y por los buenos ratos que he pasado con ellos.

Agradecer también a todo el personal administrativo de la ETSE, y a los técnicos Rosi, Pili y Manuel su inestimable ayuda.



**Adriana Artola Casacuberta**, profesora agregada del Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona y **Antoni Sánchez Ferrer**, profesor titular del Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifican:

Que María Marín Pérez ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo, con el título “Del residuo al producto: Recuperación de enzimas hidrolíticas producidas por fermentación en estado sólido y estrategias cero residuos”, que se presenta en esta memoria, la cual constituye su Tesis para optar al Grado de Doctor.

Y para que se tenga conocimiento y conste a los efectos oportunos, presentamos

Universitat Autònoma de Barcelona la citada Tesis, firmando el presente certificado.

Bellaterra, 1 de Junio de 2018

Dra. Adriana Artola Casacuberta.

Dr Antoni Sànchez Ferrer.



## Resumen de la Tesis

Las investigaciones previas, realizadas dentro del grupo de compostaje, dieron como resultado varios procesos medioambientalmente favorables para la obtención de celulasas y proteasas, mediante fermentación en estado sólido (FES) de varios residuos agro-industriales, reduciendo de este modo los residuos generados y obteniendo enzimas a bajo coste. En este trabajo, partiendo de estos resultados previos, se determinaron las condiciones más favorables de extracción de la matriz sólida de dichas enzimas, teniendo como objetivo la máxima recuperación de actividad con el menor coste posible. Para ello, se llevó a cabo la fermentación de los residuos, de acuerdo a los procedimientos optimizados en previas investigaciones, utilizando mayoritariamente reactores de 10 L de volumen de trabajo. El proceso se interrumpió en el punto de máxima actividad enzimática, llevando a cabo las consiguientes extracciones del producto bajo condiciones experimentales diferentes. Los parámetros estudiados durante las extracciones fueron el ratio sólido-líquido, el tipo de extractante y el modo de extracción. Las extracciones se realizaron principalmente a escala laboratorio, utilizando entre 200 y 500 g de material fermentado. Los resultados mostraron en todos los casos que el agua destilada resultaba ser un extractante apropiado en comparación con el tampón propuesto para cada enzima, y que el ratio de extracción óptimo oscilaba entre 1:2 y 1:3 (g:mL).

Posteriormente a la extracción, se aplicaron dos estrategias cero residuos para la gestión del sólido húmedo restante, que fueron la estabilización aerobia, para obtener un sólido semejante al compost y que pudiese servir de enmienda del suelo, y la digestión anaerobia, para la producción de biogás, la cual se prolongó aproximadamente hasta los 21 días. Los resultados mostraron que la duración del proceso de estabilización dependía de la duración de la FES y de los valores respirométricos iniciales, y que la digestión anaerobia era la opción más recomendable, debido a la alta producción de biogás, para los residuos no fermentados tras la extracción. La co-digestión con otros residuos puede ser una opción para la fibra de soja, mientras que la estabilización parece ser la opción más recomendable en el caso de la cascarilla de café y la mezcla de pelo y lodo.

También se evaluó la recuperación de actividad del extracto tras la liofilización y, en algunos casos, su conservación en el tiempo a una temperatura de 4°C, observándose una alta recuperación de actividad inicial, superior al 80% en todos los casos, excepto para la fibra de arroz. En el caso de la cascarilla de café el extracto liofilizado conservó prácticamente el



100% de su actividad durante los primeros 150 días, mientras que las proteasas obtenidas de la mezcla de pelo y lodo no sufrieron pérdidas significativas a lo largo de un año.

## Overview of the Thesis

Previous investigation, undertaken in the composting group, gave as a result several environmental-friendly processes for the production of cellulase and protease, through solid state fermentation of agro-industrial residues, decreasing this way the generation of waste and achieving as a product a low cost enzyme. The aim of the present work is, based on these previous results, the determination of the most favourable extraction conditions of the enzymes from the fermented solid, achieving the maximum recovery with the lowest possible cost. To perform the extractions, the waste was fermented, according to previous works, and the process was interrupted at the point of maximum enzyme activity. The fermentations were carried out mainly in 10 L working volume reactors, working at adiabatic regime. The fermented material was used to perform extractions under different conditions, the parameters assayed were solid-liquid ratio, extractant type and extraction mode. The extractions were performed mostly at laboratory scale, using between 200 and 500 g at each extraction. Results showed in all cases that distilled water was the best extraction agent or showed no significant difference with the use of the proposed buffer solution for each enzyme. As for the extraction ratio, the optimum one vary between 1:2 and 1:3 (g:mL) in all cases.

After the extraction, two zero waste strategies were evaluated on the moist solid, which were aerobic stabilization, in order to obtain a compost-like product to be used as organic amendment, and anaerobic digestion, which was carried out during approximately 21 days. The results showed a dependency of the stabilization process with the initial respirometric values and the length of the solid state fermentation process. Anaerobic digestion is recommended, due to the high biogas production, for the fresh residues after extraction, and co-digestion with other residues could be an option for soy fibre, while stabilization would be the best option for coffee husk and the mixture of hair and sludge.

Activity recovery after lyophilisation was also assessed, and in some cases, the activity conservation of the lyophilised extract was measured after a certain time of storage at 4 °C, showing a high initial activity recovery, above 80% in all cases except for rice fibre. Coffee husk lyophilized extract, maintained almost 100% of its activity during 150 days, while protease from the mixture of hair and sludge showed no significant losses near during year.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1	PARADIGMA DE PRODUCCIÓN.....	1
1.2	RESIDUOS.....	2
1.2.1	<i>Residuos Agro-industriales.....</i>	2
1.2.2	<i>Residuos de la industria del cuero.....</i>	4
1.3	FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.....	4
1.3.1	<i>Ventajas y desventajas de la FES y la fermentación sumergida.....</i>	5
1.4	PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EN LA INDUSTRIA.....	7
1.5	PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE PROTEASAS Y CELULASAS.....	8
1.6	PROCESADO DE LA ENZIMA.....	11
1.6.1	<i>Extracción.....</i>	11
1.6.2	<i>Purificación y liofilización.....</i>	13
1.7	GESTIÓN DEL RESIDUO SÓLIDO – ESTRATEGIAS CERO RESIDUOS.....	16
1.7.1	<i>Estabilización.....</i>	16
1.7.2	<i>Digestión anaerobia.....</i>	19
1.7.3	<i>Índices de estabilidad.....</i>	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1	MATERIALES UTILIZADOS.....	29
3.1.1	<i>Sustratos.....</i>	29
3.1.2	<i>Inóculos.....</i>	29
3.1.3	<i>Otros materiales.....</i>	30
3.2	EQUIPOS FES.....	30
3.2.1	<i>Escala laboratorio – Respirómetros.....</i>	30
3.2.2	<i>Escala banco de pruebas – Reactores de 4.5 L y 10 L.....</i>	32
3.2.3	<i>Planta Piloto – Reactor de 50 L.....</i>	33
3.3	RÉGIMEN DE AIREACIÓN.....	33
3.3.1	<i>Control por retro-alimentación de oxígeno.....</i>	34
3.3.2	<i>Control por OUR.....</i>	35
3.3.3	<i>Control manual.....</i>	36
3.4	PARÁMETROS DE PROCESO.....	36
3.4.1	<i>Velocidad de consumo de oxígeno (OUR).....</i>	36
3.4.2	<i>Estabilidad de la muestra.....</i>	37
3.5	CONSUMO DE OXIGENO ACUMULADO.....	37
3.6	ÍNDICE RESPIROMÉTRICO DINÁMICO (IRD).....	38
3.7	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
3.7.1	<i>Determinación de actividad de proteasas.....</i>	38
3.7.2	<i>Determinación de actividad de celulasas, ensayo de papel de filtro.....</i>	41

3.7.3	<i>Métodos rutinarios</i> .....	44
3.8	RENDIMIENTO DE RECUPERACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	46
3.8.1	<i>Parámetros de extracción</i> .....	46
3.8.2	<i>Equipos</i> .....	48
3.8.3	<i>Liofilización</i> .....	49
3.9	DIGESTIÓN ANAEROBIA – PRODUCCIÓN DE BIOGÁS.....	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>55</b>
4.1	DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE PROTEASAS PRODUCIDAS POR LA FES DE RESIDUOS, CONSERVACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y ESTRATEGIAS DE CERO RESIDUOS PARA LA GESTIÓN DEL SÓLIDO	55
4.1.1	<i>Introducción</i> .....	55
4.1.2	<i>Materiales y Metodología</i> .....	56
4.1.2.1	Reactores y materiales utilizados.....	56
4.1.2.2	Extracciones.....	56
4.1.2.3	Liofilizado.....	57
4.1.3	<i>Resultados y discusión</i> .....	57
4.1.3.1	Caracterización del material.....	57
4.1.3.2	Fermentación en estado sólido.....	58
4.1.3.3	Extracciones.....	62
4.1.3.4	Liofilización.....	73
4.1.3.5	Estrategias cero residuos.....	75
4.1.4	<i>Conclusiones</i> .....	79
4.2	DOWNSTREAM DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS MEDIANTE FES DEL RESIDUO DE CASCARILLA DE CAFÉ. RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y ESTRATEGIAS CERO RESIDUOS .....	83
4.2.1	<i>Introducción</i> .....	83
4.2.2	<i>Materiales y metodología</i> .....	84
4.2.2.1	Reactores utilizados .....	84
4.2.2.2	Extracciones.....	84
4.2.2.3	Análisis de resultados .....	85
4.2.3	<i>Resultados y Discusión</i> .....	85
4.2.3.1	Caracterización del residuo.....	85
4.2.3.2	Fermentación en estado sólido.....	87
4.2.3.3	Extracciones.....	88
4.2.3.4	Liofilización del extracto y preservación de la actividad.....	92
4.2.3.5	Estrategias Cero residuos.....	93
4.2.4	<i>Conclusiones</i> .....	97
4.3	VIABILIDAD DE LA CÁSCARA DE NARANJA, LA POMAZA DE MANZANA Y LA FIBRA DE ARROZ PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS MEDIANTE FES, PROCESADO DE LA ENZIMA Y ESTRATEGIAS CERO RESIDUO	99
4.3.1	<i>Introducción</i> .....	99
4.3.2	<i>Materiales y métodos</i> .....	99

4.3.2.1	Reactores utilizados .....	99
4.3.2.2	Extracciones.....	100
4.3.2.3	Análisis de resultados .....	100
4.3.3	<i>Resultados y Discusión</i> .....	100
4.3.3.1	Caracterización del residuo.....	100
4.3.3.2	Fermentación en estado sólido.....	101
4.3.3.3	Extracciones.....	104
4.3.3.4	Liofilización.....	110
4.3.3.5	Estrategias cero residuos.....	112
4.3.4	<i>Conclusión</i> .....	117
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>121</b>
	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>123</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>137</b>
	<b>ARTÍCULOS</b> .....	<b>139</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1 CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN DE ENZIMAS	14
TABLA 3.1 CARACTERIZACIÓN DE INÓCULOS UTILIZADOS	31
TABLA 4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS RESIDUOS DE PELO Y SOJA	58
TABLA 4.2 VALORES DE pH Y CONDUCTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE PROTEASAS DE MECLA DE FIBRA DE SOJA Y MEZCLA DE PELO Y LODO FERMENTADOS	64
TABLA 4.3 VALORES DE LOS PARÁMETROS RESPIROMÉTRICOS EN DIFERENTES FASES DE ESTABILIZACIÓN	78
TABLA 4.4 CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO UTILIZADO EN LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	85
TABLA 4.5 RESULTADOS DE ENSAYOS RESPIROMÉTRICOS, LOS VALORES DE FES SON LOS INICIALES DEL PROCESO DE COMPOSTAJE	86
TABLA 4.6 RESUMEN DE EXPERIMENTOS DE EXTRACCIÓN, TIEMPO DE EXTRACCIÓN 30 MIN	89
TABLA 4.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS UTILIZADOS EN LA FES	102
TABLA 4.8 RESULTADOS DE LA RECUPERACIÓN DE ACTIVIDAD DE LA POMAZA DE MANZANA, CÁSCARA DE NARANJA Y FIBRA DE ARROZ	105
TABLA 4.9 RECUPERACIÓN DE ACTIVIDAD TRAS LA LIOFILIZACIÓN (%)	110

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 GENERACIÓN DE RESIDUOS EU-28 . PORCENTAJE RESPECTO DEL TOTAL. FUENTE:EUROSTAT	1
FIGURA 1.2 FASES DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO. FUENTE: MITCHELL ET AL. 2006	5
FIGURA 1.3 PROCESO DE OBTENCIÓN DE ENZIMAS MEDIANTE FERMENTACIÓN. FUENTE: SINGHANIA ET AL. 2010	8
FIGURA 1.4 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL PROCESO DE COMPOSTAJE. FUENTE: GONZÁLEZ ET AL. 2014	18
FIGURA 3.1 RESIDUOS UTILIZADOS A) MEZCLA DE LODO Y PELO ESTRUCTURADO B) FIBRA DE SOJA ESTRUCTURADA C) CASCARILLA DE CAFÉ D) POMAZA DE MANZANA, E) CÁSCARA DE NARANJA F) FIBRA DE ARROZ	30
FIGURA 3.2 RESPIRÓMETRO DINÁMICO (UNA LÍNEA)	32
FIGURA 3.3 REACTORES FERMENTACIÓN AEROBIA DE 4.5 Y 10 L	33
FIGURA 3.4 GESTIÓN ON LINE DE LOS DATOS DE CAUDAL, TEMPERATURA Y O <sub>2</sub>	34
FIGURA 3.5 REACTOR DE 50 L	34
FIGURA 3.6 ESQUEMA DEL ALGORITMO SEGUIDO PARA EL CONTROL DE CAUDAL DE AIRE SUMINISTRADO AL REACTOR POR OUR F: CAUDAL VOLUMÉTRICO DE AIRE (mL min <sup>-1</sup> ), OUR: OXYGEN UPTAKE RATE (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ). FUENTE: PUYUELO 2010	35
FIGURA 3.7 RECTA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACIÓN DE L-TIROSINA	40
FIGURA 3.8 RECTA DE CALIBRADO L-GLUCOSA	43
FIGURA 4.1 PERFIL DE TEMPERATURA (LÍNEA CONTINUA), OUR1H (LÍNEA PUNTEADA), ACTIVIDAD (PUNTOS NEGROS), pH (DIAMANTES AZULES) Y PORCENTAJE DE HUMEDAD (TRIÁNGULOS ROJOS) DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE LA MEZCLA DE PELO Y LODO(1:2 G:G) ESTRUCTURADA CON ASTILLA DE MADERA (1:1 mL:Ml)	59
FIGURA 4.2 PERFIL DE TEMPERATURA (LÍNEA CONTINUA), OUR1H (LÍNEA PUNTEADA), ACTIVIDAD (PUNTOS NEGROS) Y HUMEDAD (TRIÁNGULOS ROJOS) DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE LA MEZCLA DE PELO Y LODO (1:2 G:G) ESTRUCTURADA CON ASTILLAS DE MADERA (1:1 mL:Ml)	60

FIGURA 4.3 PERFIL DE TEMPERATURA (LÍNEA CONTINUA), OUR1H (LÍNEA PUNTEADA) Y ACTIVIDAD (PUNTOS NEGROS) DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE LA MEZCLA DE PELO Y LODO (1:2 G:G) ESTRUCTURADA CON ASTILLAS DE MADERA (1:1 mL:Ml)	61
FIGURA 4.4 PERFIL DE TEMPERATURA (LÍNEA CONTINUA), OUR1H (LÍNEA PUNTEADA), ACTIVIDAD (PUNTOS NEGROS), PH (DIAMANTES AZULES) Y HUMEDAD (TRIÁNGULOS ROJOS) DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE FIBRA DE SOJA ESTRUCTURADA CON ASTILLAS DE MADERA (1:1 mL:Ml)	62
FIGURA 4.5 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEICA VARIANDO EL RATIO DE EXTRACCIÓN SÓLIDO:LÍQUIDO (G:Ml) Y EL TIPO DE EXTRACTANTE. TB: HCL-TRIS BUFFER 8.1, AD: AGUA DESTILADA, 1, 2, 3 Y 4: RATIOS DE EXTRACCIÓN G:Ml 1:1, 1:2, 1:3 Y 1:4 RESPECTIVAMENTE. LAS LETRAS MOSTRADAS EN LAS BARRAS MARCAN LOS VALORES QUE NO PRESENTAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DENTRO DE LA FIGURA, LOS NÚMEROS MARCAN LOS VALORES QUE NO PRESENTAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS COMPARANDO LAS DIFERENTES FIGURAS 4.5 A), B) Y C), SEGÚN ANOVA. A) MODO DE EXTRACCIÓN ESTÁTICO, B) MODO DE EXTRACCIÓN AGITADO, C) MODO DE EXTRACCIÓN RECIRCULADO	67
FIGURA 4.6 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEICA REALIZANDO EXTRACCIONES A UNA CANTIDAD DE SOLIDO SUPERIOR A 1.5 KG	71
FIGURA 4.7 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEICA DE EXTRACCIONES CONSECUTIVAS SOBRE LA MISMA MASA DE SÓLIDO FERMENTADO AD: AGUA DESTILADA; TB: HCL-TRIS BUFFER 0.05 M pH 8.1. A) PELO Y LODO, B) FIBRA DE SOJA	72
FIGURA 4.8 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE ACTIVIDAD DE 2 MUESTRAS DE 15 mL DE EXTRACTO FRESCO LIOFILIZADO EN FALCONS (LINEA ROJA) Y DE 500 mL DE EXTRACTO FRESCO LIOFILIZADO (LÍNEA NEGRA). AMBOS SÓLIDOS REDISUELTOS EN AD	74
FIGURA 4.9 VOLUMEN DE BIOGÁS PRODUCIDO EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE A) DE PELO Y LODO FERMENTADOS PROCEDENTES DE DOS PROCESOS DE FERMENTACIÓN INDEPENDIENTES (CIRCULO INVERTIDO, CÍRCULO)B) DE FIBRA DE SOJA FRESCA (DIAMANTE ROJO), Y DE FIBRA DE SOJA FERMENTADA Y EXTRAÍDA PROCEDENTE DE TRES PROCESOS DE FERMENTACIÓN DIFERENTES (CUADRADO NEGRO, TRIANGULO INVERTIDO NEGRO, CIRCULO NEGRO)	75
FIGURA 4.10 PERFILES DE TEMPERATURA (LÍNEA CONTINUA), OUR1H (LÍNEA DISCONTINUA), PORCENTAJE DE HUMEDAD (TRIANGULOS ROJOS) Y PH (DIAMANTES AZULES) DURANTE EL PROCESO DE ESTABILIZACIÓN DE MATERIAL FERMENTADO Y EXTRAÍDO A) MEZCLA DE PELO Y LODO, B) FIBRA DE SOJA	77
FIGURA 4.11 RESUMEN DE LOS EXPERIMENTOS Y RESULTADOS REALIZADOS EN EL CAPÍTULO 4	81
FIGURA 4.12 PERFIL DE TEMPERATURA (LÍNEA CONTINUA) Y OUR1H (LÍNEA DISCONTINUA) DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE CASCARILLA DE CAFÉ INOCULADA CON COMPOST	87
FIGURA 4.13 RECUPERACIÓN DE ACTIVIDAD DE EXTRACCIONES CONSECUTIVAS SOBRE CASCARILLA DE CAFÉ FERMENTADA	91
FIGURA 4.14 RECUPERACIÓN DE ACTIVIDAD DE MUESTRAS OBTENIDAS CON UN RATIO DE EXTRACCIÓN 1:2 G:Ml TRAS LA CONGELACIÓN (CÍRCULOS VERDES) Y EL LIOFILIZADO (CÍRCULOS NEGROS); Y MUESTRAS OBTENIDAS CON UN RATIO DE EXTRACCIÓN 1:5 G:Ml TRAS LA CONGELACIÓN (CUADROS VERDES) Y TRAS LA LIOFILIZACIÓN (CUADRADOS NEGROS).	92
FIGURA 4.15 PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A TRAVÉS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE CASCARILLA DE CAFÉ FRESCA (PUNTOS ROJOS), CASCARILLA DE CAFÉ FERMENTADA TRAS LA EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA (PUNTOS	



MORADOS) Y CASCARILLA DE CAFÉ FERMENTADA ANTES DE LA EXTRACCIÓN (PUNTOS VERDES). EL RESULTADO ES LA MEDIDA DE TRES DIGESTIONES INDEPENDIENTES	94
FIGURA 4.16 PERFILES DE OUR1H (LÍNEA DISCONTINUA) Y TEMPERATURA (LÍNEA CONTINUA) DE PROCESOS DE ESTABILIZACIÓN AEROBIA DE CASCARILLA DE CAFÉ FERMENTADA A) ANTES DE LA EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA Y B) DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA	96
FIGURA 4.17 PERFILES DE TEMPERATURA (LÍNEA SÓLIDA), OUR1H (LÍNEA DISCONTINUA), pH (PUNTOS NEGROS) Y ACTIVIDAD CELULASA (DIAMANTES BLANCOS) DURANTE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE UNA MEZCLA DE RESIDUO Y COMPOST 9:1 G:G ESTRUCTURADO CON ASTILLAS DE MADERA 1:1 M <sup>L</sup> :M <sup>L</sup> DE A) CÁSCARA DE NARANJA, B) POMAZA DE MANZANA Y C) FIBRA DE ARROZ	103
FIGURA 4.18 EXTRACTOS EN MODO AGITADO Y MODO ESTÁTICO DE LA CÁSCARA DE NARANJA USANDO AD A RATIO 1:3 (G:M <sup>L</sup> )	107
FIGURA 4.19 RECUPERACIÓN DE ACTIVIDAD EN EXTRACCIONES CONSECUTIVAS A) CÁSCARA DE NARANJA B) POMAZA DE MANZANA, C) FIBRA DE ARROZ	109
FIGURA 4.20 PRODUCCIÓN DE BIOGÁS TRAS 25 DÍAS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LA POMAZA DE MANZANA EXTRAÍDA (PUNTOS NEGROS), CÁSCARA DE NARANJA EXTRAÍDA (PUNTOS ROJOS), FIBRA DE ARROZ EXTRAÍDA (PUNTOS VERDE OSCURO) Y FIBRA DE ARROZ SIN EXTRAER (PUNTOS VERDE CLARO)	112
FIGURA 4.21 POMAZA DE MANZANA A) TRAS LA EXTRACCIÓN B) TRAS LA FASE DE ESCURRIDO	114
FIGURA 4.22 PERFILES DE TEMPERATURA (LINEA CONTINUA), OUR1H (LÍNEA PUNTEADA), ACTIVIDAD CELULASAS (PUNTOS NEGROS) Y ACTIVIDAD PROTEASAS (PUNTOS VERDES) DURANTO LOS PROCESOS DE ESTABILIZACIÓN DE A) CÁSCARA DE NARANJA, B) POMAZA DE MANZANA Y C) FIBRA DE ARROZ	116

# *Capítulo 1*

---



# 1 Introducción

## 1.1 Paradigma de producción

El modelo económico lineal que impera en la actualidad, se basa en la utilización de recursos naturales para la fabricación de productos que, tras finalizar su vida útil, se convierten en residuos, y son gestionados como tales. En el 2014, la totalidad de residuos generados en Europa por la totalidad de actividades económicas y hogares, ascendió a más de 2503 millones de toneladas (Figura 1.1), lo que supuso un gran desperdicio de recursos y energía.

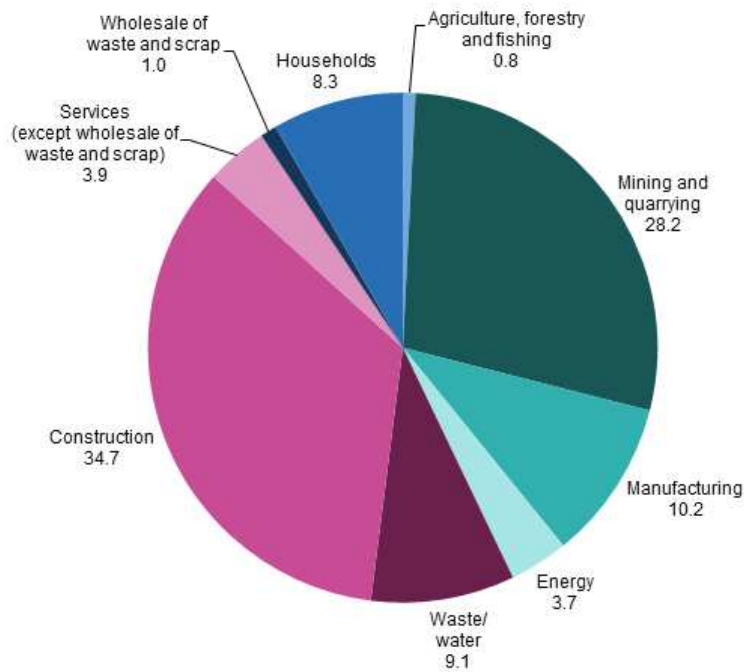


Figura 1.1 Generación de residuos EU-28 . Porcentaje respecto del total. Fuente: Eurostat

En los últimos tiempos, ha surgido un nuevo paradigma en el que los residuos pasan a ser materias primas, que pueden ser utilizados en la fabricación u obtención de nuevos productos. Este proceso productivo circular comporta varias ventajas, tanto para los consumidores como para los fabricantes, ya que los recursos resultan más económicos al no ser obtenidos desde cero, por lo que el producto resulta más barato, además de generar menos cantidad de residuos finales. En 2014, se trataron en Europa 2320 millones de toneladas de residuos, que excluían los grandes residuos de la minería, de los cuales, un 36.2%, se envió a operaciones de valorización, aunque casi la mitad, 47,4%, fue enviado a vertedero, por lo que resultan necesarias más políticas de gestión.

De entre los diferentes grupos de residuos generados, los residuos agro-industriales y animales se caracterizan por presentar un alto contenido en componentes bio-activos. Muchos de estos residuos agro-industriales y animales no son tratados, o bien se hace indebidamente, mediante su quema o depósito incontrolado en vertedero (Sadh et al. 2018), lo que conlleva problemas como el aumento de gases de efecto invernadero. Estos residuos pueden ser usados como una fuente alternativa de producción de biogás, bio-fuel o productos de alimentación animal, además de constituir la materia prima para muchas investigaciones e industrias. Dentro de estos dos últimos campos los residuos pueden ser utilizados en la producción de vitaminas, antioxidantes, antibióticos, alimento animal y sobretodo enzimas, ampliamente demandadas por gran cantidad de industrias (Sadh et al. 2018). Siguiendo esta línea de economía circular, la posibilidad de obtener productos de alto valor añadido, como enzimas o biopesticidas, a partir de residuos orgánicos, resulta una opción muy atractiva desde el punto de vista medioambiental y económico.

Por este motivo, desde la administración, se han impulsado diferentes proyectos de investigación enfocados a la obtención de bioproductos a partir de residuos. El presente trabajo, se engloba dentro del proyecto “Del residuo al producto: aplicación de la fermentación en estado sólido (FES) para la obtención de enzimas de interés (lipolíticas, proteolíticas y lignocelulósicas), a partir de residuos industriales orgánicos”, concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación al grupo de compostaje (GICOM) de la Universidad Autónoma de Barcelona.

## **1.2 Residuos**

### ***1.2.1 Residuos Agro-industriales***

Para cubrir la demanda de alimentos actual y de materias primas vegetales para algunas industrias, como la cosmética o la industria química, actualmente se dedica a la agricultura una superficie aproximada de 3000 millones de hectáreas en todo el mundo, un 11% de la superficie terrestre (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, 2011). Muchos de estos cultivos generan gran cantidad de residuos sólidos que contienen aun compuestos orgánicos y nutrientes, tanto en el lugar de cultivo como durante su procesamiento en instalaciones industriales.

Según la FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, 2016), durante el año 2016, los cultivos mayoritarios fueron la caña de azúcar

(2013.7 millones de toneladas), el maíz (1291.9 millones de toneladas) y el arroz (952.1 millones de toneladas). El arroz es destinado, en su mayor parte, al consumo humano directo. En su procesado, se producen residuos sólidos como cascarilla, paja, salvado, cenizas y granos de arroz rotos, que deben ser gestionados (Moraes et al. 2014). Uno de los alimentos obtenidos a partir de este cereal, es la leche de arroz, cuyo proceso de preparación genera un residuo sólido que contiene aún nutrientes como fibra, proteínas y azúcares.

Frutas como naranjas (81.7 millones de toneladas) y manzanas (135.7 millones de toneladas), fueron producidas también en grandes cantidades (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, 2016). Según la USDA (2017), la cantidad de zumo de naranja que se obtendrá durante 2018 en los principales países productores, rondaría los 1.8 millones de toneladas, mientras que de la producción de manzana, un 20% aproximadamente se destinan a la elaboración de otros productos procesados, de los cuales un 65% son alimenticios, como la sidra y el zumo (Shalini y Gupta, 2015). En la industria de bebidas cítricas a partir de naranjas, se produce gran cantidad de residuo de fruta, aproximadamente un 50%-60% de la materia prima (Zema et al. 2018), que es principalmente cáscara de naranja y frutas descartadas. Lo mismo ocurre en la fabricación de bebidas a partir de la manzana, a pesar de que el residuo de manzana generado en estos procesos posee alto contenido en agua, azúcares y fibra, lo que lo convertiría en apto como alimento animal. Sin embargo, la velocidad con la que se oxida hace que sea un pequeño porcentaje el destinado a este fin.

La soja (346.9 millones de toneladas) y el café (9.3 millones de toneladas) también se cultivan mundialmente en grandes cantidades. La soja se destina principalmente a la obtención de aceite y harina, utilizada a su vez en la elaboración de gran cantidad de productos alimentarios, tanto humanos como animales. Uno de sus usos, no tan mayoritarios, y que genera una gran cantidad de residuo orgánico, es la elaboración de bebidas de soja como sustitutivos de la leche, debido al alto contenido en proteínas de la soja, un 38% (Hartman et al. 2011). El residuo generado en este proceso sigue siendo un residuo rico en fibra, proteínas y grasas, que puede ser utilizado en alimentación animal. Como ejemplo de la cantidad de residuo generado en esta industria, la empresa Natursoy, situada en la provincia de Barcelona, fabricante de tofu y bebida de soja, produce 20 toneladas de residuo a la semana.

Por otro lado, los principales residuos generados por la industria del café son la pulpa y la cascarilla de café, de los cuales se genera 1 kg por cada kg de grano de café producido

(Franca y Oliveira, 2009), este residuo presenta un alto contenido en carbohidratos. No obstante, la presencia de sustancias como cafeína, taninos y polifenoles, que tienen un efecto tóxico, imposibilita su uso directo en alimentación animal.

### **1.2.2 Residuos de la industria del cuero**

La obtención industrial de productos de origen animal también genera gran cantidad de residuos orgánicos, que pueden ser gestionados de manera eficiente con el fin de obtener otros subproductos. Una práctica muy extendida en la ganadería, es la digestión anaerobia de estiércol y purines, para seguidamente, ser compostados y utilizados como enmienda agrícola (Flotats et al. 2009). Otros residuos como las plumas o el pelo, pueden ser utilizados como fuente de proteínas. Una de las industrias más contaminantes en la cual se generan residuos ricos en proteínas, es la industria de curtido de pieles. Para su conservación, las pieles son fuertemente saladas y almacenadas hasta su uso. Una vez que se procede a su curtido, la sal es aclarada y la piel se trata con cal e hidróxido de sodio para eliminar el pelo y la carne, generando un residuo rico en proteínas, con pH alcalino cercano a 10 y una humedad del 60%. En Igualada, la Asociación de Curtidores genera 14 toneladas al día de residuo de pelo (Abraham et al. 2014).

### **1.3 Fermentación en estado sólido**

La Fermentación en estado sólido (FES) es un proceso biológico en el cual cierto microorganismo o consorcio de microorganismos, como bacterias u hongos, crecen en un soporte sólido que contiene los nutrientes y humedad necesaria, en ausencia o casi ausencia de agua libre y en condiciones aerobias. Durante sus procesos metabólicos, los microorganismos liberan compuestos adicionales diferentes al dióxido de carbono o el alcohol, que son el producto buscado. Estos compuestos producidos son extremadamente variados, y muchos presentan actividad biológica, por lo que son llamados biometabolitos. Algunos de los compuestos producidos son enzimas, como las amilasas, proteasas, lipasas, pectinasas o celulasas. Otros compuestos producidos son: aromas, algunos pigmentos, compuestos orgánicos, como el etanol o el ácido cítrico, biopesticidas, o antibióticos como la penicilina. El producto buscado puede ser también el sólido una vez fermentado, como en el caso de algunos alimentos. Cuando el producto es un biometabolito, puede requerirse una extracción posterior de la matriz sólida, como se suele proceder en la producción de enzimas (Singhania et al. 2010).

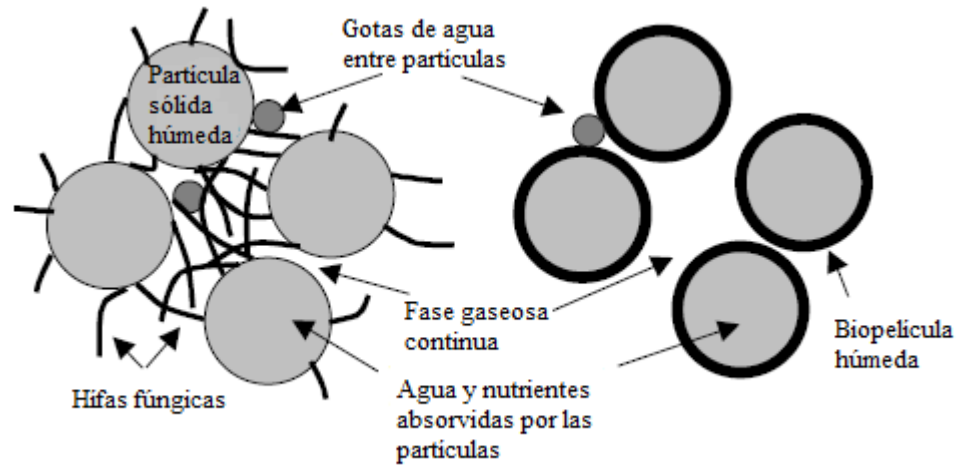


Figura 1.2 Fases de fermentación en estado sólido. Fuente: Mitchell et al. 2006

El sistema es un sistema de tres fases, sólido, líquido y gas (Figura 1.2).

La fase sólida vendría a ser el soporte sobre el que crece el microorganismo, que contiene los nutrientes necesarios. La fase líquida es la película líquida que se forma sobre el sólido, y de la cual los microorganismos obtienen el agua necesaria. La fase gas la constituye el espacio entre las partículas de sólido por donde circula el aire.

La mayoría de los procesos de FES implican la presencia de un cultivo puro de un microorganismo, como bacterias, hongos o levaduras, o el cultivo de varias cepas puras inoculadas simultánea o secuencialmente, mientras que en otros procesos, una microflora seleccionada surge de la microflora original (ej. compostaje) o de un inóculo preparado originariamente.

Históricamente, se ha utilizado la FES para obtener productos alimentarios como el tempe, salsa de soja o ang-kak (arroz rojo), en los cuales se produce el cultivo de un hongo sobre un determinado sustrato orgánico (Mitchell et al. 2006).

### 1.3.1 Ventajas y desventajas de la FES y la fermentación sumergida

Existen ventajas y desventajas en el uso de la FES frente a la fermentación sumergida (FS):

La fermentación sumergida o fermentación líquida utiliza sustratos líquidos, como melazas o un medio artificial que contenga todos los nutrientes necesarios para el microorganismo, y por lo tanto, los compuestos extracelulares son secretados en el medio líquido. Los sustratos son utilizados con rapidez, por lo que requiere un suministro continuo, lo mismo que ocurre con el oxígeno (Subramaniyam y Vimala 2012). Además, no suelen



observarse gradientes de concentración o temperatura, ya que posibilita una correcta homogeneización. El volumen de los reactores industriales suele oscilar entre 50-500 m<sup>3</sup> (Singhania et al. 2010).

La producción enzimática usando fermentación sumergida presenta altos costes, debido al tamaño y la complejidad del equipo, así como al procesado posterior del producto, ya que dependiendo de su uso, puede requerir de una purificación. Si es necesaria, puede llevarse a cabo mediante intercambio iónico o filtración de gel entre otras técnicas. El producto final puede ser un líquido concentrado que requiera ser preservado mediante sales, o bien un producto seco (Singhania et al. 2010).

El ambiente en la FES, comparada con la fermentación sumergida, es bastante estresante para el microorganismo. Por un lado, los microorganismos están expuestos a una fase gaseosa que puede desecarlos, las temperaturas pueden elevarse a valores por encima del óptimo de crecimiento, debido a una eliminación deficiente del calor metabólico producido (Ashley et al. 1999), y dentro del reactor pueden aparecer gradientes, por lo que las condiciones no serán homogéneas. A pesar de que el oxígeno está ampliamente disponible en la fase gaseosa, pueden presentarse problemas de difusión dentro de la biopelícula y de la partícula, debido a un exceso de humedad o de colmatación, producido por el crecimiento del microorganismo.

La disponibilidad de nutrientes puede ser pobre, aunque la concentración de nutrientes en general sea la requerida una vez homogeneizado el sustrato, lo que quiere decir que pueden aparecer gradientes en la concentración de nutrientes. Por otro lado, una agitación muy continuada del sólido, para evitar los gradientes mencionados, puede interferir en el crecimiento de los microorganismos y causar daños, no alcanzándose la producción deseada.

No obstante, el uso de FES presenta otras ventajas como un mayor rendimiento, ser procesos más robustos y resistentes a los contaminantes, usar equipos más económicos que los utilizados en la fermentación sumergida por su menor tamaño y simpleza de manejo, y sobre todo, es posible usar residuos sólidos como sustrato, reduciendo el impacto ambiental de los mismos y los costes del proceso (Mitchell 2006).

La fermentación sumergida es normalmente preferida en la fermentación bacteriana por la elevada humedad requerida, mientras que la fermentación en estado sólido suele aplicarse en el uso de hongos, que requieren menor potencial hídrico (Thomas et al. 2013). Más del 75% de las enzimas industriales se producen mediante fermentación líquida, aunque

en los últimos tiempos, la fermentación en estado sólido está ganando interés, debido a la posibilidad, ya mencionada, de usar residuos como sustrato.

En la literatura se reportan diferentes rendimientos, utilizando un tipo de fermentación u otra. Mazzoto et al. (2013) utilizaron 4 cepas diferentes de *Aspergillus niger* para la producción de peptidasas y queratinasas, en un medio basal que contenía plumas de ave. Para todas las cepas, la mayor producción se observó realizando la fermentación en estado sólido. La misma tendencia fue observada por Mrudula y Murugammal (2011) en la producción de celulastas, mediante la fermentación de corteza de coco en estado sólido y sumergido, utilizando *Aspergillus niger*. La producción observada fue 14 veces mayor para el proceso de fermentación en estado sólido que para la fermentación sumergida.

#### **1.4 Producción de enzimas en la industria**

Las enzimas son proteínas catalizadoras de reacciones bioquímicas. En las reacciones enzimáticas, las moléculas del sustrato son convertidas en otras diferentes denominadas producto. Las enzimas han sido utilizadas en la fabricación de alimentos desde hace siglos, pero fueron usadas de manera aislada por primera vez en 1914 en detergentes (Singhania et al. 2010).

La mayor parte de las enzimas comerciales hoy en día son producidas por microorganismos a través de procesos de FS o FES, aunque algunas son aun extraídas de tejidos animales o vegetales.

El proceso de producción de enzimas puede dividirse en los pasos mostrados en la Figura 1.3.

Los criterios usados en la selección de la enzima adecuada deben incluir especificidad, velocidad de reacción, pH y temperatura optima de estabilidad, factores que puedan inhibir la reacción y afinidad con el sustrato (Singhania et al. 2010).

En los últimos años la obtención de enzimas se ha llevado a cabo casi exclusivamente usando microorganismos debido a la facilidad de cultivo y rápida multiplicación. En general, se prefieren los productores extracelulares por facilitar la recuperación y purificación posterior. Además, el microorganismo debe presentar un alto rendimiento de producción y ser considerado seguro para la salud humana. En la literatura, se pueden encontrar gran cantidad de trabajos enfocados a la optimización de las condiciones de producción, utilizando diferentes microorganismos. Como ejemplo, das Mercês Penha (2016) utilizó una cepa

mutante de *Aspergillus niger* 11T53A14 para producir lipasas a partir de FES de la torta de aceite de palma. Ncube et al. (2012) usaron *Aspergillus niger* FGSCA733 para obtener celulasas y xilanasas mediante FES de residuo de torta de semilla de *Jatropha curcas*.

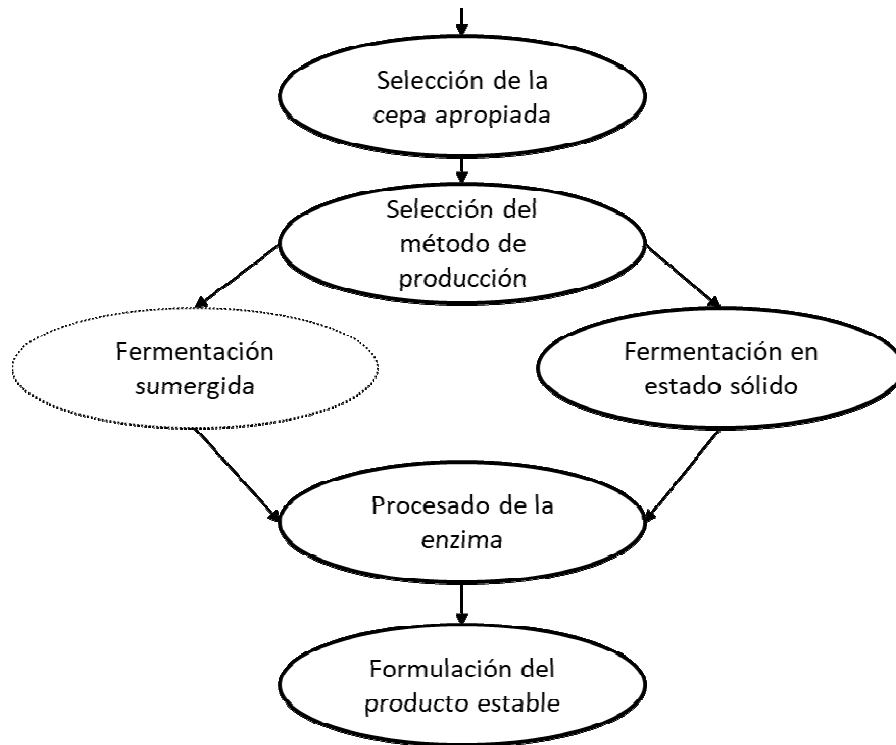


Figura 1.3 Proceso de obtención de enzimas mediante fermentación. Fuente:Singhania et al. 2010

En ciertas ocasiones no se requiere un solo tipo de enzima, sino que es necesario un consorcio de varios tipos. Zhenhong et al. (2015) utilizaron *Trichoderma reesei* CICC 40359 y *Penicillium decumbens* LSM-1 para producir celulasas y hemicelulasas utilizando como sustrato material celulósico.

## 1.5 Procesos de producción de proteasas y celulasas

Las proteasas microbianas se encuentran entre las enzimas hidrolíticas más importantes, y se utilizan en diferentes sectores industriales, como por ejemplo la fabricación de detergentes, la industria alimentaria, la del tratamiento de pieles, farmacéutica y de diagnóstico o tratamiento de residuos. Las proteasas son las enzimas más abundantes en el mercado y tienen gran variedad de aplicaciones, aunque mayoritariamente son usadas en detergentes (Li et al. 2013). Gran parte de las proteasas comerciales, principalmente neutras y alcalinas, son producidas por microorganismos *Bacillus*. Las proteasas del tipo serin producidas por *Bacillus subtilis* forman el mayor subgrupo de proteasas industriales. Estas

enzimas son comercialmente importantes como componentes degradantes o aditivos en detergentes. Existen variables mejoradas de esta enzima natural, con mayor capacidad catalítica o estabilidad frente a altas temperaturas. Algunos ejemplos de proteasas comerciales son Carlsberg subtilisin (Alcalase, Novozymes, DK) o subtilisin 309 (Savinase, Novozymes, DK) (Juntunen et al. 2009).

Existen gran cantidad de microorganismos productores de proteasas, como por ejemplo *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (Chatterjee et al. 2015), *Serratia proteamaculans AP-CMST* (Esakkiraj et al. 2011) o *Bacillus sp.* (Kandasamy et al. 2016).

No obstante, la producción de proteasas utilizando residuos como sustratos de fermentación en estado sólido, y permitiendo el crecimiento de un consorcio de microorganismos autóctono, es posible. Abraham et al. (2013, 2014) y Abu Yazid et al. (2016) consiguieron, utilizando como sustrato fibra de soja proveniente de la fabricación de bebidas vegetales, y pelo de vacuno generado por la industria del curtido, en el proceso de depilado de pieles, actividades enzimáticas de 47000 y 60000 U g<sup>-1</sup> MS, respectivamente. A través de la selección del residuo idóneo, en este caso dos residuos con alto contenido en proteínas, se consigue una biomasa especializada a partir de la población microbiana autóctona, en este caso productora de proteasas, ya que es la enzima requerida para la degradación del sustrato. Mediante esta estrategia, se consiguió un proceso robusto que no requirió esterilización previa ni inoculación de ningún microorganismo. La fermentación se llevó a cabo en un reactor de lecho empacado en condiciones de temperatura variable, no controlada, en el cual sólo fue necesario el control del caudal de aireación para garantizar condiciones aerobias y verificar una adecuada humedad inicial de la mezcla. Según Abraham et al. (2013) el residuo de fibra de soja mostró la máxima producción de proteasas el tercer día de fermentación, durante la fase termófila, mientras que el máximo de actividad para la mezcla de pelo y lodo se observó en el rango mesófilo tras 14 días de proceso (Abraham et al 2014; Abu Yazid 2016).

Por otro lado, las celulasas son las enzimas que hidrolizan el enlace  $\beta$ -1,4 de las cadenas de celulosa. Son producidas por hongos, bacterias, plantas y animales, y se clasifican dentro de una gran variedad de familias dependiendo de la secuencia de aminoácidos de su módulo catalítico y su estructura cristalina. La hidrólisis total de la celulosa es llevada a cabo por tres tipos principales de celulasas: endoglucanasas, exoglucanasas, incluyendo celobiohidrolasas, y  $\beta$ -glucosidasas. Estos tres tipos de enzima pueden ser extracelulares o hallarse ligadas a la superficie celular. Las celulasas son usadas en gran número de procesos

industriales, en la industria textil, alimentaria, detergentes o para hacer más digerible el forraje animal (Zhang y Percival, 2013). Ejemplos de preparados de celulasas comerciales son Novozymes Cellic® Ctec2, Dupont Accellerase® 1500, o DSM Cytolase CL.

El interés en las celulasas ha aumentado enormemente en los últimos tiempos, debido a la necesidad de la obtención de combustibles renovables a precios competitivos. El bioetanol es una alternativa renovable a la gasolina que puede ser utilizada por gran cantidad de motores convencionales. Además puede ser mezclado con ciertos aditivos para producir combustible líquido apto para operar en gran cantidad de motores. El etanol puede ser producido a partir de cualquier materia prima que pueda ser convertida en azúcares fermentables. Existen gran cantidad de fuentes de azúcares disponibles para fermentación, por ejemplo carbohidratos como almidón y celulosa. No obstante, la facilidad de degradación del almidón, utilizando amilasas para obtener azúcares fermentables, es mucho mayor que a partir de la celulosa, por lo que muchas veces los materiales lignocelulosicos quedan sin aprovechar. Por otro lado, no existe aún un proceso de producción de celulasas suficientemente competitivo para rentabilizar la producción de bioetanol frente a otros tipos de combustible (Bradley y Kearns, 2007).

En la literatura se han encontrado procesos de obtención de celulasas a partir de la FES de residuos como torta de aceite de palma utilizando *Trichoderma sp.* (Lah et al. 2016), o la torta del prensado de coco mediante *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 (Prajapati et al. 2018). Cerda et al. (2017a) describe un proceso de obtención de celulasas mediante fermentación en estado sólido de cascarilla de café, la cual se generó durante la fase de torrefactado. Los valores de actividad obtenida alcanzaron, según Cerda et al. (2017a), valores máximos de 9 IU g<sup>-1</sup> MS, y se obtuvieron a las 48 horas de fermentación, en un rango de temperatura termófilo, trabajando en condiciones pseudo-adiabáticas en un reactor de lecho empacado. A diferencia de la mayoría de las fermentaciones descritas en la literatura, la fermentación de cascarilla de café, se llevó a cabo primero a escala de banco de pruebas (3.5 kg), y posteriormente a escala piloto (20 kg) (Cerda et al. 2017b), mostrando que el proceso podía ser fácilmente escalable. De acuerdo con Cerda et al. (2017b), este proceso de fermentación presenta varias ventajas con respecto a otros procesos descritos en la literatura, como por ejemplo valerse de la población microbiana autóctona del residuo para realizar la FES o no requerir de control de temperatura, sino tan solo control de oxígeno para garantizar las condiciones aerobias del reactor. A través de sucesivas fermentaciones en que parte de la FES anterior era utilizado como inóculo para el siguiente proceso, fue posible obtener una

biomasa especializada, la cual puede ser utilizada en la inoculación de residuos diferentes a la cascarilla de café.

## **1.6 Procesado de la enzima**

En los procesos de fermentación en estado sólido en los que el producto deseado no es el sólido en sí, sino que debe ser separado de la matriz, como en el caso de la producción de enzimas, es necesario un paso de extracción sólido-líquido. La extracción y procesado de los bioproductos representa una parte significativa de la inversión requerida por el proceso (Gopalan and Nampoothiri, 2016). Por lo tanto, la optimización de recursos en este punto puede significar la viabilidad o no del proceso.

### **1.6.1 Extracción**

Existen varios parámetros que son optimizados en este punto. A continuación se enumeran algunos de ellos:

- i) pH del agente extractante: El pH óptimo del líquido extractante depende, por un lado, del punto isoeléctrico de la enzima, ya que si el pH se encuentra muy cerca de éste, la solubilidad de la proteína será menor (Khalid et al. 2003). Por otro lado, el pH presenta influencia en la estabilidad de la proteína, por lo que a ciertos valores de pH, puede medirse alta concentración de nitrógeno solubilizado pero baja actividad enzimática (Kishore et al. 2012).
- ii) Tipo de agente extractante: Las enzimas poseen cargas distribuidas a través de su estructura, por lo que existen interacciones polares entre los agentes extractantes y las cargas de las proteínas. Por lo tanto, el tipo de extractante, polar o no polar, molaridad del mismo en caso de ser polar o la acción de aditivos como surfactantes o detergentes, pueden tener una gran influencia en la recuperación de la enzima (Ndamitso y Abulude, 2014; Rabbani y Choi, 2018).
- iii) Ratio entre extractante y sólido: Ajustar adecuadamente la cantidad mínima de extractante necesaria es de gran importancia debido a que un exceso de extractante supondrá un gasto tanto en solvente usado como posteriormente en concentrar y purificar el producto. Dependiendo de la finalidad a la que se destine, puede ser necesaria una purificación, en la que la adición de precipitantes será requerida, y la cantidad utilizada dependerá del volumen de extracto. Por otro lado, puede ser que para la conservación de la enzima se requiera liofilizar el extracto obtenido, por lo

que un producto extremadamente diluido requerirá un mayor gasto de energía y tiempo. En cambio, si el volumen utilizado es demasiado bajo, se puede llegar a una situación de equilibrio entre la concentración de la enzima solubilizada y la presente en el sólido, ya que la solubilidad depende de la concentración, en la que la cantidad de producto presente en el sólido sea aun elevada, por lo que habrá una pérdida de producto (Kim et al. 2018; Chandra et al. 2010).

- iv) Temperatura de extracción: La solubilidad de un compuesto es una propiedad que también depende de la temperatura, por lo que normalmente a una temperatura más elevada se producirá una mayor solubilización. No obstante, la estabilidad del compuesto también depende de la temperatura, por lo será necesario determinar el valor idóneo para la extracción (Pelegri y Gasparetto 2005).
- v) Modo de extracción: Cuanto mayor es la superficie de contacto entre el disolvente y la enzima mayor será el rendimiento de extracción. Dependiendo de la naturaleza del material, su composición o el tamaño de partícula, puede ser requerida una cierta agitación para propiciar el contacto entre el sólido y el líquido. Otras veces se observa que la desintegración del sólido aumenta ostensiblemente el rendimiento de extracción (sonificación).

Todos estos factores se interrelacionan entre ellos, por lo que es recomendable realizar la optimización de todos ellos de manera conjunta, teniendo en cuenta las interacciones simultáneas.

Aunque muchos parámetros como la temperatura y la agitación son fáciles y baratos de controlar a escala laboratorio, cuando es necesaria la extracción a escala piloto, el coste de equipos y energía puede superar el beneficio obtenido con el incremento del rendimiento de extracción. En la Tabla 1.1 se muestran algunos de los estudios realizados en la extracción de proteasas y celulasas. Como puede observarse, los parámetros optimizados en cada estudio varían, así como el rango de valores escogidos para su optimización.

En el caso de la extracción de celulasas, la utilización de agua destilada como mejor extractante es reportada por Chandra et al. (2008, 2010), mientras que Pirota et al. (2013) obtuvieron máxima extracción utilizando buffer acetato a pH 4.8.

En cuanto a la extracción de proteasas, como puede verse, un extractante con pH 7 fue reportado como mejor opción por Ikasari y Mitchell (1996), Aikat y Bhattacharyya (2000) y por Freitas et al. (2013).

Por otro lado, en ambos casos, la sonificación aplicada a diferentes matrices sólidas como la fibra de lino y el lodo activado producen un incremento del rendimiento de extracción.

En el caso de la producción de celulasas usadas en la fabricación de bioetanol, según Bradley et al. (2007), el cultivo es secado y añadido directamente al tanque de fermentación de etanol, por lo que la extracción se hace innecesaria. En éste caso, el etanol es el producto final, y la enzima se produciría según la demanda del proceso global, por lo que su conservación a largo plazo no es necesaria. En general, no se encuentran muchos estudios enfocados a la optimización del procesado de enzimas sino que mayoritariamente se enfocan a optimización de las condiciones de producción. En la patente CN101818136A, se especifican las condiciones de extracción, estableciendo tiempos de agitación para la recuperación de celulasas de entre 16 y 24 horas, lo que parece excesivo comparado con los resultados obtenidos a escala laboratorio. En la patente CN107189996A, se especifica también un ratio de extracción de 1:10 (g:mL), elevado fuera de una escala laboratorio. En efecto, las pocas referencias existentes presentan trabajos realizados a escala laboratorio, realizando extracción de enzima de unos pocos gramos de material.

### ***1.6.2 Purificación y liofilización***

Una vez obtenido el extracto, la enzima puede ser purificada de acuerdo a sus características de solubilidad (precipitación mediante adición de sales), tamaño (diálisis, filtración por cromatografía de gel), carga (intercambio iónico) o especificidad de enlace (cromatografía de afinidad). Normalmente se aplica más de un proceso de separación en serie si la pureza requerida es muy elevada (Berg et al. 2002).

La liofilización es un proceso que tiene como objetivo separar el agua (u otro solvente) de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida. En el liofilizador se genera un entorno de vacío a bajas temperaturas, alrededor de -40 °C, en el cual se produce la sublimación del líquido. La liofilización es el proceso más suave para secar productos y es el mejor método para secar compuestos orgánicos o inorgánicos sin alterar su composición cualitativa o cuantitativa, y así, por ejemplo, es posible evitar la desnaturalización de las proteínas (Gaidhani et al. 2015).

La liofilización de la proteína purificada, o bien del extracto crudo en caso de no ser requerida su purificación, es un modo de concentrar la enzima, reducir el espacio de almacenamiento requerido y preservar su actividad (Anchordoquy et al. 2001).



Tabla 1.1 Condiciones óptimas de extracción de enzimas

Enzima	Sustrato	Escala de extracción	Resultado óptimo	Actividad Recuperada	Referencia
Celulasas Papel de filtro (FPA) y Carboximetil-celulasas (CMC)	Bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo	500 g	Prensado inicial 220 bar + N° extracciones (3) FPA: <b>prensado + 1 extracción (95%)</b> CMC: <b>prensado + 1 extracción (85%)</b>	FPA: 221 U g <sup>-1</sup> MS CMC: 17 U g <sup>-1</sup> MS	Roussos et al. (1992)
Celulasas Papel de filtro	Salvado de trigo	10 g	Solvente: <b>Agua destilada</b> Ratio: <b>1g salvado : 5 mL agua</b> Tiempo de extracción: <b>90 min</b> Número de extracciones: <b>1 (85%)</b> Modo de extracción: <b>Estacionario</b>	13.5 U g <sup>-1</sup> salvado	Chandra et al. (2008)
β-endoglucanasa	Salvado de trigo	10 g	Solvente: <b>Agua destilada</b> Ratio: <b>1g salvado : 4 mL agua</b> Tiempo de extracción: <b>30 min</b> Número de extracciones: <b>1 (70%)</b> Modo de extracción: <b>agitación 150 rpm</b>	16.7 U g <sup>-1</sup> salvado	Chandra et al. (2010)
Endoglucanase	Salvado de trigo	10 g MS	Solvente: <b>0.2 M buffer acetato pH 4.8</b> Tiempo de extracción: <b>10 min</b> Ratio: <b>1 g Materia húmeda (MH) : 9 mL</b> Número de extracciones: <b>1 (70%)</b> Temperatura y velocidad de agitación estudiadas pero no influyeron	35.7 U g <sup>-1</sup> MS	Pirota et al. (2013)
Poligalacturonasa	Fruta de la pasión (piel y albedo)	10 g	Velocidad agitación: <b>50 rpm</b> Tiempo de contacto: <b>45 min</b> Ratio extracción: <b>10:1 mL g<sup>-1</sup> fermentado</b>	53.70 U g <sup>-1</sup> MS	De Sousa et al. (2012)

Celulase Papel de filtro (FPA), poligalacturonasas (PGal) y lignin peroxidadas (LiP)	Fibra de lino	5 g	Frecuencia de sonicación + Estrategia de extracción (1 extracción a tiempo=t, ratio=R o 3 extracciones consecutivas a tiempo = t/3, ratio = R/3) FPA: <b>Sonificación 60%, 1 extracción a t/3 y R/3</b> PGal: <b>Sonificación 60%, 3 extracciones</b> LiP: <b>Sonificación 60%, 3 extracciones</b>	FPA: 25 U g <sup>-1</sup> MS PGal: 66 U g <sup>-1</sup> MS LiP: 425 U g <sup>-1</sup> MS	Szabo et al. (2015)
Proteasas ácidas	Salvado de arroz	10 g	Solvente: <b>2% solución NaCl</b> pH: <b>7</b> Temperatura: <b>inferior a 40 °C</b> Tiempo de contacto: <b>60 min</b> Ratio de extracción: <b>10 mL g<sup>-1</sup> de salvado</b>	20.7 U g <sup>-1</sup> MS	Ikasari and Mitchell (1996)
Proteasas ácidas	Salvado de trigo	10 g	Solvente: <b>500 mM NaCl</b> Tiempo de extracción: <b>60 min</b> (220 rpm)	8255±206 U g <sup>-1</sup> Salvado	Fernández-Lahore et al. (1998)
Proteasas	Salvado de trigo	10 g	Ratio: <b>5 mL g<sup>-1</sup> salvado</b> (agua destilada) Tiempo de extracción: <b>2h (90%)</b> Nº extracciones: <b>1 (88%)</b> pH: <b>Buffer neutro fosfato de potasio pH 7</b>	60.52 U g <sup>-1</sup> Salvado	Aikat and Bhattacharyya (2000)
Proteasas	Lodo activado	200 mL	Modo de extracción (agitación o ultrasonicación) Tiempo de extracción: <b>10 min</b> Modo extracción: <b>Ultrasonicación 4 W cm<sup>-2</sup></b> Aditivos: <b>2% v/v triton X100</b>	52.9 U g <sup>-1</sup> SV	Nabarlatz et al. (2010)
Proteasas y glucoamilasas	Salvado de trigo	10 g	Proteasas: <b>10% solución de glicerol acuosa, 120 min y 30 °C</b> Glucoamilasa: <b>10% solución de glicerol acuosa, 120 min y 40 °C</b>	Proteasa: 800 U g <sup>-1</sup> MS Glucoamilasa: 8000 U g <sup>-1</sup> MS	Negi et al. (2011)
Proteasas	Torta de canola	40 g	pH: Buffer fosfato de sodio pH 7.0	354.3 U g <sup>-1</sup> MS	Freitas et al. (2013)
Proteasas	Cascarilla de arroz	3 g	Agua del grifo	470 10 <sup>3</sup> U g <sup>-1</sup> MS	Karatas et al. (2013)

Durante el proceso de liofilización, varios factores pueden suponer una fuente de estrés y afectar a la estabilidad de la proteína. Durante la congelación, la formación de hielo es el factor crítico para su desnaturalización. También se ha observado que existen dos etapas de secado, y que la etapa secundaria presenta mucho más impacto en la conservación de la estructura, que se ve afectada por la temperatura y la duración de la misma (Kasper et al. 2013). La adición de protectores como la sacarosa pueden contribuir a la conservación de la actividad durante el proceso de liofilización (Capolongo et al. 2002; Long et al. 2010). Algunos bioprocesos de la industria farmacéutica o alimentaria requieren el uso de enzimas en disolventes orgánicos, en los cuales normalmente su actividad decrece. Mediante la liofilización de la enzima en combinación con una sal, se ha observado el aumento de su actividad en solventes orgánicos (Borole y Davison 2007).

## **1.7 Gestión del residuo sólido – Estrategias cero residuos**

Tras la extracción del producto de interés, en este caso proteasas y celulasas, obtenidos mediante FES de residuos orgánicos, el sólido remanente tras la extracción, con un contenido en humedad más elevado que el residuo inicial, necesita ser gestionado. Mediante la aplicación de estrategias cero residuos, se pretende conseguir un proceso limpio y valorizar la totalidad de la materia prima utilizada.

### **1.7.1 Estabilización**

Basado en el proceso de compostaje, en el que se produce la descomposición biológica de la materia orgánica (MO) fácilmente biodegradable, en condiciones aerobias y controladas. El producto final del proceso de compostaje es el compost, un material de valor agregado, cuyas propiedades fisicoquímicas y biológicas contribuyen a mejorar la disponibilidad de materia orgánica y nutriente en el suelo (Soto-Paz et al. 2017). Entre otras características, el compost contiene macronutrientes (N, P, K) en forma de complejos químicos que facilitan su asimilación por parte de las plantas, previene el lixiviado, regula el pH, ya que actúa como buffer, aumenta la capacidad de retención de agua del suelo, por lo que se requerirá menos frecuencia de riego y aumenta la porosidad, favoreciendo la aireación. Además, contiene una población microbiana abundante cuya actividad favorece a las plantas (Agència de Residus de Catalunya, 2018). Mediante el compostaje, se produce la reducción del volumen de residuo, su aprovechamiento agrícola y la eliminación de patógenos debido a las altas temperaturas alcanzadas en el proceso, y puede aplicarse a gran variedad de materiales y escalas de trabajo

(Agencia de Residuos de Catalunya, 2008). En la Figura 1.4 se muestra la evolución de los parámetros característicos del proceso con el tiempo.

Durante la primera fase mesófila, se descompone rápidamente la materia fácilmente biodegradable. El calor generado por la descomposición lleva a un aumento de la temperatura hasta alcanzar el régimen termófilo. En esta fase se produce la higienización del material, en la cual los patógenos que contienen algunos sustratos son destruidos. Tras la higienización, el proceso entra de nuevo en un rango de temperatura mesófilo de maduración (Epstein, 2011).

Los factores más determinantes del proceso son:

**i) Temperatura:** El calor generado depende de la cantidad de materia biodegradable contenida en la materia. Durante los cambios de temperatura, también se producen cambios en la población microbiana, necesarios para que se produzca la metabolización de todos los compuestos orgánicos. Los sistemas cerrados, tanto dinámicos como estáticos presentan un mayor gradiente de temperatura que los sistemas como las pilas aireadas, que proporcionan un mayor control de la temperatura (Agencia de Residuos de Catalunya, 2008).

**ii) C/N:** Un ratio alto C/N ralentizará el proceso de compostaje, por otro lado, si es muy bajo se liberará amoníaco provocando la aparición de olores. El valor ideal para la relación C/N está establecido entre 27 a 30 (Epstein, 2011). Puyuelo et al. (2011) propuso un método de medida del ratio de C/N biodegradable basándose en la determinación del carbono biodegradable aeróbica y anaeróbicamente ( $COB_{AE}$  y  $COB_{AN}$ ), encontrando que los ratios C/N basados en el COB son siempre más bajos que los basados en el carbono orgánico total (COT).

**iii) Humedad:** La actividad microbiológica decrece cuando la humedad en el material decrece por debajo de un 40% y se hace inexistente a un 20% de humedad. Cuando la humedad excede el 60 %, el espacio libre del material se llena de agua y la transferencia de oxígeno puede volverse deficiente, por lo que la actividad puede también disminuir (Epstein, 2011). Por lo tanto, el rango óptimo de operación se encuentra entre un 40-60% de humedad, aunque dependiendo del material puede llegar a valores superiores.

**iv) Oxígeno y aireación:** El nivel deseado de oxígeno para mantener las condiciones aerobias sería por encima del 10%, cuando el oxígeno alcanza valores bajo 5% se convierte en un factor limitante para los microorganismos aerobios (Román et al. 2013). Para que el oxígeno sea transportado hasta los microorganismos, es necesario que exista una porosidad

suficiente en el material, por lo que normalmente se utilizan agentes estructurantes, como astillas de madera, restos de poda, o materiales sintéticos como tiras de goma.

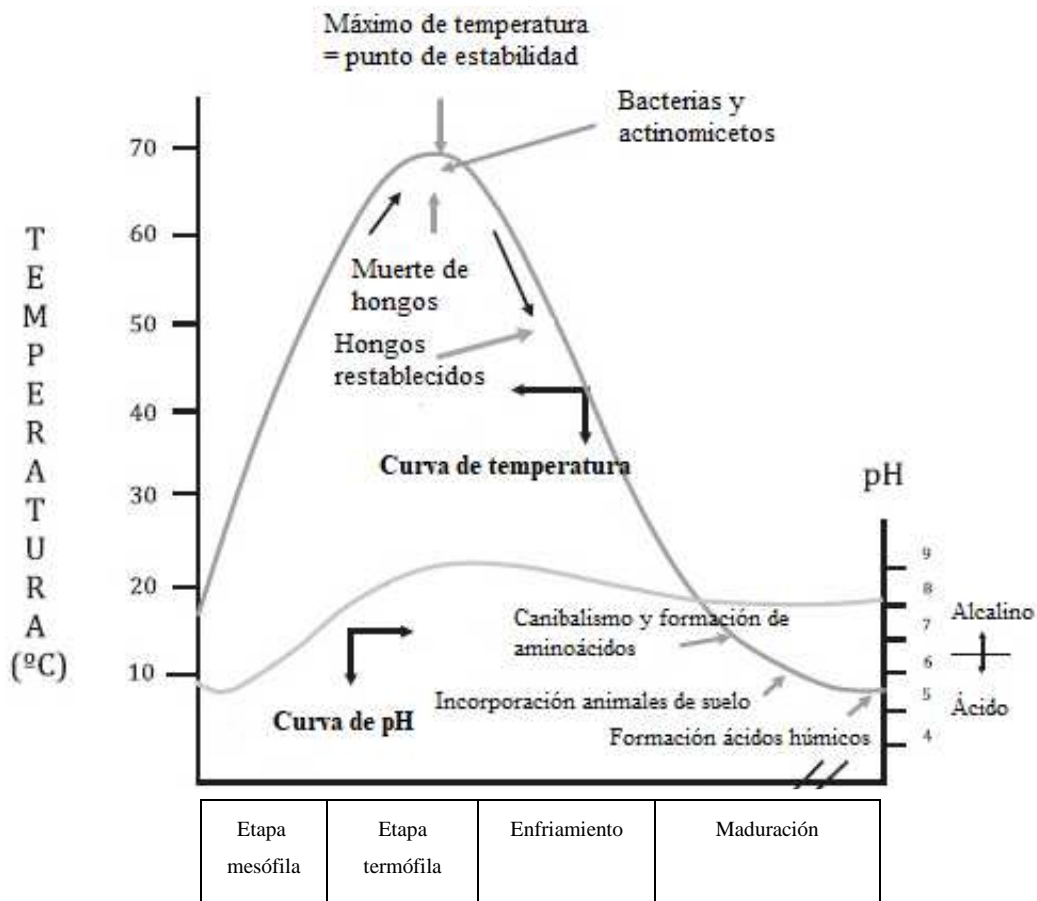


Figura 1.4 Evolución de los parámetros del proceso de compostaje. Fuente: González et al. 2014

La porosidad total no es un buen indicador de la porosidad disponible, mientras que el espacio de aire libre (FAS) sí que lo es, el cual se define como la porción de espacio de poro que no ha sido ocupado por agua, y que permite la difusión del oxígeno.

El régimen de aireación puede ser natural o forzado, en el primer caso la oxigenación se produce por convección a través del material, durante el volteo o bien al desplazarse masas de aire más caliente y ser substituido por aire frío. En este caso la porosidad y estructura del conjunto presentan gran influencia en el grado de aireación (colchón de aire, chimenea) (Román et al. 2013). En el segundo caso, la aireación se produce utilizando equipos de suministro de aire. La estrategia de aireación, en el caso de la aireación forzada, influye en la actividad biológica del material, que es más elevada en régimen ajustable (caudal variable a

requerimiento de la actividad del material) que en régimen continuo de aireación (caudal de aire continuo) (Almeira et al. 2015).

**vi) pH:** Este parámetro depende del origen de los materiales, y varía durante el proceso. En la primera etapa, el medio se acidifica por la formación de ácidos orgánicos y posteriormente, el pH aumenta durante la fase termófila, debido a la conversión de amonio en amoníaco. El valor de pH determina el grupo de microorganismos presentes, ya que cada uno presenta un pH óptimo de crecimiento. El valor de pH tiende a estabilizarse al final del proceso en valores cercanos a la neutralidad (Román et al. 2013).

**vii) Estabilidad:** La estabilidad es un estadio de la descomposición de la materia orgánica relacionada con la actividad biológica, cuanto más estable es el compost, más baja o lenta es la actividad biológica, por lo que ésta es función de la cantidad de materia orgánica inicial y del tiempo que el proceso se lleva a cabo. Un material estable no produce olores, además de presentar bajo potencial de calentamiento (Epstein, 2011).

### **1.7.2 Digestión anaerobia**

La digestión anaerobia es el proceso de degradación de materia orgánica en ausencia total de oxígeno, obteniendo como producto biogás, cuyos principales componentes son metano (CH<sub>4</sub>), entre un 50-70%, y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). El biogás producido puede ser utilizado mediante su combustión para la obtención de energía térmica, en la co-generación de electricidad y calor a través de turbinas de gas o motores de combustión interna, o como combustible para algunos vehículos (Varnero y Romero 2011).

El proceso de digestión se desarrolla en 4 fases que pueden darse simultáneamente, hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, que son llevadas a cabo por 4 tipos de microorganismos (Bajpai, 2017).

Existen dos principales procesos de digestión anaerobia dependiendo de la cantidad de sólidos totales contenidos dentro del digestor, los sistemas húmedos y los sistemas secos. Ambos sistemas presentan ventajas e inconvenientes.

La digestión seca se caracteriza por un contenido en sólidos totales de entre un 20% - 40%. Este sistema de operación requiere un suministro bajo de calor y energía, presenta alta tolerancia a los contaminantes y, aunque requiere equipos más robustos que para la digestión húmeda, son más pequeños y los pretratamientos más baratos. Por otro lado, la mezcla no se

realiza de manera óptima, por lo que la producción de biogás puede ser inferior que en la digestión húmeda. (Biogasworld, 2018).

Por su parte, la digestión húmeda presenta un contenido en sólidos totales entre un 10% y un 20%. Una de las ventajas principales es que permite una mejor mezcla del contenido del reactor, por lo que suele presentar mayor producción de biogás que la digestión seca. En este caso, la inversión inicial requerida suele ser inferior que en la digestión seca, aunque requiere mayor gasto energético en su operación. Es recomendado para lodos de aguas residuales o aguas industriales con alto contenido de DBO, ya que en el caso de los sólidos requiere una adición constante de agua. Otro requerimiento de la digestión húmeda es la separación de inertes, pesados y flotantes, por lo que si el contenido de materia inerte es mayor al 10% se recomienda la digestión seca (Biogasworld, 2018).

Algunos parámetros de operación del proceso a controlar, con el fin de conseguir una producción óptima serían los siguientes (Lorenzo y Obaya, 2005):

**i) Carga orgánica, tiempo de retención hidráulica:** La carga orgánica se define como la cantidad de sólidos volátiles (SV) por unidad de tiempo, alimentados al digestor, mientras que la retención hidráulica es el tiempo que el alimento permanece en el digestor. Una carga orgánica excesiva puede producir la inhibición del proceso por acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) en los procesos de digestión húmeda. Por otro lado, si el tiempo de retención hidráulico es demasiado bajo no se obtendrá el máximo rendimiento de biogás y el efluente de salida presentará un elevado porcentaje de SV.

**ii) Temperatura:** Existen dos modos de operación, en rango termófilo y mesófilo. Los sistemas mesófilos (37 °C) se caracterizan por ser más robustos, mientras que en los sistemas termófilos se observa mayor producción de biogás, suficiente como para compensar sus necesidades de calefacción, además de proveer una mayor higienización (Komilis et al. 2017).

**iii) Acidez:** determina la cantidad y el porcentaje de metano en el biogás, habiéndose encontrado que el valor óptimo de pH oscila entre 6,6 y 7,6 (Lorenzo y Obaya, 2005). En los sistemas de digestión seca es habitual la alta concentración de AGV debido a la mayor carga orgánica, y por tanto acidificación del medio (André et al. 2018).

**iv) Alcalinidad:** El sistema químico que regula principalmente el pH de la digestión anaerobia es el sistema dióxido de carbono/bicarbonato. La alcalinidad total en muchos sistemas es equivalente a la concentración de anión bicarbonato, no obstante, cuando la

concentración de AGV es elevada la alcalinidad total es la suma de la alcalinidad debida al anión bicarbonato y a los ácidos grasos.

### ***1.7.3 Índices de estabilidad***

En la gestión de residuos orgánicos a nivel mundial, la tendencia en los últimos años ha sido pasar de su depósito en vertedero e incineración, a tratamientos biológicos como el compostaje y la digestión anaerobia, de los cuales se pueden obtener subproductos como enmiendas orgánicas o producción de calor y electricidad. Saber la cantidad de materia biodegradable del residuo es necesario para determinar el tratamiento idóneo, con el fin de aprovechar al máximo su potencial. Cuando se toma como indicador el contenido de sólidos volátiles para la determinación de la biodegradabilidad, se produce una sobrestimación debido a la presencia de sólidos volátiles no-biodegradables, como por ejemplo plásticos, por lo que el uso de índices respirométricos (consumo de O<sub>2</sub> o producción de CO<sub>2</sub>) y de producción de biogás (CH<sub>4</sub>) son los métodos más fiables, ya que la actividad biológica se encuentra correlacionada con la actividad respirométrica. No obstante, el gran número de índices propuestos en la literatura para expresar la actividad biológica de un residuo sólido, hace difícil su comparación. La biodegradabilidad de un residuo bajo condiciones anaeróbicas puede ser medida mediante la producción de biogás durante un tiempo determinado (GBn), y el potencial de metano biológico durante un tiempo determinado (BMPn). El método de determinación de estos parámetros ha sido descrito por el Instituto alemán para la estandarización (Federal Government of Germany, 2001), fijando el tiempo en 21 días de digestión. Estos índices se expresan como litros, bien de biogás o bien de metano, en condiciones normales (temperatura de 273 K y presión 1.01325 bares) producidos por kg de sólidos totales (NL kg MS<sup>-1</sup>) (Ponsá 2010a). En cuanto a índices respirométricos, el cálculo del consumo de oxígeno acumulado tras 4 días (AT<sub>4</sub>), es obtenido de manera estática y utilizando 50 g de MS, a una temperatura de 20°C según el método establecido por el Federal Government of Germany (2001), y de manera dinámica y utilizando 400 g MS a 35°C por la UK Environmental Agency (Godley et al. 2005). Otras diferencias posibles y que dificultan la comparación entre los índices respirométricos son las unidades de cada uno, ya que pueden ser expresados en función del CO<sub>2</sub> generado o el O<sub>2</sub> consumido, de la materia seca (MS) o de la materia orgánica contenida en la muestra o bien la temperatura establecida por el método experimental. Barrena et al. (2011) propusieron una clasificación basándose en valores encontrados en la bibliografía y otros obtenidos experimentalmente en la cual los residuos orgánicos eran divididos en 3 categorías: altamente biodegradables, cuando su índice



respirométrico era mayor que  $5 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MO h}^{-1}$ , moderadamente biodegradables cuando el índice respirométrico estaba comprendido entre 2 y  $5 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MO h}^{-1}$ , y de baja biodegradabilidad, si su índice respirométrico presentaba valores por debajo de  $2 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MO h}^{-1}$ . Estos índices respirométricos o cualquier otro indicador de la actividad biológica del residuo, y por lo tanto de su estabilidad, son un indicador fiable de la efectividad de un determinado tratamiento biológico (Barrena et al. 2009). Ponsá et al. (2008), encontraron una correlación entre índices aerobios y anaerobios.

Por lo tanto, con el objetivo de generación cero residuos, cualquier tratamiento aplicado al residuo del proceso de FES más extracción, deberá permitir la obtención de un material final estable, sea cual sea el material de partida.



## *Capítulo 2*

---

## **2 Objetivos**

Las investigaciones más recientes realizadas por el grupo de Compostaje de la Universidad Autónoma de Barcelona, han sido enfocadas a la obtención de bioproductos, como enzimas (proteasas, celulasas), biosurfactantes o biopesticidas, mediante procesos de FES de residuos orgánicos industriales y urbanos, revalorizando dichos residuos como materia prima. Los objetivos de dichos proyectos se han centrado especialmente en la optimización del proceso de producción, y en su optimización a escala piloto. No obstante, para la implementación del proceso a nivel industrial, es necesario optimizar las operaciones de down-stream del producto, como su extracción de la matriz sólida y la conservación del producto una vez separado. Además, será necesaria una gestión del sólido restante tras la extracción, con una humedad más elevada que la inicial.

Por tanto, los objetivos principales de este trabajo, centrados en la obtención de enzimas de interés (celulasas y proteasas), serán:

- Optimizar las condiciones de extracción del producto final de la matriz sólida, evaluando diferentes condiciones de extracción, teniendo en cuenta las limitaciones de las mismas a escala industrial.
- Evaluar la pérdida de actividad de los extractos obtenidos cuando se someten a liofilización, ya que se trata de un procedimiento efectivo de concentración y conservación de la enzima.
- La aplicación de estrategias “cero residuo” como el compostaje o la digestión anaerobia del sólido orgánico remanente tras la extracción, con el fin de conseguir un proceso globalmente libre de residuos, con aprovechamiento del sólido sobrante como enmienda orgánica y/o para la producción de biogás.

Con ello se tiene un proceso de FES completo para unos objetivos posteriores como escalado o evaluación económica y ambiental.



## *Capítulo 3*

---



### **3 Materiales y Métodos**

En este capítulo se describen las materias primas empleadas en los experimentos, los equipos que se utilizaron, las metodologías seguidas y los cálculos realizados para la obtención de los resultados finales.

#### **3.1 Materiales utilizados**

##### **3.1.1 Sustratos**

En los experimentos realizados se utilizaron como sustratos pelo de vacuno, fibra de soja, cascarilla de café, cáscara de naranja, pomaza de manzana y fibra de arroz. El pelo de vacuno provenía del depilado químico de pieles de la industria del curtido, concretamente del establecimiento PERE CARME S.A. (Igalada – Barcelona), la fibra de soja fue un residuo producido en la fabricación de bebidas de soja, de la empresa NATURSOY (Castellterçol – Barcelona). La cascarilla de café fue generada durante el proceso de tueste del grano de café y suministrada por MARCILLA S.A. (Mollet del Vallés – Barcelona). Las cáscaras de naranja fueron obtenidas de comercios locales, la pomaza de manzana provenía del prensado de la fruta para la extracción de zumo, destinado a la fabricación de sidra, y fue cedida por la empresa MOOMA (Fontanilles - Girona), finalmente la fibra de arroz fue suministrada por la empresa LIQUATS VEGETALS S.A. y se generó durante la fabricación de bebida de arroz. En la figura 3.1 se muestran imágenes de los distintos residuos utilizados, algunos mezclados con estructurantes.

##### **3.1.2 Inóculos**

Se utilizaron tres tipos de inóculo: en los experimentos realizados en condiciones aerobias el sustrato se inoculó, bien con lodo fresco, recogido del decantador primario y secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales de Igualada, y posteriormente secado hasta una humedad final del 70%, o bien con compost, obtenido de la digestión anaerobia y posterior compostaje de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos en la planta del Consorcio para la gestión de residuos del Vallés Oriental (Granollers – Barcelona). En los experimentos de digestión anaerobia del material sólido restante tras la extracción, el inóculo utilizado fue recirculado del reactor de digestión anaerobia de los lodos del decantador primario y secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales de Riu Sec



(Sabadell – Barcelona). En la Tabla 3.1, se muestran las principales características de estos inóculos.

### 3.1.3 Otros materiales

Como estructurante se utilizaron restos de pallet triturados, proporcionados por la Planta de compostaje de Jorba (Barcelona) y por la Planta de compostaje del Consorci del Bages per a la Gestió de Residus (Manresa, Barcelona).

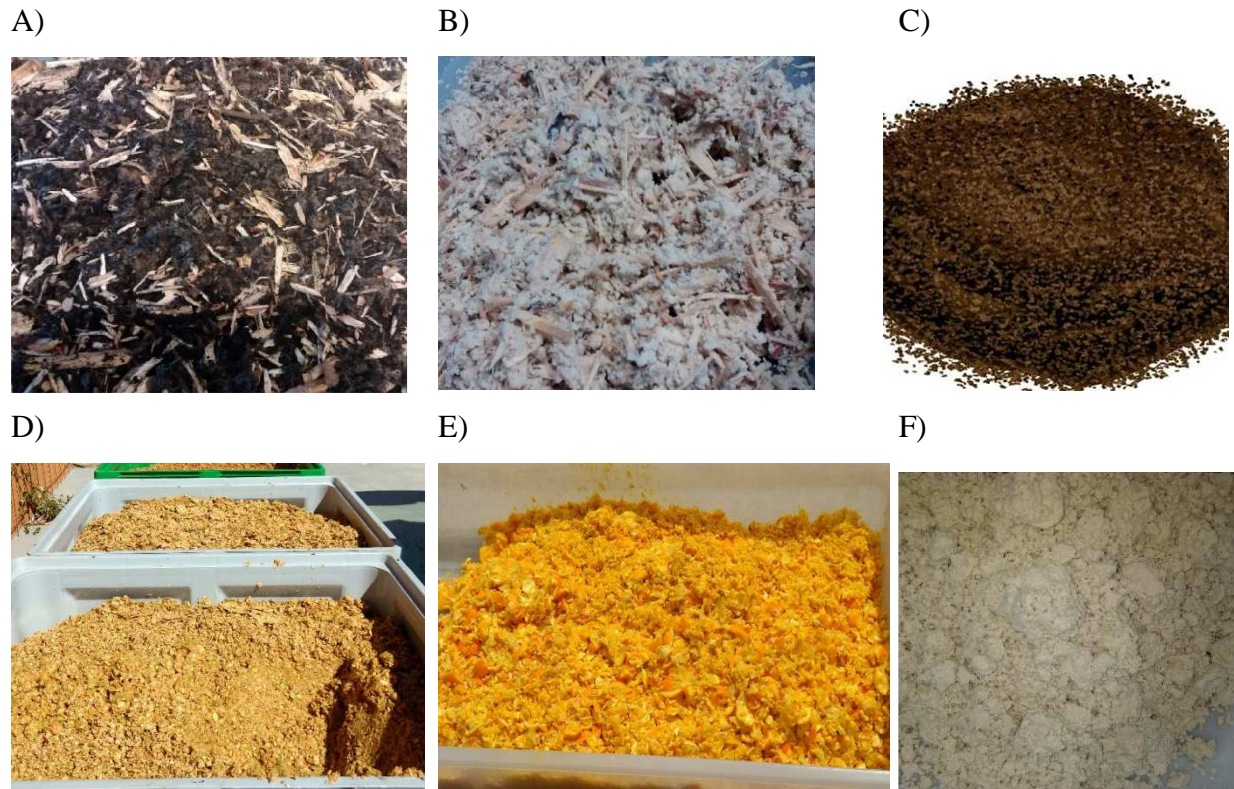


Figura 3.1 Residuos utilizados A) Mezcla de lodo y pelo estructurado B) Fibra de soja estructurada C) Cascarina de café D) Pomaza de manzana, E) Cáscara de naranja F) Fibra de arroz

## 3.2 Equipos FES

### 3.2.1 Escala laboratorio – Respirómetros

Para los experimentos escala laboratorio se utilizó un equipo llamado respirómetro dinámico (Figura 3.2), desarrollado por Ponsá et al. (2010b) y Pognani et al. (2011), que consistía en un conjunto de 9 líneas, cada una con capacidad para tres muestras. Cada línea contaba con tres Erlenmeyers de 500 mL que actuarían como reactores de FES conteniendo el

material a fermentar, cerrados herméticamente con tapones de goma y a los que se les acoplaban dos tubos de plástico para la entrada y salida de aire respectivamente.

Tabla 3.1 Caracterización de inóculos utilizados

	Lodo deshidratado (Igalada)	Compost (Granollers)	Recirculado Anaerobio (Sabadell)
<b>Humedad (% , bh)</b>	75 ± 2	35 ± 1	98.50 ± 0.01
<b>Materia orgánica (% , bs)</b>	67	n.d.	61.40 ± 0.07
<b>pH</b>	7.8 ± 0.4	7.6 ± 0.5	7.59 ± 0.03
<b>Conductividad (mS cm<sup>-1</sup>)</b>	2.3 ± 0.9	6.3 ± 0.2	8.83 ± 0.08
<b>Nitrogeno Total Kjeldahl (% , bs)</b>	16	n.d.	n.d.
<b>Ratio C/N</b>	3	n.d.	n.d.
<b>Celulosa (% , bs)</b>	n.d.	10 ± 1	n.d.
<b>Hemicelulosa (% , bs)</b>	n.d.	10.2 ± 0.1	n.d.
<b>Lignina (% , bs)</b>	n.d.	14 ± 1	n.d.

bh: Base húmeda, bs: Base seca

Los recipientes se sumergían en agua dentro de un baño termostático para regular la temperatura. En el interior del Erlenmeyer, el aire de entrada circulaba hasta el fondo del recipiente, bajo una malla, sobre la que se depositaba la muestra, y que servía además para distribuir homogéneamente el flujo de aire. Este aire de entrada era previamente humidificado al pasar por otro Erlenmeyer con agua a la temperatura fijada en el baño, para evitar que secase el material. El aire circulaba a través de la muestra de forma ascendente y a la salida era conducido hacia una trampa de agua a temperatura ambiente y, seguidamente, hacia los sensores electroquímicos de oxígeno. El valor del caudal de aire y del porcentaje de oxígeno en el aire de salida eran procesados por un software no comercial llamado SENSOR, que proporcionaba, a partir de las medidas dinámicas de oxígeno y caudal y de los datos iniciales de la muestra, las curvas de consumo de oxígeno y otros parámetros respirométricos en tiempo real. Este equipo se utilizó para la obtención de los parámetros respirométricos IDR<sub>24h</sub> y AT<sub>4</sub> (apartado 3.4.3 y 3.4.4), además de para la realización de las fermentaciones en estado sólido a escala laboratorio.

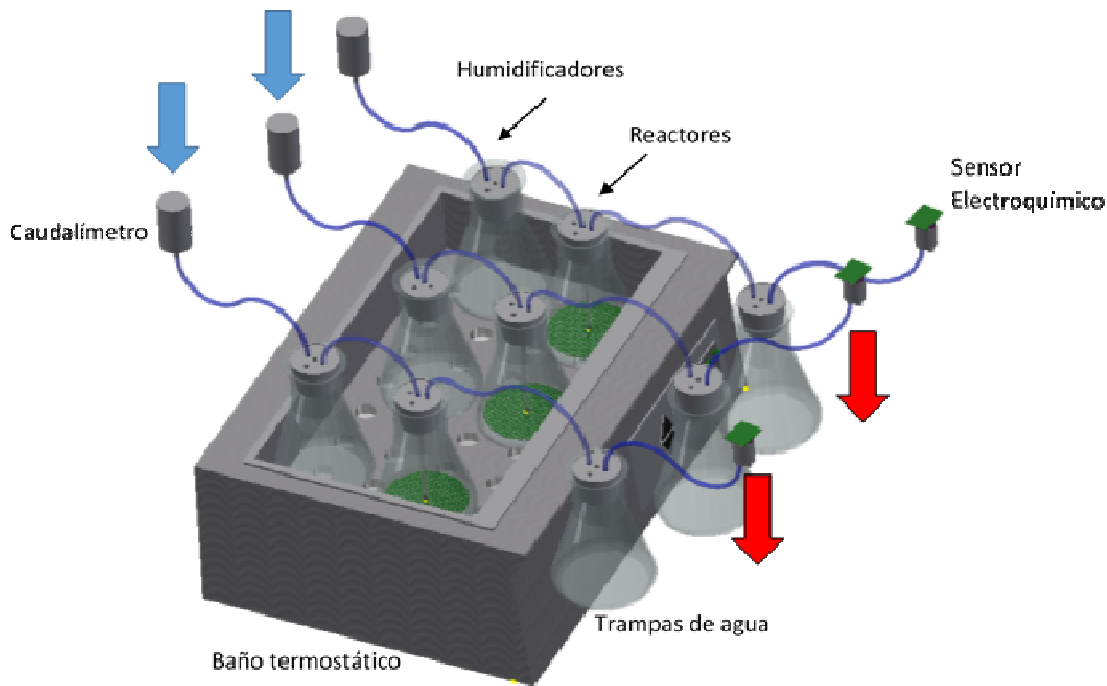


Figura 3.2 Respirómetro dinámico (una línea)

### 3.2.2 Escala banco de pruebas – Reactores de 4.5 L y 10 L

Estos reactores de lecho fijo, de volumen de trabajo 4.5 y 10 L, trabajaban de manera pseudo-adiabática y consistían en vasos Dewar ® adaptados a las necesidades de la FES (Figura 3.3). Constaban también de una tapa revestida de un material aislante para evitar intercambio de calor con el exterior, y se cerraban de manera hermética. Estos reactores no disponían de control de temperatura, pero sí de registro. Al igual que en los respirómetros, la tapa contaba con dos conexiones para la entrada y salida de aire, además de una tercera a la que se acoplaba una sonda de temperatura (Transmisor CCPI/T-120, Seneca, Italy), ya que en este caso la temperatura no era constante.

La mezcla de material se depositaba dentro del reactor sobre una malla. El aire de entrada era conducido bajo la malla para una distribución uniforme por todo el material. Como en los respirómetros, el aire de salida pasaba por una trampa de agua a temperatura ambiente antes de llegar a los sensores electroquímicos de oxígeno. Los datos de caudal de aire de entrada, porcentaje de oxígeno en el aire de salida y temperatura de la mezcla, eran recogidos y procesados por un microcontrolador Arduino, conectado a un ordenador personal

equipado con el software SENSOR, que mostraba dichos parámetros gráficamente (Figura 3.4).

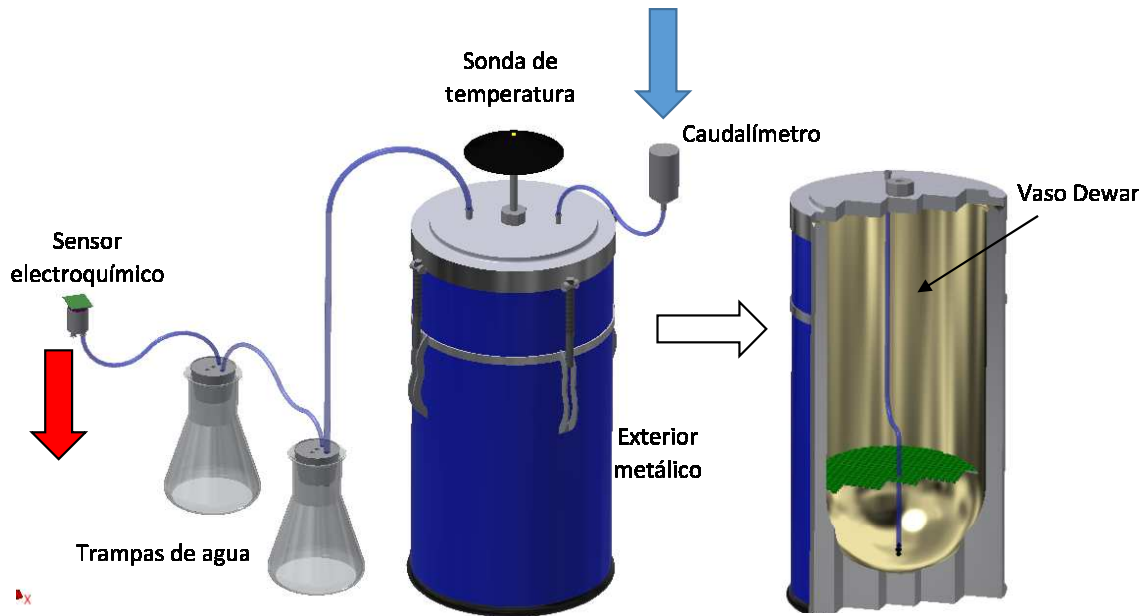


Figura 3.3 Reactores fermentación aerobia de 4.5 y 10 L

### 3.2.3 Planta Piloto – Reactor de 50 L

Los experimentos a escala piloto se llevaron a cabo utilizando un reactor cilíndrico de acero de lecho fijo, de volumen de trabajo 50 L (Figura 3.5), que trabajaba en modo pseudo-adiabático. El reactor contaba con una entrada de aire en la base y una conexión para la salida en la tapa. El aire de salida del reactor pasaba por una trampa de agua a 4 °C antes de llegar al sensor de oxígeno. El caudal de aire suministrado era medido por un caudalímetro másico. El reactor contaba además con un conector para una sonda de temperatura en la tapa (Transmisor CCPI/T-120, Seneca, Italy) y otro conector en la base para la eliminación de lixiviados si fuera necesario. Los datos de temperatura, caudal de aire suministrado y porcentaje de oxígeno en el aire de salida eran recogidos por un procesador Arduino conectado a la red y mostrados on-line. Los parámetros experimentales eran también configurados desde la misma dirección web.

### 3.3 Régimen de aireación

Durante los distintos experimentos realizados se han aplicado distintas estrategias para el control del caudal de aireación.

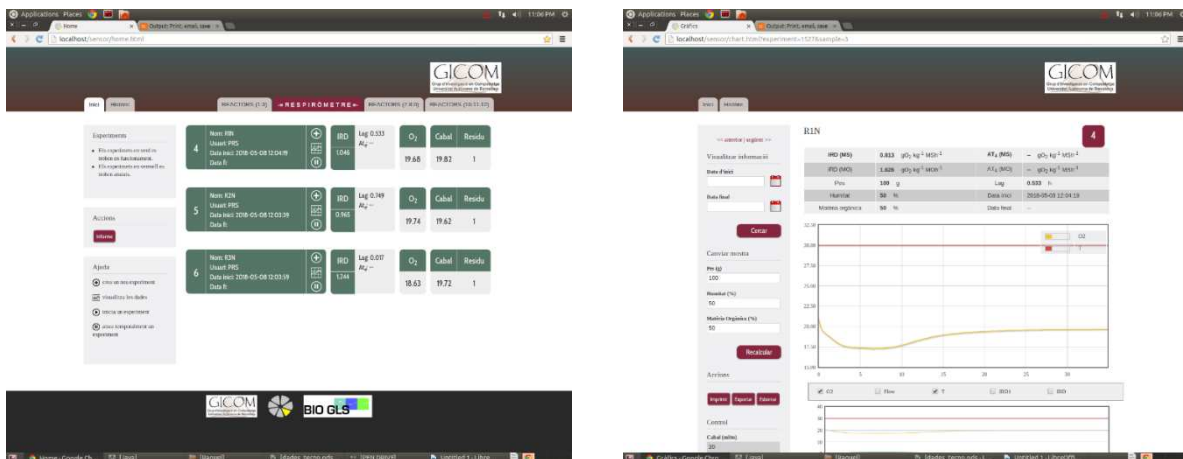


Figura 3.4 Gestión on line de los datos de caudal, temperatura y O<sub>2</sub>

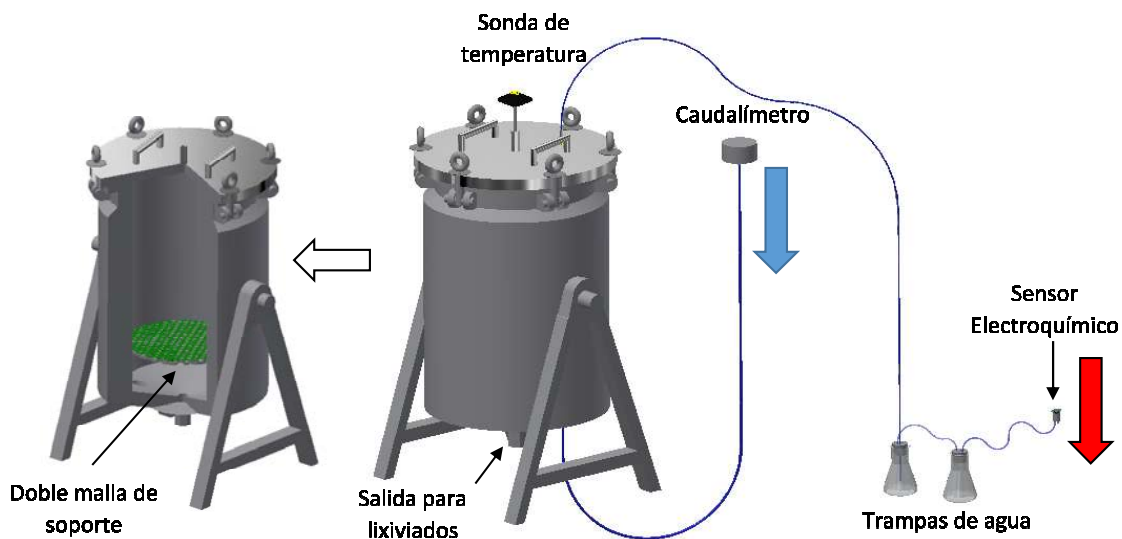


Figura 3.5 Reactor de 50 L

### 3.3.1 Control por retro-alimentación de oxígeno

Esta estrategia se basa en mantener los niveles de oxígeno en los gases de salida dentro de un rango considerado óptimo (Puyuelo et al. 2010), que será superior a un 10%. Para ello el usuario estipula en el sistema el valor de dos caudales de aireación, uno mínimo y otro máximo, que dependerán de la biodegradabilidad de la mezcla. En el software de control se establecen dos valores límite, inferior y superior, de concentración de oxígeno, 11.5% y 12.5 % de oxígeno, respectivamente. Si el porcentaje de oxígeno a la salida del reactor es superior al 12.5%, el sistema operará a caudal mínimo, si en cambio éste es inferior a 11.5%,

el caudal de operación será el máximo establecido. Con esta estrategia se mantienen condiciones aerobias dentro del reactor.

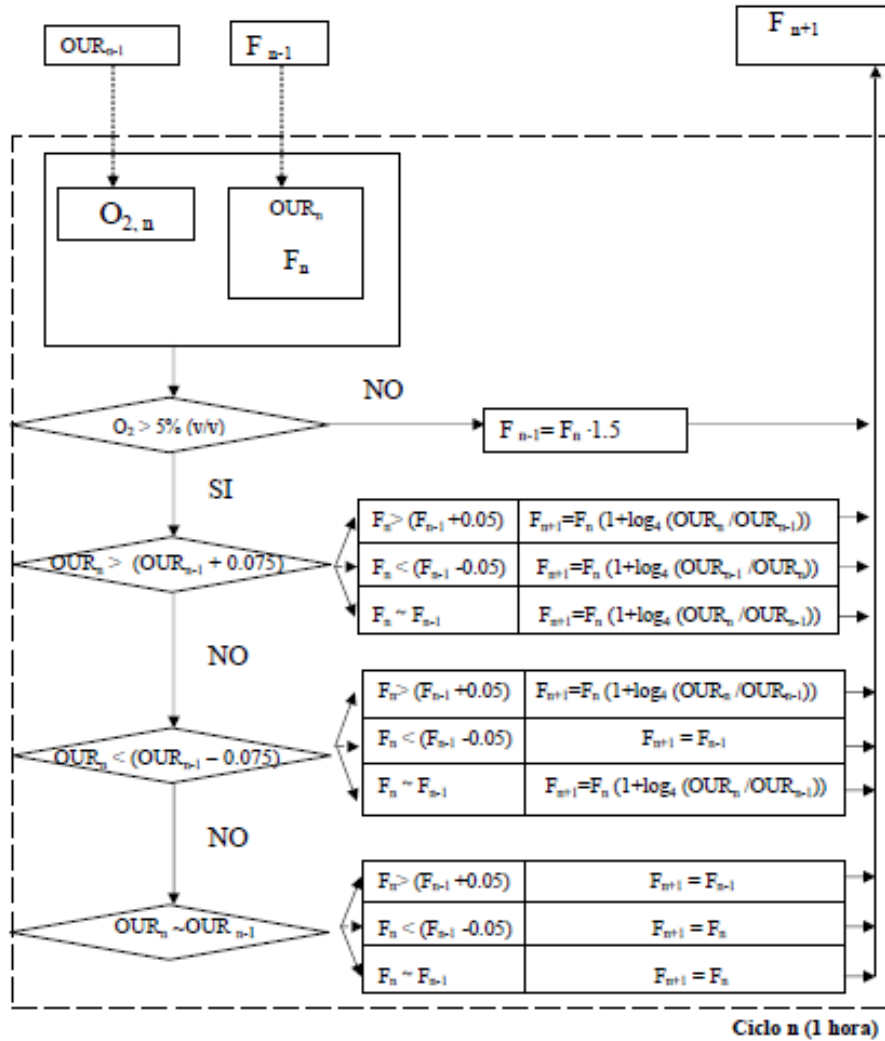


Figura 3.6 Esquema del algoritmo seguido para el control de caudal de aire suministrado al reactor por OUR F: Caudal volumétrico de aire ( $\text{mL min}^{-1}$ ), OUR: Oxygen uptake rate ( $\text{g O}_2 \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). Fuente: Puyuelo 2010

### 3.3.2 Control por OUR.

Brevemente, este sistema de control fue desarrollado por Puyuelo et al. (2010), y se basa en obtener valores de OUR máximos en todo momento, ya que, este parámetro, que se definirá en detalle en el punto 3.4.1, es directamente proporcional a la actividad biológica de la muestra.



El controlador OUR se rige por la secuencia lógica mostrada en la figura 3.6 El algoritmo mostrado compara en cada ciclo la medida de OUR del ciclo anterior con la calculada en el ciclo actual, y considera tres casuísticas diferentes: que el valor de OUR sea mayor al valor de OUR del ciclo anterior sumándole 0.075, que sea igual, o que sea menor que el valor de OUR del ciclo anterior restándole 0.075. En los tres casos, se compararán los caudales másicos del ciclo anterior y del actual, y dependiendo del resultado se utilizará una ecuación u otra para calcular el caudal másico de aire a suministrar en el siguiente ciclo, siendo el ciclo de una hora de duración y siendo las ecuaciones diferentes dependiendo de la comparación entre valores de OUR. En caso de que el porcentaje de oxígeno en el aire de salida (mL:mL) sea inferior al 5%, se aumentará el caudal en un 50%. Para una información más detallada del funcionamiento del sistema de control, consultar Puyuelo et al. (2010).

### 3.3.3 Control manual

En este método el caudal requerido se varía manualmente dependiendo de las necesidades del sistema, intentando mantener la concentración de O<sub>2</sub> en los gases de salida por encima del 10%.

## 3.4 Parámetros de proceso

### 3.4.1 Velocidad de consumo de oxígeno (OUR)

La velocidad de consumo de oxígeno (OUR: Oxygen Uptaken Rate) permite medir la actividad biológica de la muestra. Sus unidades son masa de oxígeno consumida por unidad de tiempo. Este parámetro se puede expresar de manera específica (sOUR), refiriéndolo a la masa de materia seca (MS) o a la masa de materia orgánica (MO) contenida en la muestra. Para el cálculo de la velocidad de consumo de oxígeno se utiliza la ecuación 3.1., que se obtiene a partir de un balance de materia al reactor en régimen estacionario y en condiciones normales.

$$OUR = F (0.209 - O_2)(32 \text{ 60})/(22.4) \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Donde, OUR es la velocidad de consumo de oxígeno (g O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup>), F es el caudal volumétrico (mL min<sup>-1</sup>), 0.209 es la fracción molar de oxígeno en el aire de entrada al reactor (mol O<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> aire), O<sub>2</sub> es la fracción molar de oxígeno a la salida, 22.4 es el factor de conversión de mL a moles de aire, medidos en condiciones normales (273 K de temperatura y

101325 Pa de presión), 32 es el peso molecular del O<sub>2</sub> (g mol<sup>-1</sup>) y 60 el factor de conversión de minutos a horas.

Para el cálculo del valor de OUR en términos específicos (sOUR) se aplicaría la ecuación 3.2.

$$sOUR = OUR / (M \cdot MS) \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Donde sOUR sería la velocidad específica de consumo de oxígeno por unidad de materia seca o de materia orgánica, OUR la velocidad de consumo de oxígeno (g O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup>), M la masa total de material (kg), MS la fracción de materia seca del sólido (kg MS kg<sup>-1</sup> M). En caso de querer expresar la velocidad de consumo referida a la materia orgánica, MS se sustituiría por MO, que representa la fracción de materia orgánica en base húmeda (kg MO kg<sup>-1</sup> M).

### 3.4.2 Estabilidad de la muestra

Los experimentos necesarios para la obtención de los parámetros de estabilidad de una muestra (Ponsá et al. 2010b) determinada se realizaron en un respirómetro. La temperatura fue fijada en 37 °C, de acuerdo con las teorías de Adani et al. (2006). Los valores se obtuvieron por triplicado y en cada medida se utilizó 100 g de muestra estructurada y con una humedad comprendida entre 40% y 70% en peso. Se utilizaron diferentes rangos de caudal, en el caso de muestras frescas los valores escogidos eran de 30 a 45 mL min<sup>-1</sup>, mientras que para muestras ya fermentadas o estabilizadas previamente, estos oscilaban entre los 15 y los 20 mL min<sup>-1</sup>. El caudal escogido intentaba garantizar condiciones aerobias dentro del sistema, por encima de un 10% de oxígeno, y evitar el exceso de aireación en una muestra estabilizada, ya que dificultaría la medida de consumo de oxígeno, pudiendo ser del mismo rango que el error del sensor (Mejías et al. 2017). Se procuró además que el caudal fuese constante durante todo el experimento, ya que la variación de caudal podría producir alteraciones en la actividad biológica debidas al aumento de la cantidad de oxígeno o la turbulencia.

### 3.5 Consumo de oxígeno acumulado

Se determina a partir de la velocidad de consumo de oxígeno y es considerada por algunos autores y normas legales como medida de estabilidad. Este consumo de oxígeno acumulado se determinó en todos los casos para un periodo de proceso de 4 días (AT<sub>4</sub>), en los



cuales el consumo de oxígeno fue máximo, siguiendo las indicaciones del Federal Government of Germany (2001), que considera este período como medida estándar de la estabilidad del material. La fase de latencia finaliza cuando la OUR, expresada como promedio de una hora, alcanzaba el 25% del valor máximo (Federal Government of Germany, 2001). El cálculo del consumo acumulado se realiza de acuerdo con la ecuación 3.3, donde el tiempo se expresa en horas

$$AT_4 = \int_t^{t+96} OUR_t dt \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

### 3.6 Índice Respirométrico Dinámico (IRD)

Su cálculo se realiza a partir de los valores puntuales de sOUR obtenidos trabajando a una temperatura constante, cuyo cálculo fue descrito anteriormente, y al igual que éste, puede ser expresado en  $\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{MS}$  o  $\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{MO}$ . No obstante, y para obtener unos valores estándares y comparables a otros materiales, se ha establecido que la temperatura experimental debe ser de  $37^\circ\text{C}$ . Las opciones para expresar el índice respirométrico de un residuo son varias:

- $\text{IRD}_{\text{max}}$ : Valor máximo de sOUR puntual
- $\text{IRD}_{1\text{h}}$ : Valor máximo de sOUR calculado como promedio de una hora
- $\text{IRD}_{24\text{h}}$ : Valor máximo de sOUR calculado como promedio de 24 horas.

Entre las opciones disponibles el índice de estabilidad de un material se suele expresar como  $\text{IRD}_{24\text{h}}$ . El motivo es que esta opción permite una mejor discriminación de picos y valores erróneos

### 3.7 Métodos analíticos

#### 3.7.1 Determinación de actividad de proteasas.

La determinación de la actividad de proteasa de los extractos se hizo modificando el método propuesto por Alef y Nannipieri (1972) que se describe a continuación. Éste método

se basa en la liberación de peptidos contenidos en el sustrato (caseína) debido a la acción de las proteasas, y su posterior detección mediante colorimetría, utilizando reactivo Folin-Ciocalteu. Este reactivo se une mediante un doble enlace a las moléculas creando un compuesto de color azulado. Utilizando una recta de calibrado que correlaciona absorbancia medida en el espectrofotómetro y concentración de tirosina se consigue calcular la actividad enzimática del extracto. Los reactivos utilizados son de pureza analítica.

#### *Reactivos utilizados y preparación*

- Tris buffer (50 mM, pH 8.1). Se disuelven 6.05 g de hidroxil metil amino metano en 1 L de agua destilada, se ajusta el pH con una solución de HCl al 50% en volumen hasta pH 8.1.
- Solución de caseína (2%). Disolver 10 g de sal de caseinato de sodio bobino en 500 mL de agua destilada aplicando agitación magnética y a una temperatura de 50 °C.
- Ácido tricloroacético (15%). Disolver 75 g de ácido tricloroacético en 500 mL de agua destilada aplicando agitación.
- Reactante alcalino: Este reactivo debe ser preparado en el momento de usarse, y es una mezcla de tres soluciones (A, B y C) que pueden ser preparadas previamente y conservarse a temperatura ambiente:
  - Disolver 50 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 2.4 g de NaOH en 1000 mL de agua destilada aplicando agitación (A)
  - Disolver 0.5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua destilada (B)
  - Disolver 1 g de  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua destilada (C)
- Folin-Ciocalteu (25%). Diluir en proporción 1:3 (v:v) Folin-Ciocalteu: agua destilada.

Los volúmenes de ambos dependerán de la cantidad de muestras a analizar.

- Solución estándar de Tirosina ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Disolver 500 mg de tirosina en 100 mL de Tris buffer.

#### *Realización del análisis*

- 1 mL del extracto a analizar, 4 mL de Tris buffer y 5 mL de caseína (2%) se añaden a un tubo de centrífuga de 50 mL. La preparación se realiza por triplicado.
- 1 mL de extracto y 4 mL de Tris buffer se mezclan en un tubo de centrífuga para la preparación del blanco de enzima, realizándose también por triplicado.
- 5 mL de Tris buffer y 5 mL de caseína (2%) son añadidos a un tubo de centrífuga para obtener el blanco del método. En este caso solo un replicado.

- Se realiza la incubación a 50°C durante 2 horas y con agitación de todas las mezclas preparadas. Trascorridas dos horas se añaden 5 mL de ácido tricloroacético (15%) a todos los tubos. Seguidamente se añaden 5 mL de caseína (2%) a los triplicados de blanco de enzima. Se homogeniza la mezcla utilizando un vórtex.
- Los tubos se centrifugan a 10000 rpm durante 10 min. Seguidamente se pipetea 1 mL del sobrenadante en un tubo de ensayo de vidrio.
- Se añaden 1,5 mL de reactante alcalino. Éste se prepara siguiendo la proporción 1000:20:20 en volumen de A:B:C. Se deja incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se añade 1 mL de solución Folin-Ciocalteu (25%) y se deja incubar también a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de ese tiempo, se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 700 nm.

#### Recta de calibrado

Para obtener la recta de calibrado se determinó la absorbancia de diferentes muestras con una concentración conocida de tirosina. Para ello, se pipeteó, en diferentes tubos Falcon de 50 mL, cantidades comprendidas entre 0.25 y 2.5 mL de solución estándar de tirosina descrita anteriormente. El volumen restante hasta 5 mL se completó con Tris Buffer pH 8.1. Seguidamente se añadió a cada tubo 5 mL de caseína (2%) y 5 mL de ácido tricloroacético (15%). A partir de este punto se siguió el método analítico del mismo modo que se haría para cualquier muestra.

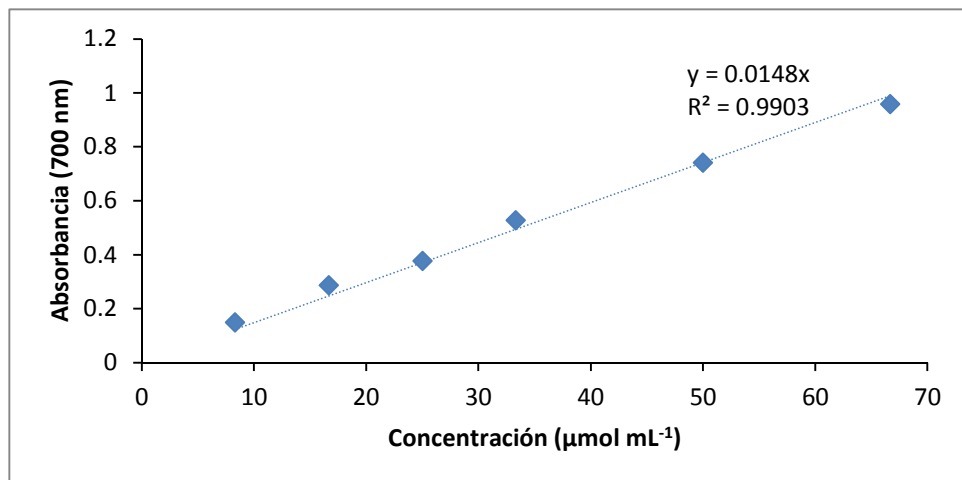


Figura 3.7 Recta de calibrado para la determinación de L-tirosina

Los valores de absorbancia obtenidos para las cantidades elegidas se encontraban entre 0.1 y 1. Los valores de absorbancia (ordenadas) se ajustan frente a los valores de concentración de tirosina ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) en el eje de abscisas para obtener la pendiente de la recta de calibrado (Figura 3.7).

#### *Cálculo de Actividad*

Una vez medida la absorbancia de la muestra el cálculo de la actividad se llevó a cabo siguiendo la ecuación 3.4:

$$\text{Actividad } (U \text{ g}^{-1}MS) = \frac{\text{Abs } 15 B}{MS P_t} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

En la que Abs es la absorbancia medida a 700 nm menos la absorbancia del blanco enzima, 15 es la dilución de la cantidad de muestra analizada (1 mL) tras añadir Tris buffer (4 mL), caseína (2%) (5 mL) y ácido tricloroacético (15%) (5 mL). B sería el volumen añadido (mL) al sólido para realizar la extracción, MS la cantidad de materia seca contenida en la muestra sobre la que se realiza la extracción (g), es decir, materia total por la fracción de materia seca. Finalmente  $P_t$  sería el valor de la pendiente de la recta de calibrado, expresado en  $\text{mL } \mu\text{mol}^{-1}$  tirosina, asimilando todos los péptidos liberados a este compuesto, ya que es el utilizado, según el método, para realizar el cálculo de la recta de calibrado.

#### **3.7.2 Determinación de actividad de celulasas, ensayo de papel de filtro.**

Sustrato. Se utilizaron tiras de 6 x 1 cm de papel de filtro.

#### *Reactivos*

- Buffer citrato pH 4.8 (0.05M). Disolver 10.5 g de ácido cítrico monohidratado,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , en un litro de agua destilada y ajustar pH hasta 4.8 añadiendo hidróxido de sodio.

- Reactante DNS. Mezclar:

- 1416 ml agua destilada
- 10.6 g de ácido 3-5-dinitrosalicílico
- 19.8 g de hidróxido de sodio
- 306 g de sal Rochelle (tartrato Na-K)
- 7.6 mL de fenol (líquido a 50°C)

- 8.3 g de meta bisulfito sódico
  - Estándar de glucosa ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ). 100 mg de glucosa anhidra se disolvieron en 10 mL de agua destilada.

#### *Extracción*

Añadir 150 mL de buffer citrato a 10 g de muestra húmeda, aplicar agitación durante 30 minutos. Centrifugar la mezcla a 10000 rpm durante 10 min. Separar el sobrenadante para su análisis.

#### *Procedimiento*

- Añadir 1 tira de papel de filtro, 1 mL de buffer citrato y 0,5 mL de extracto a un tubo de ensayo de vidrio. Preparar por triplicado.
- Añadir 1 mL de buffer citrato y 0,5 mL de extracto a un tubo de ensayo para la medida del blanco de la enzima. Preparar por duplicado.
- Añadir 1.5 mL de buffer citrato y una tira de papel de filtro para el blanco de sustrato. Preparar por triplicado.
- Finalmente, para el blanco del método, añadir 1.5 mL de buffer citrato a un tubo de ensayo.
- Incubar a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  con agitación los triplicados de la muestra más sustrato, los triplicados de blanco sustrato y el blanco del método durante 1 hora.
- Pasado este tiempo añadir 3 mL de DNS a todos los tubos y hervir durante 5 minutos. Tras el hervido enfriar rápidamente introduciendo los tubos en un baño con hielo.
- Añadir en todos los casos 20 mL de agua destilada y homogeneizar la mezcla.
- Realizar la lectura de la absorbancia a 540 nm.

#### *Cálculo de la actividad*

La actividad se calculó según la ecuación 3.5:

$$\text{Actividad IU (Ug}^{-1}\text{MS)} = \frac{\text{Abs BC 3}}{\text{Pt 0.18 60 MS}} \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

Donde Abs sería la absorbancia medida a 540 nm restándole los valores de absorbancia obtenidos para el blanco enzima y el blanco sustrato, BC los mL de buffer citrato requeridos en la extracción, 3 el factor de dilución del extracto en el tubo de ensayo, Pt la pendiente de la recta de calibrado, 0.18 el peso molecular de la celulosa expresado en  $\mu\text{mol mg}^{-1}$ , 60 (min) el tiempo de incubación, y finalmente MS (g), la cantidad de materia seca en la muestra extraída.

#### Recta de calibrado

Para la obtención de la recta de calibrado se realizaron las siguientes diluciones del estándar de glucosa (EG).

- 1 mL EG + 0.5 ml buffer citrato
- 1 mL EG + 1 mL buffer citrato
- 1 mL EG + 2 mL buffer citrato
- 1 mL EG + 4 mL buffer citrato
- 1 mL EG + 8 mL buffer citrato
- 1 mL EG + 15 mL buffer citrato
- 1 mL EG + 25 mL buffer citrato

0.5 mL de cada dilución preparada se adición a 1 mL de buffer citrato y se llevó a cabo el procedimiento de determinación prescindiendo de la etapa de incubado. Una vez obtenida la absorbancia se representó frente a la concentración (Figura 3.8).

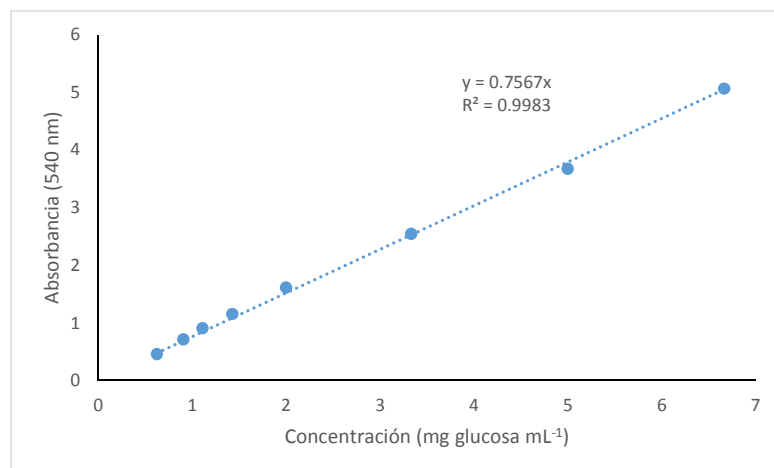


Figura 3.8 Recta de calibrado L-glucosa

### 3.7.3 Métodos rutinarios

Los parámetros descritos a continuación sirvieron para caracterizar la muestra y realizar el control de los procesos de fermentación y compostaje. El contenido en humedad, pH, materia seca y orgánica, carbono orgánico y nitrógeno total (en forma amoniacal como orgánico) se midieron según el US Department of Agriculture and US composting Council (2001).

#### *Humedad (H), Materia seca (MS) y Materia orgánica (MO)*

Estos parámetros se expresaron como porcentajes en peso. La humedad se calculó como la pérdida en peso de una muestra húmeda tras 24 horas, o hasta que la variación de peso resultaba despreciable, a 105 °C. El material restante tras este procedimiento sería la materia seca.

Para el cálculo del porcentaje de materia orgánica un peso conocido de muestra seca era calcinado a 550 °C durante tres horas o hasta que el cambio de peso resultase despreciable. La diferencia de peso representaba el porcentaje de materia orgánica.

#### *pH y conductividad*

Para la determinación de pH y conductividad, a 10 g de muestra húmeda se le adicionaron 50 mL de agua destilada y se aplicó agitación magnética durante 30 min. Seguidamente se centrifugó la mezcla a 10000 rpm durante 10 min. El pH en el sobrenadante se midió con un pHímetro Crison, micropH2000 mientras que la conductividad fue medida con un conductímetro de la marca XS Instruments.

#### *Carbono orgánico total (COT)*

Expresado como porcentaje en peso sobre materia seca. Se determinó por las pérdidas de materia de la muestra seca durante su combustión en un analizador de carbono (Solids TOC Analyzer, IOAnalytical).

#### *Nitrógeno total Kjendhal (NTK)*

Se determinó a partir de 0.5 g de muestra seca y triturada. Inicialmente la muestra se digirió con 20 mL de ácido sulfúrico concentrado a 420 C durante 1,5 horas junto con un catalizador de la reacción (Kjendhal), con el fin de transformar el nitrógeno orgánico en amoniacal. La digestión se llevó a cabo usando un digestor de bloque de seis tubos de

capacidad (J.P. Selecta S.A., Barcelona, Spain). Seguidamente la muestra se destiló con un exceso de NaOH (35%) utilizando una unidad de destilación Büchi K-355 (Flawil, CH). El destilado se recogió en un volumen conocido y en exceso de ácido bórico, de concentración también conocida, formándose borato de amonio. Mediante valoración del destilado utilizando HCl y en presencia de fenoftaleina como indicador se midió la cantidad de nitrógeno de acuerdo con la ecuación 3.6.

$$TNK (\%) = \frac{(V1 - V0)N 14}{MS} \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

Donde, V1 es el volumen consumido de HCl (mL) en la valoración del destilado, V0 es el volumen consumido de HCl (mL) en la valoración del blanco, N es la normalidad de la solución de HCl, 14 es el peso molecular del nitrógeno, y MS es el peso de materia seca de la muestra (g).

#### *Contenido en grasa (MEH-Material extractable con hexano)*

El contenido en grasas fue medido utilizando el método Soxhlet estándar con n-hexano ( $\geq 95\%$  pureza) como solvente orgánico (The U.S. Environmental Protection Agency, Method 9071B). La muestra fue secada y molida previamente a realizar la extracción mezclándola con sulfato sódico anhidro en un cartucho de celulosa y utilizando un Soxhlet E-186 (Büchi) 4 horas. Los resultados se expresan como porcentaje en base seca.

#### *Free Air Space (FAS)*

Se define como la fracción de volumen disponible para el aire ( $V_s$ ), respecto al volumen total ( $V_t$ ) en un material sólido (Ecuación 3.7).

$$FAS = \frac{V_s}{V_t} \quad (\text{Ecuación 3.7.})$$

Para su medida se utilizó un picnómetro construido por Ruggieri et al. (2009a). Éste equipo consiste básicamente en dos cámaras de cierto volumen, cerradas herméticamente, y conectadas entre sí mediante una válvula. Inicialmente una de ellas contiene aire a una presión conocida y la otra un volumen conocido de material a presión atmosférica. Cuando se abre la válvula que las conecta la presión entre ambas se iguala. De acuerdo con la ley de gases



ideales de Boyle-Mariotte se obtiene la ecuación 3.8, que permite calcular el volumen disponible.

$$V_s = \frac{(P_1 - P_2) V_1}{P_1} \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

Donde P1 (bar) es la presión inicial en la cámara de aire, P2 (bar) es la presión después de la apertura de la válvula y V1 es el volumen de aire a presión (L).

#### *Celulosa, Hemicelulosa y Lignina*

La determinación del contenido de Lignina, celulosa y hemicelulosa se realizó en el laboratorio de la facultad de veterinaria de la UAB.

### **3.8 Rendimiento de recuperación de actividad enzimática**

#### **3.8.1 Parámetros de extracción**

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar el rendimiento de recuperación de la actividad enzimática cuando la extracción no se realizaba en las condiciones descritas en los métodos de análisis, ya que éstas pueden ser factibles como estándar para el análisis de pequeñas muestras pero no a nivel industrial, cuando es necesario procesar grandes cantidades tanto de residuo fermentado como de extracto obtenido.

Para determinar el método óptimo de extracción de la matriz sólida, se estudió la influencia de diferentes parámetros de extracción. La actividad recuperada extrayendo bajo las condiciones de interés se comparaba con la actividad estándar para calcular el porcentaje de recuperación obtenido, según la ecuación 3.9.

$$\% \text{ Recuperación Actividad} = \frac{100 \text{ Actividad extracto}}{\text{Actividad estándar}} \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

Se estableció que la actividad obtenida realizando la extracción en condiciones estándar representaba un 100% de recuperación de actividad. Las condiciones de extracción estándares dependiendo de la enzima a extraer fueron las siguientes:

Proteasas:

- Agitación orbital
- Ratio 1:5 masa de sólido (g) – volumen de extractante (mL),
- 0.05M HCl-Tris buffer (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol), pH 8.1 (TB) como extractante.
- Tiempo de extracción 1 h.

Celulasas:

- Agitación orbital
- Ratio 1:15 masa de sólido (g) – volumen de extractante (mL),
- 0.05M Buffer citrato monohidratado, pH 4.8 (BC) como extractante.
- Tiempo de extracción 30 min.

Tanto para la extracción de celulasas como de proteasas, se consideró oportuno conservar como estándar el ratio de extracción especificado por los métodos de determinación de actividad, ya que no se encontraron datos bibliográficos que indicasen la necesidad de un ratio más elevado de extracción. Según la Tabla 1.1, Ikasari y Mitchell (1996) utilizaron un ratio de 1:10 (g:mL) para la extracción de proteasas, aunque posteriormente, Aikat y Bhattacharyya (2000) encontraron un ratio óptimo de 1:5 (g:mL). En este caso, el resultado de las extracciones consecutivas corrobora que la proporción 1:5 escogida es adecuada. En cuanto a los dos solventes evaluados, los autores mencionados, además de Freitas et al. (2013), concuerdan con que el pH óptimo de extracción se encuentra alrededor de 7, por lo que comparar un disolvente polar (TB) con el rendimiento obtenido con el uso de agua destilada, que sería un extractante más barato, ambos con pH cercanos a 7, es recomendable.

En cuanto a la extracción de celulasas, el ratio de 1:15 especificado por el método de determinación parece suficiente comparado con los ratios óptimos encontrados en la literatura. Chandra et al. (2010; 2009) consiguieron una máxima extracción utilizando ratios de 1:4 y 1:5 (g:mL) respectivamente. En estos trabajos, la extracción se llevó a cabo utilizando agua destilada, obteniendo buenos rendimientos. Pirota et al. (2013) reportaron la óptima extracción de celulasas con un pH de 4.8, por lo que estos fueron los extractantes escogidos.

Los parámetros de extracción que se seleccionaron para estudiar su interacción fueron los siguientes:

- Ratio sólido fermentado (g) – líquido extractante (mL). Dependiendo de la enzima extraída se eligieron diferentes valores para este parámetro:
  - Proteasas: ratios solido – líquido de 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4.
  - Celulasas: ratios solido – líquido de 1:1, 1:2, 1:3 y 1:5

Se consideró que ratios superiores a los escogidos encarecían el proceso en exceso, y aunque presentasen mayor rendimiento no podían ser considerados a nivel industrial, además de obtener la enzima en forma altamente diluida.

- Tipo de extractante: se realizó la comparación del rendimiento de recuperación de actividad para dos extractantes diferentes, dependiendo también de la enzima
  - Proteasas: TB y agua destilada (AD).
  - Celulasas: BC y AD.
- Modo de extracción. En este caso los tres modos de extracción comparados fueron:
  - Agitación orbital, 120 rpm.
  - Modo estático, sin ningún tipo de agitación.
  - Recirculando el líquido extractante un número determinado de veces sobre el mismo sólido.

### 3.8.2 Equipos

Para realizar el balance de recuperación de actividad, el proceso de fermentación en estado sólido se interrumpía en el punto de máxima actividad, se homogenizaba la mezcla fermentada, y una cantidad determinada de material se mezclaba en un recipiente con el extractante. Para asegurar la homogeneidad del material, se tomaban pequeñas cantidades en diferentes puntos del material fermentado que conformaban la muestra a extraer, tras lo cual, la totalidad del fermentado era nuevamente homogeneizado, y se repetía el proceso para la muestra siguiente.

Los equipos necesarios para realizar las extracciones en los diferentes modos fueron los siguientes:

- Agitación orbital a 120 rpm: se utilizó un agitador-incubador Sony a temperatura ambiente. El fondo del agitador era una plataforma rotatoria que disponía de unas

cintas adhesivas para fijar los recipientes. La cantidad de muestra extraída siguiendo este procedimiento estaba comprendida entre 150 y 500 g debido al peso que el agitador-incubador podía soportar y a los recipientes disponibles para contener la mezcla, que debían permitir una agitación idónea.

- Recirculación del extractante: En este caso el dispositivo experimental consistía en una bomba peristáltica Watson-Marlow 400L2 con velocidad del rotor variable desde 0 a 99 rpm y un recipiente con dos adaptadores, uno en su base y otro en la tapa, conectados a la entrada y salida de la bomba respectivamente, creando así un circuito cerrado de circulación de líquido. Un dispositivo se acopló a la tapa para permitir que el líquido cayese sobre el sólido con efecto ducha y fuese distribuido uniformemente por el área interior del recipiente. En éste caso, las extracciones fueron también a escala laboratorio, ya que la capacidad del recipiente era de 2 L, y la velocidad máxima de bombeo que permitía el dispositivo era de  $169 \text{ mL min}^{-1}$ .
- Estáticas: Debido a la sencillez de ejecución de dichas extracciones, ya que sólo requieren un tamaño de recipiente adecuado, fue posible realizar extracciones de este tipo a escala piloto, banco de pruebas y escala laboratorio, utilizando los reactores como recipiente de extracción.

### **3.8.3 Liofilización**

Otro de los objetivos establecidos fue determinar el rendimiento de recuperación de actividad enzimática tras la liofilización del extracto y su posterior redisolución.

El equipo utilizado para la liofilización de las muestras fue un liofilizador Virtis 5L sentry conectado a una bomba de vacío Edwards RV5 A653\_01\_903. Para la liofilización del extracto, éste era congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  formando una fina película de hielo, recubriendo toda la superficie interior de un recipiente de vidrio acoplable al equipo. El liofilizador trabajaba manteniendo unas condiciones de 30 bar de presión y una temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$ . Bajo estas condiciones el agua pasaba directamente de estado sólido a vapor, dejando los sólidos.

Una vez evaporada toda el agua, la parte sólida era homogeneizada y pulverizada utilizando un mortero, conservándose a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

A partir de la cantidad de sólido obtenida de cierto volumen de extracto, se calcularon los gramos por mililitro obtenidos, éste valor se utilizó para devolver la muestra a su volumen original y realizar así la determinación de actividad.

El cálculo del rendimiento de recuperación de actividad enzimática tras la liofilización se realizó siguiendo la ecuación 3.10.

$$\% \text{ recuperación actividad} = \frac{100 \text{ Actividad extracto liofilizado}}{\text{Actividad extracto fresco}} \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

### 3.9 Digestión anaerobia – Producción de biogás

Para realizar el test de producción de biogás fue necesario utilizar un inóculo rico en microorganismos anaerobios proveniente de un reactor de digestión anaerobia. El inóculo permaneció una semana a 37°C antes de ser utilizado con el fin de degradar la materia orgánica fácilmente digerible que pudiese contener aun.

El ratio inóculo/sustrato utilizado fue de 2/1 en base al contenido en sólidos volátiles (SV) medidos para el inóculo y el sustrato. Durante los experimentos no se observó inhibición del proceso debido a la acumulación de ácidos grasos volátiles, por lo que el ratio escogido fue adecuado. Según los resultados obtenidos por Ponsá et al. (2011), el ratio de inóculo/sustrato oscilaba entre 0.4/1 y 4/1 en materia seca (MS), dependiendo de si el residuo presentaba una alta o baja biodegradabilidad. Los residuos evaluados habían pasado por procesos de degradación aerobios diferentes, pero en ninguno de los casos se observó inhibición del proceso por acumulación de ácidos grasos. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando dos tipos de digestores. Para los sustratos no estructurados previamente y de tamaño de partícula reducido, se utilizaron recipientes de vidrio de 250 mL de capacidad y sellados herméticamente con tapa metálica provista de un septum de goma. En los casos en que el material provenía de un proceso de FES y contenía astillas de madera, se utilizaron botellas de aluminio de 1L de capacidad que se cerraban mediante un tapón ajustable provisto de una válvula de bola.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El aire en el interior de los digestores fue desplazado por N<sub>2</sub> antes de inicial los test con tal de inertizar el ambiente. La mezcla

inóculo sustrato se preparó de acuerdo a los sólidos volátiles medidos para cada uno. En el caso del inóculo el porcentaje variaba entre un 1% y 1,5%, mientras que para el sustrato variaba entre 25% y 30%, por lo que la cantidad de sustrato siempre era muy inferior a la de inóculo. Por este motivo, la variación de volumen de la mezcla debida al sustrato se consideró despreciable y se usó el volumen de inóculo para la realización de los cálculos.

Tres digestores que contenían el mismo volumen de inóculo que las mezclas se prepararon como blancos. Los reactores permanecieron a 37 °C dentro de un incubador Memmert In750. La medida de la presión en el espacio vacío del reactor se realizaba cada 2 días aproximadamente, el reactor era agitado manualmente antes y después de realizar la medida. Para la medida de la presión se utilizó un presostato ISE 30A-01-P con una precisión de 0.01 bares, bien acoplado a una aguja para los reactores de 250 mL o a un dispositivo ajustable a la tapa de los reactores de 1L.

Se tomaron medidas de la composición del biogás a lo largo de los experimentos. El porcentaje de metano y dióxido de carbono fue medido utilizando un cromatógrafo de gases 5890A con una columna 17066\_F ParcpackQ (250C), soporte 100/120, tubo 3m 1/8"x 5.5 mm. La temperatura inicial del horno era 70 °C, y la temperatura final era de 120°C, el tiempo de determinación del método era de 8 min, el inyector se encontraba a 150 °C y el detector a una temperatura de 180°C. El pico de metano era detectado a los 0.8 minutos. Se utilizaron 100 µl de muestra gaseosa para el análisis.

La duración de los experimentos fue aproximadamente de 21 días, por lo que se calculó la producción de biogás a los 21 días ( $GB_{21}$ ) y el potencial de metano biológico tras 21 días ( $BMP_{21}$ ) (Federal Government of Germany, 2001). Ambos índices se expresaron en  $N\text{ mL g}^{-1}\text{ SV}$ , es decir, volumen de gas medido en condiciones normales por gramo de sólidos volátiles (SV) en el sustrato.

El cálculo de  $BMP_{21}$  se llevó a cabo según las ecuaciones 3.11 y 3.12.

$$Vm = \frac{EV 273 \sum_{i=0}^{i=21} P}{310 1.013} \quad (\text{Ecuación 3.11})$$

Donde  $V_m$  es el volumen de biogás producido en condiciones normales (N mL),  $E_V$ , el espacio vacío en el reactor anaerobio (mL), 273, la temperatura en K en condiciones normales,  $P$ , la diferencia de presión entre la atmósfera y el espacio vacío del digestor (bar), medido puntualmente, 310 la temperatura de incubación (K) y 1.013, la presión atmosférica en condiciones normales (bar).

$$GB_{21} = \frac{Vm - Vb}{SV} \quad (\text{Ecuación 3.12})$$

$GB_{21}$  es la producción de biogás a los 21 días, expresado en N mL de biogás  $g^{-1}$  SV de sustrato,  $V_m$  es el volumen de biogás producido en condiciones normales calculado en la ecuación 3.14 (N mL),  $V_b$ , el volumen de biogás en condiciones normales producido por el blanco (N mL) y  $SV$ , la cantidad de sólidos volátiles de sustrato en la mezcla (g).

El cálculo de  $BMP_{21}$  se llevó a cabo según la ecuación 3.13:

$$BMP_{21} = GB_{21} \times F_{CH_4} \quad (\text{Ecuación 3.13})$$

Donde  $GB_{21}$  es la producción de biogás tras 21 días (N mL  $g^{-1}$  SV sustrato), calculado anteriormente, y  $F_{CH_4}$  es la fracción volumétrica media de  $CH_4$  medida en el biogás (por cromatografía).

# *Capítulo 4*

---





## 4 Resultados y discusión

Este capítulo ha sido estructurado en tres apartados que corresponden a los tres bloques de experimentos realizados: extracción de proteasas, extracción de celulasas y material fresco

### 4.1 Determinación del rendimiento de extracción de proteasas producidas por la FES de residuos, conservación de la actividad y estrategias de cero residuos para la gestión del sólido

Parte de este apartado ha sido publicado como: Marin M, Artola A, Sánchez A (2018) Production of protease from organic wastes by solid-state fermentation: downstream and zero waste strategies. 3 Biotech 8:205 <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1226-y>.

#### 4.1.1 Introducción

El trabajo realizado en este capítulo está relacionado con los resultados obtenidos por la doctora Juliana Abraham en su tesis *Production of proteases from industrial wastes through solid-state fermentation at different scales, Potential applications (2014)*. En la tesis mencionada, la doctora Abraham consiguió producir proteasas a partir de la fermentación en estado sólido de dos residuos, pelo de vacuno y fibra de soja, provenientes de la industria del curtido y de la preparación de bebidas vegetales respectivamente.

Los valores máximos de actividad de proteasas obtenidos por la doctora Abraham fueron de 30000 U g<sup>-1</sup>MS para el pelo y 50000 U g<sup>-1</sup>MS para la fibra de soja, respectivamente.

En vista de los altos valores de actividad obtenidos y del beneficio ambiental y económico de utilizar residuos como materia prima del proceso de fermentación, se decidió profundizar en el estudio de otros aspectos del proceso.

El presente capítulo se centra en aspectos del down-stream de ambos procesos de fermentación, tanto de pelo como de fibra de soja, y en la aplicación de estrategias de cero residuos tras la extracción, con el fin de obtener beneficio del residuo sobrante y reducir su impacto ambiental.

Se presentan a continuación los resultados obtenidos en experimentos en los que se evaluaba la recuperación de actividad de proteasas variando diferentes parámetros de extracción, que fueron: el tipo de extractante, el ratio de extracción sólido-líquido y el tipo de agitación. Otros parámetros como la temperatura no fueron considerados ya que a una escala industrial encarecerían el proceso excesivamente, contrarrestando el ahorro obtenido al utilizar un residuo como sustrato.

También se describen los resultados de la digestión anaerobia de ambos residuos tras la extracción de proteasas, así como los resultados de actividad biológica del residuo durante la estabilización aerobia del mismo, también realizada tras la extracción.

#### **4.1.2 Materiales y Metodología**

##### *4.1.2.1 Reactores y materiales utilizados*

Los reactores utilizados en las fermentaciones en estado sólido fueron los descritos en el capítulo 3. Mayoritariamente, se utilizaron los reactores de volumen de trabajo de 10 L, aunque algunos experimentos se realizaron en el reactor de 50 L, ambos de lecho fijo.

Los materiales utilizados como sustratos fueron: pelo proveniente de la industria del curtido de pieles, sometido previamente a procesos alcalinos, y fibra de soja proveniente de la fabricación de bebidas vegetales. Como inóculo en el caso del pelo, se utilizó lodo fresco deshidratado proveniente de la planta municipal de tratamiento de aguas residuales de Igualada. Todos los materiales fueron también descritos en el Capítulo 3.

En los primeros experimentos de fermentación, tanto para la soja como para la mezcla de pelo y lodo, se realizó una homogeneización del material previa al muestreo, llevando a cabo dicha homogeneización fuera del reactor. En los últimos experimentos realizados a volumen de 10 L y 50 L, no se realizó muestreo de seguimiento ni homogeneización de la muestra con el fin de alterar la evolución del proceso lo mínimo posible.

##### *4.1.2.2 Extracciones*

La extracción de proteasas se realizó siguiendo dos metodologías diferentes en el caso de la mezcla de pelo y lodo. En un principio, se preparó una cantidad suficiente de mezcla para llevar a cabo varios replicados en los reactores de 10 L y en el punto de máxima actividad se procedió a realizar la extracción de todo el volumen de material en modo estático, utilizando AD como agente extractante, y con una proporción de aproximadamente 1:1.5 g:mL. El extracto fue centrifugado y la actividad medida. Posteriormente, se realizaron una

serie de experimentos para determinar el mejor método de extracción combinando diferentes parámetros. En estas extracciones, las cantidades utilizadas eran de aproximadamente 200 g de material, con el objetivo de poder realizar triplicados de las extracciones bajo cada combinación de parámetros. En el caso de la soja, tras la experiencia previa con la mezcla de lodo y pelo, se realizaron directamente extracciones a escala banco de pruebas (200 g de material), siguiendo la misma metodología que con la mezcla de pelo y lodo. Posteriormente, se realizaron extracciones utilizando una cantidad mayor de material para verificar los resultados de las extracciones utilizando 200 g de material.

#### *4.1.2.3 Liofilizado*

Para determinar la pérdida de actividad debida a la liofilización se congelaron a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  alícuotas de 15 mL de los extractos obtenidos para cada combinación de parámetros de extracción diferentes. Estas muestras se liofilizaron y se redisolieron en AD hasta su volumen original, tras lo que se calculó la actividad remanente y la pérdida de dicha actividad.

Para el cálculo de la pérdida de actividad de las proteasas obtenidas a partir de la mezcla de pelo y lodo a largo plazo, varias alícuotas de 15 mL de la extracción de proteasas, en un ratio 1:2, en modo estático y utilizando AD como extractate, fueron congeladas también a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente liofilizadas. El mismo procedimiento se llevó a cabo para un volumen del mismo extracto de 500 mL. En este caso el sólido obtenido fue pulverizado y homogeneizado tras la liofilización.

Se realizó periódicamente la determinación de la actividad de dos de las alícuotas de 15 mL liofilizadas independientemente y redisueltas hasta su volumen original, además de una cantidad de sólido proveniente de la liofilización de los 500 mL, equivalente a 30 mL, también redisuelta en AD hasta dicho volumen.

### **4.1.3 Resultados y discusión**

#### *4.1.3.1 Caracterización del material*

La tabla 4.1 muestra las características del pelo proveniente de la industria del tratamiento de pieles, el lodo fresco desecado utilizado como inóculo, la mezcla de ambos residuos y la fibra de soja proveniente de la fabricación de bebida de soja, utilizados en este apartado 4.1.

Como se puede observar, se utilizaron sustratos ricos en nitrógeno, ya que el objetivo de la fermentación era la producción de proteasas. La porosidad de la mezcla fue medida para verificar una aireación del total del material. Annan et al. (1999) recomienda un valor de porosidad entre un 30% y un 60%. Para la humedad los valores recomendados oscilan entre un 40% y 70% en peso (Gea et al. 2007). Tanto la mezcla de pelo y lodo como la fibra de soja presentan un porcentaje de humedad óptimo y porosidad algo superior a lo recomendado según la bibliografía, así como un bajo ratio C/N. No obstante, durante el proceso, no se observaron grandes pérdidas de calor debido a la elevada porosidad.

Tabla 4.1 Caracterización físico-química de los residuos de pelo y soja

Parámetros	Pelo	Lodo	Pelo&lodo	Fibra de soja
<b>Humedad (% , bh)</b>	67 ± 8	75 ± 2	62.3 ± 0.8	67 ± 8
<b>Materia orgánica (% , bs)</b>	86 ± 1	67	89 ± 1	96 ± 3
<b>pH</b>	9.9 ± 0.8	7.8 ± 0.4	7.6 ± 0.3	6 ± 2
<b>Conductividad (ms cm<sup>-1</sup>)</b>	4.5 ± 0.8	2.3 ± 0.9	3 ± 1	0.9 ± 0.2
<b>Carbono orgánico total (% , bs)</b>	51 ± 9	n.d.	64 ± 3	69 ± 3
<b>Nitrogeno total kjeldahl (% , bs)</b>	10 ± 4	16	7.3 ± 0.5	4.9 ± 0.6
<b>Ratio C/N</b>	6 ± 1	3	7.1 ± 0.8	14 ± 1
<b>Contenido en grasa – hem (% , bs)</b>	0.9 ± 0.3	n.d.	n.d.	6 ± 2
<b>FAS (%)</b>	n.d.	n.d.	77 ± 4	74

bs: base seca; bh: base húmeda; n.d.: no disponible

La biodegradabilidad fue evaluada mediante ensayos respirométricos dinámicos mostrando valores de IRD<sub>24h</sub> de 5 ± 2 y 2.0 ± 0.1 g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup> para la fibra de soja y la mezcla de pelo y lodo, confirmando la biodegradabilidad de las mezclas.

#### 4.1.3.2 Fermentación en estado sólido

La Figura 4.1 muestra un ejemplo de perfil de temperatura y velocidad de consumo de oxígeno OUR<sub>1h</sub> (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup>), obtenidos en los procesos de fermentación de pelo y lodo.

La actividad de proteasas más elevada se observó mayoritariamente durante la fase mesófila, tras 8 días de proceso. Como se muestra, el pH inicial de la mezcla se encuentra alrededor de 7.5 y aumenta rápidamente a valores cercanos a 8 durante la fase termófila, manteniéndose en este rango durante toda la fermentación.

La Figura 4.1 muestra un descenso de temperatura tras la toma de muestra y homogeneización simultáneas que, como se observa, podía llegar a los 10 °C. Utilizando este método de operación, los valores máximos de actividad alcanzados fueron de 8000 U g<sup>-1</sup> MS, muy inferiores a los reportados por Abraham et al. (2017), que rondaban las 30000 U g<sup>-1</sup> MS.

En un primer momento se creyó que la causa podía ser el inóculo utilizado, que era de diferente procedencia, ya que Abraham et al. (2017) y Abu Yazid et al. (2016) utilizaban lodo digerido anaeróbicamente y deshidratado, proveniente de la planta de depuración de Aguas de Riu Sec (Sabadell), mientras que en estos experimentos se utilizó lodo fresco y deshidratado de la planta de depuración de aguas de Igualada.

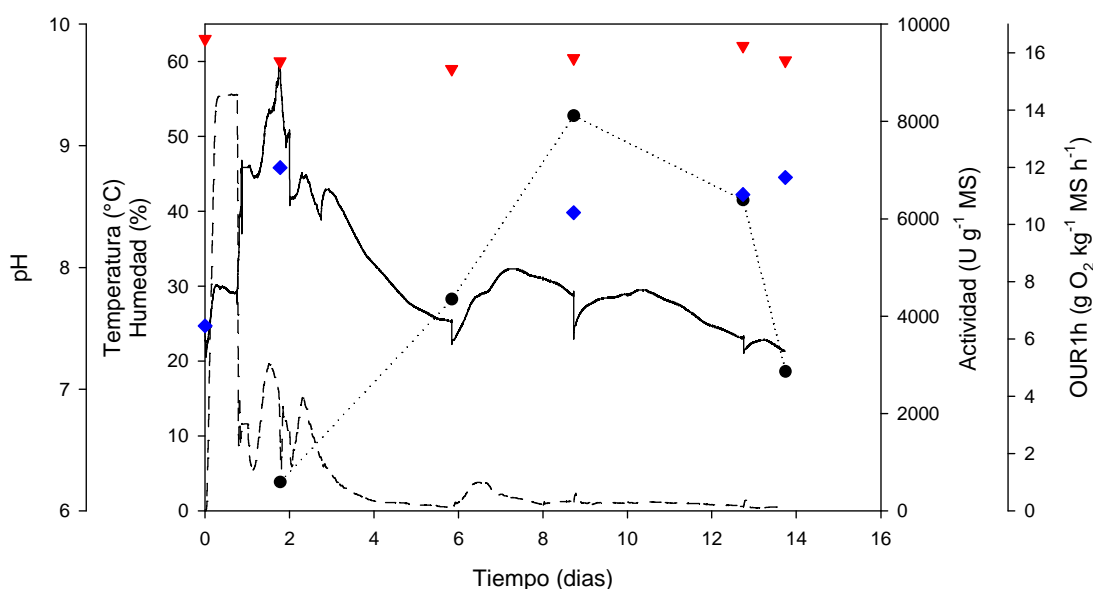


Figura 4.1 Perfil de temperatura (línea continua), OUR1h (línea punteada), actividad (puntos negros), pH (diamantes azules) y porcentaje de humedad (triángulos rojos) de un proceso de fermentación en estado sólido de la mezcla de pelo y lodo (1:2 g:g) estructurada con astilla de madera (1:1 mL:mL)

De todas formas, se probó a realizar el proceso de fermentación aplicando una corta homogeneización del material y procurando que no se produjese ninguna caída de la temperatura, el resultado se muestra en la Figura 4.2.

Como puede observarse, la actividad medida presenta ya valores de 8000 U g<sup>-1</sup> MS en el 5º día, mientras que en los experimentos anteriores se observaban en el día 8. Las temperaturas alcanzadas rozaron los 70 °C, lo que provocó el aumento de la evaporación de agua y una pérdida de humedad de la mezcla hasta el punto de desprender polvo durante su

manipulación. La humedad en este caso alcanzó valores del 35%, demasiado reducida para que la actividad biológica prosiguiese.

En este punto del proceso, se decidió añadir agua a la muestra, resultando en una posterior recuperación de la actividad en el rango observado en la Figura 4.2. Tras estos resultados, en las siguientes fermentaciones, se decidió saturar el material de humedad hasta el máximo de su capacidad hídrica y no aplicar ningún tipo de homogeneización con tal de no provocar alteraciones en el sistema. El resultado fue la medición de una actividad de 24000 U g<sup>-1</sup> DM el día 8 de proceso. El experimento bajo estas condiciones se realizó por sextuplicado, obteniendo valores muy similares en los seis casos, a pesar de presentarse otras complicaciones durante el proceso como aireación insuficiente por debajo del 10% de oxígeno dentro del reactor.

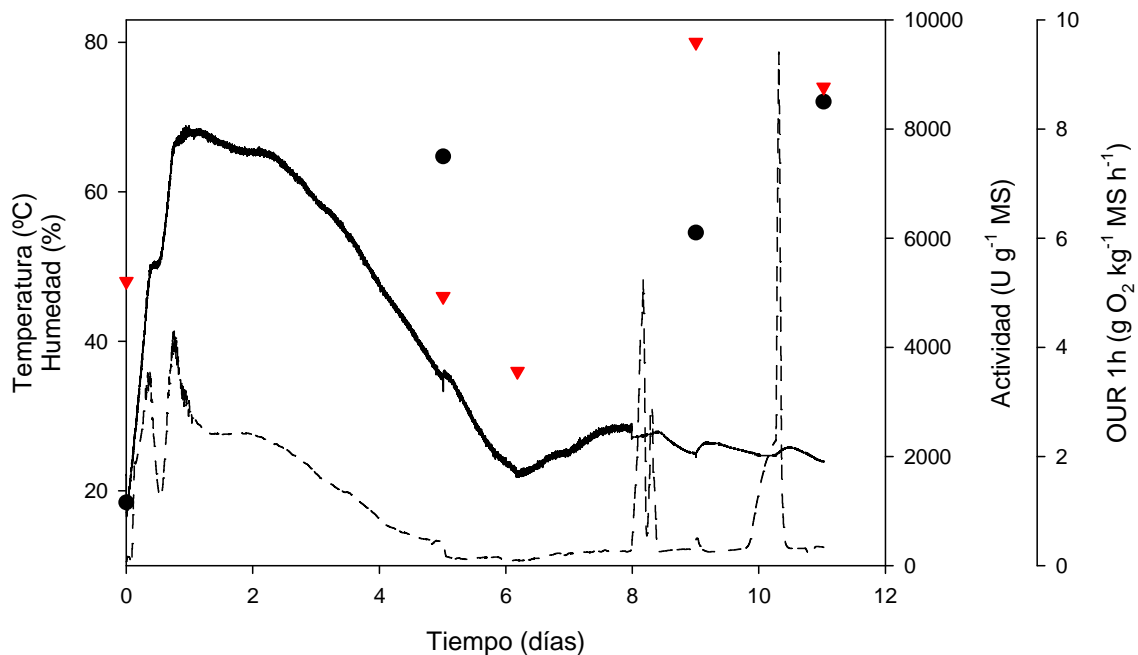


Figura 4.2 Perfil de temperatura (línea continua), OUR1h (línea punteada), actividad (puntos negros) y humedad (triángulos rojos) de un proceso de fermentación en estado sólido de la mezcla de pelo y lodo (1:2 g:g) estructurada con astillas de madera (1:1 mL:mL)

Por tanto, el usar lodo fresco y secado en lugar de lodo anaerobiamente digerido, que presenta un porcentaje mayor de humedad, resultó ser menos beneficioso, ya que fue necesario adicionar agua para evitar el secado del material debido a las altas temperaturas alcanzadas.

Otro caso observado en el que las condiciones exteriores causaron una gran influencia en el proceso se muestra en la Figura 4.3.

En este caso, el proceso de fermentación se realizó a escala piloto con 17.5 kg de material. Como puede observarse, y a pesar de la homogeneización continuada que se le aplicó en cada toma de muestra, la temperatura alcanzada consigue llegar a los 60 °C, no Por lo tanto, se deduce que la alteración del proceso, ya sea provocando pérdidas de calor o aplicando agitación a la mezcla, hacen caer la actividad de manera drástica. Finkler et al. (2017) demostraron que la agitación intermitente favorecía la eliminación de gradientes de temperatura y caminos preferenciales en la producción de pectinasas mediante fermentación en estado sólido en un reactor lecho empacado a escala piloto, siendo por lo tanto beneficiosa para el proceso. Por otro lado, según Mitchell et al. (2004) las condiciones ambientales influyen en la cinética de crecimiento de cada cultivo de manera diferente, siendo la temperatura y la humedad las más relevantes en los reactores de FES. En el caso que nos ocupa, en el proceso de fermentación no interviene un tipo único de microorganismos, sino que es un consorcio presente en el residuo, y que se espera que sea variable en el tiempo debido al cambio de condiciones ambientales. Por lo tanto, si durante la etapa termófila inicial, que dura aproximadamente 48 horas, se da una bajada de temperatura drástica, esto podría estar favoreciendo a determinadas poblaciones en detrimento de otras, y a la larga a la evolución del proceso, por lo que la población final diferiría de la esperada, dando lugar en este caso a una menor producción de proteasas.

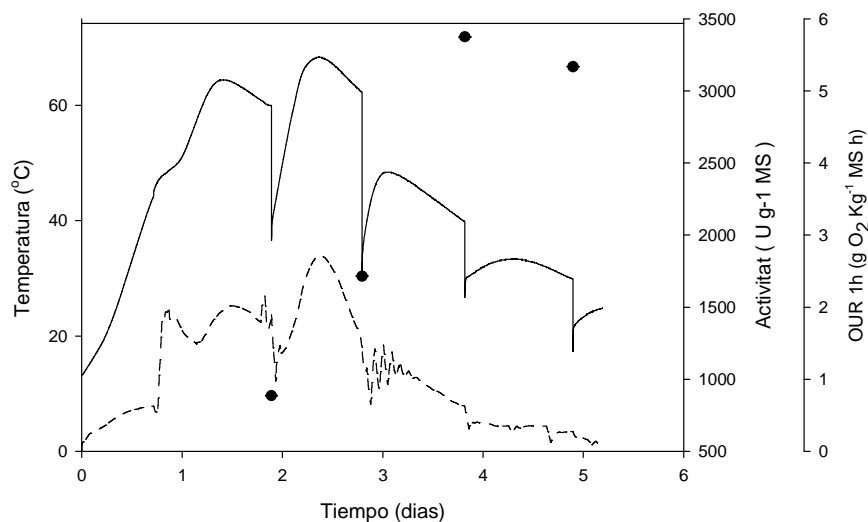


Figura 4.3 Perfil de temperatura (línea continua), OUR1h (línea punteada) y actividad (puntos negros) de un proceso de fermentación en estado sólido de la mezcla de pelo y lodo (1:2 g:g) estructurada con astillas de madera (1:1 mL:mL)



La Figura 4.4 muestra los perfiles de actividad, temperatura y consumo de oxígeno correspondientes a un proceso de fermentación en estado sólido de fibra de soja estructurada con astillas de madera.

En este caso, tal y como ocurrió con la mezcla de lodo y pelo, la actividad alcanzada al final de proceso, que en este caso duró aproximadamente 4 días (Abraham et al. 2013), fue de aproximadamente  $8000 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$ , muy inferior a la reportada por Abraham et al. (2013) y por Abu Yazid et al. (2016). Tal y como se procedió en el caso del pelo y el lodo, se llevó a cabo la homogeneización del material en el momento del muestreo, lo que provocó una alteración en el sistema.

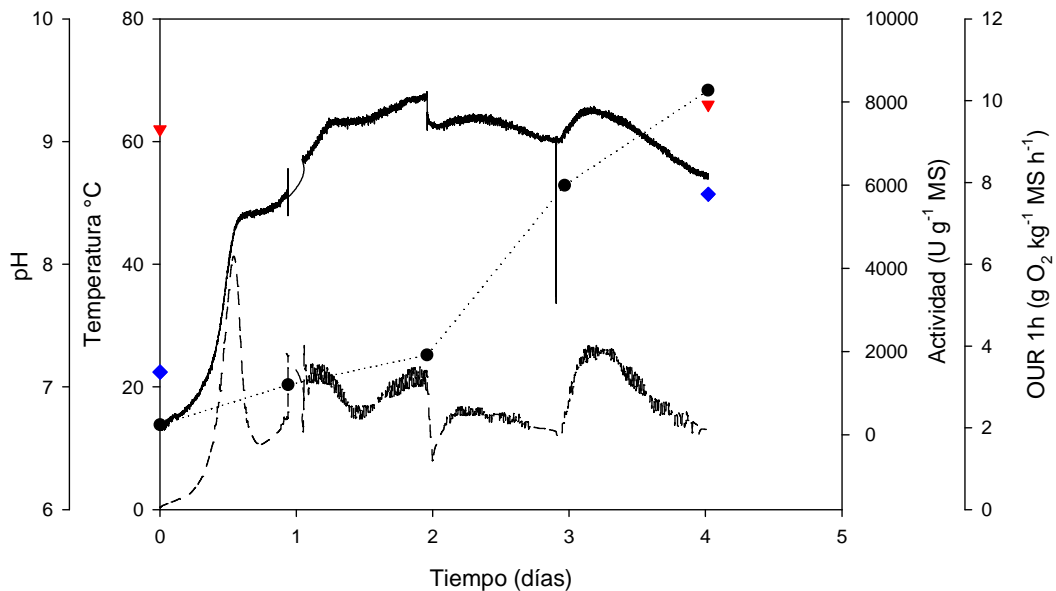


Figura 4.4 Perfil de temperatura (línea continua), OUR1h (línea punteada), actividad (puntos negros), pH (diamantes azules) y humedad (triángulos rojos) de un proceso de fermentación en estado sólido de fibra de soja estructurada con astillas de madera (1:1 mL:mL)

Un experimento posterior, llevado a cabo a escala piloto (20 kg de mezcla inicial) para el cual el reactor no se abrió en ningún momento, mostró una actividad final de  $32000 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$  al cabo de 5 días de proceso, alcanzando temperaturas cercanas a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . De este hecho se deduce que al igual que pasaba en el caso de la mezcla de pelo y lodo, la alteración del proceso presenta gran influencia en la producción final.

#### 4.1.3.3 Extracciones

Algunos de los factores que influyen la extracción enzimática de la matriz sólida en el punto de máxima actividad durante el proceso de fermentación en estado sólido fueron

evaluados para ambos residuos variando los parámetros de extracción indicados con anterioridad: agitación, agente extrantante y relación sólido:agente extractante.

La Figura 4.5 a), b) y c) muestra la media numérica y la desviación estándar de la actividad proteasa recuperada bajo las diferentes condiciones de extracción. Cada valor es, al menos, la media de tres replicados independientes para ambos residuos. En el caso de las extracciones en las que se recirculó el líquido extractante se realizaron por duplicado debido a la disponibilidad de equipos y las dificultades que implicaban.

### **i) Agitación**

La máxima recuperación de actividad tanto para la fibra de soja como para la mezcla de lodo y pelo, fue obtenida en modo agitado, con un ratio de 1:4 y utilizando AD como agente extractante se recuperó un  $91 \pm 8\%$  de la actividad para la fibra de soja y un  $121 \pm 22\%$  para la mezcla de pelo y lodo

Los valores más bajos de recuperación obtenidos para la fibra de soja se observaron para un ratio de extracción de 1:1 (g:mL) con AD como agente extractante y en régimen agitado. Observando la media de valores obtenidos en estático y aplicando agitación para el mencionado residuo, la extracción con agitación presenta aproximadamente un 10% más de eficiencia que el modo estático. Comparando estos resultados con los obtenidos por Heck et al. (2005) en la extracción de xilanasas de residuo fibroso de soja, en los que se alcanzan diferencias del 20% entre régimen agitado y estático, el régimen de agitación presentaría menos influencia en la extracción de proteasas obtenidas en este trabajo.

En cuanto a los valores mínimos de recuperación obtenidos para la mezcla de pelo y lodo, éstos se observaron para las extracciones realizadas bajo un ratio 1:3 (g:mL) utilizando TB y en régimen estático. La diferencia entre los resultados en estático y aplicando agitación para lodo y pelo presentan hasta un 40% de diferencia, lo que indica que en este caso el régimen de agitación resulta de gran importancia.

### **ii) Tipo de extractante**

El análisis de varianza de un factor (ANOVA) fue llevado a cabo para comparar los rendimientos de actividad obtenidos cuando las condiciones de extracción diferían en un parámetro de extracción. Para ambos residuos, no se muestran diferencias entre los resultados obtenidos utilizando TB o AD y manteniendo el resto de parámetros iguales.

La solubilidad de las proteínas depende principalmente de interacciones polares entre moléculas y disolvente y entre moléculas y matriz sólida. Ambos disolventes resultan ser polares y pueden ser usados a priori en la extracción de proteasas. El perfil de solubilidad de las proteínas dependiendo del pH, presenta un mínimo en el punto isoeléctrico, el valor del cual depende de la proteína (Hu et al. 2017). De acuerdo con Vuong et al. (2016), la concentración de sal puede también afectar, negativa o positivamente, a la solubilidad, ya que puede eliminar capas de hidrato alrededor de las proteínas. Freitas et al. (2013) detectó desnaturalización de proteasas producidas durante la FES de torta de canola a pH 4, por lo que un pH excesivamente bajo debe ser evitado. La tabla 4.2 muestra los valores de pH y conductividad medidos en diferentes extractos.

Tabla 4.2 Valores de pH y conductividad de los extractos de proteasas de mecla de fibra de soja y mezcla de pelo y lodo fermentados

Fibra de soja					Pelo & lodo				
L	E	RA	pH	Conductividad (mS cm <sup>-1</sup> )	L	E	RA	pH	Conductividad (mS cm <sup>-1</sup> )
AD	Agitado	1:1	8.9	6.9	AD	Agitado	1:1	8.7	11.46
AD	Agitado	1:2	8.9	4.7	AD	Agitado	1:2	8.83	7.77
AD	Agitado	1:3	8.9	3.2	AD	Agitado	1:3	8.78	5.83
AD	Agitado	1:4	9.0	2.9	AD	Agitado	1:4	8.77	4.76
AD	Estático	1:1	8.5	2.4	AD	Estático	1:1	8.79	10.16
AD	Estático	1:2	8.7	3.0	AD	Estático	1:2	8.82	5.99
AD	Estático	1:3	8.7	3.5	AD	Estático	1:3	8.81	4.34
AD	Estático	1:4	8.6	2.7	AD	Estático	1:4	8.85	4.32
TB	Agitado	1:1	8.6 ± 0.2	7.5 ± 0.5	TB	Agitado	1:1	8.69	12.04
TB	Agitado	1:2	8.5 ± 0.1	6.1 ± 0.7	TB	Agitado	1:2	8.6	8.76
TB	Agitado	1:3	8.5 ± 0.04	5.2 ± 0.2	TB	Agitado	1:3	8.5	7.09
TB	Agitado	1:4	8.4 ± 0.04	4.7 ± 0.4	TB	Agitado	1:4	8.51	6.67
TB	Estático	1:1	n.d.	n.d.	TB	Estático	1:1	8.58	12.55
TB	Estático	1:2	n.d.	n.d.	TB	Estático	1:2	8.54	8.35
TB	Estático	1:3	n.d.	n.d.	TB	Estático	1:3	8.37	5.83
TB	Estático	1:4	n.d.	n.d.	TB	Estático	1:4	8.31	5.09

L: Líquido extractante; AD: agua destilada; TB: HCl-Tris buffer 0.05M y pH 8.1; E: Modo de extracción; RA: ratio de extracción (g:mL), n.d.: no disponible

Como se puede observar, el pH tanto en los casos en los que se utilizó AD como en los que la extracción se realizó con TB son muy similares, con un máximo de 9 y un mínimo de 8.3, de lo que se desprende que el efecto de regulación del pH que aporta el TB no es requerido para mantener un pH adecuado.

El pH alcanzado en el caso del AD es debido a la solubilización de sales y otros compuestos contenidos en la matriz sólida. La diferencia entre ambos residuos queda reflejada

en los valores de conductividad, que incrementa a medida que disminuye el ratio de extracción, debido a una mayor concentración de sales solubles contenidas en la matriz sólida, la conductividad alcanza valores más elevados para pelo y lodo, de acuerdo con los valores del residuo de partida.

Durante la FES de la fibra de soja y la mezcla de pelo y lodo, la actividad proteica aumentaba siempre que el pH alcanzara valores cercanos a 8-9, por lo que es de esperar que dichas proteasas conserven su estabilidad en las condiciones de extracción que se muestran en la tabla 4.2.

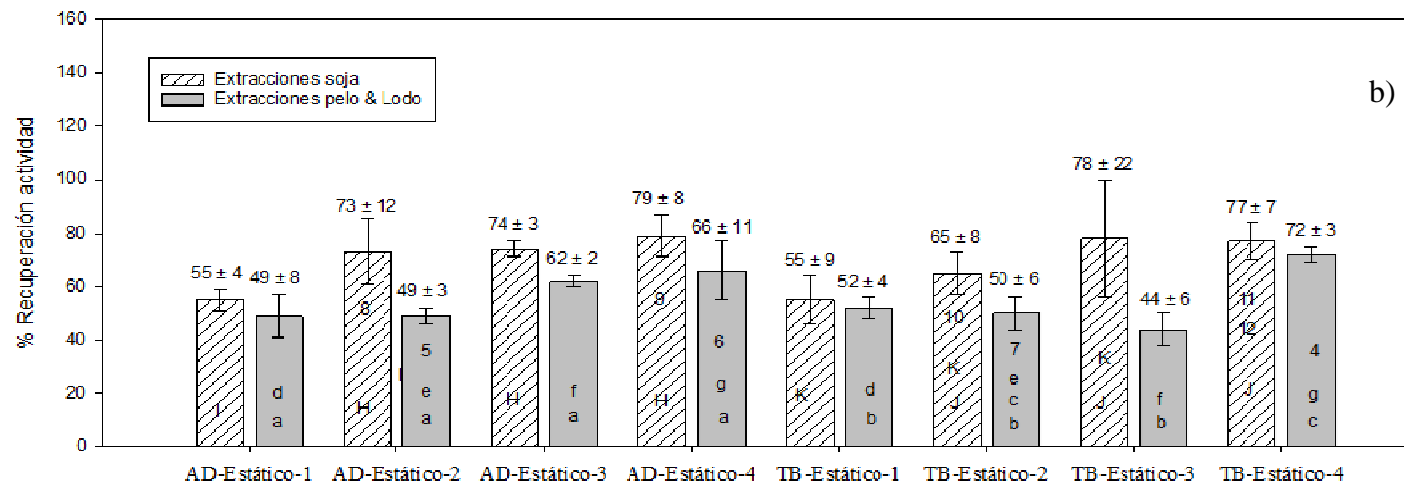
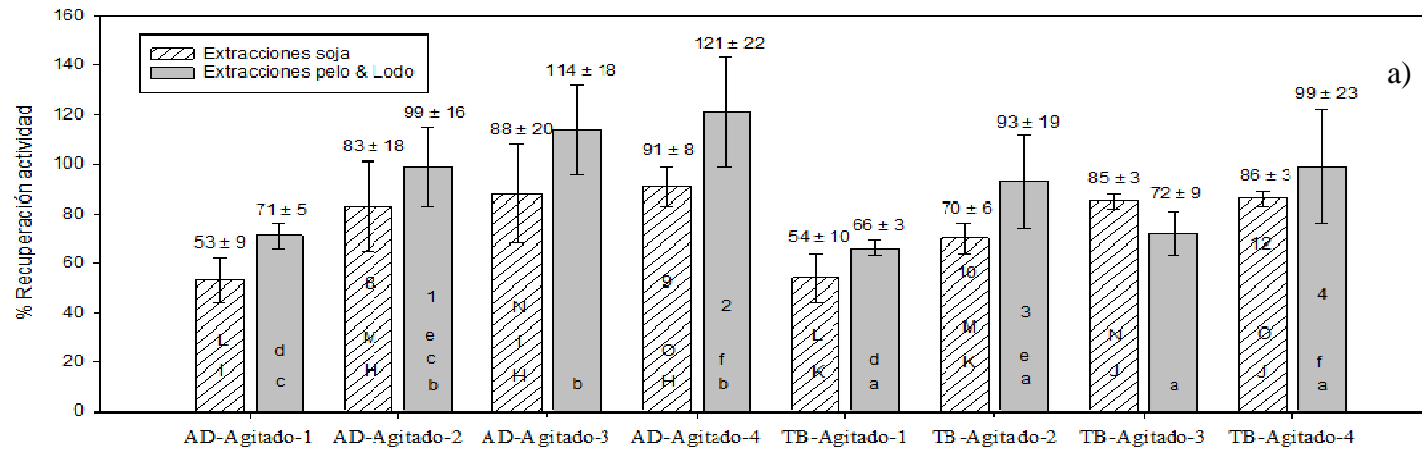
De acuerdo con la literatura consultada, la AD es frecuentemente utilizada en la extracción enzimática con rendimientos elevados (Aikat et al. 2000). Díaz et al. (2007) obtuvieron buenos resultados en la extracción de xilanasas y exo-poligalacturonasas con AD en comparación con otros agentes de extracción como el citrato, el acetato y diferentes concentraciones de surfactantes. No obstante, Singh et al. (2003), observaron una mejora en la extracción de  $\beta$ -glucosidasa y lacasa proveniente de champiñón compostado utilizando citrato en vez de agua de red y AD.

En la literatura, se han encontrado trabajos en los que la extracción de proteasas se lleva a cabo utilizando TB (Nabarlatz et al. 2012). Sin embargo no se ha encontrado ningún trabajo que compare el rendimiento obtenido con el uso de AD frente al TB.

### **iii) Régimen de agitación**

Fueron evaluados tres regímenes de extracción diferentes por su efectividad en la extracción de proteasas: Sin agitación, con agitación orbital a 120 rpm y recirculación del líquido a dos ratios de extracción diferentes, 1:2 y 1:4 (g:mL), utilizando un caudal de 96 mL/min, lo que resultaba en 14 recirculaciones del total del líquido extractante en el caso del ratio 1:2 y en 7.2 recirculaciones del total del líquido en el caso del ratio 1:4, debido a la adición del doble de agente extractante. Los resultados para ambos residuos se muestran en las Figuras 4.5 a), b) y c), respectivamente.

El análisis de varianza de un factor (ANOVA) fue realizado comparando los resultados obtenidos para los ratios de extracción 1:4 y 1:2 para ambos residuos. La actividad recuperada en el caso de la fibra de soja no presentaba diferencias significativas entre la obtenida en régimen agitado y estático. No obstante, existía una diferencia estadística



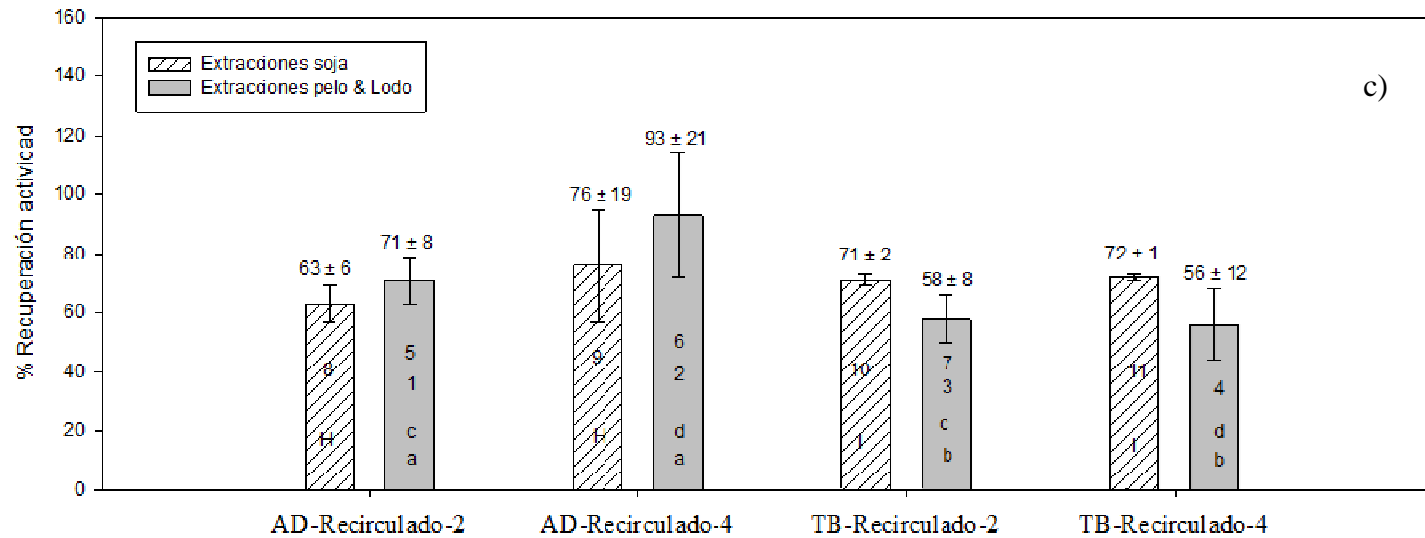


Figura 4.5 Porcentaje de recuperación de actividad proteica variando el ratio de extracción sólido:líquido (g:mL) y el tipo de extractante. TB: HCl-Tris buffer 8.1, AD: Agua destilada, 1, 2, 3 y 4: ratios de extracción g:mL 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 respectivamente. Las letras mostradas en las barras marcan los valores que no presentan diferencia significativa dentro de la figura, los números marcan los valores que no presentan diferencias estadísticas comparando las diferentes figuras 4.5 a), b) y c), según ANOVA. a) Modo de extracción estático, b) Modo de extracción agitado, c) Modo de extracción recirculado

entre las recuperaciones de actividad obtenidas en régimen agitado y con recirculación del líquido cuando se utilizaba TB como extractante.

El perfil observado coincide con el trabajo publicado por Tunga et al. (1999), donde se llevó a cabo la extracción de proteasas de una matriz sólida de salvado de trigo, y en el que se observó aproximadamente una diferencia del 10% entre la recuperación enzimática en régimen agitado y estático. La similitud parece consistente, ya que ambos residuos, salvado de trigo y fibra de soja, son materiales lignocelulosicos.

Cuando se compararon los resultados obtenidos para la mezcla de lodo y pelo utilizando nuevamente el análisis de varianza de un factor, éste mostró la existencia de diferencias significativas en todos los casos entre los regímenes de agitación orbital y estática. Esta diferencia es debida a la naturaleza del residuo. El lodo utilizado como inóculo contiene productos químicos añadidos al agua en la planta de tratamiento de aguas residuales para producir la floculación de los sólidos y su posterior sedimentación. Nabarlatz et al. (2012) comparó la extracción de proteasas y lipasas provenientes de dos lodos de diferente procedencia usando agitación y ultrasonicación, obteniendo un mucho mejor resultado con la mitad de tiempo de extracción en la segunda estrategia. Este hecho muestra que la presencia de flóculos, formados por la adición de productos químicos, produce aglomeración de los sólidos presentes en el agua tratada, derivando en un pobre contacto entre sólido y líquido durante la extracción y por lo tanto un descenso en el rendimiento.

Por otro lado, la fibra de soja presenta un tamaño de partícula realmente pequeño, y se observa que el sólido pierde su estructura apenas entra en contacto con el líquido, permitiendo un buen contacto entre sólido y líquido.

Valores de DQO de los extractos de fibra de soja y mezcla de pelo y lodo, obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales, presentaban valores de 7525 y 3280 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, lo que indica mayor solubilidad del material presente en la fibra de soja que de la mezcla de lodo y pelo.

#### **iv) Ratio líquido-sólido (extractante-residuo)**

Los resultados del análisis ANOVA de un factor practicado a los resultados que diferían en el ratio de extracción no muestran, para la fibra de soja, ninguna diferencia estadística entre extracciones realizadas con ratio 1:3 y 1:4 (g:mL). Por otro lado, en algún

caso, si se han observado diferencias significativas entre las extracciones realizadas con ratio 1:4 y 1:2 (g:mL), y más aún entre las extracciones realizadas con ratio 1:4 y 1:1.

Cuando se evaluaron las diferencias entre los ratios de extracción para la mezcla de lodo y pelo, no se encontraron diferencias significativas entre las extracciones realizadas a ratio 1:2 y 1:4. Sólo se observó en algún caso diferencias estadísticas entre las extracciones a 1:4 y 1:3. Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados, la solubilidad de las proteasas en el caso de la fibra de soja parece ser más elevada y encontrarse relacionada con el equilibrio entre la concentración de proteasas en la matriz sólida y el agente extractante. En la literatura, la relación entre la actividad enzimática y el ratio g:mL ha sido documentada. Como ejemplo, Mala et al. (2007) mostraron una recuperación del 71.6% de lipasas utilizando un ratio de extracción de 1:12, mientras que la recuperación fue tan sólo de un 31.5% utilizando un ratio inferior de 1:4. La diferencia de rendimiento en comparación con el obtenido en este trabajo puede ser debido a la naturaleza hidrofóbica de la lipasa, comparada con la proteasa. A pesar de que la mayoría de estudios realizados sobre esta cuestión confirman una relación directa entre ratio de extracción y actividad (Vardenega et al. 2010), en la literatura también se encuentran resultados contrarios, como los descritos por Volken et al. (2008), quien encontró un efecto negativo en el incremento del volumen de extractante en la recuperación de transglutaminasas provenientes del residuo vegetal de fibra de soja. De cualquier forma, hay que señalar que a mayor ratio de extracción, más dilución del producto, y por lo tanto requerirá de un procesado posterior para concentrarlo o un mayor aporte de energía durante la liofilización. Este hecho no se tiene en consideración en la mayoría de trabajos realizados a escala de laboratorio, ya que no suelen considerarse las etapas posteriores de tratamiento. No obstante, es un factor de gran importancia cuando se trabaja a escala industrial.

Los datos mostrados en las Figuras 4.5 a), b) y c) se sometieron a una regresión lineal utilizando el software Excel. Se le asignaron valores a los diferentes parámetros de extracción obedeciendo al siguiente criterio, ya que tan sólo los números pueden ser linealizados: valores de 1 y -1 para los modos de extracción estático y agitado respectivamente, así como para el uso de AD o TB respectivamente. Valores de 1, 2, 3, y 4 para los ratios de extracción correspondientes a 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 (g:mL). Los experimentos realizados con recirculación del extractante no fueron considerados en este caso ya que se hubiese requerido su realización para cada ratio y tipo de extractante.



El resultado se muestran seguidamente en las ecuaciones 4.1 y 4.2, correspondientes a la fibra de soja y la mezcla de pelo y lodo respectivamente, donde L hace referencia al tipo de líquido extractante, E al régimen de extracción y RA al ratio de extracción g:mL.

$$\% \text{ Recuperación actividad} = 48.9 + 1.7 (L) - 3.4 (E) + 9.6 (RA) \quad (R^2 = 0.81) \text{ (Ec 4.1)}$$

$$\% \text{ Recuperación actividad} = 51.3 + 5.2 (L) - 18.3 (E) + 9.0 (RA) \quad (R^2 = 0.82) \text{ (Ec 4.2)}$$

Como se puede observar, existe una correlación entre los diferentes resultados, ya que los coeficientes de regresión alcanzan valores de 0.81 y 0.82, considerados altos para tratarse de valores experimentales.

La regresión para la fibra de soja muestra el coeficiente de mayor valor para RA, es decir, que el ratio de extracción resulta ser el parámetro de mayor influencia en la recuperación de actividad de los aquí mostrados. En cambio, en el caso de la mezcla de pelo y lodo, el parámetro que parece presentar más relevancia es el régimen de agitación. En ambos casos, se puede afirmar que el régimen de agitación lleva a un rendimiento de recuperación máximo.

En resumen, lo que se puede concluir de estas ecuaciones es que están en consonancia con los resultados de los análisis estadísticos de varianza de un factor, que indican que el rendimiento de extracción aumentará con el ratio en el caso de la fibra de soja presentando poca relevancia del régimen de agitación. En cambio, cuando las proteasas son extraídas de la mezcla de pelo y lodo fermentado, es necesaria la aplicación de agitación para una extracción óptima pero por otro lado la utilización de un ratio menor de extracción (1:2 g:mL) es aceptable.

#### **v) Extracciones a escala banco de pruebas**

Se realizaron algunas extracciones en escala banco de pruebas (reactor de 10 L) y piloto (reactor de 50 L) para la mezcla de pelo y lodo y a escala de banco de pruebas para la fibra de soja. La Figura 4.6 muestra la recuperación de actividad obtenida. Todas las extracciones fueron realizadas en modo estático y utilizando AD como extractante.

Como puede observarse, en ambos casos, la recuperación de actividad es superior a la esperada según las ecuaciones 1 y 2, ya que en el caso de la extracción a ratio 1:2 utilizando

AD y en régimen estático, sería de esperar un porcentaje de recuperación de actividad de 66.4 % para la fibra de soja y de 56.2% para la mezcla de pelo y lodo, cuando por el contrario, los valores de recuperación obtenidos son del 100% para la soja y de casi el 80% para el pelo mezclado con lodo.

Se puede observar que la disminución del rendimiento de extracción al disminuir el ratio de extracción es mayor que el esperado según la ecuación 2, siendo la diferencia experimental de un 12% entre la extracción con ratio 1:2.0 y la realizada a 1:1.6, cuando según la ecuación 2 debería ser alrededor de un 4%. No obstante, para afirmar con seguridad que existen diferencias significativas entre las extracciones a escala banco de pruebas y las realizadas en el apartado anterior, sería necesario realizar triplicados de las primeras.

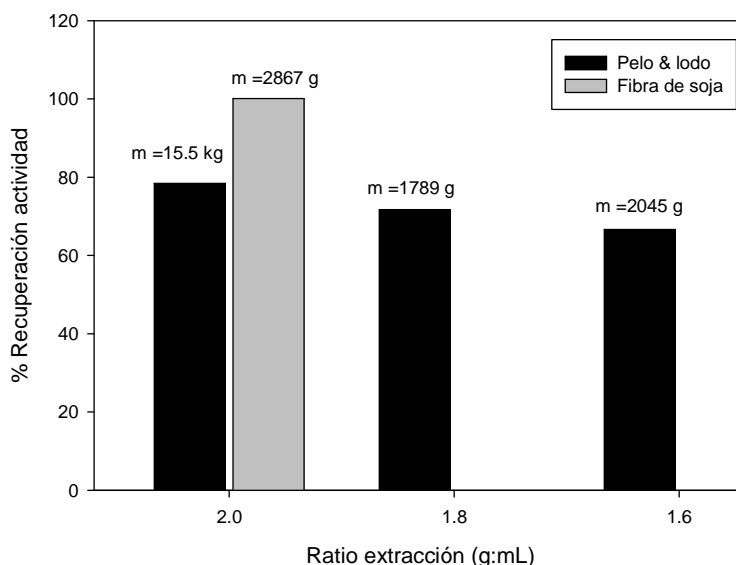


Figura 4.6 Porcentaje de recuperación de actividad proteica realizando extracciones a una cantidad de solido superior a 1.5 kg

Para determinar la causa de la desviación entre los resultados experimentales y teóricos sería necesario la realización de más experimentos.

#### vi ) Extracciones consecutivas

Se realizaron extracciones consecutivas sobre un mismo material fermentado para ambos residuos, en un ratio 1:2 g:mL, utilizando TB y AD como extractantes, tanto en régimen estático como agitado. Las Figuras 4.7 a) y b) muestran el rendimiento de recuperación de actividad para dichas extracciones, llevadas a cabo sobre 200 g de material fermentado.

Como puede observarse, para ambos residuos aproximadamente el 80% de la actividad total recuperada fue obtenida durante la primera y segunda extracción, dejando una pequeña cantidad de proteasas en la matriz sólida. Tanto utilizando AD como TB el porcentaje final de actividad recuperada es mayor con la aplicación de agitación orbital para ambos residuos.

Respecto a la actividad total recuperada, comparando los resultados obtenidos con la actividad medida en la extracción bajo condiciones estándares, es posible concluir que con una extracción en ratio 1:5, con agitación orbital y utilizando TB como extractante (condiciones estándares), efectivamente se recupera prácticamente el 100% de la actividad contenida en el sólido, tanto para la fibra de soja como para la mezcla de pelo y lodo, ya que la recuperación es comparable a la obtenida en dos extracciones consecutivas, quedando muy poca cantidad de enzima en la matriz sólida, por lo que la presunción inicial de utilizar estas condiciones de extracción como referencia resulta correcta.

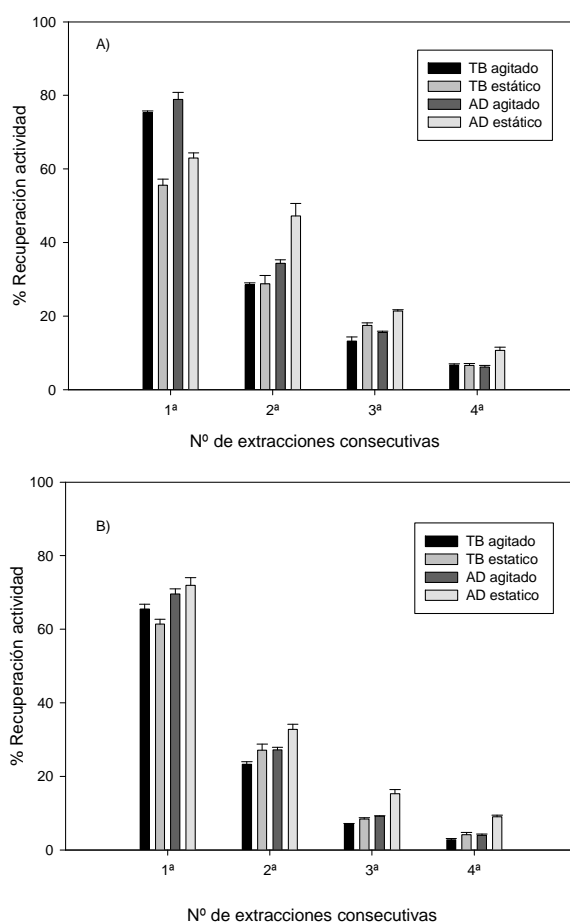


Figura 4.7 Porcentaje de recuperación de actividad proteica de extracciones consecutivas sobre la misma masa de sólido fermentado AD: agua destilada; TB: HCl-Tris buffer 0.05 M pH 8.1. a) Pelo y lodo, b) fibra de soja

Tunga et al. (1999) realizaron tres extracciones consecutivas sobre salvado de trigo para la recuperación de proteasas, el resultado mostró un 66% del total de la actividad recuperada obtenida en la primera extracción. Se trata de un resultado de un rango menor que el obtenido en este trabajo. Al igual que se observó en el salvado de trigo, para la tercera extracción no se esperaba un alto rendimiento de extracción. Este dato es importante de cara a la viabilidad económica del proceso, ya que determina el número de etapas de extracción económicamente viables.

Rezende et al. (2002) también publicó el resultado de tres extracciones consecutivas sobre una matriz fermentada de bagazo de caña de azúcar para la extracción de xilanasas, añadiendo 15 mL de líquido sobre 2.5 g de sólido. Tras 15 minutos de contacto sólido-líquido, en la primera extracción se recuperó el 47% de la actividad total. Comparando estos resultados con los obtenidos para las proteasas, el rendimiento de las extracciones realizadas resulta más elevado, tanto para la fibra de soja como para la mezcla de pelo y lodo. En los resultados obtenidos por Díaz et al. (2007) de las extracciones consecutivas de xilanasas, las unidades de actividad obtenidas por gramo de materia seca se mantuvieron constantes hasta la cuarta extracción.

En vista de estos resultados se podría afirmar que la eficiencia de recuperación de actividad está ligada al tipo de enzima y al sustrato, y debe ser evaluado para cada caso particular en términos económicos.

#### *4.1.3.4 Liofilización*

Se determinó la recuperación de actividad después de la liofilización, obteniéndose altos valores: una media de  $95 \pm 4\%$  para la fibra de soja y un  $96 \pm 6\%$  para los extractos de la mezcla de pelo y lodo fermentado.

No se observó relación entre los parámetros de extracción y la conservación de actividad, ya que se liofilizaron muestras obtenidas bajo todas las condiciones de extracción.

La actividad recuperada mínima fue de un  $87 \pm 3\%$  para el pelo y el lodo y de un 88% para la fibra de soja.

Durante el proceso de congelación y posterior liofilización, la proteína puede sufrir un proceso de desplegamiento, haciendo que pierda su funcionalidad. Según Pikal-Cleland et al. (2001), los enlaces que la molécula haya podido formar con el agua pueden desaparecer

durante el proceso de liofilización, pero algunos componentes presentan la habilidad de estabilizar la estructura de la proteína y preservar la actividad. La misma proteína dentro de una matriz diferente podría no presentar igual recuperación de actividad. Pérdidas de actividad han sido documentadas por Imamura et al. (2014) para diferentes proteínas después de su liofilización en un medio de buffer de sulfato de sodio y potasio. En el caso de Imamura et al. (2014), el mayor valor de recuperación sin la adición de sales fue 31%.

Por lo tanto, se puede concluir que la pérdida de actividad en el presente caso resulta muy baja en comparación con la bibliografía consultada, bien debido a una conservación de la estructura de la enzima a pesar de la congelación y liofilización, bien porqué los cambios estructurales no resultan irreversibles una vez redisuelta la enzima.

#### *Conservación de la actividad del extracto liofilizado en el tiempo*

Se realizó un experimento utilizando extracto enzimático liofilizado de la mezcla de pelo y lodo conservado a 4°C para determinar la perdida de actividad con el tiempo. Se liofilizaron alícuotas de 15 mL y por otra parte 500 mL. Tras comparar la actividad recuperada en ambas formas de operación, se puede afirmar que el resultado de liofilizar volúmenes reducidos es representativo del volumen total. Los resultados se muestran en la Figura 4.8.

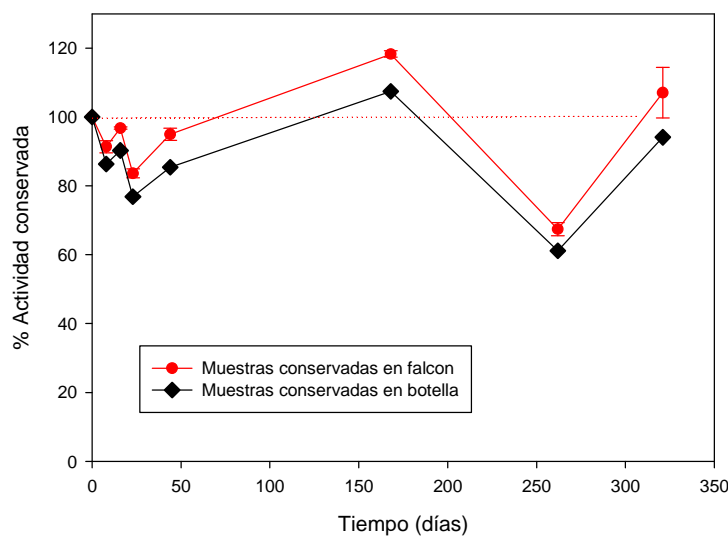


Figura 4.8 Porcentaje de recuperación de actividad de 2 muestras de 15 mL de extracto fresco liofilizado en falcons (puntos rojos) y de 500 mL de extracto fresco liofilizado (diamantes negros), ambos sólidos redisueltos en AD

Como puede observarse, la actividad conservada oscila alrededor del 100% durante todo el experimento, con una caída hasta el 65% hacia los 175 días, pero que en medidas posteriores vuelve a recuperarse, por lo que se puede concluir que la liofilización y su

posterior almacenamiento a 4 °C es una manera adecuada de preservar la actividad, al menos durante un período de un año aproximadamente.

#### 4.1.3.5 Estrategias cero residuos

##### Digestión anaerobia

Se determinó la producción de biogás para evaluar la viabilidad de realizar una digestión anaerobia del residuo sólido fermentado después de la extracción. Los resultados de producción de biogás obtenidos durante un periodo de 20-25 días se muestran en las Figuras 4.9 a) y b)

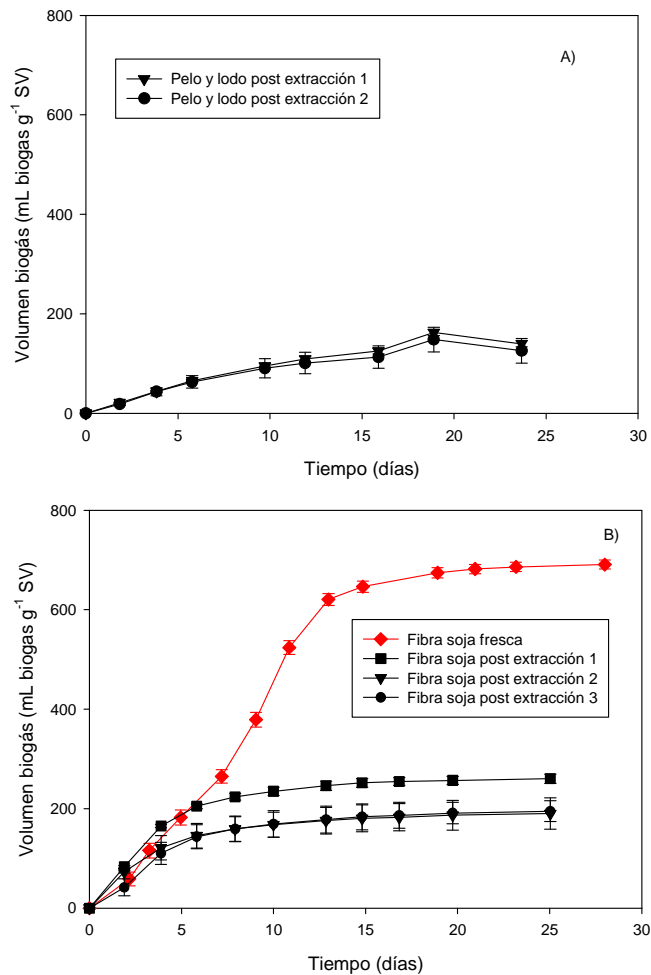


Figura 4.9 Volumen de biogás producido en la digestión anaerobia de a) de pelo y lodo fermentados procedentes de dos procesos de fermentación independientes (círculo invertido, círculo) b) de fibra de soja fresca (diamante rojo), y de fibra de soja fermentada y extraída procedente de tres procesos de fermentación diferentes (cuadrado negro, triangulo invertido negro, círculo negro)

La fibra de soja tras la extracción produjo 365, 304, 273 mL de biogás  $\text{g}^{-1}$  SV con un contenido aproximado de metano del 43%. Durante el mismo período de tiempo, la mezcla de pelo y lodo produjo 132 y 111 mL de biogás  $\text{g}^{-1}$  SV tras la extracción, con un contenido en metano de aproximadamente 40%. La cantidad de biogás producida por pelo y lodo era significativamente más baja que para la fibra de soja. Dicha diferencia era de esperar, ya que el tiempo de fermentación previa a la extracción entre ambos residuos difería en 6 días, y por lo tanto la soja contenía mayor cantidad de material biodegradable tras la extracción.

Según Kafle et al. (2013), el potencial de biogás de diferentes residuos agrícolas y animales como residuo de manzana, residuo de pan o restos de pescado se encuentra dentro del rango de 508 a 617 mL de biogás  $\text{g}^{-1}$  SV, significativamente mayor que el obtenido en este estudio, ya que tanto la fibra de soja como la mezcla de lodo y pelo se encontraban parcialmente degradados. Como puede observarse en la Figura 4.9 a), la fibra de soja fresca presenta una producción de biogás mucho mayor que después de 4 días de fermentación y posterior extracción, lo que indica que el residuo pierde gran parte de su potencial de producción durante el proceso de fermentación.

Ponsá et al. (2011) obtuvo valores de producción de biogás para la fracción orgánica de residuos sólidos municipales sin pretratamiento mecánico de 340 mL  $\text{g}^{-1}$  MS, y 133 mL  $\text{g}^{-1}$  MS para los residuos sólidos municipales con pretratamiento mecánico, los cuales se encuentran en el rango de los correspondientes a fibra de soja y lodo más pelo fermentado obtenidos en el presente estudio.

No se encontraron valores en la literatura de la producción de biogás de fibra de soja o mezcla de pelo y lodo en las condiciones del presente estudio. Merlino et al. (2012) obtuvo aproximadamente 590 NmL de biogás  $\text{g}^{-1}$  SV de la digestión de grano de soja triturado tras 35 días de digestión a 40 °C, con un contenido de metano del 55% aproximadamente. La cantidad de biogás producido en este caso es incluso inferior a la producción de la fibra de soja fresca. Este dato es difícilmente comparable a la producción de biogás de la fibra de soja fermentada ya que parte de los sólidos volátiles de la mezcla de fibra de soja y estructurante son material lignocelulósico, no-biodegradable.

#### *Proceso de estabilización aerobia*

Los resultados de la estabilización de los residuos tras la extracción, en condiciones aerobias se muestran en este apartado. La estabilización fue evaluada como técnica de valorización del residuo con el fin de obtener una enmienda orgánica para el suelo.

La mezcla de lodo, pelo y estructurante pasó por una fase de secado tras la extracción enzimática antes de ser estabilizado, con el fin de disminuir la humedad del residuo de un 74% (después de la extracción) a un 62%, más conveniente para el proceso. Antes del secado, no se observó ninguna actividad biológica aunque se aplicó un caudal de aire suficiente para mantener una buena aireación del residuo. Según Chen et al. (2012), un contenido excesivo de agua puede dificultar el transporte de oxígeno entre la fase gaseosa y la fase sólida. Después del secado, la mezcla de pelo y lodo, alcanzó una temperatura máxima que no superó los 55 °C (apenas llegó a los 20 °C), tal y como muestra la Figura 4.10 a), mínimo requerido para la higienización del residuo

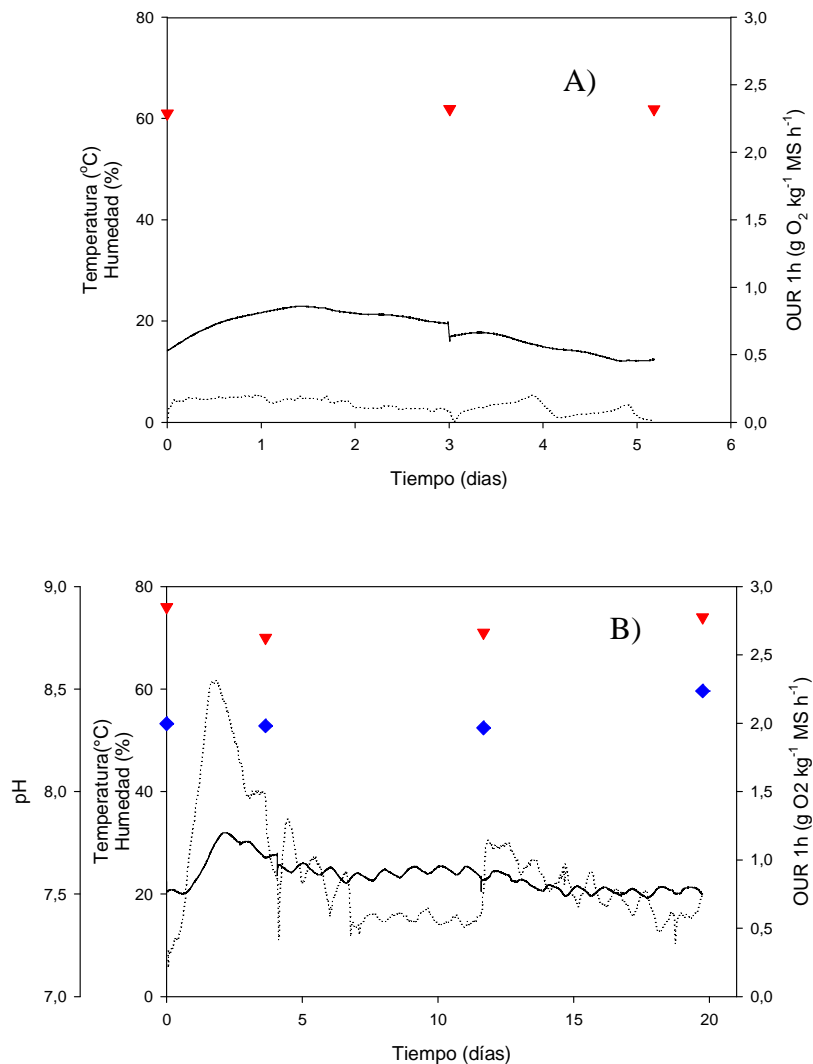


Figura 4.10 Perfiles de temperatura (línea continua), OUR1h (línea discontinua), porcentaje de humedad (triangulos rojos) y pH (diamantes azules) durante el proceso de estabilización de material fermentado y extraído a) Mezcla de pelo y lodo, b) fibra de soja



El motivo pudo ser la cantidad de residuo estabilizado (17 kg), comparándolo con las cantidades a escala industrial, mucho mayores, con mayor potencial de calentamiento. En efecto, Barrena et al. (2007) alcanzó temperaturas de higienización durante un tiempo de compostaje de 80 días de una mezcla similar pero a una escala muy superior, de 20 toneladas. El hecho de que la fermentación fuese realizada durante un periodo de bajas temperaturas en una instalación situada en un recinto sin climatización también influyó en la temperatura alcanzada durante el proceso. La Tabla 4.3 muestra valores de  $IRD_{24h}$  de  $1.0 \pm 0.1$  y  $0.61 \pm 0.05$   $g O_2 kg^{-1} MS h^{-1}$  para la mezcla de pelo y lodo tras la fermentación en estado sólido y el residuo posteriormente estabilizado respectivamente, indicando que el material es estable ya después de la fermentación, y más aún después de 5 días (Barrena et al. 2011).

Tabla 4.3 Valores de los parámetros respirométricos en diferentes fases de estabilización

Fermentación en estado sólido				
<b>RESIDUO</b>	<b>AT<sub>4</sub> Inicial</b> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS)	<b>AT<sub>4</sub> final</b> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS)	<b>IRD<sub>24h</sub> Inicial</b> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	<b>IRD<sub>24h</sub> final</b> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )
<i>Fibra de soja</i>	326±98	185±48	5±2	3±1
<i>Pelo &amp; lodo</i>	113±11	61±6	2.0±0.1	1.0±0.1

Estabilización		
<b>RESIDUO</b>	<b>AT<sub>4</sub> final</b> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS)	<b>IRD<sub>24h</sub> final</b> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )
<i>Fibra de soja</i>	59.4±0.9	0.93±0.07
<i>Pelo &amp; lodo</i>	48±4	0.61±0.05

Medias y desviación estándar. Los valores mostrados son la media de al menos tres experimentos independientes. MS: Materia Seca

En el caso de la fibra de soja, se realizaron tres replicados del proceso de fermentación, los cuales se interrumpieron tras 3.2 días mostrando una  $OUR_{1h}$  de entre 1.5 y 2.6  $g O_2 kg^{-1} MS h^{-1}$  en todos los casos, dentro del rango termófilo, mostrando que la fibra de soja no había alcanzado la estabilidad en este punto del proceso. El proceso de estabilización de la fibra de soja tras la extracción fue llevado a cabo en un reactor de 10 L, y los perfiles obtenidos se muestran en la Figura 4.10 b).

Como puede observarse, existe un incremento de la temperatura y el consumo de oxígeno durante las primeras 48 horas, seguido por un rápido descenso de la temperatura hasta alcanzar la temperatura ambiental. El valor máximo alcanzado fue de 32 °C, sin llegar nunca al rango termófilo de nuevo, tal y como ocurrió en el caso de la mezcla de pelo y lodo. El valor de OUR<sub>1h</sub> máximo fue de 2.3 g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup> durante la estabilización del material extraído

Tras 20 días de proceso aerobio, el residuo pudo ser considerado estable, ya que presentaba un índice de respiración dinámico (IRD<sub>24h</sub>) de 0.93 ± 0.07 g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup> y un valor de consumo acumulado de oxígeno (AT<sub>4</sub>) de 59.4 ± 0.9 g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS.

La duración del proceso de estabilización de la fibra de soja duró 15 días más que la estabilización de la mezcla de pelo y lodo. Esta diferencia fue debida, en primer lugar, a la mayor biodegradabilidad inicial del residuo, ya que los valores de los parámetros respirométricos son el doble para la fibra de soja que para la mezcla de pelo y lodo. En segundo lugar, el proceso de FES de la soja fue interrumpido tras tres días, mientras que el de la mezcla de pelo y lodo llegó a los 8 días, por lo que el material ya era mucho más estable tras la FES.

Según Barrena et al. (2009), los índices anaeróbicos y aeróbicos de biodegradabilidad están fuertemente relacionados. Valores encontrados para la diferencia entre IRD<sub>24h</sub>, AT<sub>4</sub> y la producción de biogás en condiciones líquidas fueron 86 y 1.56 respectivamente. Los mismos ratios fueron calculados usando los valores obtenidos en este estudio, obteniendo valores de 84 y 1.56 respectivamente. Estos números concuerdan con los ratios proporcionados por Barrena et al. (2009).

#### **4.1.4 Conclusiones**

En este capítulo se ha realizado un estudio completo del downstream del proceso de producción de proteasas resumido en la Figura 4.11.

- El uso de lodo deshidratado como inóculo no presenta ventaja respecto al uso de otros inóculos con mayor porcentaje de humedad, ya que ésta resulta insuficiente tras la etapa termófila. Parámetros de operación como la temperatura o la agitación muestran gran influencia en la producción final de proteasas y deberían ser estudiados en profundidad.

- Se han calculado los rendimientos de actividad en la extracción de proteasas y las etapas de liofilización bajo una gran variedad de condiciones experimentales. De acuerdo con los resultados, se recomienda para la fibra de soja, la extracción utilizando una relación sólido: líquido (g:mL) de 1:3 y para el lodo mezclado con pelo de vacuno, se recomienda una relación 1:2 aplicando agitación, y en ambos casos, utilizando agua destilada.
- Las extracciones consecutivas en modo estático parecen ser también un modo efectivo de extracción sin emplear agitación pero con el doble de tiempo de extracción. Se recomienda realizar un balance económico entre la rentabilidad de la recuperación del producto y los gastos de agua y energía. La liofilización proporciona una alta recuperación de la actividad tras la redisolución del sólido, alrededor de un 95%, además de no observarse pérdidas de actividad durante más de 6 meses de almacenamiento a 4°C.
- También se observó que a medida que la solubilidad del sólido aumentaba, la relación sólido: extractante requerida se convertía en el factor determinante en la recuperación de actividad, mientras que si la solubilidad es baja es la agitación el parámetro más importante.
- Tras la extracción del enzima, la producción de biogás de ambos residuos a través de la digestión anaerobia reporta valores bajos para la mezcla de pelo y lodo, y relativamente altos para la fibra de soja si se compara con residuos similares. Tanto la fibra de soja como el pelo de vacuno, pueden ser tratados a través de procesos de compostaje para obtener un producto estable.

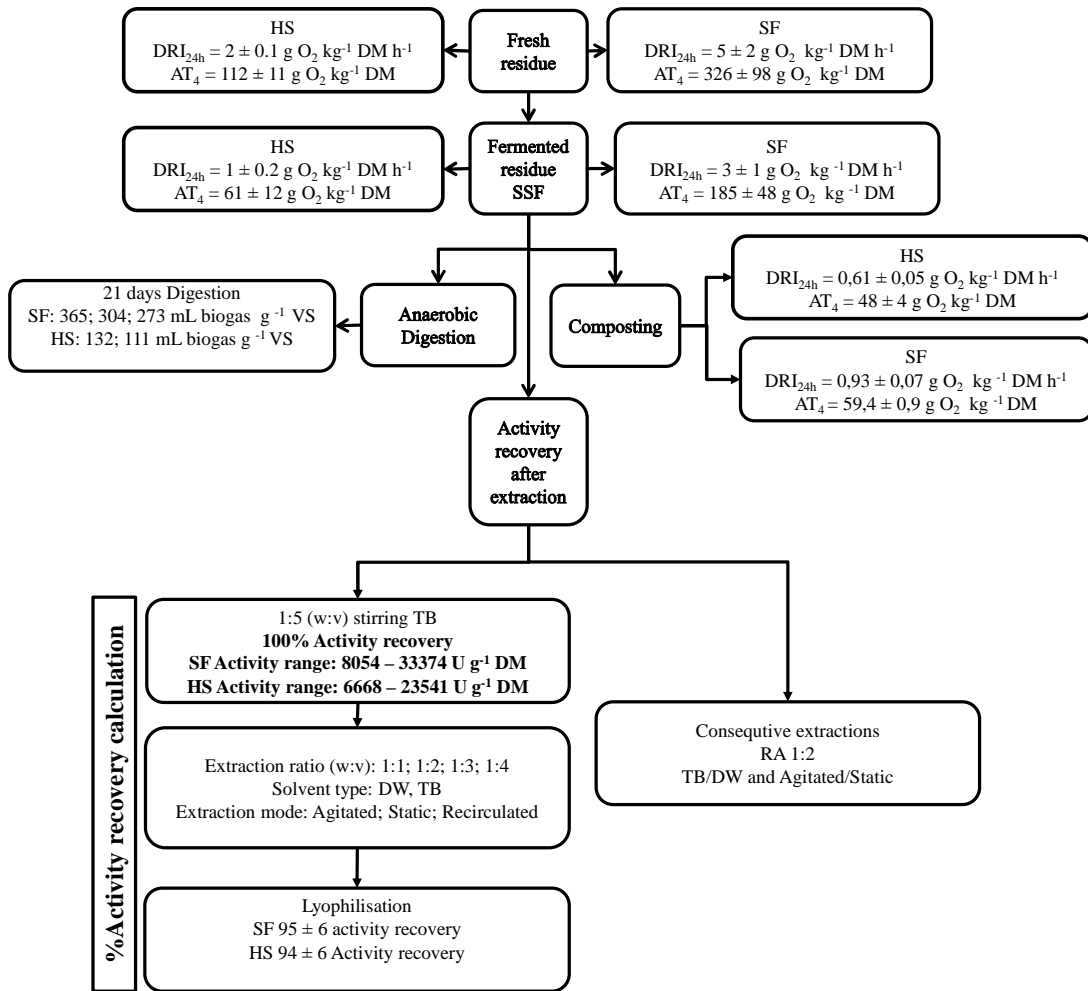


Figura 4.11 Resumen de los experimentos y resultados realizados en el capítulo 4



## 4.2 Downstream del proceso de producción de celulasas mediante FES del residuo de cascarilla de café. Rendimiento de extracción y estrategias cero residuos

Parte de este apartado ha sido publicado como: Marín M, Artola A, Sánchez A (2018) Optimization of down-stream for cellulases produced under solid-state fermentation of coffee husk. Waste and Biomass Valorization.

<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0327-5>

### 4.2.1 Introducción

En el apartado 4.2 se presentan los resultados del estudio de parte del downstream del proceso de fermentación de cascarilla de café para la producción de celulasas desarrollado en la tesis doctoral de Alejanda Cerda “*Sustainable carbohydrase production using organic wastes through solid-state fermentation: Operational strategies and microbial communities assessment*” (2017). Según Cerda et al. (2017a, 2017b), la fermentación de cascarilla de café estructurada con astillas de madera es capaz de producir actividades de celulasa de hasta 9 FPU g<sup>-1</sup> MS a las 48 horas de proceso y a temperaturas termófilas coincidiendo con el punto de consumo máximo de oxígeno.

En estos trabajos, la extracción de celulasas se realiza con un volumen de 15 mL de extractante, que en este caso es buffer citrato (BC), por cada gramo de material fermentado. Estas proporciones a nivel industrial supondrían un gran sobre coste ya que el producto final quedaría demasiado diluido en el extracto y su concentración, además del coste de la cantidad de solvente utilizada, incrementaría el coste final. Por estos motivos, en el apartado 4.2 se estudió el rendimiento de recuperación de celulasas bajo diferentes condiciones de extracción así como la recuperación de actividad tras la liofilización del extracto y su durabilidad en el tiempo.

Los parámetros de extracción estudiados fueron el ratio solido (g): líquido (mL), tipo de extractante y modo de agitación.

Otro aspecto del proceso estudiado en este apartado 4.2 fue la aplicación de estrategias de cero residuos al material sobrante de la extracción con tal de cerrar el círculo y conseguir un proceso limpio además de obtener otro beneficio añadido de la cascarilla de café. Las

técnicas evaluadas fueron la digestión anaerobia de la cascarilla para producir biogás y por lo tanto energía, y la estabilización del residuo para ser utilizado como enmienda orgánica del suelo.

#### **4.2.2 Materiales y metodología**

##### *4.2.2.1 Reactores utilizados*

Tanto para la realización tanto de la FES como para la estabilización del material sólido restante tras la extracción, se utilizaron los reactores de 10 L de volumen de trabajo descritos en el capítulo 3. En los procesos de FES el método de control de la aireación fue por retroalimentación, descrito anteriormente, mientras que en los procesos de estabilización se utilizó el control por OUR.

##### *4.2.2.2 Extracciones*

Los parámetros estudiados en la recuperación de actividad fueron la relación extractante (mL): sólido (g), el tipo de extractante y el modo de extracción. Los ratios elegidos fueron 1:2, 1:3 y 1:5 (g:mL), los dos extractantes utilizados fueron AD y BC. En cuanto a los modos de extracción, se realizaron extracciones en estático, con agitación orbital a 120 rpm y recirculando el solvente.

Entre 160 y 200 g de material fermentado fueron utilizados en cada extracción, las cuales tuvieron una duración de 30 min y se realizaron a temperatura ambiente. La extracción en las condiciones asignadas como estándar y que se consideró se obtenía un 100% de recuperación de actividad se realizó por duplicado, utilizando 50 g de material fermentado. Las condiciones consideradas estándar fueron ratio sólido: líquido (g:mL) de 1:15, BC a pH 4.8 y agitación magnética a temperatura ambiente.

Diferentes extracciones fueron realizadas bajo todas las posibles combinaciones de los parámetros mencionados excepto con recirculación del líquido extractante, que se comparó con la actividad obtenida con agitación orbital utilizando el mismo ratio y tipo de solvente.

En todos los casos se realizaron al menos 3 extracciones independientes bajo las mismas condiciones experimentales para determinar la desviación del valor de recuperación obtenido.

#### 4.2.2.3 Análisis de resultados

La comparación estadística de los resultados se realizó mediante análisis t-Student del programa Sigmaplot v11 en todos los casos.

#### 4.2.3 Resultados y Discusión

Seguidamente se presentan los resultados obtenidos de los experimentos de downstream de celulasas, así como los resultados de las estrategias cero residuos.

##### 4.2.3.1 Caracterización del residuo

La Tabla 4.4 muestra la caracterización realizada al residuo.

Tabla 4.4 Caracterización del residuo utilizado en la fermentación en estado sólido

	<i>Cascarilla de café</i>	<i>Compost</i>	<i>Mezcla**</i>
<i>pH</i>	6.4 ± 0.1	7.6 ± 0.5	6.7 ± 0.4
<i>CE (mS cm<sup>-1</sup>)</i>	n.d.	6.3 ± 0.2	n.d.
<i>Humedad (% , bh)</i>	60.2 ± 0.6	35 ± 1	61 ± 1
<i>Materia seca (% , bh)</i>	40.1 ± 0.4	64 ± 1	39 ± 1
<i>Materia orgánica* (% , bs)</i>	90.21 ± 0.01	n.d.	90
<i>C Total* (% , bs)</i>	80.1	n.d.	n.d.
<i>N Total* (% , bs)</i>	3.5	n.d.	n.d.
<i>C/N ratio</i>	22.9 ± 0.1	n.d.	n.d.
<i>Densidad aparente* (g L<sup>-1</sup>)</i>	238.1	n.d.	358
<i>FAS* (%) (v/v)</i>	78.9	n.d.	77.2
<i>Azúcares reductores (% , bs)</i>	0.65 ± 0.01	n.d.	n.d.
<i>Glucosa (% , bs)</i>	0.02 ± 0.01	n.d.	n.d.
<i>Celulosa (% , bs)</i>	25.7 ± 0.2	10 ± 1	26 ± 3
<i>Hemicelulosa (% , bs)</i>	14.6 ± 0.1	10.2 ± 0.1	13.25 ± 0.07
<i>Lignina (% , bs)</i>	17.6 ± 0.5	14 ± 1	21.1 ± 1.0

bh: base húmeda; bs: base seca; n.d.: no disponible. Los valores son la media de experimentos independientes y su desviación estándar. (\*) s.d.<6%. (\*\*) Mezcla de compost y cascarilla de café en ratio 1:9 en peso y estructurante en ratio 1:1 en volumen.



Como puede verse en la Tabla 4.4, la humedad de la mezcla es la adecuada para el proceso de fermentación en estado sólido, ya que se encuentra dentro del intervalo de 40% y 70% recomendado. Krishna et al. (2005) mencionan un amplio rango entre 20% y 70% de humedad permitida para el crecimiento de hongos, y superior a un 80% para el crecimiento de bacterias, por lo que no fue necesaria la adición de agua. La FAS medida era también la adecuada para garantizar la completa aireación durante el proceso. Como ya se ha comentado, Ruggieri et al. (2009b) encontraron que el valor recomendado de FAS depende del material a fermentar, y puede variar entre un 30% y un 60%. Albuquerque et al. (2008) determinaron que debido a la gran variedad de métodos de medida de FAS, la misma medición podía variar entre un 26% y un 61%, por lo que el 77% obtenido para la mezcla de cascarilla de café y estructurante es aceptable. Ya que el objetivo final es la producción de celulasas, se determinó el porcentaje de fibras del material. Según la literatura, la cantidad de celulosa medida en otros sustratos lignocelulosicos utilizados para la producción de bioetanol, se encuentra entre un 32-47% para la paja de arroz, entre un 34-45% para la paja de trigo y sobre un 42% para los restos vegetales de maíz (Yoon et al. 2014), por lo que el porcentaje de material fibroso presente en la cascarilla de café resulta algo más bajo en comparación con otros residuos. En cuanto a la biodegradabilidad del residuo, los valores de la respirometría dinámica realizada al material fresco (Tabla 4.5) muestran que se trata de un material no estable y que puede ser degradado aeróbicamente.

Tabla 4.5 Resultados de ensayos respirométricos, los valores de FES son los iniciales del proceso de compostaje

	AT <sub>4</sub> (O <sub>2</sub> g kg <sup>-1</sup> MS)	IRD <sub>24h</sub> (O <sub>2</sub> g kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )
<b>Material Inicial</b>	86 ± 23	1.6 ± 0.2
<b>48 horas de FES ( pre-extracción)</b>	86 ± 17	1.3 ± 0.3
<b>48 horas FES (post-extraction)</b>	47 ± 7	0.70 ± 0.06
<b>7 días FES - sin extraction</b>	59 ± 21	0.7 ± 0.3
<b>Estabilizado (sin extracción)</b>	29 ± 5	0.33 ± 0.04
<b>Estabilizado (post extracción)</b>	20.0 ± 0.7	0.29 ± 0.01

Todos los valores son el promedio de 3 experimentos independientes

4.2.3.2 Fermentación en estado sólido

La Figura 4.12 muestra un ejemplo de perfiles de temperatura y  $OUR_{1h}$  de un proceso de fermentación realizado en reactor de 10 L de volumen de trabajo. Se realizaron al menos 10 replicados del proceso.

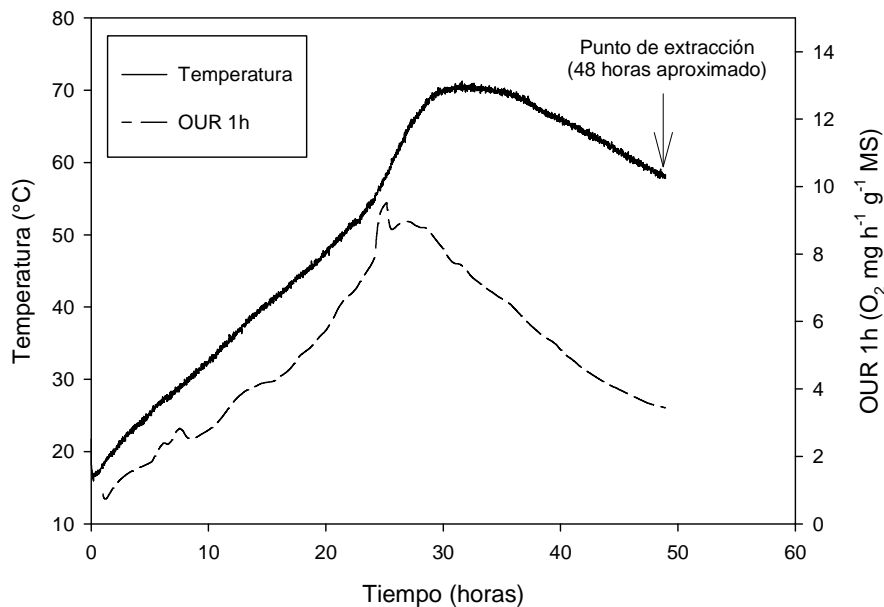


Figura 4.12 Perfil de temperatura (línea continua) y  $OUR_{1h}$  (línea discontinua) de un proceso de fermentación en estado sólido de cascarilla de café inoculada con compost

De acuerdo con Cerda et al. (2017a), a las 48 horas aproximadamente, se alcanza la producción enzimática máxima, que coincide con el máximo valor de  $OUR_{1h}$ . En la temperatura, el presente caso, alcanzó valores cercanos a los 70 °C, dentro del rango termófilo y el valor de  $OUR_{1h}$  máximo alcanzado fué de 9 mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MS, alrededor de las 27 horas. Se observó que el proceso de fermentación es altamente reproducible, ya que las diferencias en los perfiles de temperatura entre todos los replicados no fueron mayores de un 6%, presentando un valor de 98.7 °C día (área bajo la curva de temperatura). El consumo de oxígeno, por otra parte, presentaba una desviación máxima de casi un 50% del valor medio de 1.5 mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> materia húmeda (MH). Este parámetro fue calculado para cada proceso de fermentación como el total del oxígeno consumido (mg) dividido por el tiempo de proceso (h) y la cantidad inicial de material dentro del reactor (g). El valor medio de oxígeno consumido fue calculado como la media de los valores obtenidos en todas la fermentaciones. Los valores de oxígeno consumidos parecen estar relacionados con los valores de actividad de celulasas

medidos en condiciones de extracción estándares (ratio 1:15, BC y modo agitado). Los valores de actividad más elevados fueron obtenidos en los procesos de fermentación que presentaban valores de consumo de oxígeno más elevados, el cual fue  $1.3 \pm 0.2$  FPU  $g^{-1}$  MS que correspondió con un valor de consumo de oxígeno de  $2.3$  mg  $O_2$   $h^{-1}$   $g^{-1}$  MH. Jimenez-Peñalver et al. (2016) encontró una correlación entre el rendimiento de la producción de soforolípidos y el consumo de oxígeno de *Starmerella bombicola* utilizando como sustrato torta de aceite de winterización. Entre las fermentaciones llevadas a cabo, se observó uno sólo casos en el consumo de oxígeno fue elevado,  $1.7$  mg  $O_2$   $h^{-1}$   $g^{-1}$  MH, y sin embargo la actividad obtenida en el estándar fue más baja de lo esperado,  $0.45 \pm 0.07$  FPU  $g^{-1}$  MS. No obstante, al calcular la recuperación de actividad en este caso, se observó un rendimiento de extracción anormalmente elevado comparado con otros replicados, lo que puede significar que no se realizó una extracción eficiente en condiciones estándares, y que probablemente la relación entre consumo de oxígeno y producción enzimática se mantuvo. Este hecho pudo ser debido a la heterogeneidad del material y el tamaño de la muestra extraída en el estándar.

#### 4.2.3.3 Extracciones

##### i) Método de extracción

Tras 48 h de fermentación, el proceso fue interrumpido y se probaron las diferentes estrategias de extracción. La Tabla 4.6 muestra la combinación de los diferentes parámetros de extracción en cada estrategia y el rendimiento de recuperación de actividad obtenido en cada una, así como el pH y la conductividad de cada extracto. Para comparar los diferentes valores de rendimiento de cada extracto se utilizó el test de t-student. Las diferencias estadísticas de cada resultado se muestran mediante letras en la Tabla 4.6.

Como puede observarse, la estrategia de extracción más favorable fue la realizada con ratio 1:5, AD como extractante y en modo estático, en la cual el rendimiento de actividad fue de  $108 \pm 30$  %. La estrategia que arrojó peor resultado fue la realizada también a ratio 1:5, con AD como extractante pero en este caso aplicando agitación. El test t-student no mostró diferencias estadísticas significativas entre los rendimientos de actividad de las extracciones 5-estático-AD, 5-Agitado-BC, 3-Estático-AD, 2-Estático-AD y 5-Estático-B. Este grupo de métodos de extracción que mostraron el mayor rendimiento de actividad fueron obtenidos mayoritariamente utilizando AD como extractante y en modo estático, condiciones que son además las más recomendables desde el punto de vista económico para un proceso a escala industrial.

Tabla 4.6 Resumen de experimentos de extracción, tiempo de extracción 30 min

<i>Método extracción</i>	<i>pH</i>	<i>Conductividad (mS cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Recuperación actividad (%)</i>
<b>5- Estático-AD a</b>	9.21 ± 0.09	1.5 ± 0.1	<b>108 ± 30</b>
<b>5- Agitado-BC a</b>	5.4 ± 0.1	7.2 ± 0.5	103 ± 17
<b>3- Estático-AD a</b>	9.12 ± 0.05	2.6 ± 0.2	95 ± 13
<b>2-Estático-AD a, b, e, g</b>	9.0 ± 0.2	3.6 ± 0.2	84 ± 22
<b>3- Agitado-AD a, b, d</b>	9.11 ± 0.07	2.8 ± 0.1	84 ± 15
<b>5- Estático-BC a, b</b>	5.2 ± 0.1	6.9 ± 0.5	83 ± 18
<b>3- Agitado-BC b, c, g</b>	5.9 ± 0.4	7.6 ± 0.5	69 ± 12
<b>3- Estático-BC c, d, e</b>	5.6 ± 0.2	7.2 ± 0.5	61 ± 3
<b>2- Estático-BC b, c, f, g</b>	6.1 ± 0.5	7.8 ± 0.5	58 ± 6
<b>2-Agitado-AD c, d, e, g</b>	9.0 ± 0.2	3.8 ± 0.3	56 ± 14
<b>2- Agitado-BC c, d, e, f, g</b>	6.2 ± 0.9	7.9 ± 0.6	56 ± 12
<b>5- Agitado-AD g</b>	9.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1	50 ± 7

BC: Buffer citrato mono hidratado pH 4.8 0.05 M; AD: Agua destilada; 2: extracción ratio 1:2 (g:mL), 3: extracción ratio 1:3 (g:mL), 5: extracción ratio 1:5 (g:mL).

Letras indican los modos de extracción que son considerados iguales según el test de t-Student

Los valores son la media de al menos tres experimentos independientes.

Se realizó una regresión lineal de los valores obtenidos tal y como se procedió para los resultados del apartado 4.1. Los resultados muestran un bajo coeficiente de correlación, por lo que no puede concluirse que exista una relación lineal entre ellos. No obstante, los coeficientes obtenidos indican que el ratio resulta ser el parámetro más relevante en la extracción de proteasas, mientras que el de menor influencia resulta ser el tipo de extractante. Este resultado coincide con los observados tras la comparación mediante el test de t-student, el cual indica que la solubilidad de las celulasas producidas no disminuye debido a la diferencia de pH observado entre los extractos de BC y AD, al contrario, un pH más elevado parece tener una influencia positiva en el rendimiento de extracción. Según Rezaei et al. (2011), la utilización de buffer de acetato de sodio 50 mM y un pH de 5 tuvo un efecto

positivo a la hora de recuperar celulasas comerciales derivadas de hongos añadidas a pasto varilla y un efecto negativo en la recuperación de la misma enzima de una matriz sólida fermentada del mismo residuo, la cual había sido colonizada por bacterias *Acidothermus cellulolyticus*.

En el caso particular de la extracción de celulasas de una matriz sólida fermentada de cascarilla de café, es claro que el BC no tiene efecto positivo en comparación con AD. Singh et al. (1999) afirman que el buffer ideal ha de ser selectivo y presentar el mismo pH que el sustrato fermentado. Como puede observarse en la Tabla 4.6, el pH de la matriz sólida, el cual corresponde al de la extracción 5-Agitado-AD, es muy similar al pH mostrado por las extracciones realizadas con AD, contrariamente a lo que ocurre en las extracciones en las que se utilizó BC, en las que el pH es cercano a 6 en todos los casos. Comparando el pH inicial del AD y el BC, el pH del agua es más cercano a dicho valor. Referente a este hecho, Bera et al. (2008) realizó la extracciones de amilasas a diferentes rangos de pH desde 2 a 12, en los cuales no se observó diferencias estadísticas entre los diferentes resultados.

De acuerdo con los datos obtenidos, ambos métodos de contacto, estático y con agitación orbital, proporcionan un contacto adecuado entre sólido y solvente, debido probablemente al tamaño reducido de las partículas de cascarilla de café y a la no formación de agregados una vez en contacto con el solvente. En el caso de Singh et al. (1999), no se observaron diferencias estadísticas entre la utilización de una agitación de 220 rpm y el modo estático en la extracción de pectinasas de cebada, tan sólo un aumento de la viscosidad y el color en el extracto.

Por otro lado, Shata et al. (2005) obtuvieron un rendimiento de extracción de proteínas de salvado de 3000 U g<sup>-1</sup> con agitación frente a las 500 U g<sup>-1</sup> que se obtuvieron en extracción estática. Por lo tanto, los requerimientos de agitación parecen ser fuertemente dependientes del tipo de enzima y de sustrato. En el caso de la cascarilla de café y la extracción de celulasas, el método de agitación parece tener una baja influencia en el rendimiento de extracción.

Se realizaron 3 extracciones independientes con recirculación utilizando AD como agente extractante y ratio 1:3, lo que se tradujo en 7 veces la recirculación del volumen total de líquido extractante. Otras tres extracciones se realizaron utilizando el mismo material y aplicando agitación, con el mismo ratio y el mismo agente extractante. Se calculó la recuperación de actividad para las seis extracciones, encontrando un rendimiento de un  $98 \pm 1$

% para las extracciones en modo agitado y un valor de  $93.0 \pm 0.7$  % para el modo recirculado, mostrando que la recirculación del solvente no proporciona un incremento en el rendimiento.

## ii) Número de extracciones consecutivas

Tres extracciones consecutivas se llevaron a cabo en modo estático, en ratio 1:2 y AD como extractante, la actividad de los extractos fue medida y comparada con el valor estándar para el cálculo del rendimiento de extracción. La Figura 4.13 muestra el resultado de dichas extracciones.

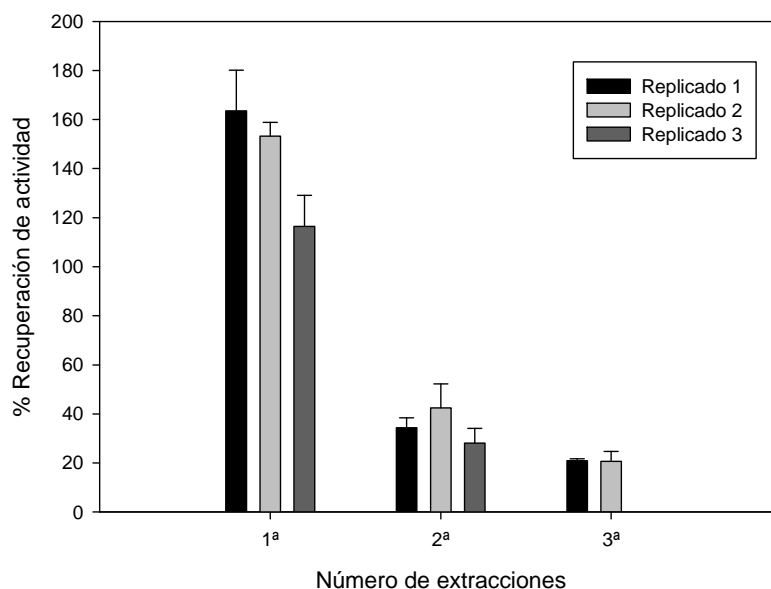


Figura 4.13 Recuperación de actividad de extracciones consecutivas sobre cascarilla de café fermentada

Como puede verse, aunque el material fermentado procede del mismo proceso, uno de los replicados difiere significativamente de los otros. El motivo puede ser la heterogeneidad del material, con una distribución irregular del estructurante. Se puede observar una disminución progresiva en la recuperación de actividad, pero se observa en general una recuperación total del 200% en dos de los replicados, y una recuperación del 140% en total en el replicado que difiere del resto. La recuperación de actividad en la segunda extracción es mucho menor que la recuperada en la primera extracción, alrededor de un 25% de ésta, con una diferencia muy clara. Pirota et al. (2013) también realizaron extracciones consecutivas para la extracción de endoglucanasas de una matriz sólida de salvado con AD, obteniendo el 75 % de recuperación de la actividad total en la primera extracción y un 25% en la segunda y tercera conjuntamente, mostrando una tendencia muy parecida a la observada en este trabajo.

Según Díaz et al. (2007), en la extracción consecutiva de exo-poligalacturonasas de pomaza de uva se obtuvo casi el mismo rendimiento de extracción durante las cuatro primeras extracciones, necesitando hasta 6 para recuperar el total de la actividad. En el caso de la cascarilla de café, aunque es cierto que hay recuperación de enzima hasta la tercera extracción, ya en el segundo extracto se encuentra muy diluida, lo que supondría un incremento en el posterior coste de procesamiento del extracto para obtener mucho menos producto. De acuerdo a estos resultados, sólo una extracción sería recomendable para la obtención casi total del producto.

#### 4.2.3.4 Liofilización del extracto y preservación de la actividad

La conservación enzimática del producto liofilizado fue seguida durante 115 días. La actividad del liofilizado rediseñado y el de muestras congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  grados fue comparada con el del extracto fresco. El peso del polvo restante tras la liofilización de 500 mL de extracto 2-Estatico-BC fue de 10.881 g, mientras que la cantidad de polvo obtenido de la liofilización del mismo volumen de extracto 5-Estatico-BC fue de 8.413 g.

La Figura 4.14 muestra la recuperación de la actividad del liofilizado y el extracto congelado refiriéndola a la actividad medida en el extracto fresco.

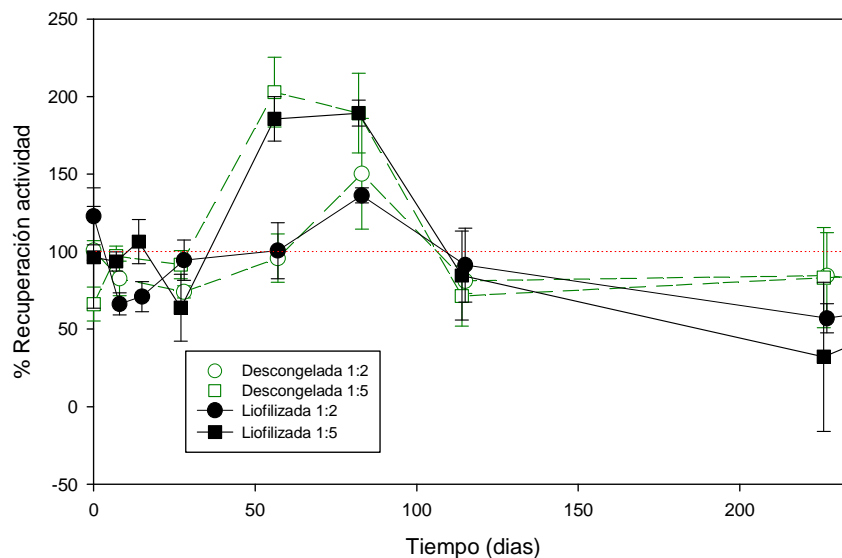


Figura 4.14 Recuperación de actividad de muestras obtenidas con un ratio de extracción 1:2 g:mL tras la congelación (círculos verdes) y el liofilizado (círculos negros); y muestras obtenidas con un ratio de extracción 1:5 g:mL tras la congelación (cuadros verdes) y tras la liofilización (cuadros negros).

Para las muestras obtenidas a ratio 1:2, la actividad recuperada presenta una disminución inicial de un 20 % para después presentar valores que sobrepasan el 100% de recuperación de la actividad en las últimas medidas. En conjunto se puede observar una

oscilación de los valores de recuperación alrededor del 100%. Las pérdidas de actividad se pueden dar en cualquiera de las etapas del proceso, desde la congelación hasta la rehidratación de la muestra. Hédoux et al. (2012) observó cambios estructurales en proteínas liofilizadas tras el paso de deshidratación de la muestra, aunque los cambios en la estructura secundaria fueron reversibles tras la rehidratación. Existen otros parámetros que pueden afectar a la recuperación de la actividad, Passot et al. (2009) observaron que el control de nucleación a través de diferentes técnicas podía mejorar la preservación de la actividad.

En el caso de la cascarilla de café, los valores de actividad obtenidos de muestras liofilizadas y descongeladas pueden ser considerados iguales, por lo que no existe una pérdida de actividad debida a la deshidratación de la muestra. Las pérdidas de actividad pueden ser debidas al proceso de congelación de la muestra, ya que se observan tanto en las muestras congeladas como en las liofilizadas.

Comparando la recuperación de actividad de las celulasas con los valores obtenidos para las proteasas en el apartado 4.1, se observa que ambas presentan una oscilación de los valores de recuperación de actividad alrededor del 100%, aunque en el caso de las celulasas, la oscilación resulta mucho más marcada. No obstante, a diferencia de las proteasas, que durante un período de un año no parecen sufrir pérdidas de actividad remarcables, la Figura 4.14 muestra que, tras aproximadamente 150 días de estudio, se produce una pérdida significativa de actividad de celulasas, lo que indicaría que la liofilización resulta más efectiva en el caso de las proteasas.

#### *4.2.3.5 Estrategias Cero residuos*

##### *Digestión anaerobia*

El potencial de producción de biometano de la cascarilla de café fue evaluado usando el residuo después de la extracción como alimento para la producción de biogás mediante digestión anaerobia. El experimento se prolongó durante 25 días y la cantidad de biogás producida y su contenido en metano fueron medidos.

En el siguiente conjunto de experimentos de digestión anaerobia realizados, la cascarilla de café fermentada de dos procesos diferentes (R1 y R2), antes y después de la extracción, fue digerida anaerobiamente a ratio 1:2 alimento: inóculo antes mencionado. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se muestran en la Figura 4.15.



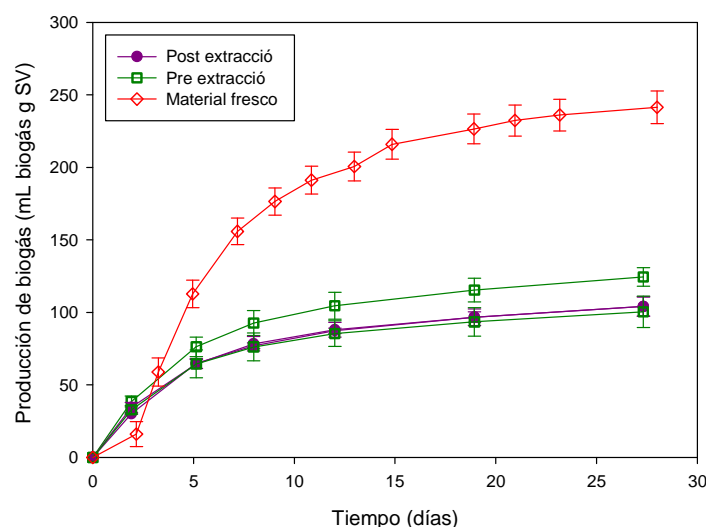


Figura 4.15 Producción de biogás a través de la digestión anaerobia de cascarilla de café fresca (diamantes rojos), cascarilla de café fermentada tras la extracción enzimática (puntos morados) y cascarilla de café fermentada antes de la extracción (cuadrados verdes). El resultado es la medida de tres digestiones independientes

Tras 27 días de digestión a 37 °C la producción de biogás fue de  $104 \pm 7$  mL biogás  $g^{-1}$  SV. Para los dos materiales fermentados y no extraídos la producción de biogás fue de  $124 \pm 6$  y  $100 \pm 11$  mL biogás  $g^{-1}$  SV, respectivamente. En cuanto a la producción de metano, las muestras extraídas produjeron  $40 \pm 8$  y  $51 \pm 3$  mL de  $CH_4$   $g^{-1}$  SV, mientras que las muestras no extraídas produjeron  $52 \pm 3$  y  $54 \pm 6$  mL de  $CH_4$   $g^{-1}$  SV. Considerando las desviaciones estándares, la producción de metano puede considerarse igual para ambos materiales. Estas producciones se han comparado con otros materiales frescos, usados como alimento en digestión anaerobia, como la paja de arroz, la cascarilla de cacahuete o la cáscara de cacao. La producción para estos residuos fue  $207 \pm 22.1$ ,  $223 \pm 25.1$  y  $199 \pm 22.4$  mL  $CH_4$   $g^{-1}$  SV respectivamente (Mancini et al. 2016), mientras que la producción de metano de otros materiales como lana, paja o mejillones azules se encontraba entre 190 y 330 mL  $CH_4$   $g^{-1}$  SV (Ammenberg et al. 2017). La baja producción de metano de la cascarilla de café puede estar influida por la presencia de estructurante, que no aporta materia fácilmente biodegradable a la mezcla. Por otra parte, la cascarilla de café es generada durante el proceso de tostado de los granos de café, lo que pudo llevar a la pérdida de material biodegradable. La cascarilla de café fresca, sin estructurar, produjo  $241 \pm 11$  mL biogás  $g^{-1}$  VS y  $141 \pm 7$  mL  $CH_4$   $g^{-1}$  SV después de 28 días de incubación, la mitad de la cantidad producida por los materiales mencionados, que no habían sido previamente tostados. Lee et al. (2017) reportó la presencia de volátiles en estado gaseoso durante la fermentación de cafés con diferente grado de torrefactado, por lo que durante la fermentación se producen pérdidas de material biodegradable. Además, durante

la extracción enzimática, también se produce pérdida de material soluble biodegradable, lo que explicaría la diferencia de producción de biogás en las diferentes etapas del proceso.

#### *Estabilización aerobia*

Una vez realizada la extracción, el sólido restante fue estabilizado también en condiciones aerobias con el objetivo de conseguir un material similar al compost, adecuado como enmienda para suelo, eliminando el residuo final.

Como se describió previamente, la fermentación se interrumpió tras 48 horas y la extracción se llevó a cabo. El sólido remanente fue escurrido manualmente con el fin de eliminar parte de la humedad extra. De todas formas, la humedad final del residuo quedó comprendida entre un 71% y un 75% en peso, más elevada que los valores idóneos según la literatura, que recomienda un rango entre 40% y 60% (Kim et al. 2016). Tres replicados del proceso de compostaje de la materia extraída fueron llevados a cabo usando los reactores de 10 L de volumen de trabajo. Además, se realizó un cuarto experimento de estabilización utilizando material no extraído con el fin de comparar ambos materiales. Las Figuras 4.16 a) y b) muestran el proceso de estabilización del mismo material previo a la extracción y posterior a la extracción respectivamente.

Los resultados indican un consumo de oxígeno por parte de la materia no extraída de  $12.5 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS d}^{-1}$ , más elevado que el presentado por la muestra previamente extraídas provenientes de la misma fermentación en estado sólido, el cual fue de  $4.3 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS d}^{-1}$ . Valores similares fueron medidos para el resto de replicados de la estabilización del material post-extracción, los cuales fueron  $4.57$  y  $4.43 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS d}^{-1}$ .

En el caso del material húmedo, no se alcanzaron temperaturas de higienización, la máxima temperatura observada fue de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Por otro lado, el material no extraído llegó a temperaturas en el rango termófilo,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 h aproximadamente. Las diferencias en la actividad biológica de ambos materiales pudo ser debida a la pérdida de materia soluble biodegradable durante el proceso de extracción, ya que las partículas de cascarilla de café presentan tamaños entre  $1.6 \text{ mm}$  y  $710 \text{ }\mu\text{m}$ , por lo que la proporción de estructurante en el material post extracción sería mayor que en el material simplemente fermentado, y por lo tanto menos biodegradable. Además, la actividad biológica puede ser obstaculizada por la alta humedad (Richard et al. 2002).

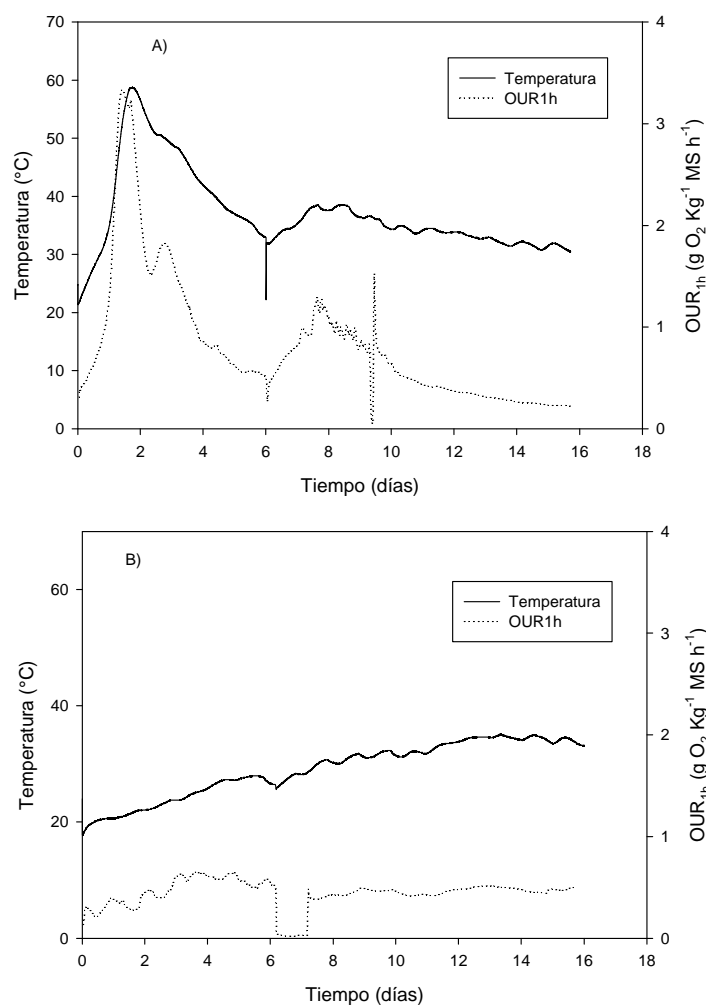


Figura 4.16 Perfiles de OUR<sub>1h</sub> (línea discontinua) y temperatura (línea continua) de procesos de estabilización aerobia de cascarilla de café fermentada a) antes de la extracción enzimática y b) después de la extracción enzimática

La Tabla 4.5 muestra los valores de los test de respirometría dinámica realizados al material en los diferentes puntos del proceso.

Como se puede observar, el residuo era estable a los 15 días de compostaje, con valores de IRD<sub>24h</sub> de  $0.33 \pm 0.04$  g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup> y AT<sub>4</sub> of  $29 \pm 5$  g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS.

Estos valores son muy parecidos a los que presentaría un compost maduro (Komilis et al. 2012). El residuo proveniente de la FES sin extracción alcanzó también la estabilidad tras 7 días de compostaje, con valores de IRD<sub>24h</sub> y AT<sub>4</sub> de  $0.7 \pm 0.3$  g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup> y  $59 \pm 21$  g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS respectivamente. El pH fue medido para un replicado, presentando valores entre 8 y 8.5, los mismos que un compost maduro.

#### **4.2.4 Conclusiones**

En este trabajo, diferentes aspectos del downstream de la producción de celulasas fueron evaluados a través de la FES de cascarilla de café. Parámetros de extracción como la relación sólido (g): extractante (mL), modo de agitación y tipo de extractante parecen tener poca influencia en la actividad total recuperada. No se observa ninguna mejora con el uso de BC en comparación con el uso de AD como agente extractante. De acuerdo con los resultados, parece ser que el contacto entre sólido y líquido durante la extracción es adecuado independientemente del modo de agitación. A pesar de que la actividad máxima recuperada es de  $108 \pm 30\%$  con unas condiciones de 1:5 relación de extracción g:mL, modo estático y AD como extractante, estadísticamente este resultado no presenta diferencia con el obtenido en una relación 1:2 g:mL, manteniendo el resto de parámetros de extracción.

No se observó pérdida de actividad tras la liofilización, ya que la recuperación calculada osciló alrededor del 100% durante los primeros 50 días.

En cuanto a la estabilización aerobia del material sólido tras la extracción, se observó que el exceso de agua podía interrumpir el proceso, por lo que se recomienda un paso previo de secado. Al final de la estabilización se obtuvo un material parecido al compost, el cual podría ser utilizado como enmienda orgánica para el suelo. La producción de biogás comparada con otros residuos agrícolas no fue elevada, por lo que se recomienda la co-digestión junto con otro residuo más biodegradable para la valorización energética del residuo post-extracción.

En resumen, se ha presentado un proceso detallado para optimizar la producción de celulasas a partir de un residuo lignocelulósico, considerando el proceso global, desde la FES hasta la liofilización del extracto, así como las estrategias de gestión del sólido restante tras la extracción con el fin de alcanzar un proceso residuo cero.



### **4.3 Viabilidad de la cáscara de naranja, la pomaza de manzana y la fibra de arroz para la producción de celulosas mediante FES, procesado de la enzima y estrategias cero residuo**

Parte de este apartado ha sido enviado para su publicación como: Marín M, Artola A, Sánchez A (2018) Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected lignocellulosic wastes. Journal of cleaner production

#### **4.3.1 Introducción**

Tras determinar en el apartado 4.2 la forma óptima de extracción de las celulosas producidas mediante fermentación en estado sólido de cascarilla de café, en el apartado 4.3 se estudió la viabilidad de tres residuos, la cáscara de naranja, la pomaza de manzana, y la fibra de arroz, como sustratos para un proceso de fermentación en estado sólido para la producción de celulosas, así como las condiciones óptimas de extracción del producto, liofilización y estrategias cero residuos.

Los parámetros de extracción estudiados, como en el resto del capítulo 4, fueron el ratio sólido (g): líquido (mL), el tipo de extractante y el modo de agitación.

Tal y como se hizo para los residuos anteriores, se llevó a cabo la evaluación de estrategias cero residuos sobre el material sobrante de la extracción, con el fin de cerrar el círculo y conseguir un proceso limpio, además de obtener otro beneficio añadido a los residuos estudiados. Las técnicas evaluadas fueron la digestión anaerobia para producir biogás y por lo tanto energía, y la estabilización del residuo para ser utilizado como enmienda orgánica del suelo.

#### **4.3.2 Materiales y métodos**

##### **4.3.2.1 Reactores utilizados**

Tanto para la realización de los procesos de FES como para la estabilización del material sólido restante tras la extracción, se utilizaron los reactores de 10 L de volumen de trabajo, descritos en el Capítulo 3. En los procesos de FES el método de control de la aireación fue por retroalimentación, descrito anteriormente, mientras que en los procesos de estabilización se utilizó el control manual.

#### *4.3.2.2 Extracciones*

Los parámetros estudiados en la recuperación de actividad fueron la relación extractante (mL): sólido (g), el tipo de extractante y el modo de extracción. Los ratios elegidos fueron 1:2, 1:3 y 1:5 (g:mL) para la cáscara de naranja y la pomaza de manzana, y 1:1, 1:3 y 1:5 (g:mL) para la fibra de arroz, ya que el residuo, a diferencia del resto, quedaba totalmente cubierto en un ratio 1:1. Los dos extractantes utilizados fueron AD y BC. En cuanto a los modos de extracción, se realizaron extracciones en estático, con agitación orbital a 120 rpm y recirculando el solvente con la pomaza de manzana. Tras observar en el caso de la extracción de cascarilla de café, que el uso de BC y la aplicación de agitación no contribuían significativamente a la mejora del rendimiento, en este apartado 4.3 tan solo se evaluó su uso a un ratio, y se comparó con la extracción estática y realizada con AD al mismo ratio, que fue 1:3 sólido (g): líquido (mL). Lo mismo pasó con la recirculación del solvente.

Entre 300 y 500 g de material fermentado fueron utilizados en cada extracción, las cuales tuvieron una duración de 30 min y se realizaron a temperatura ambiente. La extracción en las condiciones asignadas como estándar y que se consideró se obtenía un 100% de recuperación de actividad se realizó por duplicado, utilizando 50 g de material fermentado. Las condiciones consideradas estándar fueron ratio sólido: líquido (g:mL) de 1:15, BC a pH 4.8 y agitación magnética a temperatura ambiente.

Se realizaron tres replicados tras cada condición de extracción, y se descartó uno de los valores en caso de que difiriese más de un 25% del valor promedio.

#### *4.3.2.3 Análisis de resultados*

La comparación estadística de los resultados se realizó mediante análisis t-Student del programa Sigmaplot v11 en todos los casos.

### **4.3.3 Resultados y Discusión**

Seguidamente se presentan los resultados obtenidos de los experimentos de fermentación en estado sólido de los residuos mencionados, downstream de las enzimas producidas y los resultados de las estrategias cero residuos.

#### *4.3.3.1 Caracterización del residuo*

Se llevó a cabo la caracterización de los residuos, que se muestra en la Tabla 4.7. Como se puede observar, el contenido en fibra es bajo para los tres residuos, menos de 25% en total en base seca, si se compara con otros residuos agrícolas como la cascarilla de café

(Cerde et al. 2017a), que presenta un contenido del 50%. El salvado de trigo, que contiene un 24% de celulosa, similar a los residuos estudiados, ha sido también utilizado como sustrato para la producción de celulasas según la literatura (Bansal et al. 2012).

#### 4.3.3.2 Fermentación en estado sólido

Se realizó la fermentación en estado sólido los tres residuos para evaluar su idoneidad como sustrato para la producción de celulasas. Cada residuo fue mezclado con compost y estructurante para conseguir la porosidad y humedad necesaria. La mezcla fue fermentada en reactores de 10L en los tres casos. Las Figuras 4.17 a) b) y c) muestran los perfiles de temperatura y velocidad de consumo específico de oxígeno a una hora (sOUR1h) medidos en la fermentación en estado sólido de la cáscara de naranja, la pomaza de manzana y la fibra de arroz respectivamente.

El consumo de oxígeno acumulado durante la fermentación para los tres residuos fue de  $455 \pm 58 \text{ mL O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$  para la cáscara de naranja,  $80 \text{ mL O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$  para la pomaza de manzana, y  $509 \pm \text{ mL O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$  para la fibra de arroz. La temperatura alcanzó el rango termófilo ( $>45^\circ\text{C}$ ) en el caso de la cáscara de naranja y la pomaza y se mantuvo en este rango aproximadamente 48 horas. En cuanto a la fibra de arroz, las temperaturas medidas durante su fermentación alcanzaron valores superiores a  $50^\circ\text{C}$ , demostrando que la fibra de arroz puede considerarse el residuo más biodegradable de los tres.

Como se muestra en las Figuras 4.17 a), b) y c) la actividad inicial de celulasas medida para la cáscara de naranja, la pomaza de manzana y la fibra de arroz (mezcladas con compost y estructurante) fue la máxima alcanzada a lo largo de todo el proceso, presentando valores de  $2.8 \pm 0.2 \text{ IU g}^{-1} \text{ MS}$ ,  $5 \pm 1 \text{ IU g}^{-1} \text{ MS}$  y  $2.1 \pm 0.2 \text{ IU g}^{-1} \text{ MS}$  respectivamente.

En las Figuras 4.17 a) y b), las fermentaciones de la cáscara de naranja y la pomaza de manzana muestran ambas un descenso de pH de los valores iniciales, cercanos a 7, hasta valores ácidos, cercanos a 4. De acuerdo con Torrado et al. (2011), el contenido en azúcares de la cáscara de naranja presenta valores entre 29-44%, mientras que el contenido para la pomaza de manzana es de alrededor de un  $39 \pm 8\%$  en base seca (Sato et al. 2010). Estos contenidos en azúcar, comparados con otros residuos agrícolas como la paja de arroz (0.071%), o el bagazo de caña de azúcar (0.55%) (El-Tayeb et al. 2012) pueden ser la razón por la que no se observó producción de celulasas, ya que es posible, de acuerdo con la literatura, que los monosacáridos se degraden siguiendo una vía ácida, tal y como observó Novoty et al. (2008) en la degradación de glucosa y fructosa obteniendo ácido fórmico,



acético y propiónico, los cuales pueden ser los causantes del descenso del pH, el cual habría inhibido el proceso de degradación. Como se muestra en la Figura 4.17 c), la fibra de arroz también experimenta una caída en el pH, pero no desciende a valores inferiores a 5, y se observa una recuperación posterior en menos de 6 días a valores de pH alrededor de 8. El valor de la actividad de celulasas decrece a lo largo del proceso de fermentación, siendo el valor inicial el más elevado, tal y como ocurría en los otros dos casos.

Tabla 4.7 Caracterización de los residuos utilizados en la FES

<b>Parámetros</b>		<b>Pomaza de manzana</b>	<b>Cáscara de naranja</b>	<b>Fibra de arroz</b>
<b>pH</b>		3.90 ± 0.05	4.64 ± 0.01	7.7 ± 0.2
<b>Conductividad (mS cm<sup>-1</sup>)</b>		0.43 ± 0.03	0.79 ± 0.03	0.21 ± 0.07
<b>Humedad (%bs.)</b>		82 ± 1	81.81 ± 0.03	67.75 ± 0.09
<b>Materia orgánica (% bs.)</b>		97 ± 3	98 ± 4	93 ± 6
<b>AT<sub>4</sub> (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS)</b>	<i>Residuo Fresco</i>	165 ± 1	276 ± 6	306 ± 63
	<i>Residuo Estabilizado</i>	33 ± 4	30 ± 16	
<b>IRD<sub>24h</sub> (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup>)</b>	<i>Residuo Fresco</i>	2.02 ± 0.05	3.5 ± 0.1	6 ± 1
	<i>Residuo Estabilizado</i>	0.43 ± 0.03	0.4 ± 0.2	
<b>Cellulose (% db.)</b>		5.0	4.8	11.7
<b>Hemicellulose (% db.)</b>		11.0	10.9	3.76
<b>Lignin (% db.)</b>		6.0	1.9	3.21
<b>Protein (% db.)</b>		3.3	7.8	65.03

La actividad de celulasas medida para los residuos antes de realizar la mezcla con compost y estructurante fue de  $8 \pm 1$  IU g<sup>-1</sup> MS para la pomaza de manzana,  $7.8 \pm 0.1$  IU g<sup>-1</sup> MS para la cáscara de naranja y  $3.0 \pm 0.7$  IU g<sup>-1</sup> MS para la fibra de arroz. En la literatura se han encontrado gran cantidad de residuos agrícolas utilizados como sustrato en la producción de celulasas y las actividades obtenidas. Usando bagazo de caña de azúcar como sustrato, Bansal et al. (2012) obtuvo  $1.5 \pm 0.005$  IU g<sup>-1</sup> MS inoculando *Aspergillus niger* NS-2 en una escala laboratorio de 5 g, y Mendes et al. (2017) consiguieron actividades de hasta 12 IU g<sup>-1</sup>, a escala banco de pruebas, y operando con una mezcla de bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo como sustrato para el cultivo del hongo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, en un bioreactor de lecho empacado. La actividad de celulasas medida con papel de filtro para cáscara de

naranja y cascarilla de arroz, a escala de 5 g e inoculadas con *Aspergillus niger* NS-2, arrojó valores de  $1.9 \pm 0.0$  y  $3.1 \pm 0.0$  respectivamente (Bansal et al. 2012).

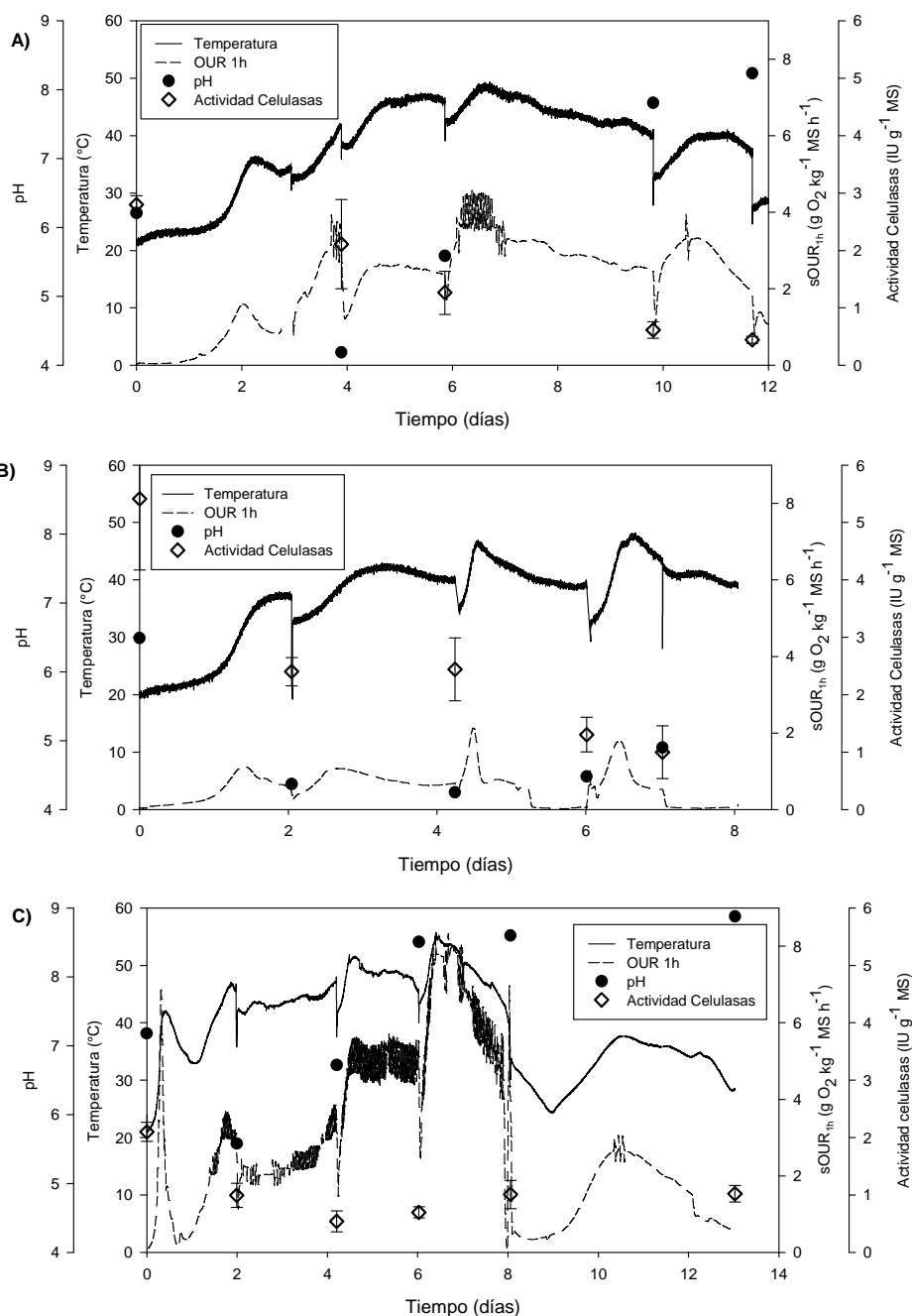


Figura 4.17 Perfiles de temperatura (línea sólida), OUR1h (línea discontinua), pH (puntos negros) y actividad celulasa (diamantes blancos) durante la fermentación en estado sólido de una mezcla de residuo y compost 9:1 g:g estructurado con astillas de madera 1:1 mL:mL de A) Cáscara de naranja, B) Pomaza de manzana y C) Fibra de arroz.

En vista de los resultados encontrados en la bibliografía, la extracción de celulasas de los residuos frescos evaluados en este trabajo es una alternativa rentable, ya que se evita el

uso de equipos y costes de operación necesarios en la realización de la FES, obteniéndose actividades del rango de  $8 \text{ IU g}^{-1} \text{ MS}$  para cáscara de naranja y pomaza de manzana, mayores que algunas actividades obtenidas tras la fermentación del residuo. Aunque el contenido en celulasas de la fibra de arroz no es tan elevado como en los otros dos residuos estudiados, el hecho de que no se necesite realizar la fermentación puede hacer la extracción rentable. Por lo tanto, ya que los trabajos encontrados ofrecen escasa información sobre la recuperación de las celulasas de la matriz sólida y gran número de estudios acerca de los procesos de fermentación, se evaluaron las condiciones de recuperación de las enzimas presentes en el residuo fresco.

#### *4.3.3.3 Extracciones*

##### *Recuperación de actividad*

La Tabla 4.8 muestra los diferentes métodos de extracción utilizados en la recuperación de celulasas para los tres residuos y los rendimientos obtenidos.

Los resultados obtenidos previamente en extracciones realizadas utilizando cascarilla de café fermentada mostraron que no existían diferencias significativas entre la recuperación de actividad en modo agitado y en modo estático, ni tampoco entre agentes extractantes, por lo que la extracción utilizando BC y modo de extracción agitado se evaluaron tan solo en un ratio de extracción (1:3). Chandra et al (2010) reportó un ratio de extracción óptimo de 1:4.

Para la pomaza de manzana, los resultados muestran una recuperación de actividad máxima de  $104 \pm 27\%$ , obtenida a ratio 1:2 y en modo estático, utilizando AD como extractante. De entre los resultados de recuperaciones de actividad obtenidas utilizando los diferentes parámetros de extracción, tan sólo difiere estadísticamente la recuperación obtenida con recirculación de extractante, que es significativamente más baja. Por lo tanto, el modo recirculado no se evaluó para el resto de residuos.

Las variaciones en el pH y la conductividad de los extractos son mínimas, tal y como se muestra en la Tabla 4.8. La conductividad nunca superó los  $1.2 \text{ mS cm}^{-1}$ , mientras el pH osciló alrededor de 3.8 en todos los extractos. La excepción fue el extracto obtenido utilizando BC, que presentó una conductividad de  $4.2 \pm 0.3 \text{ mS cm}^{-1}$  y pH 4.72.

En el caso de la cáscara de naranja, el ratio y la agitación parecen tener mayor influencia que en las extracciones con pomaza de manzana. La recuperación más alta de actividad fue de  $106 \pm 7\%$  y se obtuvo utilizando un ratio de 1:5, modo estático y AD como

agente extractante. No se encontraron diferencias significativas entre la actividad máxima y las recuperaciones obtenidas a ratio 1:3.

Tabla 4.8 Resultados de la recuperación de actividad de la pomaza de manzana, cáscara de naranja y fibra de arroz.

<b>Extracción de Celulasas de la Pomaza de Manzana</b>			
<i>Modo Extracción</i>	<i>Recuperación Actividad (%)</i>	<i>pH</i>	<i>Conductividad (mS cm<sup>-1</sup>)</i>
<b>2- Estático -AD a</b>	105 ± 27	3.77 ± 0.07	1.14 ± 0.06
<b>3- Estático – AD a,b</b>	98 ± 32	3.76 ± 0.06	0.91 ± 0.01
<b>3-Agitado- AD a,b</b>	96 ± 14	3.80 ± 0.04	0.98 ± 0.01
<b>5- Estático - AD a,b</b>	81 ± 4	3.90 ± 0.05	0.43 ± 0.03
<b>3- Estático -BC b</b>	75 ± 12	4.72 ± 0.04	4.2 ± 0.3
<b>3-Recirculado- AD c</b>	56 ± 8		
<b>Extracción de Celulasas de la Cáscara de Naranja</b>			
<i>Modo Extracción</i>	<i>Recuperación Actividad (%)</i>	<i>pH</i>	<i>Conductividad (mS cm<sup>-1</sup>)</i>
<b>5- Estático - AD a</b>	106 ± 7	4.64 ± 0.01	0.79 ± 0.03
<b>3- Agitado - AD a, b</b>	97 ± 13	4.62 ± 0.00	1.3 ± 0.1
<b>2- Estático - AD b</b>	87 ± 1	4.59 ± 0.02	1.50 ± 0.02
<b>3- Estático - AD a, b</b>	84 ± 19	4.61 ± 0.01	1.12 ± 0.01
<b>3- Estático -BC b</b>	81 ± 12	4.72 ± 0.02	5.9 ± 0.4
<b>Extracción de Celulasas de Fibra de Arroz</b>			
<i>Modo Extracción</i>	<i>Recuperación Actividad (%)</i>	<i>pH</i>	<i>Conductividad (mS cm<sup>-1</sup>)</i>
<b>3- Estático - AD a</b>	139 ± 11	7.8 ± 0.2	0.22 ± 0.03
<b>3- Agitado - AD a</b>	138 ± 2	7.73 ± 0.05	0.28 ± 0.07
<b>1- Estático - AD a, b</b>	115 ± 10	7.4 ± 0.1	0.32 ± 0.05
<b>3- Estático -BC a, b</b>	103 ± 27	5.21 ± 0.02	5.07 ± 0.10
<b>5- Estático - AD b</b>	92 ± 13	7.7 ± 0.2	0.21 ± 0.07

AD: Agua destilada, BC: Buffer citrato.

Los números en el modo de extracción indican el ratio de extracción, las letras en minúscula indican los resultados que no presentan diferencias estadísticas entre ellos. Los resultados se expresan como la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

El pH para todos los extractos fue de 4.6, con mínimas variaciones. En este caso, la extracción con BC sólo presentaba una diferencia de 0.1 en el valor de pH. Al igual que para la pomaza de manzana, la conductividad incrementó con la disminución del ratio de extracción, alcanzando un valor máximo de  $1.5 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ .

La máxima recuperación de actividad para la fibra de arroz fue de  $139 \pm 11\%$ , a un ratio de 1:3 (g:mL) sin agitación y con AD. Se observaron diferencias estadísticas con la recuperación obtenida a ratio 1:5, la cual mostró el mínimo rendimiento de extracción, por lo que la máxima recuperación de actividad puede obtenerse a ratio 1:1 g sólido: mL extractante con AD como solvente y en modo estático.

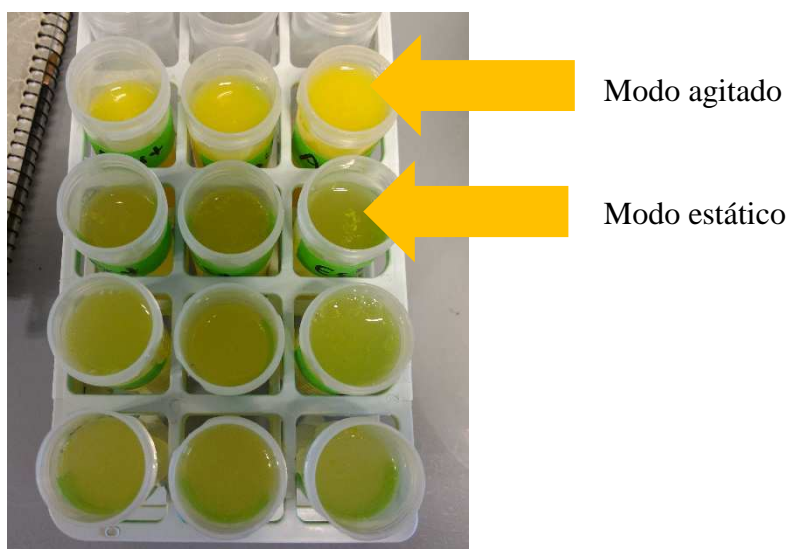
La conductividad del sobrenadante obtenido en estos experimentos fue muy baja comparada con los valores del resto de residuos, alrededor de  $250 \mu\text{S cm}^{-1}$ , mientras que el pH obtenido para este residuo presentaba valores cercanos a 7.7. Como pasaba para la pomaza de manzana, el efecto del BC no mostró ninguna mejora en la recuperación de actividad. Pathak et al. (2014) comparó la actividad de celulasas obtenida para extracciones llevadas a cabo a ratio 1:1, 1:2 y 1:3, sobre residuo de bosque, agrícola y agro-industrial, utilizando BC, obteniendo valores de  $2.34 \pm 0.11$ ,  $2.95 \pm 0.13$  y  $3.25 \pm 0.09 \text{ IU g}^{-1} \text{ MS}$  respectivamente. Comparando la desviación estándar, las extracciones realizadas a 1:2 y 1:3 son comparables, tal y como se observó para la cáscara de naranja y la pomaza de manzana.

En todos los casos, la recuperación usando BC como extractante presenta una de las recuperaciones más bajas. Ya que sería de esperar que las celulasas provenientes de cada residuo tuviesen diferentes características, el motivo de la baja recuperación con BC, en todos los casos, puede deberse a una concentración de sal demasiado alta, la cual puede dificultar la solubilización de la enzima (Ndamitso y Abulude, 2014), o un pH del BC demasiado cercano al punto isoeléctrico de la enzima (Ikasari y Mitchell, 1996). Para validar estas hipótesis sería necesaria una caracterización de la enzima. Pirota et al. (2013) evaluó la recuperación de actividad de endoglucanasas extraídas de 10 g de salvado de trigo fermentado, encontrando que el AD como extractante presentaba valores de recuperación del mismo orden de magnitud que para otros extractantes polares o añadiendo surfactante (0.2 M buffer acetato pH 4.8, BC pH 4.8 y solución 0.1% Tween-80). Este resultado está de acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, en el cual el extractante más iónico produjo un rendimiento de extracción menor.

Extracción en modo estático y agitado no mostraron diferencias para la fibra de arroz y la pomaza de manzana. De Sousa et al. (2012) estudió la influencia de la velocidad de

agitación en la extracción de poligalacturonas, no encontrando diferencia significativa entre velocidades de agitación de 150 y 50 rpm. La recuperación de actividad para el modo agitado en la extracción con cáscara de naranja tampoco mostró ninguna diferencia estadística, aunque la diferencia entre la media de las extracciones era más elevada que para la pomaza de manzana y la fibra de arroz. Para este residuo, se realizó a escala banco de pruebas (2.5 kg de material para cada extracción) una extracción en modo agitado y otra en modo estático, a ratio 1:3 y utilizando AD como extractante, en las que se obtuvo un rendimiento de  $92 \pm 10$  % para la extracción estática y  $82 \pm 13$  % para la forma agitada, mostrando que no existen diferencias significativas entre ambas, aunque el extracto obtenido de la forma agitada presentaba a simple vista mucha más cantidad de sólidos en suspensión (Figura 4.18).

Bender et al. (2008) reportó un incremento de la recuperación de inulinasas del bagazo de caña de azúcar relacionada con el incremento en la velocidad de agitación, analizando velocidades de 50, 100 y 150 rpm.



*Figura 4.18 Extractos en modo agitado y modo estático de la cáscara de naranja usando AD a ratio 1:3 (g:mL)*

Resumiendo, la recuperación máxima para la pomaza de manzana y la fibra de arroz puede ser obtenida con el ratio mínimo (g:mL) evaluado, el cual fue 1:2 y 1:1 respectivamente, usando AD como extractante. Estas fueron también las condiciones más favorables desde un punto de vista económico y para un futuro escalado del proceso. En cuanto a la cáscara de naranja, 1:3 ratio en modo estático y AD como extractante proporcionó el máximo rendimiento de actividad, probablemente debido al tamaño de la partícula. En

todos los casos, tras el análisis estadístico, no se observó ninguna mejora debido al BC como extractante o la aplicación de agitación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el apartado 4.2, en el que estadísticamente no se observó ninguna mejora con la aplicación de agitación durante la extracción. En el caso de los tres residuos estudiados en este apartado, el uso de BC parece perjudicar la recuperación de las celulasas, mientras que para la cascarilla de café, no se observó ningún efecto desfavorable. En cuanto al ratio óptimo de extracción, en el caso de la cascarilla de café, también se escogió como óptimo un ratio de 1:2, siendo el más bajo evaluado, lo que concuerda con los resultados obtenidos para la pomaza de manzana y la fibra de arroz, que, al igual que la cascarilla de café, presentaban un tamaño de partícula muy reducido en comparación con la cáscara de naranja.

Se llevaron a cabo extracciones consecutivas sobre el mismo sólido para los tres residuos para establecer si una etapa de extracción resultaba suficiente para obtener una recuperación total. Los resultados se muestran en las Figuras 4.19 a), b) y c).

En el caso de la cáscara de naranja, dos de los replicados muestran una recuperación, en la primera extracción, de casi el 80% del total de unidades de actividad recuperadas tras las 3 extracciones consecutivas. El tercer replicado muestra una eficiencia menor de extracción en la primera extracción, en la el rendimiento fue inferior al obtenido en la segunda extracción. Por lo tanto, se recomienda para la cáscara de naranja, una única extracción, ya que la segunda proporcionaría un bajo rendimiento y un extracto altamente diluido. No se han encontrado referencias del rendimiento de extracciones consecutivas a escala banco de pruebas en la literatura, tan solo a escala de laboratorio de 10 g.

Por otro lado, las extracciones realizadas sobre la pomaza de manzana, muestran una diferencia de un 20% entre el rendimiento de la primera y la segunda extracción consecutiva, y un decrecimiento drástico del rendimiento en la tercera extracción. De acuerdo con estos resultados, dos extracciones consecutivas serían recomendables para la pomaza de manzana. Resultados similares se obtuvieron en el caso de la fibra de arroz tras tres extracciones consecutivas, la diferencia en el rendimiento de actividad entre la primera y la segunda extracción fue de casi un 10% de la actividad total extraída, y dicha diferencia incrementó drásticamente para la tercera extracción consecutiva, por lo que para la fibra de arroz también resultaría provechosa una segunda extracción.

En este caso, los resultados obtenidos para la cáscara de naranja, coincidirían con la dinámica observada en la cascarilla de café, en la que la mayor parte del producto era recuperado en la primera extracción.

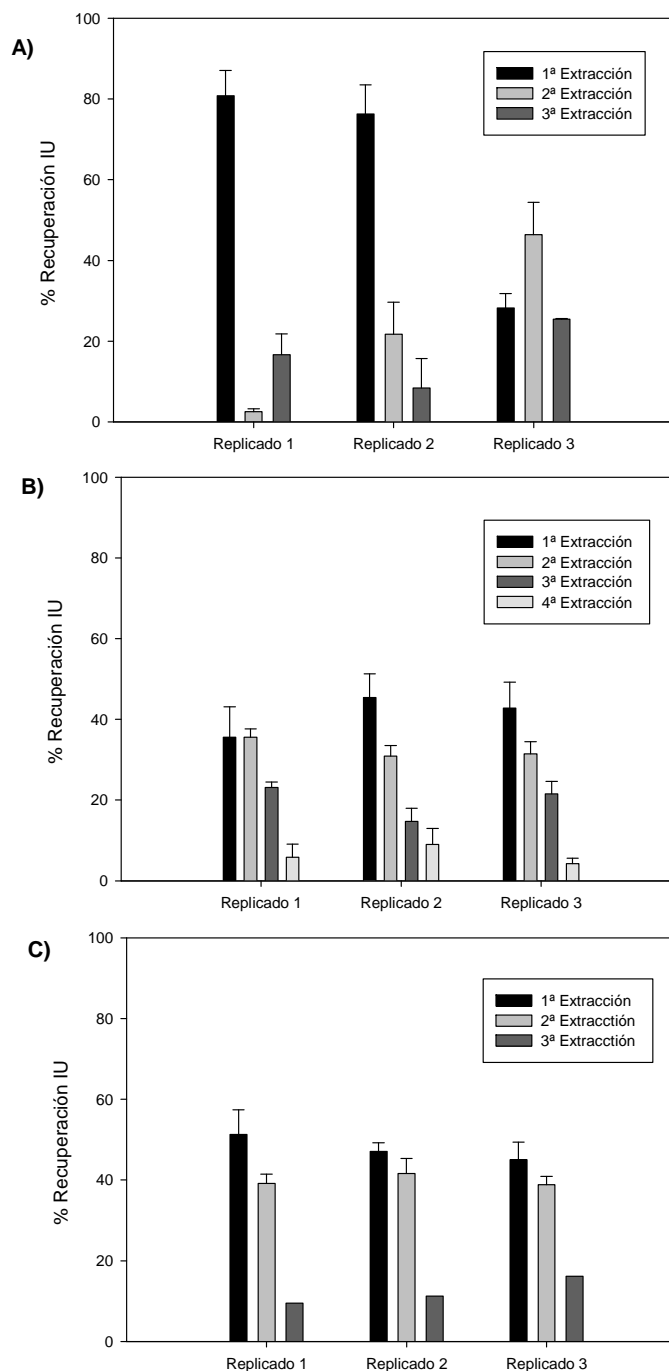


Figura 4.19 Recuperación de actividad en extracciones consecutivas A) Cáscara de Naranja B) Pomaza de Manzana, C) Fibra de arroz



Como ya ocurrió, los resultados en el caso de la cáscara de naranja coinciden con los obtenidos por Pirota et al. (2013), quienes, usando AD como extractante, obtuvieron 35 IU g<sup>-1</sup> MS en la primera extracción y 5 IU g<sup>-1</sup> MS en una segunda extracción consecutiva, siendo recomendable una única etapa de extracción. También Pathak et al. (2014) comparó la actividad obtenida tras tres extracciones consecutivas de residuos de papel con la recuperación obtenida tras una única etapa de extracción, utilizando un volumen equivalente a la suma de los volúmenes utilizados en las extracciones consecutivas, y obteniendo un incremento del 29.2% en la recuperación de IU g<sup>-1</sup> MS en la extracción consecutiva, mostrando la eficiencia de esta estrategia en algunos casos.

#### 4.3.3.4 Liofilización

Como ya se ha comentado, la liofilización del extracto crudo puede ser utilizada como método de concentración de la enzima para un uso posterior y para preservar su actividad por un tiempo más prolongado, además de para facilitar su almacenamiento (Abu Yazid et al. 2016; de Jesus and Maciel Filho 2014). Por estos motivos se investigó el efecto de la liofilización en el extracto.

Tabla 4.9 Recuperación de actividad tras la liofilización (%)

Modo extracción	Residuo	Recuperación de actividad celulasas (%) tras la liofilización	
		24h después de la liofilización	139 días tras la liofilización
3-Estático-AD	Fibra de arroz	66 ± 2	57 ± 1
3- Estático - AD	Pomaza de Manzana	117 ± 9	108 ± 6
3- Estático -BC	Pomaza de Manzana	78 ± 2	87 ± 10
3- Estático - AD	Cáscara de Naranja	125 ± 19	73 ± 12
3- Estático -BC	Cáscara de Naranja	86 ± 6	57 ± 2

Los resultados son la media de tres experimentos independientes

La Tabla 4.9 Muestra la recuperación de actividad obtenida de los extractos liofilizados y redisueltos a su volumen original comparado con la actividad del extracto fresco para los tres residuos en estudio.

Como se puede observar, para la pomaza de manzana y la cáscara de naranja, la conservación de la actividad es más eficiente en los extractos obtenidos con AD que en los

obtenidos con BC, con una diferencia de alrededor del 30%. La fibra de arroz presenta una baja recuperación de la actividad,  $66 \pm 2\%$ , en comparación con los valores obtenidos para la pomaza de manzana y la cáscara de naranja:  $117 \pm 9\%$  y  $125 \pm 119\%$ , respectivamente. Resultados similares fueron observados en la liofilización y purificación de xilanansas obtenidas mediante FES de residuos agrícolas (Shah y Madamwar, 2005).

En comparación con los valores de recuperación de actividad, obtenidos para la cascarilla de café, que fueron de  $123 \pm 18$  para 2-Estático-BC y  $97 \pm 22\%$  para 5-Estático-BC, respectivamente, tras la liofilización del extracto, se observa que resultan comparables a los obtenidos en los casos de la cáscara de naranja y la pomaza de manzana a ratio 1:3 (g:mL), mientras que los obtenidos para la fibra de arroz, resultan menos favorables que para el resto de residuos.

Durante las últimas décadas, la estabilización de proteínas utilizando azúcares como aditivo ha incrementado. Han sido propuestas dos teorías para explicar el mecanismo por el cual estos azúcares actúan, la vitrificación o la sustitución de agua (Mensink et al.2017). En nuestro caso, el extracto crudo de los tres residuos contenía azúcares, los cuales, de acuerdo con alguno de estos mecanismos, podrían haber ayudado a preservar la actividad del extracto en el proceso de liofilización. Pikal-Cleland et al. (2001) observó la desnaturalización de proteínas debido a la variación de pH en el medio debido a la precipitación de los compuestos menos solubles en el buffer durante el proceso de congelación. En este estudio, esto podría explicar porqué las pérdidas de actividad observadas en los extractos de BC eran superiores que las observadas en los de AD.

Durante los cuatro meses siguientes, el liofilizado se mantuvo a una temperatura de 4 °C, tiempo durante el cual se observó una pérdida de actividad superior al 10% tan solo para la cáscara de naranja, siendo las pérdidas mucho más elevada que para el resto de residuos.

Como conclusión, la liofilización puede ser considerada una forma eficiente de concentrar el extracto y preservar la actividad de las celulasas obtenidas de estos tres residuos. Comparando los resultados obtenidos con estos tres residuos con los mostrados en el apartado 4.2, sería necesario un estudio de la conservación de la actividad con el tiempo para determinar si las pérdidas observadas tras 139 días de conservación se deben a oscilaciones como en el caso de la cascarilla de café o la conservación de las enzimas extraídas de los residuos frescos resulta menos favorable.

4.3.3.5 Estrategias cero residuos

Tras la extracción de las celulasas, el sólido remanente debe ser gestionado de manera apropiada. Ya que este sólido no ha sido fermentado, aún posee un elevado porcentaje de materia fácilmente biodegradable, así como un alto contenido en agua. Con el fin de alcanzar un proceso limpio para la producción de celulasas, obteniéndose beneficio del sólido remanente, se probó la digestión anaerobia y la estabilización del residuo con el fin de que sirviese de enmienda orgánica. En la literatura se han encontrado algunos trabajos intentando obtener un proceso de producción cero residuos. Chintagunta et al. (2016) obtuvo etanol y una enmienda biológica del residuo de patata, requiriéndose una co-inoculación y enriquecimiento del sólido tras la obtención del etanol.

Digestión anaerobia

La producción de biogás tras 25 días de digestión para los tres residuos fue de  $552 \pm 66$ ,  $543 \pm 47$  y  $633 \pm 40$  mL biogás  $g^{-1}$  SV para la cáscara de naranja, la pomaza de manzana y la fibra de arroz respectivamente, tras la extracción de celulasas (Figura 4.20).

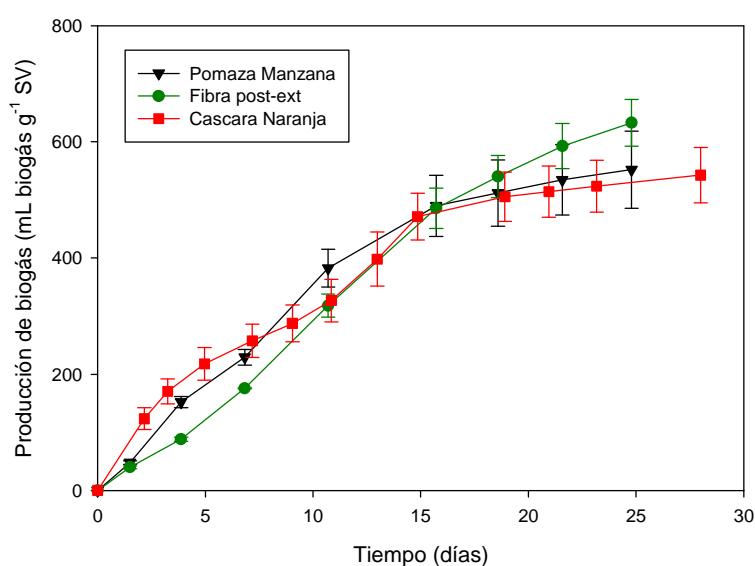


Figura 4.20 Producción de biogás tras 25 días de digestión anaerobia de la Pomaza de manzana extraída (puntos negros), Cáscara de naranja extraída (puntos rojos), Fibra de arroz extraída (puntos verde oscuro) y Fibra de arroz sin extraer (puntos verde claro)

Wikandari et al. (2015) reportó una producción de 217 mL metano  $g^{-1}$  VS tras 33 días de incubación para la cáscara de naranja, en la cual, el limoneno que contenía había sido previamente eliminado para incrementar la producción, ya que es sabido que dicho compuesto puede ser anti-microbiano. La producción de metano en este estudio fue de  $364 \pm 32$  mL  $g^{-1}$  VS, superior a la reportada por Wikandari et al. (2015). En cuanto a la pomaza de manzana, la

producción de biogás resultó muy similar a la obtenida con la cáscara de naranja. Kupryscaruk et al. (2014) obtuvieron una producción de 559 mL de biogás  $\text{g}^{-1}$  VS aplicando un ensilado previo a la pomaza de manzana, producción muy similar a la obtenida en este estudio. En cuanto a la fibra de arroz, la extracción de celulasas pudo causar un efecto similar al de la eliminación de limonene u otros inhibidores de la cáscara de naranja, ya que la fibra digerida previamente a la extracción de celulasas, produjo un 31% menos de biogás  $\text{g}^{-1}$  VS que el material extraído. Como comparación de valores, Kashi et al. (2017) obtuvo producciones de 648, 1381, 168 y 879 mL de biogás  $\text{g}^{-1}$  VS para lodo activado de una planta de tratamiento de aguas residuales, residuo de una trampa de grasa, lodo del tratamiento de aguas de una segunda planta de tratamiento, y residuo del procesado de carne, respectivamente, todos inoculados en un ratio 1:4 F:1 en base de SV con lodo anaerobio y tras 35 días de digestión. Ponsá et al. (2011) obtuvo, tras 21 días de digestión de la fracción orgánica de residuos municipales con un pre-tratamiento mecánico, una producción de  $224 \pm 92$  NmL biogás  $\text{g}^{-1}$  VS, y una producción de  $221 \pm 53$  NmL biogás  $\text{g}^{-1}$  VS de residuos sólidos municipales con pre-tratamiento mecánico en las mismas condiciones, todos inoculados en un ratio de 1:1 en base de SV. Comparando los resultados obtenidos en este trabajo, la digestión anaeróbica para la producción de biogás es recomendable como estrategia, ya que la producción de biogás es alta comparada con los valores de la literatura. Además, no será necesaria una etapa de secado para el sólido remanente si el proceso se lleva a cabo por vía húmeda.

#### *Estabilización Aerobia*

Tras la extracción, el residuo húmedo se estabilizó aeróbicamente. La humedad del sólido se había incrementado tras la extracción de celulasas, por lo que se requirió una etapa de secado, que consistió en un prensado manual del sólido dentro de un tejido permeable, intentando emular el prensado de lodos (Figura 4.21), para alcanzar en la mezcla final el contenido en humedad recomendado, en el intervalo de 40-60% (Kim et al. 2016).

Se utilizaron astillas de madera como agente estructurante en un ratio 1:1 (mL:mL) para todos los residuos tras el prensado, basándose en el trabajo previo de Cerda et al. (2017a), con el fin de proveer de porosidad al residuo. Las mezclas fueron estabilizadas en los reactores de 10 L.

Se llevaron a cabo dos procesos de estabilización para la pomaza de manzana, el primero tras una extracción simple y el segundo tras las cuatro extracciones consecutivas.

Ambos procesos tuvieron una duración de 14 días, y el consumo medio de oxígeno para ambos procesos fue de  $335 \pm 5 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$ . Los valores de  $AT_4$  e  $IRD_{24h}$  fueron, tras la estabilización aerobia,  $44 \pm 5 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$  y  $0.5 \pm 0.1 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$  respectivamente para el residuo tras una única etapa de extracción, y  $33 \pm 4 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$  y  $0.43 \pm 0.03 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$  respectivamente para el residuo estabilizado tras 4 etapas de extracción (Tabla 4.7), mostrando que las extracciones consecutivas no produjeron ningún efecto remarcable en el proceso de estabilización, ya que ambos materiales presentan índices respirométricos muy similares. En ambos casos, la humedad durante todo el proceso se mantuvo en valores cercanos al 70%. En cuanto al pH, los valores iniciales fueron de 4.5 en ambos casos e incrementó hasta 6.5-7 a lo largo del proceso.

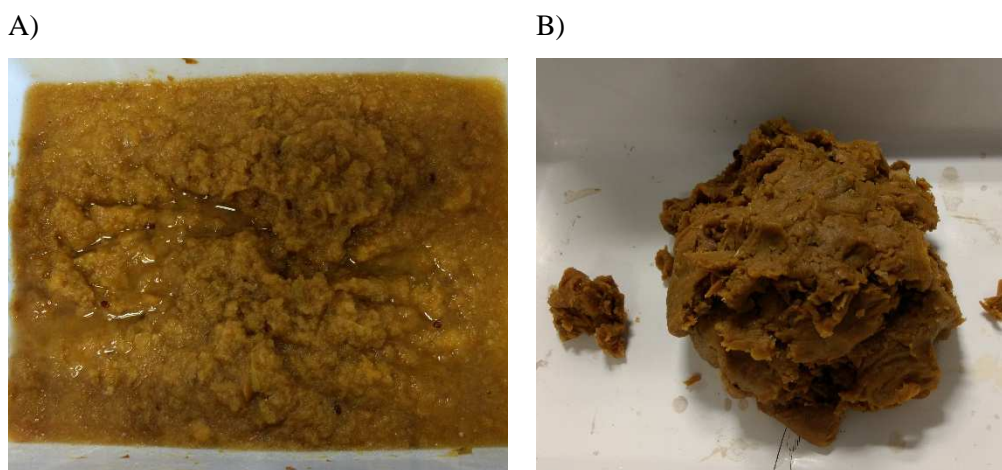


Figura 4.21 Pomaza de manzana A) tras la extracción B) tras la fase de escurrido

La cáscara de naranja proveniente de los experimentos de una etapa de extracción fue también prensada, mezclada con astillas de madera como estructurante y estabilizada aeróbicamente, alcanzando, tras la estabilización, valores de  $AT_4$  de  $30 \pm 16 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$  e  $IRD_{24h}$  de  $0.4 \pm 0.2 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$  tras 24 días de estabilización. Se llevaron a cabo tres ensayos de estabilización de diferente duración. Durante la estabilización, el consumo de oxígeno presentó desviaciones de aproximadamente 30%, siendo el valor medio de consumo de oxígeno tras 11 días de estabilización de  $847 \pm 292 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$ , más de dos veces el valor alcanzado en el caso de la pomaza de manzana. En este caso se alcanzaron temperaturas termófilas durante más de 24 horas. En cuanto al pH, los valores iniciales se encontraban entre 3.6-4.6 e incrementaron a 7.5-8 a lo largo del proceso. La humedad incrementó desde valores iniciales de 71% a aproximadamente 76-78% en los tres ensayos, este incremento produjo una deficiencia en la transferencia de oxígeno, causando la acidificación de uno de los replicados. La estabilización de la cáscara de naranja generó agua debido a la degradación

del material fácilmente biodegradable. Al llevarse a cabo el proceso en reactores herméticamente cerrados y no alcanzar temperaturas elevadas que favorecieran la evaporación, trajo como consecuencia la acumulación de agua dentro del reactor, incrementando la humedad de la mezcla. Para evitar la acidificación durante el proceso de estabilización, sería recomendable que se realizase en otras condiciones, como en pilas de compostaje, donde la convección natural produciría el secado del material.

En cuanto a la estabilización de la fibra de arroz, se realizó tan solo un replicado, este proceso tuvo una duración de 13 días, y el consumo de oxígeno fue de  $715 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$ , en el rango del oxígeno consumido por la cáscara de naranja. Los datos respirométricos en este caso no se encuentran disponibles, pero tras 13 días de proceso el valor de  $sOUR_{1h}$  era de  $0.88 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ .

Barrena et al. (2011) clasificó los diferentes residuos orgánicos en altamente biodegradables (actividad respirométrica mayor que  $5 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ ), residuos moderadamente biodegradables (actividad respirométrica entre 2 y  $5 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ ) y residuos de baja biodegradabilidad (actividad respirométrica menor que  $2 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ ). Debido al contenido de materia orgánica de los tres residuos (Tabla 4.7), muy cercana al 100%, los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser comparados con la escala propuesta por Barrena et al. (2011). De acuerdo con dicha clasificación, los tres residuos habrían pasado de moderadamente biodegradables como residuos frescos, a baja biodegradabilidad tras la extracción y estabilización.

#### *Producción enzimática durante la estabilización*

Durante la estabilización aerobia de los residuos realizada tras la extracción enzimática y la etapa de secado, se midió periódicamente la actividad enzimática. Las figuras 4.22 a), b) y c) muestran los resultados obtenidos para la cáscara de naranja, la pomaza de manzana y la fibra de arroz, respectivamente. La medición de la actividad se llevó a cabo bajo la suposición de que el descenso de pH debido a la descomposición de los azúcares presentes, siguiendo una ruta ácida, provocaba la inhibición del proceso de fermentación y por lo tanto de producción de enzimas. Tras la extracción, gran parte de los azúcares solubles presentes podían haber sido eliminados, por lo que la producción enzimática podría ser observada.

En el caso de la cáscara de naranja, se observó un incremento en la producción de celulasas, que alcanzó su máximo aproximadamente el día 7 de fermentación. El incremento observado es de aproximadamente el doble del valor inicial, llegando a una actividad de 3 IU

$\text{g}^{-1}$  DM. Se evaluó la recuperación de actividad a ratio 1:3 sólido (g): líquido (mL) utilizando AD y en ambos modos, agitado y estático, ya que el ratio 1:3 había resultado ser el más favorable para la cáscara de naranja en previos experimentos, y además no se disponía de suficiente material fermentado para la realización de un gran número de extracciones. La recuperación de actividad fue en este caso de un  $53 \pm 12\%$  y un  $52 \pm 12\%$  para los modos agitados y estáticos, respectivamente, rendimientos bastante bajos en comparación con los obtenidos previamente, por lo que dependiendo del valor de mercado del producto podría considerarse realizar la extracción de la enzima.

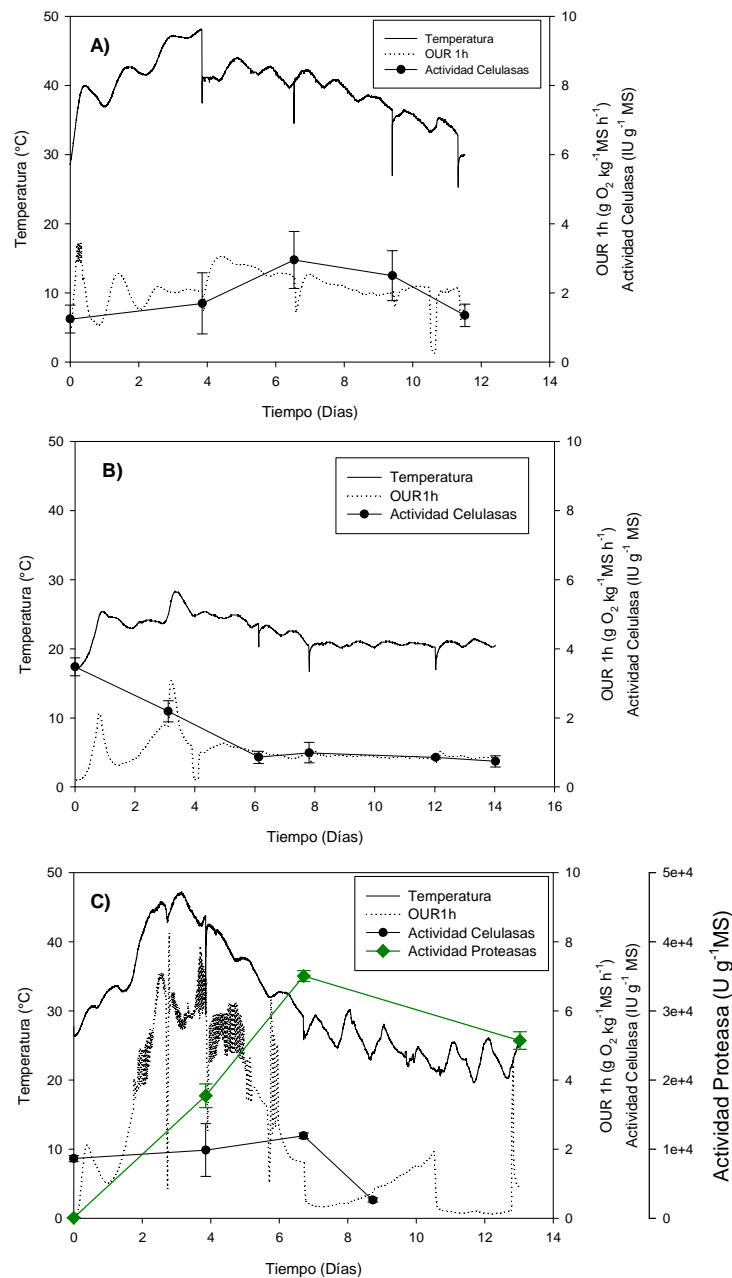


Figura 4.22 Perfiles de temperatura (línea continua), OUR1h (línea punteada), Actividad celulasas (puntos negros) y Actividad proteasas (puntos verdes) durante los procesos de estabilización de A) Cáscara de Naranja, B) Pomaza de Manzana y C) Fibra de arroz

Como puede verse, en el caso de la pomaza de manzana, no se observó producción alguna, sino que la actividad enzimática descendió a lo largo de la estabilización.

En cuanto a la fibra de arroz (6.3c), la producción de celulasas fue mínima, dándose su valor más elevado alrededor del día 7 de proceso. Por otra parte, se observó una elevada producción de proteasas, con un máximo también el día 7 de proceso y con valores de aproximadamente  $35000 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$ . En este caso, se evaluó el rendimiento de extracción de dicha enzima encontrándose una gran dependencia con el ratio de extracción, ya que la recuperación fue de un  $73 \pm 2\%$  a ratio 1:3 (g:mL) y de un  $29.9 \pm 0.3\%$  a ratio 1:1 (g:mL), ambos utilizando AD y en modo agitado. También se encontró dependencia con el modo de extracción, ya que la recuperación a ratio 1:3 (g:mL) utilizando AD pero en modo estático fue de  $61 \pm 6\%$ , lo cual muestra una diferencia significativa con el resultado en modo agitado.

La producción máxima de proteasas utilizando fibra de arroz, se encuentra en el mismo rango que los valores obtenidos en el apartado 4.1, siendo comparable a la fibra de soja como sustrato para su producción. No obstante, el rendimiento de recuperación de actividad en el caso de la fibra de arroz, requiere la aplicación de agitación y ratios de extracción elevado, lo que hará menos económica su extracción que para los dos residuos utilizados en el apartado 4.1.

#### **4.3.4 Conclusión**

La pomaza de manzana, la cáscara de naranja y la fibra de arroz presentan una actividad inicial de celulasas elevada, del mismo rango que la obtenida por Cerda et al. (2017a) y mucho más elevada que la observada en el apartado 4.2, la cual no incrementa durante el proceso de fermentación en estado sólido. Por lo tanto, la extracción de celulasas del residuo fresco es recomendable. Con el uso de AD y modo estático de extracción se obtiene una recuperación máxima de la enzima, en un ratio de extracción de 1:2 sólido:líquido para la pomaza de manzana, 1:1 para la fibra de arroz y 1:3 para la cáscara de naranja. Estas condiciones son favorables desde el punto de vista económico si se compara con el modo de extracción agitado o con el uso de BC como solvente, ya que no incrementan la recuperación de la actividad enzimática para estos residuos.

La estabilización aeróbica del sólido tras la extracción de enzimas es posible, obteniéndose una enmienda orgánica para el suelo. Por otro lado, en el caso de la cáscara de naranja, se observa una interferencia en la transferencia de oxígeno debido al incremento del



porcentaje de humedad durante la estabilización en reactor cerrado. De la digestión anaerobia de los tres residuos tras la extracción enzimática, se obtiene una producción de biogás elevada en comparación con los valores en la literatura.

Como consecuencia, la cáscara de naranja, la pomaza de manzana y la fibra de arroz pueden ser valorizadas con éxito a través de la recuperación de celulasas del material fresco, seguido por una digestión anaerobia del residuo remanente como estrategia cero residuo.

# *Capítulo 5*

---



## 5 Conclusiones

Las conclusiones generales extraídas de este trabajo son las siguientes.

- El porcentaje de recuperación de proteasas se encuentra más ligado a las características físicas iniciales del residuo que en el caso de las celulasas, como tamaño de partícula o solubilidad del material, haciéndose más dependiente de las condiciones de extracción.
- El agua resulta un buen agente extractor tanto para celulasas como para proteasas, no observándose en el caso de los residuos fermentados diferencias con TB y BC en el rendimiento de extracción, mientras que en el caso de la extracción de residuos frescos se observó incluso una influencia negativa.
- La aplicación de agitación solo presentó una influencia positiva en el caso de la recuperación de proteasas de la mezcla de pelo y lodo, en la cual consiguió aumentar la superficie de contacto sólido-líquido, por lo que si el material es fácilmente solubilizable, la agitación no aumentará la recuperación de actividad, tanto para celulasas como para proteasas.
- Se observó una mayor influencia del ratio de extracción en el caso de las proteasas que en la extracción de celulasas.
- En general, los óptimos de extracción se consiguen bajo condiciones favorables de cara a la implementación industrial del proceso: extractante agua, contacto estático y ratios sólido:líquido intermedio
- Tras la extracción fue necesaria una etapa de secado previa a la estabilización aerobia para la mezcla de pelo y lodo, la pomaza de manzana, y la fibra de arroz, mientras que la fibra de soja, la cascarilla de café y la cáscara de naranja presentaban una humedad adecuada tras un escurrido manual.
- El material sólido tras la extracción es, en todos los casos, estabilizable aeróbicamente y se obtuvo un producto final similar al compost que puede ser usado como enmienda del suelo.
- La producción de biogás utilizando materiales no fermentados tras la extracción de celulasas es claramente superior que la obtenida de materiales fermentados, haciendo que la digestión de estos últimos no sea recomendable fuera de la co-digestión con otros residuos debido a su bajo rendimiento.

- Las pruebas de conservación de actividad tras la liofilización muestran resultados positivos, en los que la pérdida inicial no supera el 20% en ningún caso y posteriormente, conservando el liofilizado a 4 °C, no se observan pérdidas significativas en los siguientes 6 meses.

---

## Referencias

- Abraham J, Gea T, Komilis D, Sánchez A (2017) Reproducibility of solid-state fermentation at bench-scale: the case of protease production. *Global Nest. J.* 19 (2): 183-190.
- Abraham J (2014) Production of proteases from industrial wastes through solid-state fermentation at different scales, potential applications. PhD Thesis, UAB, Barcelona.
- Abraham J, Gea T, Sánchez A (2014) Substitution of chemical dehairing by proteases from solid-state fermentation of hair wastes. *J. of Clean. Prod.* 74: 191-198.
- Abraham J, Gea T, Sánchez A (2013) Potential of the solid-state fermentation of soy fibre residues by native microbial populations for bench-scale alkaline protease production. *Biochem. Eng. J.* 74: 15-19.
- Abu Yazid N, Barrena R, Sánchez A (2016) Assessment of protease activity in hydrolysed extracts from SSF of hair waste by an indigenous consortium of microorganisms. *Waste Manage.* 49: 420-426.
- Adani F, Ubbiali P, Genevini P (2006) The determination of biological stability of composts using the Dynamic Respiration Index: the results of experience after two years. *Waste Manage.* 26: 41-48.
- Aikat K, Bhattacharyya BC (2000) Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. *Process Biochem.* 35: 907-914.
- Agència de Residus de Catalunya (2018) [http://residus.gencat.cat/en/ambits\\_dactuacio/recollida\\_selectiva/residus\\_municipals/materia\\_organica\\_form\\_-\\_fv/el\\_compost/caracteristiques\\_i\\_beneficis\\_de\\_lus\\_del\\_compost/](http://residus.gencat.cat/en/ambits_dactuacio/recollida_selectiva/residus_municipals/materia_organica_form_-_fv/el_compost/caracteristiques_i_beneficis_de_lus_del_compost/) Acceso 28/05/2018
- Agencia de Residus de Catalunya (2008) Guia de suport per al disseny i l'exploració de plantes de compostatge. [http://residus.gencat.cat/web/.content/home/lagencia/publicacions/residus\\_municipals/guiaplantescompost\\_cat.pdf](http://residus.gencat.cat/web/.content/home/lagencia/publicacions/residus_municipals/guiaplantescompost_cat.pdf) Acceso 10/05/2018.
- Albuquerque JA, McCartney D, Yu S, Brown L, Leonard JJ (2008) Air space in composting research: A literature review. *Compost Sci Util.* 16(3): 159-170.
- Alef K, Nannipieri P (1995) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, ed by Academic Press Limited, San Diego, USA, 312-315.
- Almeira N, Komilis D, Barrena R, Gea T, Sánchez A (2015) The importance of aeration mode and flowrate in the determination of the biological activity and stability of organic wastes by respiration indices. *Bioresource Technol.* 196: 256-262.

- American Gas Council (2008) What is anaerobic digestion. [https://www.americanbiogas.com/council.org/biogas\\_what.asp](https://www.americanbiogas.com/council.org/biogas_what.asp) Acceso 28/04/2018.
- Ammenberg J, Feiz R (2017) Assessment of feedstocks for biogas production, part ii: results for strategic decision making. *Resour Conserv Recy.* 122: 388–404.
- Anchordoquy TJ, Izutsu KI, Randolph TW, Carpenter JF (2001) Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying. *Arch. Biochem. Biophys.* 390(1): 35-41.
- André L, Pauss A, Ribeiro T (2018) Solid anaerobic digestion: State-of-art, scientific and technological hurdles. *Bioresource Technol.* 247: 1027-1037.
- Annan JS, White RK (1999) Evaluation of techniques for measuring air filled porosity in compost of municipal biosolid and wood chips, ed by AWARE environmental. Inc. North Carolina.
- Bansal N, Tewari R, Soni R, Soni SK (2012) Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Manage.* 32 (7): 1341-1346.
- Barrena R, Gea T, Ponsá S, Ruggieri L, Artola A, Font X, Sánchez A (2011) Categorizing Raw Organic Material Biodegradability Via Respiration Activity Measurement: A Review. *Compost Sci. Util.* 19 (2): 105-113.
- Barrena R, d'Imporzano G, Ponsá S, Gea T, Artola A, Vázquez F, Sánchez A, Adani F (2009) In search of a reliable technique for the determination of the biological stability of the organic matter in the mechanical-biological treated waste. *J. Hazard. Mater.* 162: 1065-1072.
- Barrena R, Pagans EL, Vázquez F, Artola A, Sánchez A (2007) Full-Scale Co-composting of Hair Wastes from the Leather Manufacturing Industry and Sewage Sludge. *Compost Sci. Util.* 15:16.
- Bender JP, Mazutti MA, Di Luccio M, Treichel H (2008) Extraction of inulinase obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Appl. Biochem. Biotech.* 149 (3): 195-203.
- Bera MB, Panesar PS, Panesar R, Singh B (2008) Application of reverse micelle extraction process for amylase recovery using response surface methodology. *Bioproc Biosyst Eng.* 31(4): 379–84.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) *Biochemistry*. 5<sup>th</sup> edition. New York WH Freeman, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22410/> Acceso 02/05/2018

- Biogas World, State-of-the-art dry and wet anaerobic digestion systems for solid waste. (2018) <https://www.biogasworld.com/news/dry-wet-anaerobic-digestion-systems/> Acceso 28/04/2018.
- Borole AP, Davison BH (2008) Improving Activity of Salt-Lyophilized Enzymes in Organic Media. *Appl. Biochem. Biotech.* 146: 215-222.
- Bradley C, Kearns R (2007) US20090117634A1-Process of Producing Ethanol Using Cellulose with Enzymes Generated Through Solid State Culture.
- CN101818136A. (2010) Method for producing cellulase by solid fermentation (Patente). <https://patents.google.com/patent/CN101818136A/en>. Acceso 29/05/2018
- CN107189996A. (2017) Method used for producing acidic cellulase via solid fermentation of forestry and agricultural residues with *inonotus obliquus*. <https://patents.google.com/patent/CN107189996A/en>. Acceso 29/05/2018
- Capolongo A, Barresi AA, Rovero G (2002) Freeze-drying of lignin peroxidase: influence of lyoprotectants on enzyme activity and stability. *J. Chem. Technol. Biot.* 78: 56-63.
- Cerda A, Gea T, Vargas-García MC, Sánchez A (2017a) Towards a competitive solid state fermentation: Cellulase production from coffee husk by sequential batch operation and role of microbial diversity. *Sci. Total Environ.* 589: 56-65
- Cerda A, Mejías L, Gea T, Sánchez A (2017b) Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. *Bioresource Technol.* 243: 1059-1068.
- Chandra MS, Viswanath B, Reddy BR (2010) Optimization of extraction of  $\beta$ -endoglucanase from the fermented bran of *Aspergillus niger*. *Indian J. Microbiol.* 50 (11): 122-126.
- Chandra MS, Reddy BR, Choi YL (2008) Optimization of extraction of Fpase from the fermented bran of *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *J. Appl. Chem* 51 (4): 155-159.
- Chatterjee J, Giri S, Maity S, Sinha A, Ranjan A, Rajsherkhar, Gupta S (2015) Production and characterization of thermostable alkaline protease of *Bacillus subtilis* (ATCC6633) from optimized solid-state fermentation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 62 (5): 709-718.
- Chen HZ, He Q (2012) Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. *J. Chem. Technol. Biot.* 87: 1619–1625.
- Chintagunta AD, Jacob S, Banerjee R (2016) Integrated bioethanol and biomanure production from potato waste. *Waste Manage.* 49: 320–325.



- Das Mercês Penha E, Nunes Viana L, Fortes Gottschalk LM, Costa Terzi S, Fraga de Souza E, Cordeiro de Freitas S, Oliveira Santos J, Chan Salum TF (2016) Agro-industrial residues utilization of palm oil for lipase production by *Aspergillus niger*. *Cienc. Rural*, Santa Maria, 46 (4): 755-761
- De Jesus SS, Maciel Filho R (2014) Drying of  $\alpha$ -amylase by spray drying and freeze-drying: A comparative study. *Braz. J. of Chem. Eng.* 31 (3): 625-631.
- De Sousa CAB, da Silva FLH, Conrado LS (2012) Leaching of polygalacturonases produced by solid state fermentation of peel and albedo of passion fruit. *Rev. Bras. Eng. Agr. Amb.* 16 (7): 790-794.
- Díaz AB, Caro I, de Ory I, Blandino A (2007) Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme Microb. Tech.* 41: 302-306.
- El-Tayeb TS, Abdelhafez AA, Ali SH, Ramadan EM (2012) Effect of acid hydrolysis and fungal biotreatment on agro-industrial wastes for obtainment of free sugars for bioethanol production. *Braz J Microbiol.* 43(4): 1523-1535.
- Epsen E (2011) *Industrial composting, Environmental engineering and facilities management.* Taylor and Francis Group, LLC. Boca Raton.
- Esakkiraj P, Sankaralingam S, Usha R, Palavesam A, Immanuel G (2011) Solid-state protease production using anchovy waste meal by moderate halophile *Serratia proteamaculans AP-CMST* isolated from fish intestine. *Ann. Microbiol.* 61: 749-755.
- Eurostat Statistics Explained (2014) [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Waste\\_statistics/es#Generaci.C3.B3n\\_de\\_residuos.2C\\_excluyend\\_o\\_los\\_grandes\\_residuos\\_minerales](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Waste_statistics/es#Generaci.C3.B3n_de_residuos.2C_excluyend_o_los_grandes_residuos_minerales).
- Finkler ATJ, Bizb A, Pitol LO, Medina BS, Luithardt H, de Lima Luz Jr. LF, Kriegerd N, Mitchell DA (2017) Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 121: 1–12.
- Flotats X, Bonmatí, A, Fernández B, Magrí A (2009) Manure treatment technologies: On-farm versus centralized strategies. NE Spain as case study. *Bioresource Technol.* 100: 5519–5526.
- Franca AS, Oliveira LS (2009) Coffee processing solid wastes: Current uses and future perspectives. In: *Agricultural Wastes.* ISBN 978-1-60741-305-9, Editor: Geoffrey S. Ashworth and Pablo Azevedo.

- Freitas AC, Castro RJS, Fontenele MA, Egito AS, Farinas CS,. Pinto GAS (2013) Canola Cake as a Potential Substrate for Proteolytic Enzymes Production by a Selected Strain of *Aspergillus oryzae*: Selection of Process Conditions and Product Characterization, ISRN Microbi. 2013: 8.
- Gaidhani KA, Harwalkar M, Bhambere D, Nirgude PS (2015) Lyophilization/Freeze drying- A review. J Pharm Res Int. 4 (8): 516-543.
- Gea T, Barrena R, Artola A, Sánchez A (2007) Optimal bulking agent particle size and usage for heat retention and disinfection in domestic wastewater sludge composting. Waste Manage. 27: 1108-1116.
- German Federal Ministry for the Environment (2001) Nature Conservation and Nuclear Safety, Ordinance on environmentally compatible storage of waste from human settlements and on biological waste treatment facilities of 20 February 2001. URL:<http://www.bmu.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/ablagerungsverordnung.pdf> Accessed 05/05/2018.
- Godley A, Muller W, Frederickson J, Barker H (2005) Comparison of the SRI and DR<sub>4</sub> biodegradation test methods for assessing the biodegradability of untreated and MBT treated municipal solid waste. In: Kühle-Weidemeier, M. (Ed.), International Symposium MBT 2005/Internationale Tagung MBA 2005. Cuvillier-Verlag, Germany, 2005: 548–559.
- González Díaz JM, Medina MA (2014) Diseño y evaluación del compostaje como alternativa para el tratamiento de residuos de aditivos en la construcción. Producción Limpia 9 (1): 44-62.
- Gopalan N., Nampoothiri KM (2016) Biotechnological production of enzymes using agro-industrial wastes: Economic considerations, commercialization potential, and future prospects. Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production. CSIR-National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (NIIST), Trivandrum, India.
- Ghose TK (1987) Measurement of Cellulase Activities, Pure Applied Chemistry 59 (2): 257–268.
- Hartman GL, West ED, Herman TK (2011) Crops that feed the world 2. Soybean-Worldwide production, use, and constraints caused by pathogen and pests. Food Secur. 3:5–17
- Heck JX, Hertz PF, Ayub MAZ (2005) Extraction optimization of xylanases obtained by solid-state cultivation of *Bacillus circulans* BL53. Process Biochem. 40: 2891-2895.

- Hédoux A, Paccou L, Achir S, Guinet Y (2012) In situ monitoring of proteins during lyophilization using micro-Raman spectroscopy: a description of structural changes induced by dehydration. *J Pharm Sci.* 101(7): 2316–26.
- Hu H, Fan T, Zhao X, Zhang X, Sun Y, Liu H (2017) Influence of pH and salt concentration on functional properties of walnut protein from different extraction methods. *J Food Sci Technol* 54(9):2833–2841.
- Ikasari L, Mitchell DA (1996) Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Tech.* 19: 171-175.
- Imamura K, Murai K, Korehisa T, Shimizu N, Yamahira R, Matsuura T, Tada H, Imanaka H, Ishida N, Nakanishi K (2014) Characteristics of Sugar Surfactants in Stabilizing Proteins During Freeze-Thawing and Freeze-Drying. *J. Pharm. Sci.* 103: 1628-1637.
- Jimenez-Penalver P, Gea T, Sanchez A, Font X (2016) Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: optimization, monitoring and effect of mixing. *Biochem Eng J.* 115: 93–100.
- Juntunen K, Valtakari L, Mäkinen S, Kallio J, Vehmaanperä J, Ojapalo P, Paloheimo M (2009) WO2010125174A1-A novel fungal protease and use thereof. Patente. <https://patents.google.com/patent/WO2010125174A1/en?q=WO2010125174A1>. Acceso 29/05/2018.
- Kafle GK, Kim SH (2013) Effects of chemical composition and ensiling on the biogas productivity and degradation rates of agricultural and food processing by-products. *Bioresource Technol.* 142: 553-561.
- Kandasamy S, Muthusamy G, Balakrishnan S, Duraisamy S, Thangasamy S, Seralathan KK, Chinnappan S (2016) Optimization of protease production from surface-modified coffee pulp waste and corncobs using *Bacillus sp.* By SSF. *3 Biotech.* 6 (2):167.
- Kashi S, Satari B, Lundin M, Horváth IS, Othman M (2017) Application of a mixture design to identify the effects of substrates ratios and interactions on anaerobic co-digestion of municipal sludge, grease trap waste, and meat processing waste. *J. Environ. Chem. Eng.* 5: 6156–6164.
- Khalid EK, Babiker EE, El Tinay AH (2003) Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Food Chem.* 82: 361-366.
- Kim NA, Thapa R, Jeong SH (2018) Preferential exclusion mechanism by carbohydrates on protein stabilization using thermodynamic evaluation. *Int. J. Biol. Macromol.* 109: 311-322.

- Kim E, Lee DH, Won S, Ahn H (2016) Evaluation of optimum moisture content for composting of beef manure and bedding material mixtures using oxygen uptake measurement. *Asian Austral J Anim.* 29(5): 753–58.
- Kishore D, Kundu S, Kayastha AM (2012) Thermal, chemical and pH induced denaturation of a multimeric  $\beta$ -Galactosidase reveals multiple unfolding pathways. *PLOS ONE* 7(11): e50380.
- Komilis D, Barrena R, Lora Grando R, Vogiatzi V, Sánchez A, Font X (2017) A state of the art literatura review on anaerobic digestion of food waste: influential operating parameters on methane yield. *Revision of Environmental Science and Biotechnology* 16: 347-360.
- Komilis D, Kanellos D (2012) A modified dynamic respiration test to assess compost stability: Effect of sample size and air flowrate. *Bioresource Technol.* 117: 300-309.
- Krishna C (2005) Solid-State Fermentation Systems: An Overview. *Crit Rev Biotechnol.* 25(1–2): 1–30.
- Kupryś-Caruk M, Kołodziejski R, (2014) Evaluation of ensilaged apple pomace usefulness for biogas production. *Adv. Sci. Tech. in Agri-Food Industry.* 69 (1): 5-13.
- Lah TNT, Norulaini NARN, Shahadat M, Nagao H, Hossain MS, Omar AKM (2016) Utilization of industrial waste for the production of cellulase by the cultivation of *Trichoderma* via solid state fermentation. *Environ. Processes* 3: 803-814.
- Lee LW, Tay GY, Cheong MW, Curran P, Yu B, Liu SQ (2017) Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia Lipolytica* : II. Roasted coffee. *Lebensm-Wiss Technol.* 80: 32–42.
- Li Q, Marek P, Iverson BL (2013) Commercial proteases: present and future. *FEBS Lett.* 587: 1155-1163.
- Long Z, Kong X, Zhang C, Hua Y (2010) Stability of hydroperoxide lyase activity from *Amaranthus tricolor* (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves: Influence of selected additives. *J. Sci. Food Agric.* 90: 729-734.
- Lorenzo Acosta Y, Obaya Abreu MC (2005) LA digestión anaerobia. Aspectos téóricos. Parte I. Sobre los derivados de la caña de Azúcar, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar XXXIX, 1: 35-48. Ciudad de la Habana, Cuba.
- Mala JGS, Edwinoliver NG, Kamini NR, Puvanakrishnan R (2007) Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53: 247-253.

- Mancini G, Papirio S, Lens PNL, Esposito G (2016) Effect of N-methylmorpholine- N-oxide pretreatment on biogas production from rice straw, cocoa shell, and hazelnut skin. *Environ Eng Sci.* 33(11): 843–50.
- Mazotto AM, Couri S, Damaso MCT, Vermelho AB (2013) Degradation of feather waste by *Aspergillus niger keratinases*: Comparison of submerged and solid-state fermentation. *Int. Biodeter. Biodegr.* 85: 189-195.
- Mejías L, Komilis D, Gea T, Sánchez A (2017) The effect of airflow rates and aeration mode on the respiration activity of four organic wastes: Implications on the composting process. *Waste Manage.* 65: 22-28.
- Mendes FB, Ibraim D, Atala P, Thoméo JC (2017) Is cellulase production by solid-state fermentation economically attractive for the second generation ethanol production?. *Renew. Energ.* 114: 525-533.
- Mensink MA, Frijlink HW, Van der Voort Maarschalk K, Hinrichs WLJ (2017) How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 114: 288–295.
- Merlino G, Rizzi A, Villa F, Sorlini C, Brambilla M, Navarotto P, Bertazzoni B, Zagni M, Araldi F, Daffonchio D (2012) Shifts of microbial community structure during anaerobic digestion of agro-industrial energetic crops and food industry byproducts. *J. Chem. Technol. Biot.* 87: 1302–1311.
- Mitchell DA, Krieger N, Berovic M (2006) *Solid-State Fermentation Bioreactors. Fundamentals of Design and Operation.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Mitchell DA, Von Meien OF, Krieger N, Dalsenter FDH (2004) A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J* 17: 15–26.
- Moraes CAM, Fernandes IJ, Calheiro D, Kieling AG, Brehm FA, Rigon MR (2014) Berwanger Filho J.A., Schneider I.A.H., Osorio E. Review of the rice production cycle: Byproducts and the main applications focusing on rice husk combustion and ash recycling. *Waste Manage. Res.* 32(11): 1034-1048.
- Mrudula S, Murugammal R (2011) Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Braz. J. Microbiol.* 42: 1119-11.

- Nabarlantz D, Stuber F, Font J, Fortuny A, Fabregat A, Bengoa C (2012) Extraction and purification of hydrolytic enzymes from activated sludge. *Resour. Conserv. Recy.* 59: 9-13.
- Ncube T, Howard RL, Abotsi EK, Jansen EL, Rensburg JV, Ncube I (2012) *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. *Ind. Crop Prod.* 37: 118-123.
- Ndamitso MM, Abulude FO (2014) Effect of Different Salt concentration on Protein Solubility of mushroom varieties obtained in Akure, Nigeria. *Am. J. Food and Nutr.* 2 (1): 7-10.
- Novotný O, Cejpek K, Velíšek J (2008) Formation of carboxylic acids during degradation of monosaccharides. *Czech J. Food Sci.* 26(2): 117-131.
- Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) (2011). El estado de los recursos de tierras y aguas del mundo para la alimentación y la agricultura, como gestionar los sistemas en peligro <http://www.fao.org/docrep/015/i1688s/i1688s00.pdf> Acceso 24-04-2018.
- Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) (2016) <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Acceso 24-04-2018.
- Passot S, Trelea IC, Marin M, Galan M, Morris GJ, Fonseca F (2009) Effect of controlled ice nucleation on primary drying stage and protein recovery in vials cooled in a modified freeze-dryer. *J Biomech Eng.* 131(7): 74511.
- Pathak P, Kant Bhardwaj N, Singh AK (2014) Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172: 3776–3797.
- Pelegrine DHG, Gasparetto CA (2004) Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT-Food Sci. Technol.* 38: 77-88.
- Pirota RDPB, Miotto LS, Delabona PS, Farinas CS (2013) Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. *Braz. J. Chem. Eng.* 30(1): 117-123.
- Pikal-Cleland KA, Carpenter JF (2001) Lyophilization-induced protein denaturation in phosphate buffer systems: Monomeric and tetrameric beta-galactosidase. *J. Pharm. Sci.* 90: 1255-1268.
- Pognani M, Barrena R, Font X, Adani F, Scaglia B, Sánchez A (2011) Evolution of organic matter in a full-scale composting plant for the treatment of sewage sludge and

- biowaste by respiration techniques and pyrolysis-GC/MS. *Bioresource Technol.* 102: 4536-4543.
- Ponsá S, Gea T, Sánchez A (2011) Short-time estimation of biogas and methane potential from samples of municipal solid wastes. *J. Chem. Technol. Biot.* 86: 1121-1124.
- Ponsá S (2010a) Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. Application to full scale waste treatment plants. PhD Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra.
- Ponsá S, Gea T, Sánchez A. (2010b) Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. *J. Environ. Quality.* 39: 706-712.
- Ponsá S, Gea T, Alerm LI, Cerezo J, Sánchez A (2008) Comparison of aerobic and anaerobic stability indices through a MSW biological treatment process. *Waste Manage.* 28: 2735-2742.
- Prajapati BP, Suryawanshi RK, Agrawal S, Ghosh M, Kango N (2018) Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues. *Bioresource Technol.* 250: 733-740.
- Puyuelo B, Ponsá S, Gea T, Sánchez A (2011) Determining C/N ratios for typical organic wastes using biodegradable fractions. *Chemosphere.* 85: 653-659.
- Puyuelo B, Gea T, Sánchez A (2010) A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate. *Chem. Eng. J.* 165: 161-169.
- Rabbani G, Choi I (2018) Roles of osmolytes in protein folding and aggregation in cells and their biotechnological applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 109: 483-491.
- Rezaei F, Joh LD, Kashima H, Reddy AP, VanderGheynst JS (2011) Selection of conditions for cellulase and xylanase extraction from switchgrass colonized by *acidothermus cellulolyticus*. *Appl Biochem Biotech.* 164(6): 793–803.
- Rezende MI, Barbosa AD, Vasconcelos AFD, Endo AS (2002) Xylanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Braz. J. Microbiol.* 33: 67-72.
- Richard TL, Hamelers HVM, Veeken A, Silva T (2002) Moisture relationships in composting processes. *Compost Sci Util.* 10(4): 286–302.
- Román P, Martínez MM, Pantoja A (2013) Manual de compostaje del agricultor, experiencias en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) <http://www.fao.org/3/a-i3388s.pdf> Acceso 28/05/2018

- Ruggieri L, Gea T, Artola A, Sanchez A (2009a) Air filled porosity measurements by air pycnometry in the composting process: A review and a correlation analysis. *Bioresource Technol.* 100(10): 2655–66.
- Ruggieri L, Gea T, Artola A, Sánchez A. (2009b) Factors affecting air pycnometer performance for its use in the composting process. *Compost Science Utilization.* 17(4): 266-275.
- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing* 5:1.
- Sato MF, Vieira RG, Zardo DM, Falcao LD, Nogueira A, Wosiacki G (2010) Apple pomace from eleven cultivars: an approach to identify sources of bioactive compounds. *Acta Sci-Agron.* 32(1): 29-35.
- Shah AR, Madamwar D (2005) Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World J. Microb. Biot.* 21(3): 233-243.
- Singh AD, Abdullah N, Vikineswary S (2003) Optimization of extraction of bulk enzymes from spent mushroom compost. *J. Chem. Technol. Biot.* 78: 743–752.
- Singh SA, Ramakrishna M, Appu Rao AG (1999) Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochem.* 35(3–4): 411–17.
- Singhania RR, Patel AK, Pandey A (2010) The industrial production of enzymes. *Industrial Biotechnology. Sustainable growth and economic success.* Edited by Wim Soetaert and Erick J. Vandamme. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Shalini R, Gupta D (2010) Utilization of pomace from apple processing industries: a review. *J. Food Sci. Tech.* 47(4): 365-371.
- Shata HMA (2013) Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *aspergillus oryzae*. *Pol. J. Microbiol.* 54(3): 241–47.
- Soto-Paz J, Oviedo-Ocaña R, Torres-Lozada P, Marmolejo-Rebellón LF, Manyoma-Velásquez PC (2017) Composting of biowaste: Research trends and relevance in developing countries. *DYNA.* DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/dyna.v84n203.61549>.
- The U.S. Department of Agriculture and the U.S. Composting Council (2001) *Test Methods for the Examination of Composting and Compost*, Edaphos International, Houston.
- Thomas L, Larroche C, Pandey A (2013) Current development in solid-state fermentation. *Chem. Eng. J.* 81: 146-161.



- Torrado AM, Cortés S, Salgado JM, Max B, Rodríguez N, Bibbins BP, Converti A, Domínguez JM (2011) Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. *Braz J Microbiol.* 42(1): 94-409.
- Tunga R, Banerjee R, Bhattacharya BC (1999) Some studies on optimization of extraction process for protease production in SSF. *Bioprocess Eng.* 20: 485-489.
- United State Department of Agriculture (USDA) (2018) Citrus: World market and trade <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acceso 24/04/2018
- Varnero MT, Romero H (2018) Manual de biogás Proyecto CHI/00/G32 “Chile: Remoción de Barreras para la Electrificación Rural con Energías Renovables” <http://www.fao.org/docrep/019/as400s/as400s.pdf> Acceso 28/04/2018
- Van Soest P, Robertson J, Lewis B (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition, *J. of Dairy Sci.* 74 (10): 3583-3597.
- Wikandari R, Nguyen H, Millati R, Niklasson C, Taherzadeh MJ, Horváth IS (2015) Improvement of Biogas Production from Orange Peel Waste by Leaching of Limonene. *Biomed. Res. Int.* 2015: 6.
- Volken de Souza CF, Rodrigues RC, Heck JX, Ayub MAZ (2008) Optimization of transglutaminase extraction produced by *Bacillus circulans* BL32 on solid-state cultivation. *J. Chem. Technol. Biot.* 83: 1306–1313.
- Vuong HTH, Tran NM, Tran TTT, Ton NMN, Le VVM (2016) Effects of pH and salt concentration on functional properties of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) seed albumin concentrate. *Int J Food Sci Technol* 51(5):1212–1219.
- Yoon LW, Ang TN, Ngho GC, Chua ASM (2014) Fungal Solid-State Fermentation and Various Methods of Enhancement in Cellulase Production. *Biomass Bioenerg.* 67: 319–38.
- Zema DA, Fòlino A, Zappia G, Calabrò PS, Tamburino V, Zimbone SM (2018) Anaerobic digestion of orange peel in a semi-continuous pilot plant: An environmentally sound way of citrus waste management in agro-ecosystems. *Sci. Total Environ.* 630: 401-408.
- Zhang XZ, Percival Zhang YH (2013) Cellulases: Characteristics, sources, production, and applications. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers.* John Wiley & Sons.

Zhenhong Y, Yunyun L, Yu Z, Jingliang X, Minchao H, Xinshu Z (2015) CN103343156 (B)  
- Method and device for producing fuel ethanol by solid state fermentation of fiber raw materials.



## Lista de abreviaturas

Abreviaturas	Definición	Unidades
AD	Agua Destilada	
AT <sub>4</sub>	Consumo de oxígeno acumulado (4 días de máximo consumo)	g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS
BC	Buffer Citrato 0.05 M pH 4.8	
BMP <sub>n</sub>	Potencial de metano biológico	NL kg MS <sup>-1</sup>
CH <sub>4</sub>	Metano	mL g <sup>-1</sup> SV
COB <sub>AE</sub>	Carbono Orgánico Biodegradable aerobiamente	% g/g base seca
COB <sub>AN</sub>	Carbono Orgánico Biodegradable anaerobiamente	% g/g base seca
COT	Carbono orgánico total	% g/g base seca
DBO <sub>4</sub>	Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>
E	Modo de extracción	
FAS	Free air space (Espacio de aire libre)	% v/v
ES	Fermentación en estado sólido	
GB <sub>n</sub>	Producción de biogás	NL kg MS <sup>-1</sup>
IRD <sub>24h</sub>	Índice respirométrico dinámico (promedio 24 h de máximo consumo)	g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup>
L	Tipo de extractante	
MO	Materia orgánica	% g/g (base seca)
MS	Masa seca	g absolutos ó % g/g (base húmeda)
RA	Ratio de extracción	
sOUR	Specific Oxygen Uptaken rate (Velocidad específica de consumo de oxígeno)	g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup>
SV	Sólidos volátiles	% g/g base seca ó g absolutos
TB	HCl-Tris Buffer 0.05 M, pH 8.1 (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol)	



## Artículos



# Production of proteases from organic wastes by solid-state fermentation: downstream and zero waste strategies

Maria Marín<sup>1</sup> · Adriana Artola<sup>1</sup> · Antoni Sánchez<sup>1</sup>

Received: 22 November 2017 / Accepted: 22 March 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Production of enzymes through solid-state fermentation (SSF) of agro-industrial wastes reports high productivity with low investment. The extraction of the final product from the solid waste and solid disposal represent the main cost of the process. In this work, the complete downstream processes of SSF of two industrial residues for the production of proteases, soy fibre (SF) and a mixture of hair and sludge (HS), were studied in terms of activity recovery, using different extraction parameters (extracting solvent, ratio solid: solvent and extraction mode). Activity after lyophilisation was tested. Solid waste valorisation after extraction was studied using respiration techniques and biogas production tests, as part of a zero waste strategy. Results showed a maximum extraction yield of 91% for SF and 121% for HS, both in agitated mode and distilled water as extraction agent. An average activity recovery of  $95 \pm 6$  and  $94 \pm 6\%$  for SF and HS, respectively, was obtained after lyophilisation and redissolution. To reduce the cost of extraction, a ratio 1:3 *w:v* solid–solvent in static mode is advised for SF, and 1:2 *w:v* extraction ratio in agitated mode for HS, both with distilled water as extracting agent. Both composting and anaerobic digestion are suitable techniques for valorisation of the waste material.

**Keywords** Downstream · Extraction · Protease · Organic wastes · Solid-state fermentation · Zero waste

## Introduction

The use of enzymes in industrial processes is growing every day. They are used, for example, in detergent manufacturing, bioethanol production and food and beverage processing. Their use versus traditional chemical processes allows reducing manufacturing costs and waste generation, also avoiding the need of harsh operational conditions, such as high pressure or temperature (Singh et al. 2016).

Two main processes are used to produce enzymes, solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation. In the recent years, the use of SSF has become outstanding due to its higher yield and the requirement of simpler and smaller equipment (Kriaa and Kammoun 2016). As substrates, literature provides a wide range of residues, the most popular being agro-industrial residues, like the coffee pulp waste

used by Kandasamy et al. (2016) to produce protease. These residues are adequate as a substrate due to their low cost and availability. Besides, several microorganisms have been reported to produce all types of enzymes when inoculated in sterile conditions on an adequate substrate (Riyadi et al. 2017; Lizardi-Jiménez and Hernández-Martínez 2017). In fact, the main part of the studies carried out in solid-state and submerged fermentation are focused on the improvement of the production yield by optimizing fermentation parameters such as temperature, particle size, moisture or selecting the right strain (Sun et al. 2011; Karpe et al. 2015).

However, several issues regarding operational conditions still need to be solved to ensure a successful scale-up of the SSF processes, like overheating problems (Finkler et al. 2017), or optimization of aeration and agitation modes (Gassara et al. 2013). Also, since most of the optimal working temperatures of SSF microorganisms are around 30 °C, questions like moisture and temperature are critical in the scale-up of SSF processes. Despite the good yields obtained, SSF is mainly being developed at lab scale (El-Bakry et al. 2015).

Apart from all the technical issues mentioned above, the assessment of the performance of the entire process at

✉ Adriana Artola  
adriana.artola@uab.cat

<sup>1</sup> Composting Research Group, Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental, Escola d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Q, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

industrial scale is crucial to determine its profitability. Activity losses can occur during extraction due to a low contact area between solid and solvent (Zhang and Sang 2015), and thus there is inefficient mass transfer, or due to stability of the enzyme, which is mainly affected by pH and temperature (Silva et al. 2014). Storage of the crude extract can also lead to activity losses through time or during purification (Negi et al. 2011) or lyophilisation stage (Mensink et al. 2017). Also, the disposal of solid biodegradable residues generated after extraction should be studied. These residues still contain a considerable amount of biodegradable matter, a resource that can be used to obtain biogas or organic amendments. Despite the relevance of having a better understanding of downstream and global performance of SSF processes, to our knowledge, no complete study at pilot scale has been published.

Some data obtained at lab scale are provided by Rashid et al. (2013), where mannose extraction from 0.9 kg of palm kernel cake was studied, finding that soaking time, nature of solvent, physical state, solid to solvent ratio and number of washes have great influence on enzyme recovery. Chaithanya et al. (2012) also extracted protease from fermented bran, finding that the optimum leaching conditions were using glycerol and tap water as solvent, contact time 60 min and agitation at 100 rpm. Both authors obtained the highest recovery yield when agitation was applied and the solvent was a mixture of water and glycerol. A solid–solvent ratio of 1:5 (*w:v*) was also determined as optimal in both cases. The most influential parameter was the ratio of solid–solvent, which produced the highest difference within the maximum and the minimum activity recovery in the extraction of protease.

In previous works by Abraham et al. (2013) and Abu Yazid et al. (2016a), the listed problems of SSF processes at pilot scale were overcome by developing and describing robust SSF processes at pilot scale. The operational strategy was based on allowing the native consortia of microorganisms present in the residue to develop, so inoculation and sterilization would not be necessary. Protease activity obtained in those works was remarkably higher than those previously reported and with simpler operational conditions.

Therefore, the aim of this work is to provide a complete picture of the downstream process of two SSF processes for protease production at pilot scale, including activity recovery from enzyme extraction, lyophilisation of the crude extract and activity conservation after dissolving the lyophilised enzyme. Downstream processes for two different wastes, soy fibre waste and cow hair, were studied. Influence of extraction parameters (*w:v* ratio, type of solvent and presence/absence of agitation) was studied to determine the activity recovery obtained with each strategy. Operational conditions were selected considering their suitability for industrial scale. Regarding the management of the substrate

after extraction, its potential as feedstock for biogas production was assessed, along with the possible transformation of the solid into an agricultural organic amendment according to its stability for soil application in a zero waste strategy.

## Materials and methods

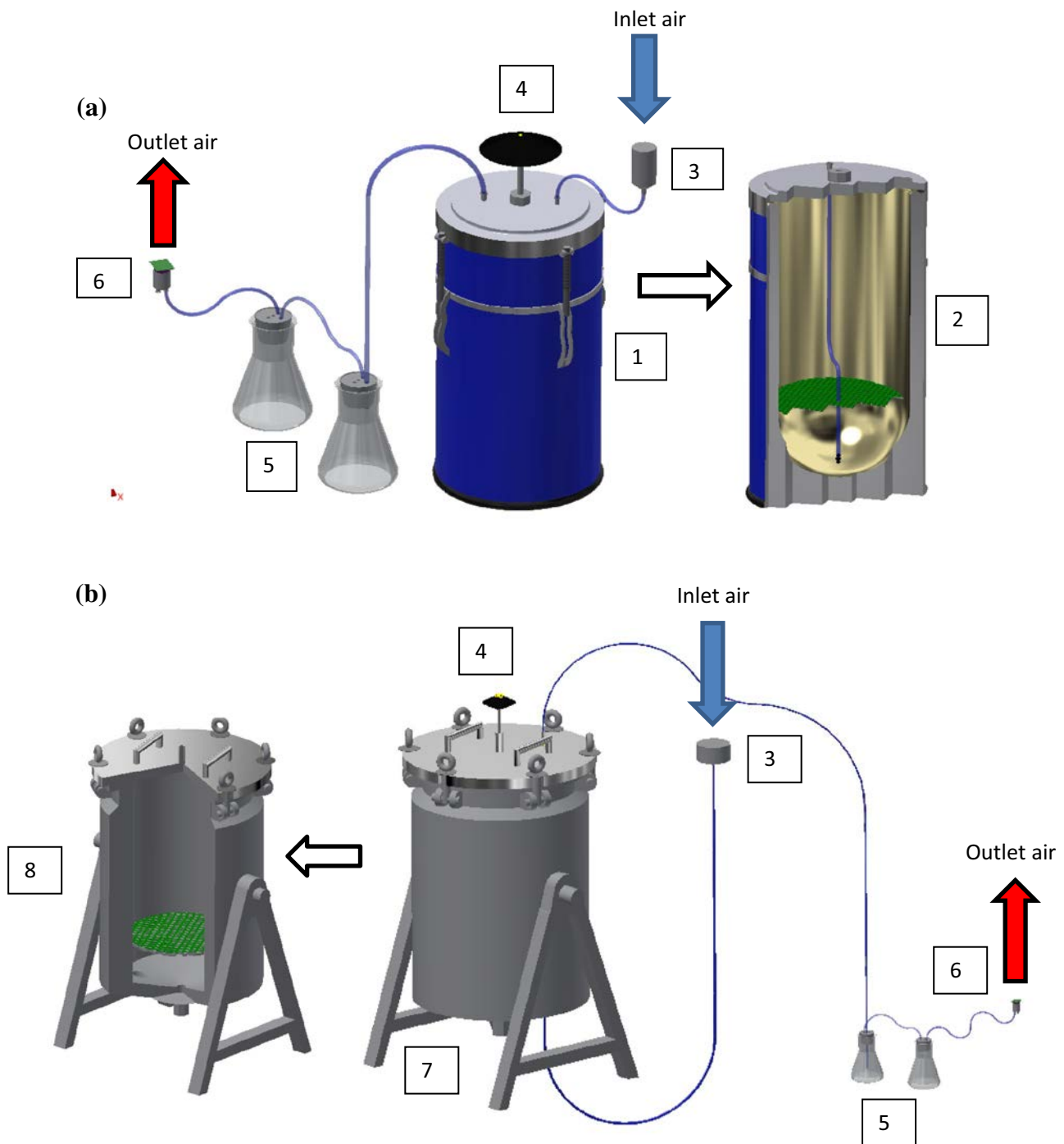
### Raw material

Two wastes were assessed for the extraction of protease after SSF, soy fibre (SF), from a soy beverage manufacturing plant in Castellterçol (Barcelona, Spain), and cow hair, from a local tannery industry located at Igualada (Barcelona, Spain). Cow hair was mixed with dehydrated sludge from the WWTP (wastewater treatment plant) of Igualada (Barcelona, Spain) as inoculum for the SSF process in a ratio 1:2 of hair: sludge (*w:w*) (HS), and moisture was adjusted to 65%. Neither inoculation nor moisture adjustment was needed for SF, as the residue possesses a native population of microorganisms and adequate water content. In both cases, wood chips from a composting plant in Manresa (Barcelona) were used as bulking agent in ratio 1:1 (*v:v*). SF average particle size is between 800 and 0.074  $\mu\text{m}$ , while cow hair particle size is about 1 cm long. 79% in weigh of bulking agent particle size is between 16 and 3.15 mm, Soy fibre was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  before the experiments, while fresh sludge and hair were stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  due to the structural changes that freezes produces in fresh sludge. The suitability of these industrial residues as raw materials for protease production through SSF has been described by Abraham et al. (2013, 2017) and Abu Yazid et al. (2016a), where details of the process and proteases production range are thoroughly provided.

### SSF materials and experimental set-up

Solid-state fermentation was carried out in 10 and 50 L (working volume) adiabatic reactors, to minimize environment influence, as described in detail in previous works (Fig. 1) (Maulini-Duran et al. 2014; Puyuelo et al. 2010). Reactors consist in a Dewar-glass with an outside metallic coverage and an adjusted cap to close the container hermetically. The inward part of the cap is covered with isolating material. In the bottom of the glass, a double plastic net was placed to provide support to the fermentable waste, create a space for lixivates and distribute evenly the inlet air flow. The cap of the reactor has three connections: one of them for a temperature probe, another one for inlet air and the third one for exhaust gases outlet. Inside the reactor, a plastic pipe conducts the inlet air to the bottom of the reactor, below the plastic net. The oxygen content of exhausted gases was measured by an electrochemical oxygen sensor and data were collected





**Fig. 1** **a** 4.5 and 10 L reactors, **b** 50 L reactor. 1: 4.5 and 10 L reactor; 2: 4.5 and 10 L reactor inside; 3: mass of flowmeter; 4: temperature probe; 5: water trap; 6: O<sub>2</sub> electrochemical sensor. 7: 50 L reactor; 8: 50 L reactor inside

using a personal computer. Data analysis was carried on by non-commercial software called Sensor. Temperature and air flow were also measured. A control system for air flow based in oxygen content in the outlet gases was used, establishing an upper and lower set point of 12.5 and

11.5% oxygen content and variation of volumetric air flow between values of 300 and 1000 mL min<sup>-1</sup>, assuring that oxygen was always above 10% in exhaust gases. Reactors capacity (mass) was 3.8 kg of SF and 2.8 kg of HS for 10 L reactors and 17.5 kg of HS and 20 kg of SF for 50 L reactors, respectively.

## Protease activity recovery: material and experimental set-up

### Influence of extraction parameters

Extractions were performed to evaluate the recovery of protease activity under different experimental conditions. In each extraction 200 g of the material obtained after fermentation in 10 or 50 L reactors were used. The solid and the solvent were in contact during 1 h under different regimes, at environment temperature, in this case, around 15 °C, and then the liquid phase centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. Protease activity of the supernatant was measured and referred to a value considering the total protease activity produced.

To obtain the total protease activity, an extraction in agitated mode at 1:5 solid: solvent ratio and HCl-Tris (hydroxymethyl aminomethane) buffer pH 8.1 as solvent was also performed for 1 h. The extraction ratio was selected in basis on Salariato et al. (2010) work who extracted polygalacturonase with distilled water at a solid: solvent ratio of 1:5. Also, results obtained in this work from consecutive extractions confirm the accuracy of the choice.

The experimental parameters assayed were solvent type, extraction mode and *w:v* solid: solvent ratio. The variations of each parameter were:

*Solvent type* Two different solvents were used to perform extractions, distilled water (DW) and HCl-Tris (hydroxymethyl aminomethane) buffer at pH 8.10 (TB).

*Extraction mode* The extraction modes were three: (1) no agitation (static mode), (2) orbital agitation at 120 rpm, and (3) circulation of the solvent through a column packed with the waste at 96 mL min<sup>-1</sup>, which resulted in the renewal of the whole volume of liquid 14 and 7.2 times, for 1:2 *w:v* and 1:4 *w:v* extractions, respectively, as added volume of solvent in 1:4 extraction is double than for 1:2.

*Waste to solvent ratio (weight: volume)* Assayed ratios of solid: solvent were 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4.

The different combinations of these tested variables are shown in Table 2.

Experimental set-up for static and agitated mode consists of a set of glass containers of different volumes where solvent and solid were placed. Static extraction was performed introducing the fermented solid and the chosen volume of solvent in a beaker and waiting for 1 h. To obtain the extract in agitated mode, the same procedure was followed, but beakers were placed in a Sony orbital shaker incubator for an hour at 120 rpm and room temperature.

The experimental set-up used in liquid circulation extraction was composed of a peristaltic pump Watson-Marlow

400L2 with variable rotor speed from 2.5 to 50 rpm and a 0.5 L plastic vessel with two adaptors, one at the top and one at the bottom, connected by plastic tubes to the pump input and output. Inside the vessel, a device was coupled to let the water fall over the biomass in a drop-shower mode, to achieve a homogenous contact with the solid in a percolation mode. Fermented matter was placed inside the vessel and solvent added. The flowrate was set up in the pump and liquid circulation lasted for an hour

### Number of extraction stages

Enzyme recovery from consecutive stages was assayed performing four consecutive extractions to the same fermented material. Between extractions, the biomass was drained to reduce its moisture as much as possible. 1:2 solid: solvent *w:v* ratio was chosen for these experiments. Differences between static/agitated mode and TB/DW were evaluated.

### Lyophilisation

15 mL of supernatant obtained after centrifugation of the extraction mixture Solid-DW and Solid-TB were frozen at -80 °C and later lyophilized using a Virtis 5L sentry lyophilizer connected to an Edwards vacuum pump RV5 A653\_01\_903. The protease activity was measured in the dissolved lyophilized solid and the activity recovery calculated.

### Zero waste strategies

#### Anaerobic digestion: biogas potential test (BPT)

Biomass fermented for the production of protease was tested as feedstock for biogas production through anaerobic digestion after extraction. Sludge from an anaerobic digester of raw sludge from a municipal WWTP in Sabadell (Barcelona) was used as inoculum.

The methodology used was a modified method of the protocol described by the German Institute for Standardization and reported by the Ordinance on environmentally compatible storage of waste from human settlements (2001), detailed by Ponsá (2010) Inoculum and biomass from SSF were mixed in a feed to inoculum (*F/I*) ratio of 0.5 for both residues and placed in hermetically closed bottles. Each sample was tested in triplicate. The ratio *F/I* was calculated based on the initial amounts of volatile solids (VS) of substrate and inoculum. According to Ponsá (2010), this ratio is the optimum to maximize biogas production. The content of volatile solids in fermented SF, HS and anaerobic inoculum were measured, obtaining a percentage of 26, 24, and 1.5%, respectively. A triplicate with only inoculum was also

tested as control and its biogas production subtracted from the sample tests.

All the bottles were placed in an incubator Memmert In750 working at 37 °C for 21 days. The amount of biogas produced was calculated from the biogas pressure, measured by an ISE 30A-01-P vacuum switch, temperature and head-space volume. The bottles were manually agitated before and after measurement, biogas was periodically released to avoid overpressure.

Representative measures of methane percentage in the biogas were taken at different days of incubation. Percentage of methane and carbon dioxide were measured using a gas chromatograph 5890A with a column 17066\_F ParcpackQ (250C), support 100/120, tube 3 m 1/8" × 5.5 mm. Initial oven temperature was 70 °C, final oven temperature was 120 °C, determination time was 8 min, injector temperature was 150 °C and detector temperature was 180 °C. Methane peak was detected at 0.8 min. 100 µl of gas sample were required for the analysis.

### Composting assays

Solid material after SSF and protease extraction was stabilized to test its suitability as soil organic amendment. Experiments were carried out in 50 and 4.5 L working volume reactors (Fig. 1), for HS and SF, respectively. Both reactors have been previously described (Sayara et al. 2010; Maulini-Duran et al. 2014). 50 L reactor was a packet bed type reactor, working in almost-adiabatic conditions and made of steel. The cap has two connectors, one for a temperature probe and the other as exhaust gases outlet. The outlet air was conducted through a water trap at 4 °C, and oxygen content was measured by an electrochemical sensor. 4.5 L reactor is identical to the 10 L reactor described above but in a smaller size. Composting process was performed with air supplied under OUR control (Puyuelo et al. 2010), a control system based in an algorithm which assures maximum O<sub>2</sub> consumption during the experiment. Volumetric flow oscillated between 1300 and 200 mL min<sup>-1</sup> for HS and between 1000 and 100 mL min<sup>-1</sup> for SF.

In the case of HS, a drying stage was required after extraction for moisture removal, to continue the stabilization. During the drying step, the solid was disposed in thin layer out of the reactor for 24 h.

### Analytical methods

#### Protease activity determination

Protease activity was determined using an adaptation of the Alef and Nannipieri (1995) method for activity determination in soil (Abraham et al. 2013). According to the methodology, 1 g of soil is mixed in a falcon tube with 5 mL of

HCl-Tris buffer pH 8.1, 5 mL of bovine casein salt (2%) as substrate and it was covered and incubated for 2 h at 50 °C. During this time, the protease will break the molecules of casein, releasing peptides and free amino acids into the media. In this case, 1 g of soil specified in the methodology was replaced by 1 mL of extract from the SSF and 4 mL of TB was added instead of 5 mL. The conditions for the standard extraction were fixed in a ratio of 1:5 in g of biomass per mL of HCl-tris buffer pH 8.1, agitation mode and environment temperature. The extract was centrifuged 10 min at 10,000 rpm and the supernatant was analysed. After the 2 incubation hours, 5 mL of trichloroacetic acid (TCA) (15%) was added to precipitate the non-soluble peptides at this TCA concentration. 1.5 mL of an alkaline solution and 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (25%) solution were added to 1 mL of the incubated mixture after centrifugation and then incubated at environment temperature for 1 h, to perform a colorimetric determination of the amount of tyrosine present, using the spectrometer working at 700 nm. L-Tyrosine was used as a standard. So, protease activity was expressed in activity units per gram of dry matter, being an Activity Unit (U) equivalent to 1 µg of tyrosine released after 1 h under incubation conditions. Calculations were carried out according to Eq. 1.

$$\text{Protease activity (U g}^{-1}\text{DM)} = \frac{C15V}{\text{DM}} \quad (1)$$

where *C* is the concentration of tyrosine expressed as µg of tyrosine per mL in the 15 mL of solution after incubation, 15 is the transformation factor to obtain the concentration in 1 mL of extract; *V* is the volume of solvent used in the extraction (mL) and DM (g) is the dry matter of fermented solid used in the extraction.

#### Activity recovery calculation

Activity recovery was calculated referring to the activity obtained in the extraction at given conditions as a percentage of the standard extraction according to Eq. 2.

$$\% \text{ Activity recovery} = \frac{100 \times \text{Protease activity (U g}^{-1}\text{DM)}}{\text{Standard protease activity (U g}^{-1}\text{DM)}} \quad (2)$$

As the extractions were performed by triplicate, rule of 25% was applied, discarding the values that differ more than 25% from the average.

#### Chemical oxygen demand (COD)

2 mL of the extract obtained for activity determination with DW as solvent were used to determine COD with a Lange

Kit LCK 514 ranging from 100 to 2000 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> and COD measures were taken by a Lange Spectrophotometer DR 3900.

### Dynamic Respirometric Index (DRI)

In this case, respirometric tests were performed on the residues before and after SSF to determine their stability (German Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety, Ordinance on environmentally compatible storage of waste from human settlements and on biological waste treatment facilities, 2001).

A dynamic respirometer following the method described by Adani et al. (2003) was used. The experimental device was described by Pognani et al. (2011). According to Gea et al. (2004), the test was carried out at a constant temperature of 37 °C. All the experiments were performed in triplicate. Cumulative oxygen demand, AT<sub>4</sub> (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> dry matter), and Dynamic Respirometric Indices, DRI<sub>24</sub> DRI 1 hour (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> dry matter h<sup>-1</sup>), were calculated (Mejias et al. 2017; Almeida et al. 2015).

### Routine methods

pH was calculated by soaking 10 g of sample in 50 mL of distilled water. After 30 min, pH value was measured with a pH meter Crison micro pH 2001. Volatile solids, moisture content, total organic carbon (TOC), total Kjeldahl nitrogen, (TKN) and Soluble N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> were measured according to TMECC (The U.S. Department of Agriculture and The U.S. Composting Council,] 2001).

TOC (total organic carbon) was determined using an O.I. analytical solid TOC Analyser/Win TOC Solids v3.0, and TKN was measured using a Bloc Digester 6 (with six tubes capacity) (J.P. Selecta S.A., Barcelona, Spain) and a Büchi Distillation Unit K-355 (Flawil, CH).

Fat content (HEM—hexane extractable material) was measured using a standard Soxhlet method with *n*-hexane as organic solvent (The U.S. Environmental Protection Agency, Method 9071B) (The U.S. Department of Agriculture and The U.S. Composting Council 2001).

### Statistics

One-way analysis of variance was performed to compare the mean values of activity recovery obtained under different experimental conditions. Multiple factor regression, to obtain a linear equation reflecting the influence of each experimental condition in activity recovery, was also calculated using activity recovery data. Excel 2010 data tool was used in both the calculations.

## Results and discussion

### Waste characterization

The results of the characterization of raw materials are summarized in Table 1. As in this work the objective of SSF was the production of protease, nitrogen-rich substrates were used. Air filled porosity (AFP) of the mixture was measured to ensure a good aeration of the whole mass. Casciatori et al. (2016) operated with a bed porosity of 0.75 in a mixture of sugarcane bagasse and wheat bran using a packet bed bioreactor. According to Machado de Castro et al. (2016), a high porosity will ensure the oxygen transport, but the initial value will change through the process due to degradation of the support. Porosity seemed to be adequate along the experiment, achieving a good aeration of the whole sample and no heat loss. Biodegradability was evaluated through the dynamic respirometric assay. As Table 1 shows, mixtures assayed presented appropriate initial moisture and porosity, as well as a low C/N ratio. The raw material chosen as a

**Table 1** Characterization of wastes and mixtures used as substrates in SSF

Parameters	Hair waste	Sludge	HS	SF
Moisture (% <i>, wb</i> )	67 ± 8	75 ± 2	62.3 ± 0.8	67 ± 8
Organic matter (% <i>, db</i> )	86 ± 1	67	89 ± 1	96 ± 3
pH	9.9 ± 0.8	7.8 ± 0.4	7.6 ± 0.3	6 ± 2
EC (mS cm <sup>-1</sup> )	4.5 ± 0.8	2.3 ± 0.9	3 ± 1	0.9 ± 0.2
Total organic carbon (% <i>, db</i> )	51 ± 9	n.a.	64 ± 3	69 ± 3
Total Kjeldahl nitrogen (% <i>, db</i> )	10 ± 4	16	7.3 ± 0.5	4.9 ± 0.6
C/N ratio	6 ± 1	3	7.1 ± 0.8	14 ± 1
Fat content—HEM (% <i>, db</i> )	0.9 ± 0.3	n.a.	n.a.	6 ± 2
Air filled porosity (%)	n.a.	n.a.	77 ± 4	74

Values are the average of independent experiments and its standard deviation

*wb* wet basis, *db* dry basis, *n.a.* not available, *HEM* hexane extractable material

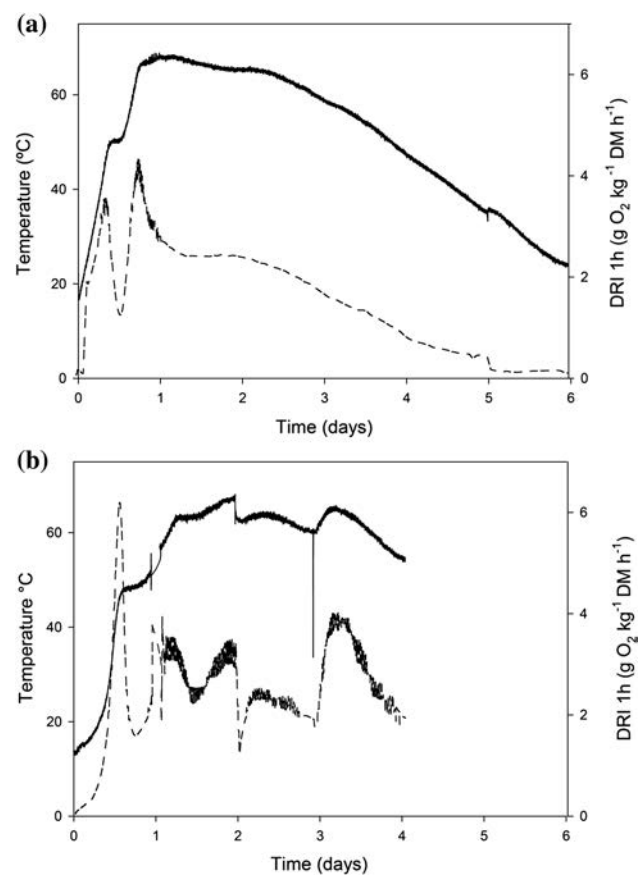
*HS* hair waste: sludge (1:2, *w:w*) and wood chips (1:1, *v:v*), *SF* soy fibre and wood chips (1:1, *v:v*)

substrate could be a good inducer of the enzyme produced (Gopalan and Nampoothiri 2016). So, for protease production using a consortium of microorganism, the substrate should be a nitrogen-rich one, which means a high content in protein. Compared to other reported wastes used as substrate for protease production like coffee pulp, corn cobs (Kandasamy et al. 2016), wheat bran (Meena et al. 2013) or *Jatropha curcas* seed cake (Thanapimmetha et al. 2012), which presented *C/N* ratios of 18.9 (Eshetu et al. 2013), 36 (Pan-In and Sukasem 2016), 19.49 and 2.46 (Mishra et al. 2016) respectively, HS and SF present a high content of proteins (nitrogen). Comparing the reported values of protease production in the mentioned examples, and after optimization of the experimental conditions in all cases, maximum production correspond to *J. curcas*, with a range of production near to  $1500 \text{ U mL}^{-1}$ , which was the residue that presented lowest *C/N* ratio, while the range of production for wheat bran and the mixture of coffee pulp and corn cobs were 920 and  $582 \text{ U mL}^{-1}$ , respectively. Although wheat bran also presents a high production value, enrichment with peptone was carried out previously to the SSF process and only *J. curcas* was specifically chosen for its high *N* content, according to the authors. In the present work, a high protease production was obtained, compared with the examples above, without any enrichment of the initial mixture, as *C/N* ratio was already adequate.

Material was also biodegradable, as the respirometric values show (Table 4).

### SSF process evolution in 10 L reactors

Figure 2a and b show an example of temperature and DRI 1 hour ( $\text{g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ) profiles obtained in the fermentation process of HS and SF, respectively. The highest protease activity for HS was always observed in the mesophilic phase after 8 days of process, while SF protease activity presented its maximum at thermophilic temperatures after 5 days of fermentation. Maximum activity point was determined in previous experiments by sampling the reactors periodically and determining the protease activity for both mixtures. Abraham et al. (2013) found that maximum activity for SF was observed at the 3rd day for a mixture equal to the one used in this work. For this residue, maximum biological activity concurred with maximum enzymatic activity. On the other hand, Abraham et al. (2017) found the highest activity value for a mixture of cow hair and digested sludge at the 14th day of fermentation. For the mixture used in this work, the highest value for protease activity was found in the 8th day of fermentation approximately. Difference with Abraham results can be due to the different inoculum, as in this work fresh sludge was used. Abu Yazid et al. (2016a) characterized the protease obtained from solid-state fermentation of hair and anaerobic sludge determining that the



**Fig. 2** Temperature (lines) and DRI 1 hour (short–short) profiles obtained in SSF processes **a** HS fermentation, **b** SF fermentation. *DRI 1hour* Dynamic Respirometric Index 1 h average value

alkaline protease was a serine type in the range between 26 and 100 kDa, and exhibit good stability in a temperature range of 30–50 °C and alkaline pH. In literature, shorter optimum fermentation times are found for protease production through solid-state fermentation. Kandasamy et al. (2016) found maximum yield of protease production after 60 h of fermentation, using coffee pulp and corncob as a substrate inoculating with *Bacillus sp. BT MASC 3*, Pouryafar et al. (2015) determined an optimum incubation time of 48 h using wheat bran as substrate with *Bacillus licheniformis*. However, in the literature consulted, the SSF process was usually interrupted after a fixed time, without taking into account the biological activity. So it is difficult to determine if the maximum production occurred at this time, because no information about the complete production curve is presented. Also, the highest amount of solid used in the references found was 25 g. In consequence, temperature control and oxygen availability was not a limitation of the process. In the present work, SSF was performed at a pilot scale and this approach requires a complete monitoring of the process, which makes that highest protease activity is obtained at different times. Thus, the direct comparison is not possible.



High values of DRI 1hour were maintained longer in the case of SF, which indicates a higher content of rapidly biodegradable material. These data are in agreement with previous results obtained by Abraham et al. (2013, 2017). The range of protease activity obtained on this work was 6668 to 23,541 U g<sup>-1</sup> DM for HS and 8054 to 33,374 U g<sup>-1</sup> DM for SF. For both residues, pH reached values between 8.0 and 8.8 during the thermophilic phase, and remained in this range until the end of the process.

### Protease activity recovery

Factors influencing enzyme extraction from the solid matrix at the point of maximum protease activity during SSF were evaluated for the two wastes under study. As stated above, these factors include solvent type, waste: solvent *w:v* ratio and operation mode (static, with agitation and recirculation). Table 2 shows the mean and standard deviation of the protease activity recovery achieved during extraction under the conditions listed on the same table. Extractions were performed a minimum of three times for each set of parameters and each residue in agitated and static mode. A duplicate of the extractions was performed in recirculated mode due to experimental constraints.

Maximum activity recovery of 91 ± 8% for SF was achieved in agitated mode at 1:4 using DW as solvent, while a maximum recovery of 121 ± 22% was obtained with the same extraction conditions for HS.

The lowest value of activity recovery for SF was obtained at 1:1 *w:v* with DW as a solvent and agitated regime. HS presented its minimum at 1:3 *w:v* extracted with TB and Static mode.

Regarding the mean values of activity recovery of SF, agitated mode presents approximately 10% more efficiency than static mode. These values represent a higher recovery in static mode than the results presented by Mrudula and Kokila (2010) for the extraction of amylase from fermented bran (also a fibrous residue), where a 40% less recovery in static mode than in agitated mode was reported. However, the difference is greater for HS residue, which reached 40% difference between agitated and static mode.

### Solvent type

One factor variance analysis was performed comparing the obtained yields between experiments differing in one extraction parameter. Results showed, for SF and HS, no significant difference was present between recoveries using DW or

**Table 2** Summary of extraction experiments for fermented soy fibre (SF) and fermented cow hair and sludge (HS) (extraction time: 1 h)

% Activity recovery				Extraction parameters		
SF Mean	SF St deviation	HS Mean	HS St deviation	Solvent (S)	Extraction mode (EM)	Ratio W:V (RA)
53	9	71	5	DW	Agitated	1:1
54	10	66	3	TB	Agitated	1:1
55	4	49	8	DW	Static	1:1
55	9	52	4	TB	Static	1:1
83	18	99	16	DW	Agitated	1:2
70	6	93	19	TB	Agitated	1:2
73	12	49	3	DW	Static	1:2
65	8	50	6	TB	Static	1:2
63	6	71	8	DW	Recirculated	1:2
71	2	58	8	TB	Recirculated	1:2
88	20	114	18	DW	Agitated	1:3
85	3	72	9	TB	Agitated	1:3
74	3	62	2	DW	Static	1:3
78	22	44	6	TB	Static	1:3
91	8	121	22	DW	Agitated	1:4
86	3	99	23	TB	Agitated	1:4
79	8	66	11	DW	Static	1:4
77	7	72	3	TB	Static	1:4
76	19	93	21	DW	Recirculated	1:4
72	1	56	12	TB	Recirculated	1:4

DW distilled water, TB HCl—Tris buffer (pH8.10), EM extraction mode, S solvent type, RA ratio of extraction *w:v*

TB as extractant. Protein solubility depends mostly on polar interactions between the molecules and the solvent, in some proteins, pH solubility profile presents a minimum value in the isoelectric region, the value of which depends on the structure of the protein (Hu et al. 2017). According to Vuong et al. (2016) salt concentration can also affect solubility, either negatively or positively, as can remove hydrate layers around protein molecules. In this work, both DW and TB are polar solvents than can be adequate for protease extraction, but with different initial pH and salinity. However, certain pH can cause deactivation. Freitas et al. (2013) reported denaturalization of protease from SSF of canola cake at pH 4, so low pH should be avoided. Table 3 show values of pH and conductivity measured in several extracts. As it can be observed, pH for DW and TB extracts presents similar results with a maximum pH of 9 and a minimum value of 8.3. Thus, no buffering properties were needed in the extraction agent to maintain an optimal pH value. pH achieved is due to the solubilisation of salts and other compounds contained in the solid matrix, which rises the pH of DW extracts. Differences between both wastes are reflected in conductivity values, where TB presents higher values due to the Tris salt. As the extraction ratio decreases, conductivity increases due to higher concentration in soluble salts from the matrix. During the SSF of SF and HS, proteases were produced when pH values reached the range of 8–9, thus, these enzymes are expected to be stable under pH extraction conditions presented in Table 3.

According to literature, DW is often used for enzyme extraction with good yields (Pal and Khanum 2010; Zaslona and Trusek-Holownia 2015). Karatas et al. (2013) compared different solvents for the extraction of proteases and  $\alpha$ -amylase from fermented rice husk, showing tap water as the best recovery yield for both enzymes over HCl-Tris buffer pH 7 and distilled water. In this case, distilled water showed almost 50% less recovery than the buffer. On the other hand, Negi et al. (2011) found as the best solvent for extraction of protease and glucoamylase from wheat bran a solution containing 10% of glycerol, other solvents assayed were water, ethanol, acetone and HCl-Tris buffer pH 6.5. Freitas et al. (2013) found that the ideal pH for protease recovery from fermented canola cake was 7, although they achieved good recoveries at a range from 5 to 8.

According to the results of this work, a solvent which has a pH lower than 8.1 should be used, as recovery yield using distilled water was higher, having an initial pH lower than TB. However, optimum solvent will vary depending on the substrate and the characteristics of the enzyme produced (Rezaei et al. 2011).

### Extraction mode

Three different extraction modes were assayed for protease extraction: static extraction (no agitation), orbital agitation, and recirculation of the solvent at two different extraction ratios, 1:2 *w:v* and 1:4 *w:v*, using a flow of 96 mL min<sup>-1</sup>, which produces 14 times recirculation of the whole volume

**Table 3** pH and conductivity of the extracts

SF (fermented soy fibre)					HS (fermented hair + sludge)				
S	EM	RA	pH	Conductivity (mS cm <sup>-1</sup> )	S	EM	RA	pH	Conductivity (mS cm <sup>-1</sup> )
DW	Agitated	1:1	8.9	6.9	DW	Agitated	1:1	8.7	11.46
DW	Agitated	1:2	8.9	4.7	DW	Agitated	1:2	8.83	7.77
DW	Agitated	1:3	8.9	3.2	DW	Agitated	1:3	8.78	5.83
DW	Agitated	1:4	9.0	2.9	DW	Agitated	1:4	8.77	4.76
DW	Static	1:1	8.5	2.4	DW	Static	1:1	8.79	10.16
DW	Static	1:2	8.7	3.0	DW	Static	1:2	8.82	5.99
DW	Static	1:3	8.7	3.5	DW	Static	1:3	8.81	4.34
DW	Static	1:4	8.6	2.7	DW	Static	1:4	8.85	4.32
TB	Agitated	1:1	8.6±0.2	7.5±0.5	TB	Agitated	1:1	8.69	12.04
TB	Agitated	1:2	8.5±0.1	6.1±0.7	TB	Agitated	1:2	8.6	8.76
TB	Agitated	1:3	8.5±0.04	5.2±0.2	TB	Agitated	1:3	8.5	7.09
TB	Agitated	1:4	8.4±0.04	4.7±0.4	TB	Agitated	1:4	8.51	6.67
					TB	Static	1:1	8.58	12.55
					TB	Static	1:2	8.54	8.35
					TB	Static	1:3	8.37	5.83
					TB	Static	1:4	8.31	5.09

DW (distilled water): pH: 7.81, Conductivity: 1.86 (mS cm<sup>-1</sup>); TB (HCl—Tris buffer): pH: 8.1, Conductivity: 2.48 (mS cm<sup>-1</sup>)

for 1:2 extractions and 7.2 for 1:4 extractions, due to the doubled extracting volume. Results for both residues are shown in Table 2.

One factor variance test was performed for 1:4 and 1:2  $w:v$  experiments for both residues. Activity recovery for SF in agitated and static mode was considered statistically equal in all cases. However, for recirculation mode, differences with agitated mode were found for 1:4  $w:v$  TB.

Sugumaran and Ponnusami (2017) studied the effect of agitation speed in the extraction of pullulan, a polysaccharide, from two fibrous substrates, cassava bagasse and palm kernel, reporting increment of 42 and 46% of the recovery obtained at 100 rpm when increasing the agitation speed to 400 and 300 rpm for casava bagasse and palm kernel, respectively. This difference in recovery depending on agitation mode does not agree with the results found in this work. Also, extractions of xylanase from sorghum straw performed by Adhyaru et al. (2016) showed that in this case intermediate agitation speed was the optimum and also that interaction between other extraction parameters like temperature and ratio of solvent–solid were significant.

The small particle size of SF in contact with the solvent losses structure enhancing solid–solvent contact. Vardanega et al. (2009) also reported no influence of the agitation speed on lipase recovery from soybean meal within a range of 50–150 rpm.

When comparing results obtained for HS through one factor variance test, significant differences are shown in all cases between agitated mode and static extraction mode. Explanation for these differences is related to the nature of the residue. Sludge used in HS contains chemical compounds added at the WWTP to produce the flocculation of the solids and their sedimentation. Nabarlitz et al. (2012) compared extraction of protease and lipase from two WWTP sludges using stirring and ultra-sonication, obtaining much better results in almost half of the extraction time for the second strategy. This shows that the presence of flocks formed by the chemicals added to produce the clumping of the solids during water treatment, is the cause of poorer contact liquid–solid.

Values of COD for SF and HS extracts obtained under the same experimental conditions were 7525 and 3280  $\text{mg L}^{-1}$ , respectively, which indicates a higher solubilisation of SF material than HS.

### Volume–weight (solvent–waste) ratio

Results of one factor variance test of experiments differing from extraction ratio  $w:v$  showed, for SF, no statistical difference between extractions performed at 1:3 and 1:4  $w:v$ . However, in some cases, significant differences were found between 1:4 and 1:2  $w:v$  extractions and even more

significant with 1:1  $w:v$ . When the test was performed for HS results, there was no difference between the recovery at different extraction ratios or difference appears between 1:4 and 1:3 extraction but not between 1:4 and 1:2 ratios.

According to those facts, solubility of protease from SF seems to be high and related to the equilibrium between concentration of protease in the solid matrix and the solvent. In the literature, a direct relation between enzyme activity and  $w:v$  ratio is documented. For instance, Adhyaru et al. (2016) assessed the recovery of xylanase from sorghum straw at different ratios from 8 to 16  $\text{mL g}^{-1}$  of substrate, locating the maximum recovery at 12.41  $\text{mL g}^{-1}$  (5069.20  $\text{U g}^{-1}$ ) when the rest of extraction parameters had been optimized. Although almost all of the studies performed on this issue confirms a direct relationship between  $w:v$  ratio and activity (Vardanega et al. 2009), the opposite result was reported by Volken de Souza et al. (2008) who found a negative effect because of the increase of extraction volume during the extraction of transglutaminase from industrial fibrous soy residue. Anyway, it must be pointed that although recovery achieved at higher ratios can be almost total, the obtained extract will present lower enzyme concentration, requiring extra processes for protease concentration or more energy during lyophilisation. This fact is not taken into account in most of the works performed at laboratory scale that do not consider further downstream stages.

Linear regression using Excel software was applied to data from Table 2. Assignment of values to the different extraction parameters to perform the linear regression, as only numbers can be adjusted, was as follows: values of 1 and –1 to static and agitated mode and also to DW and TB, respectively, values of 1, 2, 3, and 4 to extraction ratios of 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4, respectively. Recirculation mode results were excluded from calculations, since experiments in this agitation regime were not performed with all ratios. Extraction parameters were designated as follows, S for solvent type, EM for extraction mode, and RA for ratio of extraction  $w:v$ . The results obtained are displayed below for SF (Eq. 3) and HS (Eq. 4).

$$\begin{aligned} \% \text{ Activity recovery} &= 48.9 + 1.7(S) - 3.4(\text{EM}) \\ &+ 9.6(\text{RA}) (R^2 = 0.81) \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Activity recovery} &= 51.3 + 5.2(S) - 18.3(\text{EM}) \\ &+ 9.0(\text{RA}) (R^2 = 0.82) \end{aligned} \quad (4)$$

As observed, there is a correlation between the different results, as regression coefficients are 0.81 and 0.82, considered high for experimental values.

SF regression shows the highest coefficient for RA, which means that extraction ratio has a greater influence in the extraction of protease. However, for HS, the parameter that presents more relevance is the extraction mode. In both

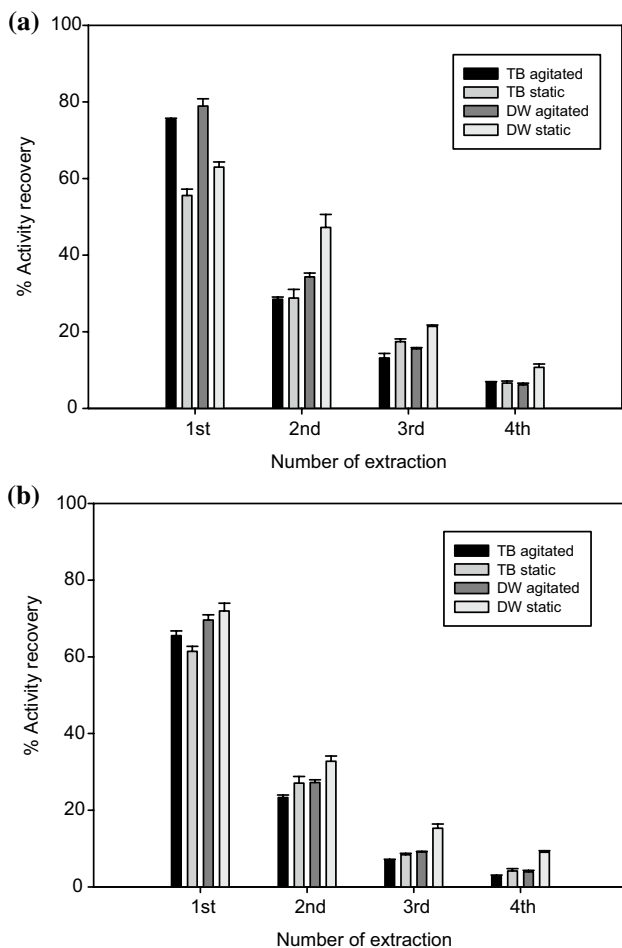


cases, it is clear that agitated mode will produce the maximum recovery yield.

To sum up, the facts that can be deduced from those equations agree with the results obtained by one factor variance test, indicating that extraction yield will increase with extraction ratio for SF with little dependence on the agitation mode. When proteases are extracted from HS, agitation must be applied to achieve maximum activity recovery, but a lower extraction ratio is allowed.

### Number of extraction stages

Consecutive extractions were carried out for HS and SF using DW and TB in a ratio of 1:2 *w:v* with agitation and in static mode. Figure 3a, b shows the percentage of activity recovery for the consecutive extractions performed on 200 g of fermented solid.



**Fig. 3** Percentage of activity recovery obtained in consecutive extractions of 200 g of fermented solid at 1:2 *w:v* ratio **a** HS, **b** SF. *HS* hair and sludge, *SF* soy fibre, *TB* HCl-Tris Buffer (pH 8.10), *DW* distilled water

As it can be seen for both residues, approximately 80% of the total activity recovered is extracted during first and second extraction, leaving a small amount of protease in the solid matrix. For both residues, the final percentage of activity recovery is higher for agitated regime. Regarding the total activity recovery after two consecutive extractions, it is possible to conclude that with 1:5 extraction ratio in agitated mode and TB as solvent, practically a 100% recovery of the protease contained in the solid matrix for both residues can be achieved.

Ahmed and Mostafa (2013) reported a recovery of 98% of exo-polygalacturonase produced by solid-state fermentation of orange bagasse under optimum leaching conditions after three washes. However, 70% of the enzyme was extracted with the first wash. Also, Abd el Aty and Mostafa (2015) extracted  $\alpha$ -amylase from pre-treated and fermented potato shells with six consecutive washes at the optimum extraction parameters, achieving a recovery of 90.3% at the fourth one. In this case, recovery in the first and second extraction was very similar, approximately 35%. Comparing the results obtained for protease, activity recovery yield was higher in both SF and HS. In view of these results, it seems that efficiency recovery of successive extraction stages may be related to the type of enzyme and specifically studied in economic terms.

### Lyophilisation process

15 mL of fresh extract were lyophilised and the remaining solid powder dissolved in DW to its original volume. The activity of that solution was measured and compared to the fresh extract to determine the activity recovery of the lyophilisation process. The process was performed in duplicate. Lyophilisation resulted in high yields of activity recovery, for SF,  $95 \pm 4\%$  was recovered as a mean value and  $96 \pm 6\%$  for HS extracts. No relation between extraction parameters and activity conservation was observed, as samples of each set of extraction parameters were assayed. Minimum activity recovered was  $87 \pm 3$  for HS and 88% for SF. Abu Yazid et al. (2016a) reported an activity loss of 21% after lyophilisation of protease extract which was also obtained from the fermentation of hair and sludge. During freezing and drying, protein can suffer denaturation, losing its activity. Bonds between water molecules disappear during drying process, but some components present the ability to stabilize the protein structure and preserve activity (Mensink et al. 2017). The same protein in a different matrix can lead to different activity preservation. Activity losses have been reported by Imamura et al. (2014) for different proteins after drying in sodium and potassium phosphate buffer. The highest recovery with no salt addition reached 31%. Thus, lyophilisation in this

case results in low activity losses compared to the results reported, and a possible explanation can be that no unfolding of the protein is happening during lyophilisation.

### Protein hydrolysis by SSF produced protease

Abu Yazid et al. (2016b) described the immobilisation of protease, obtained from the same residues used in this work, onto functionalized magnetic iron oxide nanoparticles through covalent binding method, obtaining a retention yield of 96%. Abu Yazid et al. (2016b) also used the immobilized enzymes during at least three cycles for protein hydrolysis with no loss of activity. With an initial protein amount of 5.2 mg from casein, the degree of protein hydrolysis achieved was 75 and 50% of the initial amount of protein for enzymes produced by HS and SF, respectively.

According to those results, for a 50 L reactor of fermented HS and SF (17.5 and 20 kg respectively), obtaining the maximum activity achieved in this work, 23,541 U DM<sup>-1</sup> for HS and 33,374 U DM<sup>-1</sup> for SF, it would be possible to hydrolyse 156.6 and 238.3 mg of protein from casein bovine with the recovered protease from HS and SF, respectively. For this calculation, the immobilized enzyme would be used during 6 cycles, in which initial activity does not diminish until the fourth cycle. Jin et al. (2010), reported hydrolysis of 2.1 mg of protein from rapeseed meals in one cycle using 1 mL of immobilized protease on ferric nanoparticles solution (8.50 mg mL<sup>-1</sup>), during 2 h incubation at 50 °C. Hydrolysis yield in this case was lower (9.86%) compared to the one reported by Abu Yazid et al. (2016b) (75 and 50%). Comparing activity to commercial products, neutral protease for beer brewing (Food grade) provided by Creative Enzymes (2017) was taken as example. The mentioned product activity, as stated in manufacturing specifications, is 70,000 U g<sup>-1</sup>, being an activity unit (U) the amount of enzyme that hydrolyses casein to get 1 µg of tyrosine in 1 min at 30 °C and pH 7.5. Abu Yazid et al. (2016b) was capable of immobilizing proteases into ferric nanoparticles obtaining an activity of 45.9 U mg<sup>-1</sup> of ferric nanoparticles (NP) for HS and 31.9 U mg<sup>-1</sup> nanoparticles (NP) for SF, being a unit (U) the amount of enzyme that hydrolyses casein to get 1 µg of tyrosine in 1 min at 50 °C and pH 8.1. The resulted product described by Abu Yazid et al. (2016b) will have an activity of 45,900 U g<sup>-1</sup> NP, and will be reusable for at least 3 cycles without activity loss, resulting in a much better yield than the commercial one.

### Zero waste strategies

As described above, the solid residue obtained after extraction was tested as feedstock for biogas and soil organic amendment production in the framework of a zero waste strategy.

### Anaerobic digestion

Biogas potential tests were undertaken to determine the suitability of anaerobic digestion to treat the solid waste after enzyme extraction. After 21 days, SF replicates produced 365, 304 and 273 mL of biogas g<sup>-1</sup> VS with a content of approximately 43% of methane. During the same period of time, HS produced 132 and 111 mL biogas g<sup>-1</sup> VS, with both presenting 40% of methane content. Biogas production in this case was significantly lower than for SF. This result was expected since HS fermentation lasted 6 more days than SF, so HS was more biodegraded at the point of maximum protease production and extraction.

Kafle and Kim (2013) reported the biogas potential of different agricultural and animal wastes like apple waste, bread waste or cutlet fish waste. The values reported ranged from 508 to 617 biogas mL g<sup>-1</sup> VS, significantly higher than the values reported in this study, since SF and HS were already partially degraded. Values reported by Ponsá et al. (2011) of biogas production for organic fraction of municipal solid waste with no mechanical pre-treatment (340 mL g<sup>-1</sup> DM) and for municipal solid waste with mechanical pre-treatment (133 mL g<sup>-1</sup> DM) are in the range of SF and HS biogas production values obtained in the present study. No values of biogas production were found in literature regarding SF and HS before and after SSF and extraction, but Merlino et al. (2012) reported a production approximately of 590 Nm<sup>3</sup> t<sup>-1</sup> VS of broken soybean after 35 days of digestion at 40 °C, with a methane content of approximately 55%. That data is barely comparable to biogas production of SF, since SF was already a fermented material and a part of SF volatile solids was lignocellulosic, non-biodegradable material.

### Composting process

The stabilization of the solid waste after enzyme extraction under aerobic conditions was also tested. Composting was evaluated as a valorisation technology to obtain an organic soil amendment.

HS required a drying stage after enzyme extraction and before composting, to decrease its moisture content from 74 to 62%. Before drying, no biological activity occurred despite the aeration provided. According to Chen and He (2012), excessive water content can hamper the oxygen transfer.

For HS, temperatures up to 55 °C required for sanitation were not reached during composting. This is probably due to the amount of waste in the reactor (17 kg) compared to industrial scale quantities to which EU regulations apply (European Commission, Working document, Biological treatment of Biowaste 2nd draft, 2001). Abu Yazid et al. (2016a) also composted a mixture of hair and anaerobic digested sludge after fermentation and extraction of protease

**Table 4** Results of respirometric assays

Residue	Solid-state fermentation				Composting	
	Initial $AT_4$ (g $O_2$ $kg^{-1}$ DM)	Final $AT_4$ (g $O_2$ $kg^{-1}$ DM)	Initial $DRI_{24}$ (g $O_2$ $kg^{-1}$ DM $h^{-1}$ )	Final $DRI_{24}$ (g $O_2$ $kg^{-1}$ DM $h^{-1}$ )	Final $AT_4$ (g $O_2$ $kg^{-1}$ DM)	Final $DRI_{24}$ (g $O_2$ $kg^{-1}$ DM $h^{-1}$ )
SF	326 ± 98	185 ± 48	5 ± 2	3 ± 1	146 ± 27	2.1 ± 0.4
HS	113 ± 11	61 ± 6	2.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	48 ± 4	0.61 ± 0.05

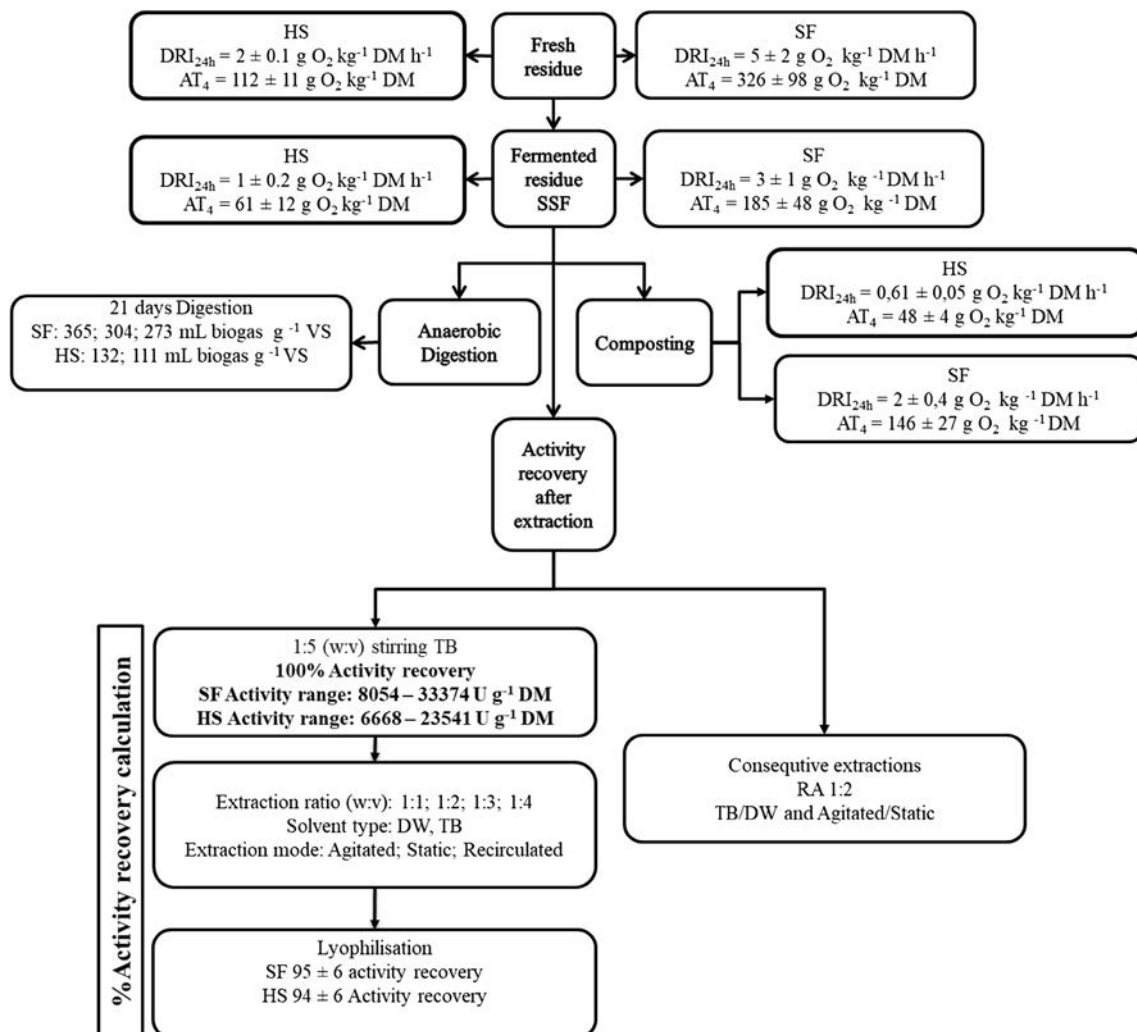
Final SSF values are initial composting values

Values are the average of independent experiments

$AT_4$  accumulated  $O_2$  consumption after 4 days,  $DRI_{24}$  dynamic respirometric index based on 24 h of maximum  $O_2$  consumption

at a 10 L scale for approximately 30 days without reaching thermophilic temperatures. Onyuka et al. (2013) composted a mixture of cow hair and soil achieving maximum temperature of 51 °C at a scale of 2 L. In an industrial scale, it would

be expected to reach the required temperature for sanitation, as heat gradient will increase as scale does (Ge et al. 2016). Table 4 shows  $DRI_{24}$  values of  $2.0 \pm 0.1$  and  $0.61 \pm 0.05$  for initial mixture of HS after SSF and composted product,



**Fig. 4** Downstream summary.  $DRI$  1 h Dynamic Respirometric Index 1 h average value,  $AT_4$  cumulative oxygen consumption during 4 days, HS hair and sludge, SF soy fibre, TB HCl-Tris Buffer (pH 8.10); DW distilled water, VS volatile solids

respectively, indicating that the material becomes stable after composting. This stage lasted 5 days for HS.

In the case of SF, SSF experiments were stopped for enzyme extraction at the 3rd and 5th day of process, showing values of average oxygen uptake rate during the last 24 h ( $OUR_{24}$ ) of 3, 4.5, 9 g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup> in thermophilic range. Thus, SF was clearly a non-stable material at this stage of the process.

Composting of SF after SSF and enzyme extraction was carried out in 4.5 L reactors in duplicate. Both replicates showed an increase of temperature and oxygen consumption during the first 24 h, followed by a fast decrease in environment temperature. The maximum temperature values reached were 34 and 42 °C, respectively, and the maximum  $OUR_{24}$  values were around 5 g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup>, but never reached the thermophilic range again.

After 9 days of composting process, the residue could not be considered stable as it presented a  $DRI_{24}$  value of  $2.1 \pm 0.4$  g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup> and  $AT_4$  value of  $146 \pm 27$  g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM. A longer composting process will be needed, since the decrease of biological activity is slow.

According to Barrena et al. (2009), aerobic and anaerobic indices are closely related. Values reported for the ratio between  $DRI_{24}$  and biogas production in liquid condition and between  $AT_4$  and biogas production at the same condition for different wastes were 86 and 1.56, respectively. The same ratios were calculated using the values obtained in this study, giving values of 84 and 1.56, respectively. These numbers agree with the parameters reported by Barrena et al. (2009).

## Conclusions

In this work, a complete assessment of the downstream of SSF processes for the production of proteases has been performed (Fig. 4). Yields of activity recovery in protease extraction and lyophilisation stages, under a wide variety of conditions, were calculated. According to the results, extraction ratio of 1:3 for SF is recommended and agitation mode at extraction ratio 1:2 would be the adequate condition for HS. Consecutive extractions in static mode seem an efficient way of also obtaining a good yield, with no agitation but double extraction time. Economical balance between profitability of the recovered product and water/energy consumption should be performed. Lyophilisation provides a high activity recovery, around 95% as an average. It was also observed that as the solubility of the solid matrix increases, the ratio of waste: solvent  $w:v$  becomes the most determining factor in the activity recovery yield, while agitation mode is the key factor when solubility decreases.

After enzyme extraction, the use of SF and HS as feedstock for anaerobic digestion reported relatively high biogas

production. Also, HS and SF could be treated through composting obtaining a stable product.

**Acknowledgements** This work could not be completed without the help of Noraziah Abu Yazid and Raquel Barrena. We would also like to thank the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, which gave financial support (Project CTM2015-69513-R). Maria Marín also thanks the Universitat Autònoma de Barcelona for a predoctoral scholarship.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

## References

- Abd El Aty AA, Mostafa FA (2015) Production and characterization of fungal  $\alpha$ -amylase from marine alternaria alternata utilizing lignocellulosic wastes and its application. Res J Pharm Biol Chem Sci 6(3):813–825
- Abraham J, Gea T, Sánchez A (2013) Potential of the solid-state fermentation of soy fibre residues by native microbial populations for bench-scale alkaline protease production. Biochem Eng J 74:15–19
- Abraham J, Gea T, Komilis D, Sánchez A (2017) Reproducibility of solid-state fermentation at bench-scale: the case of protease production. Global Nest J 19(2):183–190
- Abu Yazid N, Barrena R, Sánchez A (2016a) Assessment of protease activity in hydrolysed extracts from SSF of hair waste by and indigenous consortium of microorganisms. Waste Manag 49:420–426
- Abu Yazid N, Barrena R, Sánchez A (2016b) The immobilisation of protease produced by SSF onto functionalized magnetic nanoparticles: application in the hydrolysis of different protein sources. J Mol Catal B Enzym 133(1):s230–s242
- Adani F, Gigliotti G, Valentini F, Lاراia R (2003) Respiration index determination: a comparative study of different methods. Compost Sci Util 11:144–151
- Adhyaru DN, Bhatt NS, Modi HA, Divecha J (2016) Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHNI: production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. Biocatal Agric Biotechnol 6:51–57
- Ahmed SA, Mostafa FA (2013) Utilization of orange bagasse and molokhia stalk for production of pectinase enzyme. Braz J Chem Eng 30(3):449–456
- Alef K, Nannipieri P (1995) Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press Limited, San Diego, pp 312–315
- Almeira N, Komilis D, Barrena R, Gea T, Sánchez A (2015) The importance of aeration mode and flowrate in the determination of the biological activity and stability of organic wastes by respiration indices. Bioresour Technol 196:256–262
- Barrena R, d'Imporzano G, Ponsá S, Gea T, Artola A, Vázquez F, Sánchez A, Adani F (2009) In search of a reliable technique for the determination of the biological stability of the organic matter in the mechanical-biological treated waste. J Hazard Mater 162:1065–1072
- Casciadori FP, Bück A, Thomeo JC, Tsotsas E (2016) Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation with a packed-bed bioreactor. Chem Eng J 287:103–116



- Chaithanya R, Bhagavathy CMA, Mrudula S (2012) Optimization of process parameters and leaching conditions affecting protease production under solid state fermentation. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci* 14(1):87–94
- Chen HZ, He Q (2012) Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. *J Chem Technol Biot* 87:1619–1625
- Creative enzymes, product information (2017). [http://www.creative-enzymes.com/product/neutral-protease-for-beer-brewing-food-grade-\\_3168.html](http://www.creative-enzymes.com/product/neutral-protease-for-beer-brewing-food-grade-_3168.html). Accessed 28 Feb 2017
- El-Bakry M, Abraham J, Cerda A, Barrena R, Ponsá S, Gea T, Sanchez A (2015) From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. *Crit Rev Environ Sci Technol* 45(18):1999–2042
- Eshetu B, Eckhardt KU, Leinweber P (2013) Soil organic matter alterations by short-term composted coffee pulp waste: evidence from pyrolysis-field ionisation mass spectrometry. *Appl Agric For Res* 2(63):191–200
- European Commission, Working document, Biological treatment of Biowaste 2nd draft. [http://www.compost.it/www/publicazioni\\_on\\_line/biod.pdf](http://www.compost.it/www/publicazioni_on_line/biod.pdf) (2001). Accessed 19 Sep 2016
- Finkler ATJ, Biz A, Pitol LO, Medina BS, Luithardt H, Luz LFDL Jr, Krieger N, Mitchell DA (2017) Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochem Eng J* 121:1–12
- Freitas AC, Castro RJS, Fontenele MA, Egito AS, Farinas CS, Pinto GAS (2013) Canola cake as a potential substrate for proteolytic enzymes production by a selected strain of *Aspergillus oryzae*: selection of process conditions and product characterization. *ISRN Microbiol* 2013:8
- Gassara F, Ajila CM, Brar SK, Tyagi RD, Verma M, Valero J (2013) Influence of aeration and agitation modes on solid-state fermentation of apple pomace waste by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ligninolytic enzymes and co-extract polyphenols. *Int J Food Sci Technol* 48:2119–2126
- Ge X, Vasco-Correa J, Li Y (2016) Solid-State fermentation bioreactors and fundamentals. Current developments in biotechnology and bioengineering: bioprocesses. *Bioreact Controls* 2016:381–402
- Gea T, Barrena R, Artola A, Sánchez A (2004) Monitoring the biological activity of the composting process: oxygen uptake rate (OUR), respirometric index (RI), and respiratory quotient (RQ). *Biotechnol Bioeng* 88:520–527
- German Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety, Ordinance on environmentally compatible storage of waste from human settlements and on biological waste treatment facilities of 20 February (2001). <http://www.bmu.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/ablagerungsverordnung.pdf>. Accessed 26 Sep 2016
- Gopalan N, Nampoothiri KM (2016) Biotechnological production of enzymes using agro-industrial wastes: economic considerations, commercialization potential, and future prospects. In: *Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production*, pp 313–330
- Hu H, Fan T, Zhao X, Zhang X, Sun Y, Liu H (2017) Influence of pH and salt concentration on functional properties of walnut protein from different extraction methods. *J Food Sci Technol* 54(9):2833–2841
- Imamura K, Murai K, Korehisa T, Shimizu N, Yamahira R, Matsuura T, Tada H, Imanaka H, Ishida N, Nakanishi K (2014) Characteristics of sugar surfactants in stabilizing proteins during freeze-thawing and freeze-drying. *J Pharm Sci* 103:1628–1637
- Jin X, Fang Li J, Huang PY, Dong XY, Guo LL, Yang L, Cao YC, Wei F, Zhao YD, Chen H (2010) Immobilized protease on the magnetic nanoparticles used for the hydrolysis of rapeseed meals. *J Magn Magn Mater* 322:2031–2037
- Kafle GK, Kim SH (2013) Effects of chemical composition and ensiling on the biogas productivity and degradation rates of agricultural and food processing by-products. *Bioresour Technol* 142:553–561
- Kandasamy S, Muthusamy G, Balakrishnan S, Duraisamy S, Thangasamy S, Seralathan KK, Chinnappan S (2016) Optimization of protease production from surface-modified coffee pulp waste and corncobs using *Bacillus sp.* by SSF. *3 Biotech* 6(2):167
- Karataş H, Uyar F, Tolan V, Baysa Z (2013) Optimization and enhanced production of  $\alpha$ -amylase and protease by a newly isolated *Bacillus licheniformis* ZB-05 under solid-state fermentation. *Ann Microbiol* 63:45–52
- Karpe AV, Beale DJ, Harding IH, Palombo EA (2015) Optimization of degradation of winery-derived biomass waste by Ascomycetes. *J Chem Technol Biot* 90:1793–1801
- Kriaa M, Kammoun R (2016) Producing *Aspergillus turingensis* CTM507 glucose oxidase by solid state fermentation versus submerged fermentation: process optimization and enzyme stability by an intermediary metabolite in relation with diauxic growth. *J Chem Technol Biotechnol* 91:1540–1550
- Lizardi-Jiménez MA, Hernández-Martínez R (2017) Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorise waste and biomass. *3 Biotech* 7(1):44
- Machado de Castro A, dos Reis Castilho L, Guimarães Freirec DM (2016) Characterization of babassu, canola, castor seed and sunflower residual cakes for use as raw materials for fermentation processes. *Ind Crop Prod* 83:140–148
- Maulini-Duran C, Puyuelo B, Artola A, Font X, Sánchez A, Gea T (2014) VOC emissions from the composting of the organic fraction of municipal solid waste using standard and advanced aeration strategies. *J Chem Technol Biotechnol* 89:579–586
- Meena P, Tripathi AD, Srivastava SK, Jha A (2013) Utilization of agro-industrial waste (wheat bran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology. *Biocatal Agric Biotechnol* 2(3):210–216
- Mejias L, Komilis D, Gea T, Sánchez A (2017) The effect of airflow rates and aeration mode on the respiration activity. *Waste Manag* 65:22–28
- Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K, Hinrichs WLJ (2017) How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur J Pharm Biopharm* 114:288–295
- Merlino G, Rizzi A, Villa F, Sorlini C, Brambilla M, Navarotto P, Bertazzoni B, Zagni M, Araldi F, Daffonchio D (2012) Shifts of microbial community structure during anaerobic digestion of agro-industrial energetic crops and food industry byproducts. *J Chem Technol Biot* 87:1302–1311
- Mishra S, Kumar P, Malik A (2016) Suitability of agricultural by-products as production medium for spore production by *Beauveria bassiana* HQ917687. *Int J Recycl Org Waste Agric* 5(2, 1):179–184
- Mrudula S, Kokila R (2010) Production of thermostable  $\alpha$ -amylase by *Bacillus cereus* MK in solid state fermentation: partial purification and characterization of the enzyme. *Internet J Microbiol* 8(1):1–2
- Nabarlatz D, Stuber F, Font J, Fortuny A, Fabregat A, Bengoa C (2012) Extraction and purification of hydrolytic enzymes from activated sludge. *Resour Conserv Recycl* 59:9–13
- Negi S, Gupta S, Banerjee R (2011) Extraction and purification of glucoamylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single-stage fermentation. *Food Technol Biotechnol* 49(3):310–315
- Onyuka AS, Bates M, Attenburrow G, Covington AD, Antunes APM (2013) Pilot-scale composting and biodegradability of bovine hair. In: *32nd congress of the International Union of Leather Technologists and Chemist Societies, IULTCS 2013*
- Pal A, Khanum F (2010) Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. *Bioresour Technol* 101:7563–7569

- Pan-In S, Sukasem N (2016) Methane production potential from anaerobic co-digestions of different animal dung and sweet corn residuals. *Energy Proced* 138:943–948
- Pognani M, Barrena R, Font X, Adani F, Scaglia B, Sánchez A (2011) Evolution of organic matter in a full-scale composting plant for the treatment of sewage sludge and biowaste by respiration techniques and pyrolysis-GC/MS. *Bioresour Technol* 102:4536–4543
- Ponsá S (2010) Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. Application to full scale waste treatment plants, PhD thesis, ed by Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés
- Ponsá S, Gea T, Sánchez A (2011) Short-time estimation of biogas and methane potential from samples of municipal solid wastes. *J Chem Technol Biot* 86:1121–1124
- Pouryafar F, Najafpour GD, Noshadi N, Jahanshahi M (2015) Thermostable alkaline protease production via solid state fermentation in a tray bioreactor using *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. *Int J Environ Res* 9(4):1127–1134
- Puyuelo B, Gea T, Sánchez A (2010) A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate. *Chem Eng J* 165:161–169
- Rashid JIA, Samat N, Yusoff WMW (2013) Studies on extraction of mannanase enzyme by *Aspergillus terreus* SUK-1 from fermented palm kernel cake. *Pak J Biol Sci PJBS* 16:933–938
- Rezaei F, Joh LD, Kashima H, Reddy AP, VanderGheynst JS (2011) Selection of conditions for cellulase and xylanase extraction from switchgrass colonized by *Acidothormus cellulolyticus*. *Appl Biochem Biotechnol* 164:793–803
- Riyadi FA, Alam MZ, Salleh MN, Salleh HM (2017) Optimization of thermostable organic solvent-tolerant lipase production by thermotolerant *Rhizopus* sp. using solid-state fermentation of palm kernel cake. *3 Biotech* 7(5):300
- Salariato D, Diorio LA, Mouso N, Forchiassin F (2010) Extraction and characterization of polygalacturonase of *Fomes sclerodermeus* produced by solid-state fermentation. *Rev Argent Microbiol* 42(1):57–62
- Sayara T, Sarrà M, Sánchez A (2010) Effects of compost stability and contaminant concentration on the bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting. *J Hazard Mater* 179:999–1006
- Silva JN, Godoy MG, Gutarra MLE, Freire DMG (2014) Impact of extraction parameters on the recovery of lipolytic activity from fermented babassu cake. *PLoS One* 9(8):103176
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK (2016) Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* 6(2):174
- Sugumaran KR, Ponnusami V (2017) Conventional optimization of aqueous extraction of pullulan in solid-state fermentation of cassava bagasse and Asian palm kernel. *Biocatal Agric Biotechnol* 10:204–208
- Sun HY, Li J, Zhao P, Peng M (2011) Banana peel: a novel substrate for cellulose production under solid-state fermentation. *Afr J Biotechnol* 77:17887–17890
- Thanapimmetha A, Luadsongkram A, Titapiwatanakun B, Srinophakun P (2012) Value added waste of *Jatropha curcas* residue: optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. *Ind Crop Prod* 37(1):1–5
- The U.S. Department of Agriculture and The U.S. Composting Council (2001) Test methods for the examination of composting and compost. Edaphos International, Houston
- Vardanega R, Remonato D, Arbter F, Polloni A, Rigo E, Ninow JL, Treichel H, de Oliveira D, Di Lucio M (2009) A systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium* sp. *Food Bioprocess Technol* 3(3):461–465
- Volken de Souza CF, Rodrigues RC, Heck JX, Ayub MAZ (2008) Optimization of transglutaminase extraction produced by *Bacillus circulans* BL32 on solid-state cultivation. *J Chem Technol Biotechnol* 83:1306–1313
- Vuong HTH, Tran NM, Tran TTT, Ton NMN, Le VVM (2016) Effects of pH and salt concentration on functional properties of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) seed albumin concentrate. *Int J Food Sci Technol* 51(5):1212–1219
- Zaslona H, Trusek-Holownia A (2015) Enhanced production of polygalacturonase in solid-state fermentation: selection of the process conditions, isolation and partial characterization of the enzyme. *Acta Biochim Pol* 62(4):651–657
- Zhang H, Sang Q (2015) Production and extraction of xylanase and  $\beta$ -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. *Biochem Eng J* 97:101–110

# *Optimization of Down-Stream for Cellulases Produced Under Solid-State Fermentation of Coffee Husk*

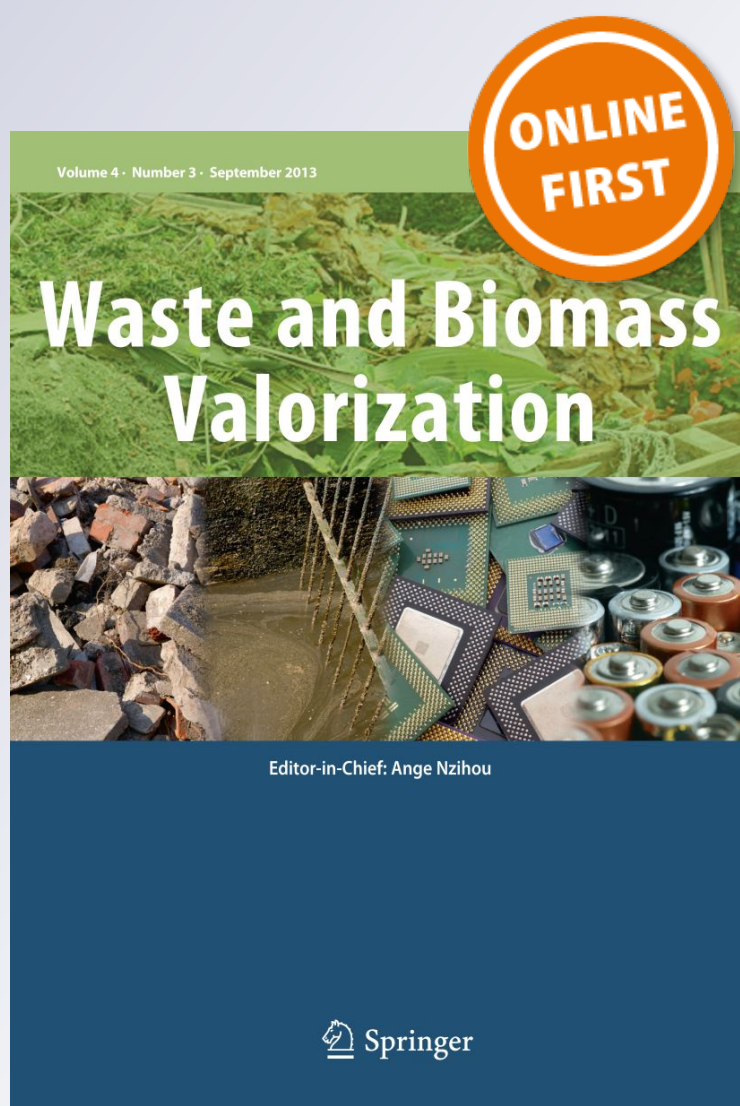
**Maria Marín, Adriana Artola & Antoni Sánchez**

**Waste and Biomass Valorization**

ISSN 1877-2641

Waste Biomass Valor

DOI 10.1007/s12649-018-0327-5



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**





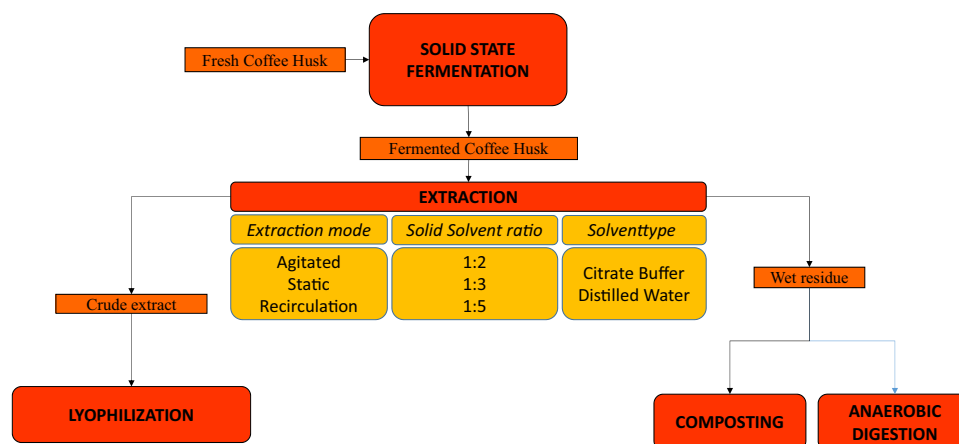
# Optimization of Down-Stream for Cellulases Produced Under Solid-State Fermentation of Coffee Husk

Maria Marín<sup>1</sup> · Adriana Artola<sup>1</sup> · Antoni Sánchez<sup>1</sup>Received: 6 December 2017 / Accepted: 7 May 2018  
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

## Abstract

This work systematically studies the downstream process of the solid state fermentation (SSF) of a mixture of coffee husk and wood chips, inoculated with compost, for cellulase production. Downstream of SSF (at pilot scale) remains as one of the less studied stages of the process, being critical in technical, environmental and economic terms. In this study, the specific downstream points considered were: (i) enzyme extraction yield, in terms of extraction ratio solid:solvent, agitation mode and solvent type; (ii) enzymatic activity recovery of the lyophilised extract and (iii) efficiency of consecutive extractions. Results indicate a maximum activity recovery of  $108 \pm 30\%$  in the extraction performed at ratio 1:5 solid-solvent, in static mode and with distilled water. Statistical analysis revealed a high dispersion of the results and needs to be considered to extract consistent conclusions in any downstream of SSF. Lyophilisation demonstrated to be an adequate technology for enzymatic activity preservation. Regarding consecutive extractions, yield recovery in the first and second extraction maintain a similar value. In a framework of a zero-waste enzyme production process, different strategies have been tested for the remaining solid after extraction. Respirometric tests reveal that it is possible to aerobically stabilize the remaining solid obtaining a compost like material, whereas anaerobic digestion resulted in low methane yields ( $51 \pm 3$  mL methane  $g^{-1}$  VS).

## Graphical Abstract

**Keywords** Cellulase extraction · Activity recovery · Solid state fermentation · Down-stream · Zero waste process✉ Antoni Sánchez  
antoni.sanchez@uab.cat<sup>1</sup> Composting Research Group, Department of Chemical, Biological and Environmental Engineering, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Q, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

## Introduction

Almost 85% of the energy consumed worldwide was obtained from fossil fuels during 2016 [1]. The excessive use of fossil fuels during the last years has produced an

increment of CO<sub>2</sub> level in the atmosphere, which is nowadays reaching an historical maximum of 409 ppm. This rise has a pernicious impact on the global climate creating a greenhouse effect and increasing temperatures around the globe. In the search for new renewable sources of energy, bioproducts like bioethanol are gaining relevance. However, its production process must be optimized in order to achieve a major use compared to fossil fuel. Among the different stages of bioethanol production, hydrolysis of the lignocellulosic material can be performed chemically, by an acid or alkaline reagent, or enzymatically using cellulases, which results in less harsh operational conditions, since most of the enzymes require mild operational conditions, avoiding great energy expenses and corrosion issues [2]. In fact, one of the main uses for cellulases is the conversion of cellulosic and lignocellulosic materials to bioethanol [3, 4]. For this reason, finding a low-cost and robust process for cellulase production is a key point in bioethanol manufacturing.

Cellulases have been in the market for more than 30 years, and they are used in all type of industries. As an example, cellulases have a role in textile industry as biopolishers of fibres or in the pulp and paper field in enzymatic deinking and to improve brightness of the product. Microbial production is the most used method in industry for cellulase production. A wide variety of microorganism like fungi [5], yeast or gram-positive [6] and gram-negative bacteria can be used in the production of cellulase. As a result, the morphology and specificity of the enzyme will depend on the substrate, operational conditions and microorganism used in the production process [7].

Two main methods are used for cellulase production, submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SSF). Both methods show advantages and disadvantages. No gradients of temperature and media composition are found in submerged fermentation. However, solid state fermentation requires smaller and cheaper equipment, which makes it economically attractive; besides, the option of using a lignocellulosic solid waste as a nutrient source and support for the growing of the microorganism increases the profit obtained in an industrial process and reduces the waste disposed into the environment. Several types of agro industrial wastes have been reported as sources of cellulose: Sun et al. [8] used banana peel obtaining a cellulase activity filter paper unit (FPU) of 5.56 FPU per gram of dry matter; Dhillon et al. [9] also reported a cellulase production of 133.68 U g<sup>-1</sup> of dry substrate from apple pomace using *Aspergillus niger* NRRL-567 as inoculum. Other residues used as substrate are wheat straw, corn fibre or seaweed [10, 11]. The mentioned cases were all reported at laboratory scale. Few processes have been developed at a scale large enough to be used for industrial purposes, especially when considering all the downstream process. Cerda et al. [12] reported a cellulase production of 9 FPU of enzyme

activity per gram of dry matter from coffee husk, a residue obtained after the thermal peeling of the coffee bean. In that case, solid state fermentation was carried on under non-sterile conditions and no temperature control at a 4.5 L scale, allowing the consortia of microorganisms present in the residue to develop. Maximum production was observed after 48 h of process. Also, Cerda et al. [12] developed a strategy to obtain a continuous stable production of cellulase from the mentioned residue. This process was tested at pilot scale, obtaining higher temperatures, which caused a decrease in the production, but showing that this strategy was valid for scaling up. These results confirmed coffee husk as a promising low-cost source of cellulase, as it cannot be used as animal feedstock, according to local regulation, and the only possible use would be composting, less profitable than enzyme production.

One of the higher expenses required in solid state fermentation is the extraction of the final product from the solid matrix. In this specific case there is no information regarding recommended extraction agent, ratio solid:liquid for the extraction or agitation method. The optimization of these parameters is not a key point at laboratory scale but at industrial scale will determine the profitability of the process. Also, after the extraction, the solid waste remains, which still can be used in a more profitable way than landfilling. Thus, considering these facts, the current work aims to study different aspects of the downstream process for the production of cellulase from coffee husk, including optimal extraction conditions, taking into account different extraction agents, agitation methods and solid:liquid ratios. Also, the dispose of the solid residue after extraction has been studied, considering its use as feedstock for anaerobic digestion and biogas production, along with the composting of the waste to obtain an organic amendment. Storage of the extracted enzyme was also studied by determining the activity loss of the lyophilised product stored at 4 °C compared to its initial activity.

## Materials and Methods

### Raw Material

Coffee husk was provided by Marcilla S.A (Mollet del Vallès, Barcelona, Spain).

Coffee husk or silverskin was produced during coffee grains roasting. The main physico-chemical characteristics of this waste are summarized in Table 1. The residue was collected within 24 h after its production and stored at -20 °C until needed. During SSF, coffee husk was mixed in a proportion 9:1 (w:w) with compost provided by the waste biological treatment plant of the Consorci per a la Gestió dels Residus del Vallès Oriental (Granollers, Barcelona,

**Table 1** Characterization of wastes used as substrates in SSF

Parameter	Coffee husk	Compost	Mixture <sup>b</sup>
pH	6.4 ± 0.1	7.6 ± 0.5	6.7 ± 0.4
CE (mS cm <sup>-1</sup> )	n.m	6.3 ± 0.2	n.m
Moisture (% , wb)	60.2 ± 0.6	35 ± 1	61 ± 1
Dry mater (% , wb)	40.1 ± 0.4	64 ± 1	39 ± 1
Organic matter <sup>a</sup> (% , db)	90.21 ± 0.01	n.m	90
Total C <sup>a</sup> (% , db)	80.1	n.m	n.m
Total N <sup>a</sup> (% , db)	3.5	n.m	n.m
C/N ratio	22.9 ± 0.1	n.m	n.m
Bulk density <sup>a</sup> (g L <sup>-1</sup> )	238.1	n.m	358
Air filled porosity <sup>a</sup> (%)	78.9	n.m	77.2
Reducing sugars (% , db)	0.65 ± 0.01	n.m	n.m
Glucose (% , db)	0.02 ± 0.01	n.m	n.m
Cellulose (% , db)	25.7 ± 0.2	10 ± 1	26 ± 3
Hemicellulose (% , db)	14.6 ± 0.1	10.2 ± 0.1	13.25 ± 0.07
Lignin (% , db)	17.6 ± 0.5	14 ± 1	21.1 ± 1.0

wb Wet basis, db dry basis, n.a not available, AFP Air filled porosity (v/v, percentage in volume). Values are the average of independent experiments and its standard deviation, n.m. not measured

<sup>a</sup>SD < 6%

<sup>b</sup>Mixture of compost and coffee husk at 1:1 weight ratio and bulking agent in a volume ratio 1:1

Spain). Compost was added to increase the initial microbial population.

The mixture of compost and coffee husk was mixed with wood chips as bulking agent to provide an adequate porosity to the final mixture (CH). Wood chips were obtained from Trabede Jorba composting plant (Jorba, Barcelona, Spain), and mixed in a ratio 1:1 (v:v). Moistening of the mixture was not necessary since its value was always near 60% in weight. The suitability of this industrial residue as raw material for cellulase production through SSF has been described for the first time by Cerda et al. [12], where details of the process and cellulase production range are thoroughly provided.

### SSF Materials and Experimental Set up

SSF was carried out in 4.5 and 10 L (working volume) adiabatic reactors, as described in detail in previous works [13, 14]. Both types of reactors were identical in operation. Briefly, air flow was adjusted by an air flow controller (Bronkhorst Hitec, The Netherlands), provided to the bottom of the reactor and evenly distributed by a net placed below the biomass. The oxygen content of output gases was measured by an electrochemical O<sub>2</sub>-A<sub>2</sub> oxygen sensor (Alphasense, United Kingdom) and data were collected using a personal computer HP Compaq LA1951g Intel core ISvpro (Hewlett-Packard, USA), equipped with Ubuntu operation system. Data analysis was carried on by a non-commercial tailor-made software. Temperature was also

measured (Transmisor CCPI/T-120, Seneca, Italy). Air flow was supplied to the reactors assuring that oxygen was always above 10% in output gases through a feedback control system in which two oxygen content set points were fixed: 11.5% as a minimum and 12.5% as maximum. Two values of air flow are set by the user, when oxygen concentration is lower than 11.5%, the system selects the maximum air flow, when oxygen content is higher than 12.5%, the system selects the minimum air flow. Reactors capacity (mass of mixture coffee husk, compost and bulking agent) was 2.7 kg for 10 L reactors and 1.5 kg for 4.5 L reactors.

## Cellulase Activity Recovery: Downstream

### Cellulase Activity Determination: Reference Value

To obtain the total cellulase activity, an extraction in agitated mode at 1:15 solid: solvent ratio and buffer citrate mono hydrated 0.05 M solution at pH 4.8 (BC) as solvent was performed during half an hour. Pirola et al. [15] performed different experiments for cellulase extraction using ratios of 1:3, 1:6 and 1:9 finding that 1:9 was the optimal extraction ratio. Also Chandra et al. [16] found an optimum extraction ratio for β-endoglucanase at 1:4 ratio w:v from fermented wheat bran. In the case of coffee husk we have observed that an extraction ratio of 1:15 w:v guarantees a good contact between solid and liquid to ensure a total extraction of the enzyme [12].

Activity recovery was calculated referring the activity obtained in the extraction at given conditions as a percentage of the activity in the standard extraction, performed at 1:15 ratio, using BC and orbital agitation, according to Eq. 1.

$$\% \text{ Activity recovery} = \frac{100 \times \text{Cellulase activity (Ug}^{-1}\text{DM)}}{\text{Standard cellulase activity (Ug}^{-1}\text{DM)}} \quad (1)$$

Since various replicates of extractions under same experimental conditions (6 or 5 depending on the case) were performed, the rule of 25% was applied, discarding the values that differ more than 25% from the average.

### Extraction Parameters

Extractions were performed to evaluate the recovery of cellulase activity under different experimental conditions.

The experimental parameters assayed were solvent type, extraction mode and w:v solid:solvent (w:v) ratio. The variations of each parameter were:

- Solvent type* Two different solvents were used to perform extractions, distilled water (DW) and BC.

- b) *Extraction mode* The extraction modes were three: (i) no agitation (static mode), (ii) orbital agitation at 120 rpm, and (iii) circulation of the solvent through a column packed with the waste at  $140 \text{ mL min}^{-1}$  ( $8.4 \text{ kg h}^{-1}$ ), which resulted in the renewal of the whole volume of liquid seven times during the extraction time.
- c) *Waste to solvent ratio (weight:volume)* Assayed ratios of solid:solvent were 1:2, 1:3 and 1:5.

The different combinations of these tested variables are shown in Table 2.

Between 150 and 200 g of solid from SSF after 48 h of fermentation were used in every extraction. The solid and the solvent were in contact during half an hour under the different regimes stated above and then the liquid phase decanted and centrifuged during 10 min at 10,000 rpm. Cellulase activity of the supernatant was measured and referred to the value considered the total cellulase activity produced.

Experimental set up for static and agitated mode extraction consist of a set of plastic containers of equal dimension and shape where solvent and solid were placed. Static extraction was performed placing the fermented solid and the chosen volume of solvent in the plastic container and waiting for half an hour. To obtain the extracted liquid in agitated mode, the same procedure was followed but plastic containers were placed in a Sanyo orbital shaker IOC402. XX1.C (Sanyo UK) incubator for half an hour at 120 rpm and room temperature.

**Table 2** Summary of extraction experiments, 30 min extraction time

Extraction method	pH	Conductivity ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	Activity recovery (%)
2-Static-DW <sup>a,b,e,g</sup>	$9.0 \pm 0.2$	$3.6 \pm 0.2$	$84 \pm 22$
2-Agitated-DW <sup>c,d,e,g</sup>	$9.0 \pm 0.2$	$3.8 \pm 0.3$	$56 \pm 14$
2-Static-BC <sup>b,c,f,g</sup>	$6.1 \pm 0.5$	$7.8 \pm 0.5$	$58 \pm 6$
2-Agitated-BC <sup>c,d,e,f,g</sup>	$6.2 \pm 0.9$	$7.9 \pm 0.6$	$56 \pm 12$
3-Static-DW <sup>a</sup>	$9.12 \pm 0.05$	$2.6 \pm 0.2$	$95 \pm 13$
3-Agitated-DW <sup>a,b,d</sup>	$9.11 \pm 0.07$	$2.8 \pm 0.1$	$84 \pm 15$
3-Static-BC <sup>c,d,e</sup>	$5.6 \pm 0.2$	$7.2 \pm 0.5$	$61 \pm 3$
3-Agitated-BC <sup>b,c,g</sup>	$5.9 \pm 0.4$	$7.6 \pm 0.5$	$69 \pm 12$
5-Static-DW <sup>a</sup>	$9.21 \pm 0.09$	$1.5 \pm 0.1$	$108 \pm 30$
5-Agitated-DW <sup>g</sup>	$9.1 \pm 0.1$	$1.9 \pm 0.1$	$50 \pm 7$
5-Static-BC <sup>a,b</sup>	$5.2 \pm 0.1$	$6.9 \pm 0.5$	$83 \pm 18$
5-Agitated-BC <sup>a</sup>	$5.4 \pm 0.1$	$7.2 \pm 0.5$	$103 \pm 17$

Subscript indicates the groups of extractions that are considered equal according to *t* student test

Values are the average of independent experiments

BC Buffer citrate mono hydrate pH 4.8, DW distilled water, 2 extraction ratio 1:2 (w:v), 3 extraction ratio 1:3 (w:v), 5 extraction ratio 1:5 (w:v)

The experimental set up used in liquid recirculation extraction was composed of a peristaltic pump Watson-Marlow 403U/L2 Ultra compact twin channel pump with variable rotor speed from 0 to 99.9 rpm (Watson-Marlow Alitea, England) and a 2 L plastic vessel with two adaptors, one at the top and one at the bottom, connected by plastic tubes to the pump input and output. Inside the vessel, a device was coupled to let the water fall over the biomass in a drop-shower mode, in order to achieve a homogenous contact with the solid in a percolation mode. Fermented material was placed inside the vessel and each solvent added. The flowrate was set up in the pump and liquid circulation lasted for half an hour.

## Number of Extraction Stages

Enzyme recovery from consecutive extraction stages was assayed performing three consecutive extractions to the same fermented material. Between extractions, the biomass was drained to reduce its moisture as much as possible. 1:2 solid:solvent (w:v ratio) was chosen for these experiments. Extractions were performed using the lowest-cost agitation mode and extraction solvent, which are static mode and DW as solvent, respectively, in order to evaluate if this strategy implied an increase in activity recovery with no extra cost.

## Lyophilisation

Supernatant from extractions at 1:2 and 1:5 solid:solvent ratios, in static mode and using BC as extraction agent were used in this experiment. According to Farinas et al. [17] optimum cellulase pH regarding stability is between 4 and 5.5, so BC was selected to preserve the enzyme stability.

Samples of 10 mL of the supernatant obtained from the centrifuged extract were frozen at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  inside plastic falcons and stored at same temperature. On the other hand, 500 mL of same supernatant were frozen at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  into two 250 mL beakers and lyophilized using a Virtis 5L sentry lyophilizer 248627 (Virtis, Gardiner, USA) connected to an Edwards vacuum pump RV5 A653\_01\_903 (Edward, United Kingdom). The beakers used in the experiment were weighted before and after the removal of the powder and the dry cleaning of the beaker. The obtained powder was easily removed from the walls of the flasks so there were no perceptible losses. After that, the remaining powder was mixed and pulverized using a ceramic mortar in order to completely homogenize the solid. Mass of powder obtained from the 500 mL extract was calculated by weigh difference, and the equivalent quantity to 10 mL of original supernatant was dissolved in DW. The remaining powder was stored at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Cellulase activity for the redissolved solid and for an unfrozen sample of 10 mL was measured for comparison using filter paper units (FPU) of activity for the supernatant obtained after extraction for both 1:2 and 1:5 ratios.

## Zero Waste Strategies

### Biomethane Potential (BMP)

Biomass fermented for the production of cellulase was tested after extraction as feedstock for biogas production through anaerobic digestion. Anaerobically digested sludge from a municipal WWTP in Sabadell (Barcelona) was used as inoculum.

The methodology used was a modified method of the protocol described by the German Institute for Standardization and reported by the Ordinance on environmentally compatible storage of waste from human settlements [18], detailed by Ponsá et al. [19]. According to this standard methodology, BMP tests were carried out under mesophilic conditions and during approximately 20–30 days. Inoculum and biomass from SSF were mixed in a feed to inoculum (F:I) final ratio of 0.5 and placed in hermetic closed bottles. Each sample was tested in triplicate. The ratio F:I was calculated based on substrate and inoculum initial amounts of volatile solids (VS). According to Ponsá et al. [19], this ratio is the optimum to maximize biogas production. The content of volatile solids in fermented CH and anaerobic inoculum were measured, obtaining a percentage of 29.8 and 1.1% on a wet basis, respectively. A triplicate with only inoculum was also tested as control and its biogas production subtracted from the sample tests.

All the bottles were placed in an incubator Memmert In750 (Mettler, Germany) working at 37 °C for 21–25 days. The amount of biogas produced was calculated from the biogas pressure, measured by an ISE 30A-01-P vacuum switch ([SMCpneumatics.com](http://SMCpneumatics.com), USA), temperature and headspace volume. The bottles were manually agitated before and after measurement, and biogas was periodically released to avoid overpressure.

Representative measures of methane percentage in the biogas were taken at different days of incubation. Percentages of methane and carbon dioxide in the biogas were measured using a gas chromatograph 5890A with a column 17066\_F ParepackQ (250 °C), support 100/120, tube 3 m 1/8" × 5.5 mm. Initial oven temperature was 70 °C, final oven temperature was 120 °C, determination time was 8 min, injector temperature was 150 °C and detector temperature was 180 °C. Methane peak was detected at 0.8 min. 100 µL of gas sample were required for the analysis.

## Composting Assays

Solid material after SSF and cellulase extraction was stabilized in order to test its suitability as soil organic amendment. Experiments were carried out in 10 L working volume reactors. Reactors have been previously described [13, 20]. The composting process was performed with air supplied under OUR control [14], which ensures maximum O<sub>2</sub> consumption during the experiment.

## Analytical Methods

### Cellulase Activity Determination

Cellulase activity was measured using filter paper analysis as described by Ghose [21].

The extract was centrifuged 10 min at 10,000 rpm and the supernatant was analysed. An activity unit (U) or filter paper unit (FPU) is defined as 1 µg of glucose released in 1 h under the assay conditions.

### Respirometric Tests

In this case, respirometric tests were performed on the residues before and after SSF in order to determine their stability (Ordinance on environmentally compatible storage of waste from human settlements and on biological waste-treatment facilities [18]). A dynamic respirometer constructed following the method described by Adani et al. [22] was used. The experimental device was described by Pognani et al. [23]. According to Gea et al. [24] the test was carried out at a constant temperature of 37 °C. All the experiments were performed in triplicate. Cumulative oxygen demand at 4 days AT<sub>4</sub> (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> dry matter) and Dynamic Respirometric Index, DRI<sub>24</sub> (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> dry matter h<sup>-1</sup>), were calculated [24, 25].

OUR (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> dry matter h<sup>-1</sup>) was calculated during solid state fermentation as a respirometric indicator of the biological activity of the mixture [14]. When obtaining DRI<sub>24</sub>, fermentations are carried on with temperature control at 37 °C, while for OUR calculation, the fermentation is performed with no temperature control. OUR was expressed as the average value after an hour (OUR1h).

### Routine Analytical Methods

pH was calculated by soaking 10 g of sample in 50 mL of distilled water. After 30 min, pH value was measured with a pH meter Crison micro pH 2001. VS moisture content, total organic carbon (TOC), total Kjeldahl nitrogen,



(TKN) and soluble  $\text{N-NH}_4^+$  were measured according to TMECC [26].

TOC was determined using an O.I. Analytical Solid TOC Analyser/Win TOC Solids v3.0, and TKN was measured using a Bloc Digester 6 (with six tubes capacity) (J.P. Selecta S.A., Barcelona, Spain) and a Büchi Distillation Unit K-355 (Flawil, CH). Fibre content (lignin, cellulose and hemicellulose) was determined by the method of Van Soest et al. [27]. Reducing sugars were determined using the method described by Miller et al. [28]. Air filled porosity was calculated using an air pycnometer, as described by Ruggieri et al. [29].

## Statistics

*T* student mean analysis comparison was performed to compare the mean values of activity recovery obtained under different experimental conditions. Also, three way ANOVA analysis was performed. Sigmaplot 11.0 (Systat software, Inc) was used for all the calculations. Linear regression of the data using Microsoft Excel 2013 was also performed.

## Results and Discussion

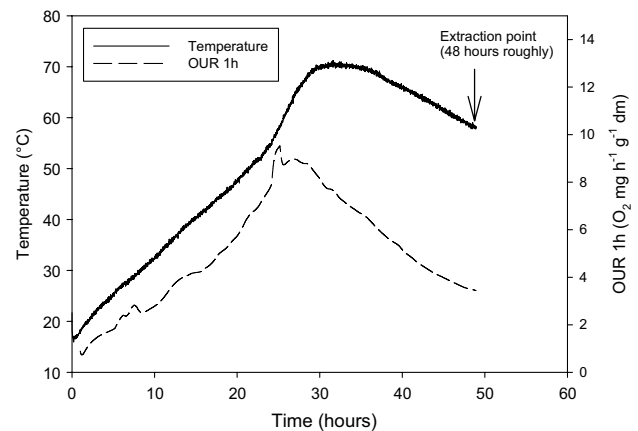
### Waste Characterization

Table 1 shows the characterization of the waste. Moisture was adequate for solid state fermentation since it falls within the recommended values of 40–70%. Krishna et al. [30] reported a range as wide as 20–70% for fungi growth and higher than 80% for bacteria, so no extra moistening was needed. Air filled porosity (AFP) was also adequate to ensure total aeration during the process. Ruggieri et al. [29] reported that the recommended AFP value is highly dependent on the material, and can vary from 30 to 60%. Albuquerque et al. [31] found that due to the wide variety of methods for measuring AFP, the same measurement can vary between 26 and 61%, so 77% obtained for coffee husk and bulking agent is acceptable. As the objective of the work was the production of cellulase, coffee husk fibres content was determined. According to literature, measured cellulose content in some lignocellulosic substrates for bioethanol production was within 32–47, 34–45 and 42% for rice straw, wheat straw and corn straw [32], respectively, so the percentage of fibrous material present in coffee husk makes it suitable for cellulase production. As for the biodegradability of the residue, initial respirometric values on Table 3 show that the raw material is not stable and it can be aerobically degraded [18].

**Table 3** Result of respirometric assay. Final SSF values are initial composting values

	$\text{AT}_4$ ( $\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM}$ )	$\text{DRI}_{24}$ ( $\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ )
Fresh material	$86 \pm 23$	$1.6 \pm 0.2$
48 h of SSF—before extraction	$86 \pm 17$	$1.3 \pm 0.3$
7 days of SSF—before extraction	$59 \pm 21$	$0.7 \pm 0.3$
48 h of SSF—after extraction	$47 \pm 7$	$0.70 \pm 0.06$
Stabilized (previous extraction)	$29 \pm 5$	$0.33 \pm 0.04$
Stabilized (no previous extraction)	$20.0 \pm 0.7$	$0.29 \pm 0.01$

All values are the average of independent experiments



**Fig. 1** Temperature (solid line) and OUR1h (dotted line) profiles of CH solid state fermentation

### Solid State Fermentation

Figure 1 shows an example of the temperature and OUR1h profiles of a fermentation process performed in 10 L working volume reactors. At 48 h roughly, according to Cerda et al. [12], the maximum enzymatic activity was reached. Cerda et al. [12] also proved that maximum OUR1h and maximum cellulase activity were achieved simultaneously. Temperatures reached 70 °C in the thermophilic range. Maximum OUR1h achieved was  $9 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ DM}$ . It was observed that the fermentation process is highly reproducible, as the differences in temperature profiles among all replicates were not higher than 6%, presenting an average value of  $98.7 \text{ }^\circ\text{C day}$  (area below temperature curve). Oxygen consumption, on the other hand, presented a maximum deviation of almost 50% of the mean value, which was  $1.5 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ wet matter (WM)}$ . This parameter was calculated for each solid state fermentation process as total amount of oxygen consumed (mg) divided by process time (h) and initial quantity of wet matter inside the reactor (g). Mean value of oxygen consumption was calculated as an average of the values

obtained in the performed fermentations. Values of oxygen consumption seem to be related to the obtained cellulase activity extracted in standard conditions (1:15 ratio, BC, agitated mode). The highest cellulase activity value was obtained in fermentation processes presenting the highest oxygen consumption, which were  $1.3 \pm 0.2$  FPU  $g^{-1}$  DM corresponding to  $2.3$  mg  $O_2$   $h^{-1}$   $g^{-1}$  WM. Jimenez-Peñalver et al. [33] reported a correlation between sophorolipids production yield by *Starmerella bombicola* in winterization oil cake and oxygen consumption. Among the fermentations performed, a case was found where correlation between cellulase activity and oxygen consumption was not observed ( $0.45 \pm 0.07$  FPU  $g^{-1}$  DM corresponding to  $1.7$  mg  $O_2$   $h^{-1}$   $g^{-1}$  WM). However, when extractions under different conditions using this fermented solid were performed and the cellulase activity was compared to the standard, the highest percentage of activity recovery was obtained, indicating that probably extraction at 1:15 (w:v) did not have the proper efficiency in this case. This can be due to the heterogeneity of the material and the size of the sample extracted as standard.

## Cellulase Activity Recovery: Downstream

### Extraction Method

After 48 h of fermentation the process was interrupted and different extraction strategies were performed on quantities of material between 160 and 200 g, under different conditions. Table 2 shows the combination of the different extraction parameters and the activity recovery obtained, as well as the pH and conductivity of each extract. *t* student test was performed comparing the means of the activity recovery values for each experimental condition. Results of the test are also presented in Table 2.

As observed, the most favourable extraction mode, according to Table 2, was the one performed at 1:5 ratio in static mode using DW as extraction solvent with an activity recovery of  $108 \pm 30\%$ . The less favourable conditions, according to Table 2, are at a ratio 1:5 and DW as extractant but in agitated mode. As *t* test showed, no differences due to extraction method can be appreciated between the means of 5-Static-DW, 5-Agitated-CB, 3-StaticDW, 3-Agitated-DW, 2-Static-DW and 5-Static-CB, being all equal to 5-Static-DW. This group of extraction methods that present higher activity recovery include the combinations in which DW and static agitation mode were used, which would be the most favourable conditions from an economic point of view. Linear regression carried out with the obtained results showed a very low correlation coefficient. Coefficients for each variable indicate that the most relevant extraction parameter is the extraction ratio, being 1:5 the most favourable one. On

the other hand, solvent type is the less influencing parameter. This result agrees with that deduced from *t* student test. According to these results, it is clear that solubility of the produced cellulase is not diminished by the difference in pH observed between BC extract and DW extract. On the contrary, higher pH seems to have a positive influence in the extraction yield. Rezaei et al. [34] reported buffer containing 50 mM sodium acetate at pH 5 to have a positive effect on the recovery of commercial fungal-derived cellulase amended to switchgrass and a negative effect in the recovery of the same enzyme from solid state fermentation samples colonized by the bacterium *Acidothermus cellulolyticus*.

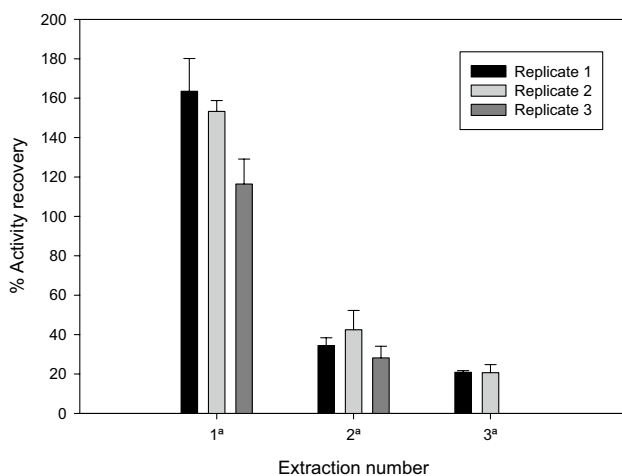
In the particular case of the extraction of cellulase from a solid matrix of fermented coffee husk it is clear that BC has no positive effect compared to DW extraction. Singh et al. [35] asserted that the ideal buffer would be selective and preferable of the same pH of the fermented substrate. As observed in Table 2, pH of the solid matrix, which corresponds to 5-Agitated-DW experiment, is very similar to the pH achieved in all extractions with DW, where pH value depended only on the electrolytes from the solid matrix, contrarily to what happens with BC extract, which pH is close to six in all cases, due to the buffer effect of citrate. Comparing initial pH of DW and BC, DW pH is closer to that value. Regarding this, Bera et al. [36] presented the extraction of amylase at different pHs ranging from 2 to 12 and observed no statistical significant differences among the results.

According to the data obtained, both agitated and static methods provide an adequate contact between solid and solvent. This can be due to the small size of the coffee husk particles, and consequently no aggregates were formed once in contact with the liquid. Singh et al. [35] reported no differences between static and agitated (220 rpm) extraction modes for pectinase from bran, and only an increase of viscosity and colour in the extract. On the other hand, Shata et al. [37] reported a yield in milk-clotting (proteins) extraction from also bran of  $3000$  U  $g^{-1}$  in agitated extraction in front of  $500$  U  $g^{-1}$  in static extraction. Therefore, agitation requirements seem to be highly dependent on the type of enzyme. In the case of coffee husk and cellulase extraction, agitation mode has a low influence in the activity recovery yield.

Three independent extractions were performed in recirculated mode with DW as solvent and ratio 1:3 solid:liquid, with seven times the recirculation of the whole volume of liquid. Also, another three independent extractions were performed using fermented coffee husk from the same process in agitated mode at same ratio and with DW as solvent. Activity recovery for both extraction modes was calculated, obtaining a  $98 \pm 1\%$  of activity recovery for the agitated mode and a  $93.0 \pm 0.7\%$  for the recirculated mode, showing that no improvement is achieved with recirculation.

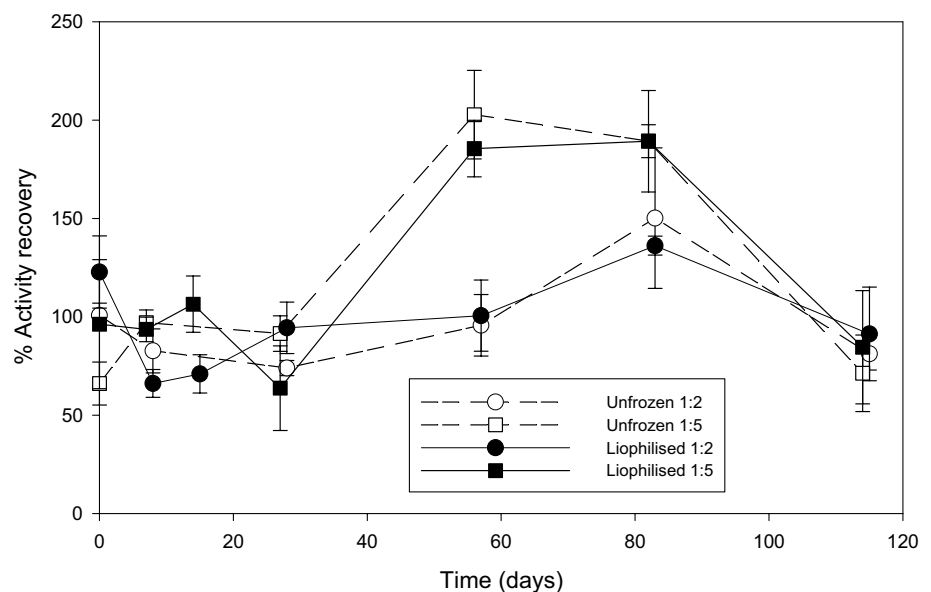
## Number of Extraction Stages

Three extractions in static mode, ratio 1:2 and DW as a solvent were performed and the cellulase activity compared to the standard in order to calculate activity recovery. Figure 2 shows cellulase activity recovery in those extractions. As it can be seen, although fermented material came from the same process, one of the replicates differs significantly from the others. One explanation could be the heterogeneity of the material, with an irregular distribution of the bulking agent. A decrease in the activity recovery through the different extraction stages is observed, but a total activity recovery after three extractions of 215% was observed in two of the replicates and a 144% for the remaining one. Activity



**Fig. 2** Percentage of activity recovery of three consecutive extractions over the same solid. Three independent experiments are showed

**Fig. 3** Percentage of activity recovery of: lyophilised samples of CH extracted in static mode, using BC and ratio 1:2 (w:v) (circles), 1:5 (w:v) (diamonds) and unfrozen samples of CH extracted in static mode, using BC and ratio 1:2 (w:v) (triangles), 1:5 (w:v) (squares)



recovery in the second extraction represents a percentage between 20 and 27% of the activity recovered in the first extraction. In the case of the second replicate. Pirota et al. [15] performed consecutive endoglucanase extractions over the same bran with DW reporting a 75% of recovery in the first extraction and almost a 25% in the second and third. Compared to the results obtained in this work, first extraction has a similar yield than in this case. Diaz et al. [38] reported consecutive extractions of exo-polygalacturonase from fermented grape pomace obtaining almost the same extraction yield up to the fourth extraction, needing at least six extractions in order to recover all the enzyme. Although enzyme can be recovered up to third extraction, the enzyme obtained will be much diluted already at the second extraction, which represents increasing costs in processing the extract for lesser yield. According to these data, it is recommended to perform only one extraction.

## Lyophilisation and Activity Preservation

Enzymatic activity conservation in the lyophilized product was assessed during 115 days. The activity of the resuspended lyophilized enzyme and that of frozen samples were compared to the activity of fresh extract. The weight of remaining powder obtained was 10.881 g for 500 mL of 2-Static-BC lyophilized extract and 8.413 g for 5-Static-BC.

Figure 3 shows the activity recovery of lyophilized and frozen extract compared to the activity of the fresh one. For the samples obtained in the 1:2 (w:v) extraction ratio, the activity recovery presented an initial drop of 20% and afterwards presented values overpassing the 100% activity recovery in the last measures. Activity losses can appear in every step from freezing to rehydration. Hédoux et al. [39]



reported structural changes in protein lyophilisation after drying step, although the changes in secondary structure were reversible after rehydration. Also, other parameters of the lyophilisation process can affect the subsequent activity recovery, Passot et al. [40] reported that nucleation control by different techniques can improve activity preservation.

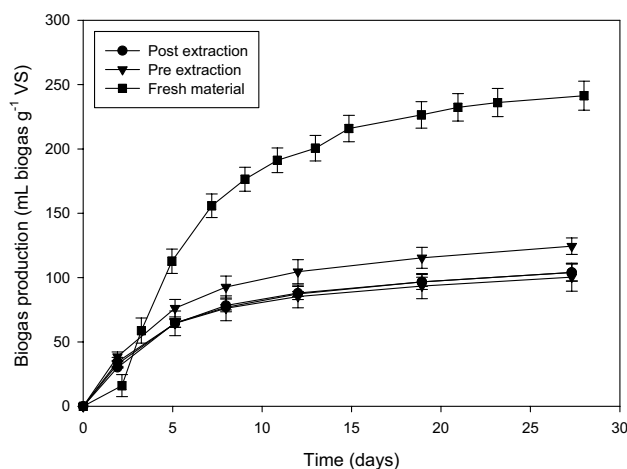
In our case, values from lyophilised and unfrozen samples can be considered equal, thus, there is no activity loss during the dehydration process. The observed initial losses can be due to the freezing process and to the error associated to the cellulase determination method, as they are observed in both frozen and lyophilised samples. When comparing lyophilisation and freezing as conservation methods, lyophilisation presents some advantages which are: the concentration of the enzyme facilitating its use and the reduction of the space required for storing and the storage at not very low temperatures for its conservation. For this reason, lyophilisation should be chosen as a preservation method.

## Zero Waste Strategies

### Biomethane Potential

Bio methane potential (BMP) was assayed using extracted CH as feedstock to evaluate the suitability of the residue after cellulase extraction for the production of biogas. Experiments were carried out during 21 days and biogas produced and methane content were measured. Although recommended ratio of inoculation according to Ponsá et al. [19] is 1:2 F:I (1 g of VS of feedstock per 2 g of VS of inoculum), a first experiment was carried out using different ratios F:I. As the anaerobic biodegradability of this residue had not been measured before, it was necessary to verify that a higher or lower F:I ratio was not needed in order to have an adequate biogas production. Ratios assayed were four; 1:1; 1:1.5; 1:2; 1:2.5 (g of VS of feedstock: g of VS of Inoculum). After 21 days of incubation, biogas production was  $96 \pm 10$ ,

$107 \pm 7$ ,  $128 \pm 10$  and  $138 \pm 6$  mL biogas  $g^{-1}$  VS respectively for the mentioned ratios. In view of the results obtained, ratio 1:2 (also according to Ponsá et al. [19]) was selected for future experiments. In the next set of biogas potential tests, fermented CH after and before extraction from two different fermentation processes was used as anaerobic feedstock in a ratio 1:2 F:I. Tests were performed in triplicate. Biogas and methane productions are shown in Table 4. After 27 days of anaerobic digestion at 37 °C biogas production for fermented material after extraction was  $104 \pm 7$  mL biogas  $g^{-1}$  VS in both cases, and  $124 \pm 6$  and  $100 \pm 11$  mL biogas  $g^{-1}$  VS for the fermented material before extraction, respectively. As for methane production, extracted samples after 27 days produced  $40 \pm 8$  and  $51 \pm 3$  mL methane  $g^{-1}$  VS and for non-previously extracted samples the methane production was  $52 \pm 3$  and  $54 \pm 6$  mL methane  $g^{-1}$  VS respectively. Considering the standard deviation, methane production can be



**Fig. 4** Biogas production from anaerobic digestion of fresh coffee husk (squares), fermented coffee husk before extraction (triangles) and fermented coffee husk after extraction (circles). For materials before and after extraction, two independent fermentations were evaluated

**Table 4** Biogas production of coffee husk anaerobic digestion

	Fresh material	Before extraction		After extraction	
		Fermentation 1	Fermentation 2	Fermentation 1	Fermentation 2
Biogas production (mL $g^{-1}$ VS)	$241 \pm 11$	$124 \pm 6$	$100 \pm 11$	$104 \pm 7$	$104 \pm 7$
Methane production (mL $g^{-1}$ VS)	$141 \pm 7$	$52 \pm 3$	$54 \pm 6$	$40 \pm 8$	$51 \pm 3$

All values are the average of triplicate measurements

For the materials before and after extraction, two independent fermentations were evaluated for biogas and methane production

considered equal for all samples. As shown in Fig. 4, in all cases, more than the 85% of the production was measured during the first 15 days of digestion, which indicates that the length of the process is adequate, since production remarkably decreased from that moment. Regarding biogas production, comparing this material to fresh lignocellulosic materials used as a feedstock for anaerobic digestion such as rice straw, hazelnut skin and cocoa shell, they have been reported to produce  $207 \pm 22.1$ ,  $223 \pm 25.1$  and  $199 \pm 22.4$  mL  $\text{CH}_4$   $\text{g}^{-1}$  VS [41], respectively, whereas other lignocellulosic materials as ley, straw or blue mussels produced between 190 and 330 mL  $\text{CH}_4$   $\text{g}^{-1}$  VS [42]. The low production of methane by coffee husk can be due to the presence of bulking agent in the mixture, which is not easily biodegradable and does not contribute to the production of biogas. Also, coffee husk is generated during the roasting process of coffee grains, which can lead to an easily biodegradable matter loss. Fresh coffee husk itself produced  $241 \pm 11$  mL biogas  $\text{g}^{-1}$  SV and  $141 \pm 7$  mL  $\text{CH}_4$   $\text{g}^{-1}$  SV after 28 days of incubation, half of the amount produced by fresh lignocellulosic wastes with no previous roasting. Lee et al. [43] reported different profile in volatile gases during fermentation of coffees with different degree of roasting. Moreover, loss of soluble biodegradable mater also occurs during the extraction of cellulase.

## Composting

Once the extraction was carried out, the remaining solid waste was stabilized in order to obtain a compost-like material adequate as agricultural amendment, closing the cycle and following a zero waste strategy.

As described previously, solid state fermentations lasted 48 h before being stopped and extraction performed. The remaining solid after extraction was pressed manually in order to remove the maximum amount of moisture. However, the final measured moisture varied between 71 and 75% in weigh, higher than the recommended values for composting, which should be in the range of 40–60% [44]. Three replicates of the composting process were performed, using 10 L working volume reactors. Also, a 10 L reactor was run containing fermented material without extraction in order to compare both materials. Oxygen consumption for the non-extracted sample was  $12.5 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM day}^{-1}$ , higher than that of the extracted sample of the same fermentation experiment, which was  $4.3 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM day}^{-1}$ . Similar values were measured in the rest of the composting processes, being  $4.57$  and  $4.43 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM day}^{-1}$ . Hygenization temperatures were reached, maximum temperature measured was around  $40^\circ\text{C}$ . However, non-extracted material reached temperatures above  $50^\circ\text{C}$  for 24 h approximately. Differences in biological activity of non-extracted material and extracted material can be due to the loss of soluble biodegradable

material during the extraction process, since particle size of coffee husk was measured, presenting values between 1.6 mm and  $710 \mu\text{m}$ . Also, biological activity could be hampered by the high moisture of the material after extraction [45]. Table 3 shows the respirometric values measured during the different steps of the process. It is observed that the stability of the waste was reached after 15 days of composting with values of  $\text{DRI}_{24}$  of  $0.33 \pm 0.04 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$  and  $\text{AT}_4$  of  $29 \pm 5 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM}$ . These values were very similar to the ones obtained from a mature compost sample [46]. Waste used in SSF with no extraction was also stable after 7 days of fermentation with values of  $\text{DRI}_{24}$  and  $\text{AT}_4$  of  $0.7 \pm 0.3 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$  and  $59 \pm 21 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM}$  respectively. pH was measured for one replicate, presenting values between 8 and 8.5, which are like those of final compost.

## Comparison of Anaerobic Digestion and Composting

According to coffee production companies, approximately 1% of the weight of final product ends up as coffee husk. In the case of the coffee husk supplier of this study, around  $180 \text{ ty}^{-1}$  of coffee husk are produced. According to our results, anaerobic digestion of this fermented coffee husk would represent a production of approximately 3.6 kW of electric power (considering the methane content of the biogas, yield of biogas conversion to electricity, etc.). Although in the case of composting no electricity is generated and there is a net consumption of energy, Zulkepli et al. [47] compared the investment required by an anaerobic digestion plant and by a composting plant for the treatment of municipal solid waste finding that capital cost was for the anaerobic digestion plant is 20 times higher than for the composting plant. In view of these facts, composting would be recommended in the present study as a low cost technology given that the production of electricity from biogas is lower than those reported for other organic wastes. However, anaerobic codigestion could be considered if other wastes with higher biogas production are available to be treated with coffee husk fermented residues.

## Conclusion

Different aspects of the downstream stage in the production of cellulase through solid state fermentation of coffee husk were assessed in this work. Extraction parameters as solid:solvent ratio, agitation mode and type of solvent seem to have low influence in the total activity recovery. Buffering effect of citrate solution does not present any advantage over distillate water on enzyme solubility. Contact between solid and solvent appears to be adequate independently of the agitation provided. Although maximum activity recovery was

108 ± 30% performing the extraction under 1:5 w:v ratio, static mode and distilled water as solvent, statistically equal result was obtained using 1:2 w:v ratio.

Activity loss after lyophilisation is not observed, as values oscillate around 100% recovery during the first 50 days of lyophilized material storage. For the aerobic stabilization of the extracted material, water can hamper the process, thus, a previous drying step is recommended. At the end of the stabilization process a compost-like product is obtained, which can be used as organic amendment. Biogas production resulted in low values compared with other agricultural wastes. Therefore, anaerobic digestion of the residue is recommended in co-digestion with higher anaerobically biodegradable residues.

In summary, a detailed process to optimize the production of cellulase from lignocellulosic wastes is presented, considering the overall process from SSF to a final lyophilized product. The strategies to manage the spent material after extraction are also presented for a zero waste process.

**Acknowledgements** The authors would like to thank the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, which gave financial support (Project CTM2015-69513-R) to this work. Maria Marín also thanks the Universitat Autònoma de Barcelona for a predoctoral scholarship.

## References

- British Petroleum plc.: [http://www.bp.com/es\\_es/spain/prensa/notas-de-prensa/2016/bp-statistical-review-world-energy-2016.html](http://www.bp.com/es_es/spain/prensa/notas-de-prensa/2016/bp-statistical-review-world-energy-2016.html). Accessed 10 July 2017
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A.: Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res.* <https://doi.org/10.4061/2011/280696> (2011)
- Cherian, E., Dharmendirakumar, M., Baskar, G.: Immobilization of cellulase onto MnO<sub>2</sub> nanoparticles for bioethanol production by enhanced hydrolysis of agricultural waste. *Chin. J. Catal.* **36**(8), 1223–1229 (2015)
- Idris, A.S.O., Pandey, A., Rao, S.S., Sukumaran, R.K.: Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from *Sorghum* stover. *Bioresour. Technol.* **242**, 265–271 (2017)
- Li, Y.H., Zhang, X.Y., Xiong, L., Mehmood, M.A., Zhao, X.Q., Bai, F.W.: On-site cellulase production and efficient saccharification of corn stover employing cbh2 overexpressing *Trichoderma reesei* with novel induction system. *Bioresour. Technol.* **238**, 643–649 (2017)
- Oke, A.M., Suffian, M., Annuar, M., Simarani, K.: Mixed lignocellulosic biomass degradation and utilization for bacterial cellulase production. *Waste Biomass Valoriz.* **8**(3), 893–903 (2017)
- Saini, A., Aggarwal, N.K., Yadav, A.: Cost-effective cellulase production using parthenium hysterophorus biomass as an unconventional lignocellulosic substrate. *3 Biotech* **7**(1), 1–11 (2017)
- Sun, H.Y., Li, J.H., Zhao, P.J., Peng, M.: Banana peel: a novel substrate for cellulase production under solid-state fermentation. *Afr. J. Biotechnol.* **10**(77), 17887–17890 (2011)
- Dhillon, G.S., Kaur, S., Brar, S.K., Verma, M.: Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Ind. Crop Prod.* **38**, 6–13 (2012)
- Yoon, L.W., Ang, T.N., Ngho, G.C., Chua, A.S.M.: Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass Bioenergy* **67**, 319–338 (2014)
- Trivedi, N., Reddy, C.R.K., Radulovich, R., Jha, B.: Solid state fermentation (ssf)-derived cellulase for saccharification of the Green Seaweed *Ulva* for bioethanol production. *Algal Res.* **9**, 48–54 (2015)
- Cerda, A., Gea, T., Vargas-Garcia, M.C., Sanchez, A.: Towards a competitive solid state fermentation: cellulases production from coffee husk by sequential batch operation and role of microbial diversity. *Sci. Total Environ.* **589**, 56–65 (2017)
- Maulini-Duran, C., Puyuelo, B., Artola, A., Font, X., Sanchez, A., Gea, T.: VOC emissions from the composting of the organic fraction of municipal solid waste using standard and advanced aeration strategies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **89**(4), 579–586 (2014)
- Puyuelo, B., Gea, T., Sanchez, A.: A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate. *Chem. Eng. J.* **165**(1), 161–169 (2010)
- Pirota, R.D.P.B., Miotto, L.S., Delabona, P.S., Farinas, C.S.: Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. *Braz. J. Chem. Eng.* **30**(1), 117–123 (2013)
- Chandra, M.S., Viswanath, B., Reddy, B.R.: Optimization of extraction of  $\beta$ -endoglucanase from the fermented bran of *Aspergillus niger*. *Indian J. Microbiol.* **50**(1), 122–126 (2010)
- Farinas, C.S., Loyo, M.M., Junior, B.A., Tardioli, P.W., Neto, V.B., Couri, V.: Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperatura. *New Biotechnol.* **27**(6), 810–815 (2010)
- German Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety, Ordinance on environmentally compatible storage of waste from human settlements and on biological waste treatment facilities of 20 February (2001). [http://www.bmu.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/ablagerung\\_sverordnung.pdf](http://www.bmu.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/ablagerung_sverordnung.pdf). Accessed 25 July 2017
- Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A.: Anaerobic co-digestion of the organic fraction of municipal solid waste with several pure organic co-substrates. *Biosyst. Eng.* **108**(4), 352–360 (2011)
- Sayara, T., Sarrà, M., Sánchez, A.: Effects of compost stability and contaminant concentration on the bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting. *J. Hazard. Mater.* **179**(1–3), 999–1006 (2010)
- Ghose, T.K.: Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* **59**(2), 257–268 (1987)
- Adani, F., Gigliotti, G., Valentini, F., Laraia, R.: Respiration index determination: a comparative study of different methods. *Compost. Sci. Util.* **11**(2), 144–151 (2003)
- Pognani, M., Barrena, R., Font, X., Adani, F., Scaglia, B., Sanchez, A.: Evolution of organic matter in a full-scale composting plant for the treatment of sewage sludge and biowaste by respiration techniques and pyrolysis-GC/MS. *Bioresour. Technol.* **102**(6), 4536–4543 (2011)
- Gea, T., Barrena, R., Artola, A., Sanchez, A.: Monitoring the biological activity of the composting process: oxygen uptake rate (OUR), respirometric index (RI), and respiratory quotient (RQ). *Biotechnol. Bioeng.* **88**(4), 520–527 (2004)
- Almeira, N., Komilis, D., Barrena, R., Gea, T., Sánchez, A.: The importance of aeration mode and flowrate in the determination of the biological activity and stability of organic wastes by respiration indices. *Bioresour. Technol.* **196**, 256–262 (2015)
- The U.S. Department of Agriculture and The U.S. Composting Council: Test Methods for the Examination of Composting and Compost. Edaphos International, Houston (2001)

27. Van Soest, P., Robertson, J., Lewis, B.: Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **74**(10), 3583–3597 (1991)
28. Miller, G.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**(3), 426–428 (1959)
29. Ruggieri, L., Gea, T., Artola, A., Sanchez, A.: Air filled porosity measurements by air pycnometry in the composting process: a review and a correlation analysis. *Bioresour. Technol.* **100**(10), 2655–2666 (2009)
30. Krishna, C.: Solid-state fermentation systems: an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* **25**(1–2), 1–30 (2005)
31. Albuquerque, J.A., McCartney, D., Yu, S., Brown, L., Leonard, J.J.: Air space in composting research: a literature review. *Compost. Sci. Util.* **16**(3), 159–170 (2008)
32. Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K.: Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renew Energ* **37**, 19–27 (2012)
33. Jimenez-Penalver, P., Gea, T., Sanchez, A., Font, X.: Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: optimization, monitoring and effect of mixing. *Biochem. Eng. J.* **115**, 93–100 (2016)
34. Rezaei, F., Joh, L.D., Kashima, H., Reddy, A.P., VanderGheynst, J.S.: Selection of conditions for cellulase and xylanase extraction from switchgrass colonized by *Acidothermus cellulolyticus*. *Appl Biochem. Biotech.* **164**(6), 793–803 (2011)
35. Singh, S.A., Ramakrishna, M., Appu Rao, A.G.: Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochem.* **35**(3–4), 411–417 (1999)
36. Bera, M.B., Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, B.: Application of reverse micelle extraction process for amylase recovery using response surface methodology. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **31**(4), 379–384 (2008)
37. Shata, H.M.A.: Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. *Pol J Microbiol* **54**(3), 241–247 (2005)
38. Díaz, A.B., Caro, I., de Ory, I., Blandino, A.: Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 302–306 (2007)
39. Hédoux, A., Paccou, L., Achir, S., Guinet, Y.: In situ monitoring of proteins during lyophilization using micro-Raman spectroscopy: a description of structural changes induced by dehydration. *J. Pharm. Sci.* **101**(7), 2316–2326 (2012)
40. Passot, S., Trelea, I.C., Marin, M., Galan, M., Morris, G.J., Fonseca, F.: Effect of controlled ice nucleation on primary drying stage and protein recovery in vials cooled in a modified freeze-dryer. *J. Biomech. Eng.* **131**(7), 74511 (2009)
41. Mancini, G., Papirio, S., Lens, P.N.L., Esposito, G.: Effect of N-methylmorpholine- N-oxide pretreatment on biogas production from rice straw, cocoa shell, and hazelnut skin. *Environ. Eng. Sci.* **33**(11), 843–850 (2016)
42. Ammenberg, J., Feiz, R.: Assessment of feedstocks for biogas production, part II: results for strategic decision making. *Resour. Conserv. Recycl.* **122**, 388–404 (2017)
43. Lee, L.W., Tay, G.Y., Cheong, M.W., Curran, P., Yu, B., Liu, S.Q.: Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: II. Roasted coffee. *Lebensm-Wiss Technol.* **80**, 32–42 (2017)
44. Kim, E., Lee, D.H., Won, S., Ahn, H.: Evaluation of optimum moisture content for composting of beef manure and bedding material mixtures using oxygen uptake measurement. *Asian Austral. J. Anim.* **29**(5), 753–758 (2016)
45. Richard, T.L., Hamelers, H.V.M., Veeken, A., Silva, T.: Moisture relationships in composting processes. *Compost. Sci. Util.* **10**(4), 286–302 (2002)
46. Komilis, D., Kanellos, D.: A modified dynamic respiration test to assess compost stability: effect of sample size and air flowrate. *Bioresour. Technol.* **117**, 300–309 (2012)
47. Zulkepli, N.E., Muis, Z.A., Mahmood, N.A.N., Hashim, H., Ho, W.S.: Cost benefit analysis of composting and anaerobic digestion in a community: a review. *Chem. Eng. Trans.* **56**, 1777–1782 (2017)

Environmental Management

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected lignocellulosic wastes

Article Type: Research Article

Keywords: Agro-industrial waste; Cellulase production; Cellulase recovery; Solid state fermentation; Zero waste strategy.

Corresponding Author: Dr. Adriana Artola, PhD

Corresponding Author's Institution: Universitat Autònoma de Barcelona

First Author: Maria Marín

Order of Authors: Maria Marín; Antoni Sánchez; Adriana Artola, PhD

**Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected  
lignocellulosic wastes**

Maria Marín, Adriana Artola\*, Antoni Sánchez

Composting Research Group

Department of Chemical, Biological and Environmental Engineering

Universitat Autònoma de Barcelona

Edifici Q, Campus de Bellaterra, 08193- Cerdanyola del Vallès, Spain

\*Corresponding author: Adriana Artola

Tel.: +34 935814480; Fax: +34 935812013

Email address: [adriana.artola@uab.cat](mailto:adriana.artola@uab.cat)

**Abstract**

Orange peel, apple pomace and rice fibre from vegetal beverage manufacturing were assessed for the production of cellulase through solid state fermentation (SSF). No increment in cellulase activity was observed during SSF, being the maximum activity that of the raw waste  $8 \pm 1$ ,  $7.8 \pm 0.1$  and  $2.1 \pm 0.2$  International units (IU)  $g^{-1}$  Dry Matter for apple pomace, orange peel and rice fibre, respectively. In view of the results, the influence of the main cellulase extraction parameters in the activity recovery from raw waste was assessed. Results show a maximum activity recovery of  $105 \pm 27\%$  for apple pomace in an extraction ratio 1:2 (w:v) using distilled water as extracting agent.  $97 \pm 13\%$  and  $139 \pm 11\%$  activity recovery for orange peel and rice fibre, respectively, were achieved at 1:3 (w:v) extraction ratio and distilled water with no agitation. Finally, zero waste strategies (aerobic stabilization and anaerobic digestion) were successfully applied to valorise the remaining waste after extraction.

Bellaterra (Barcelona), April 2018

*Journal of Environmental Management*  
Editor

Dear Editor,

We enclose our manuscript “**Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected lignocellulosic wastes**”.

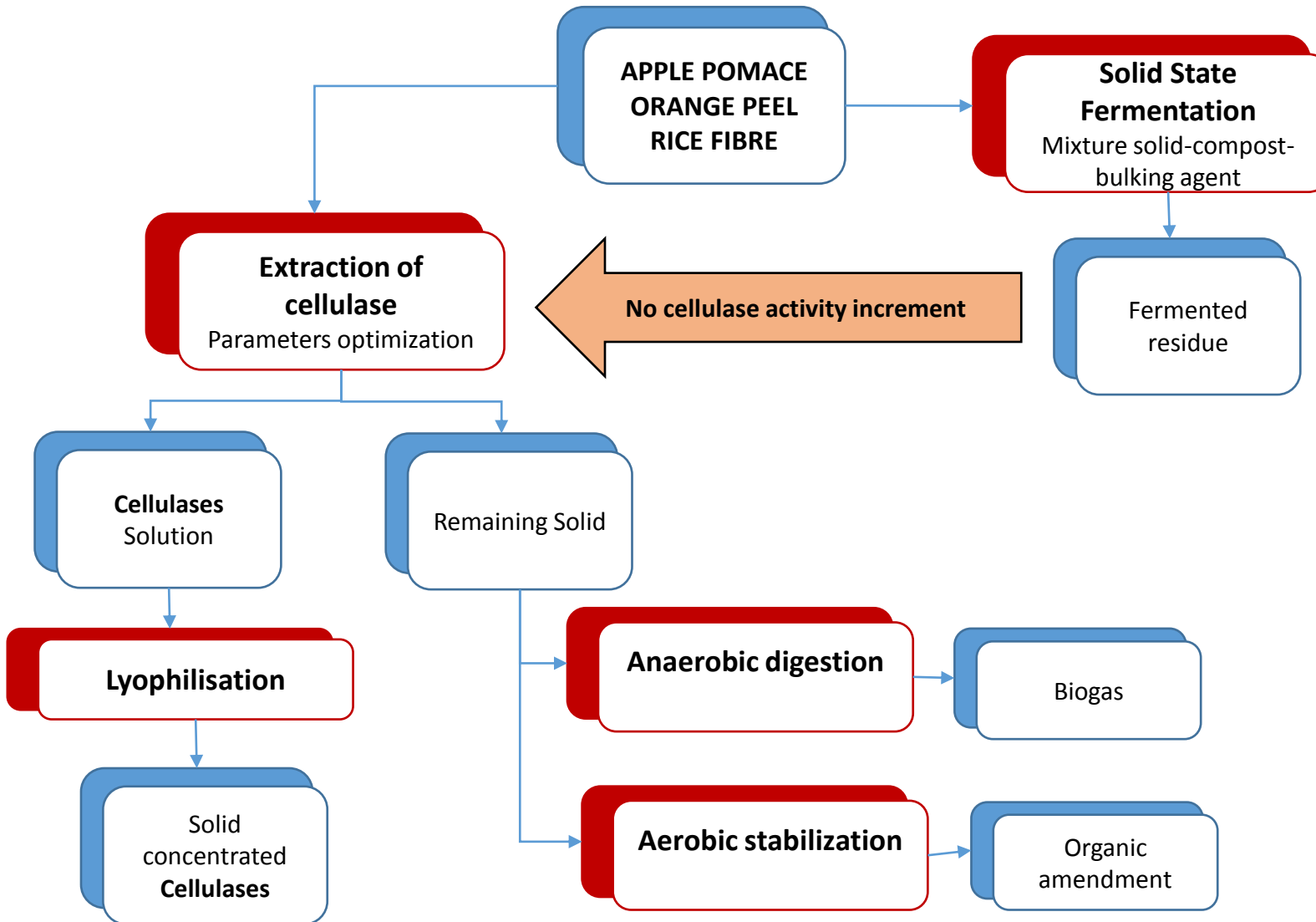
In this paper, a systematic study for the production and recovery of cellulases is presented. This is a critical point in an important part of the production of ethanol using enzymatic approaches. To our knowledge, no similar papers are published in literature, especially in a representative scale.

This article is submitted for your consideration as a possible publication in the *Journal of Environmental Management*.

Looking forward to your news.

Yours sincerely,

Adriana Artola  
Composting Research Group  
Department of Chemical Engineering  
Escola d'Enginyeria  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès, 08193-Barcelona, Spain)  
Tel.: 34-935814480; Fax: 34-935812013; Email: [adriana.artola@uab.cat](mailto:adriana.artola@uab.cat)





## Highlights

Production and recovery of cellulases from lignocellulosic wastes has been studied.

Solid state fermentation of the fresh waste does not increase initial cellulase activity.

Optimal cellulase extraction conditions are also the most economically profitable.

Two consecutive extractions are necessary for rice fibre and apple pomace.

High biogas production was achieved through anaerobic digestion of extracted waste.

1  
2  
3 **Production and recovery of cellulases through solid-state**  
4  
5 **fermentation of selected lignocellulosic wastes**  
6  
7  
8  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21 Maria Marín, Adriana Artola\*, Antoni Sánchez

22  
23 Composting Research Group

24  
25 Department of Chemical, Biological and Environmental Engineering

26  
27 Universitat Autònoma de Barcelona

28  
29 Edifici Q, Campus de Bellaterra, 08193- Cerdanyola del Vallès, Spain  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 \*Corresponding author: Adriana Artola

37  
38 Tel.: +34 935814480; Fax: +34 935812013

39  
40  
41 Email address: [adriana.artola@uab.cat](mailto:adriana.artola@uab.cat)  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Abstract

Orange peel, apple pomace and rice fibre from vegetal beverage manufacturing were assessed for the production of cellulase through solid state fermentation (SSF). No increment in cellulase activity was observed during SSF, being the maximum activity that of the raw waste  $8\pm 1$ ,  $7.8\pm 0.1$  and  $2.1\pm 0.2$  International units (IU)  $\text{g}^{-1}$  Dry Matter for apple pomace, orange peel and rice fibre, respectively. In view of the results, the influence of the main cellulase extraction parameters in the activity recovery from raw waste was assessed. Results show a maximum activity recovery of  $105\pm 27\%$  for apple pomace in an extraction ratio 1:2 (w:v) using distilled water as extracting agent.  $97\pm 13\%$  and  $139\pm 11\%$  activity recovery for orange peel and rice fibre, respectively, were achieved at 1:3 (w:v) extraction ratio and distilled water with no agitation. Finally, zero waste strategies (aerobic stabilization and anaerobic digestion) were successfully applied to valorise the remaining waste after extraction.

## Keywords

Agro-industrial waste; Cellulase production; Cellulase recovery; Solid state fermentation; Zero waste strategy.

## 1. Introduction

Cellulases have been widely used in different industrial sectors, like in pre-treatment of wood during paper manufacturing, in order to make easier the separation of fibre (Grigorevski de Lima et al. 2005), as livestock nourishment, since cellulase can be added to certain fibrous wastes to make them digestible for cattle (Zulkarnain et al. 2016) and in textile polishing, among others. However, it is in the production of bioethanol (Byadgi and Kalburgib, 2016) where nowadays its potential is greater, as the use of cellulase from a cheap source in the hydrolysis of lignocellulosic material would avoid harsh working conditions, diminishing the production cost and giving a push to bioethanol production industry. Currently, industrial production methods include pre-treatments of the lignocellulosic material, like dilute acid pre-treatment, steam explosion, ammonia fibre expansion (Xu and Huang, 2014) or biologic pre-treatment using enzymes, as in the production of bioethanol from corn, where alpha-amylase powder is added (Vohra et al. 2014). Then, fermentation of the released sugars using a microorganism like some yeast will produce the desired bioethanol (Mohd Azhar et al. 2017).

Solid State Fermentation (SSF) is the aerobic degradation of an organic substrate in absence of free water in order to obtain a desired product. The optimal operational conditions vary in a wide range depending on the process and different products can be obtained from the same substrate under different operational conditions or inoculating different strains of microorganisms (Soares de Castro and Sato, 2015). In the last years, SSF has become a cheap way to produce different enzymes and bioproducts from residues (Uncu and Cekmecelioglu, 2011). SSF of lignocellulosic waste has been reported to be a suitable method for cellulase production (Dhillon et al. 2012), as it requires small equipment, presents high yield and low operation costs. The use of agro-

1 industrial wastes as support and nutrient source for microorganisms makes the process  
2 even more profitable, with the search of a suitable substrate as a key aspect. The amount  
3 of residues evaluated for cellulase production in literature is large, since meteorological  
4 conditions vary within territories, finding different types of waste available in each one.  
5 For instance, Masutti et al. (2015) used wheat bran, grape stalk and seeds for cellulase  
6 recovery as well as for other high valuable products.  
7

8  
9  
10  
11  
12  
13  
14 One of the objectives of this work is the assessment of three largely produced agro-  
15 industrial residues as substrates for the production of cellulase, through a SSF process.  
16 The wastes selected were orange peel, apple pomace and rice fibre. Orange peel and  
17 apple pomace are massively produced in Spain. During 2016 a total of 3629.7 thousand  
18 tonnes of oranges were produced in the country, of which 900.7 tonnes were processed  
19 and consumed mainly as juice (USDA Foreign Agricultural Service, 2016). As for apple  
20 production, during 2016 Spain produced 621.2 thousand tonnes, so the quantity of waste  
21 generated is considerable (Eurostat, 2017). Currently, apple pomace and orange peel are  
22 used in pectin extraction, biogas production, citric acid elaboration and as raw materials  
23 to obtain essential oils (Shalini and Gupta, 2010; Wikandari et al. 2015). The rice fibre  
24 used in this work is currently destined to cattle nourishment and is produced during rice  
25 beverage production. Some data about suitability of the three residues as substrates for  
26 cellulase production can be found in literature. Srivastava et al. (2017) obtained a  
27 maximum cellulase production of 31 International units (IU) g<sup>-1</sup> DM using untreated  
28 orange peel as substrate at lab scale (6.0 g). As for apple pomace, Dhillon et al. (2012)  
29 reached the highest cellulase activity of 133.68 ± 5.44 IU g<sup>-1</sup> DM. Rice husk was used  
30 by Sangwan et al. (2015) in the production of cellulase by *Trichoderma atroviride*,  
31 obtaining at optimum fermentation conditions 90.43 IU g<sup>-1</sup> DM, showing that the three  
32 residues hold a potential for cellulase production.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Nevertheless, few works are found in the literature regarding optimum cellulase extraction parameters at a bench scale (in most of the works the process is carried out at a scale of few grams), which is why some of the key parameters in enzyme extraction from the solid matrix, namely: ratio solid-solvent, agitation mode and solvent type are studied in this work with the objective of finding their optimum values, considering the economical limitations of industrial scale. Extraction of the enzyme from the solid matrix accounts for the main part of the expense of the production process. If this issue is not studied, the development and scale-up of the process will be limited. In the present work SSF is performed at a bench scale allowing performing the experiments regarding management of the remaining solid. Finally, zero waste strategies of aerobic stabilization and anaerobic digestion were followed to obtain secondary products from the remaining solid waste. Little information related to management of the remaining waste was found. In literature, respiration assessments were carried out in the extracted material to determine its suitability as agricultural organic amendment after a stage of aerobic stabilization. Finally, the potential of the extracted material as a feedstock for anaerobic digestion process for biogas production was carried out, showing promising results.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Raw material

Orange peel generated during orange juice production was provided from local groceries (Cerdanyola del Vallés, Barcelona, Spain). Apple pomace was obtained from cider manufacturing in Mooma (Fontanilles, Girona, Spain) and rice fibre produced

1 during rice beverage elaboration was provided by Liquats vegetals S.L. (Viladrau,  
2 Barcelona, Spain). All residues were collected and stored, within 24 hours, at -20°C,  
3  
4 until needed. In SSF experiments, residues were mixed in a proportion 9:1 (w:w) with  
5  
6 compost from digested material from municipal solid waste to act as inoculum, which  
7  
8 was provided by the waste biological treatment plant of the Consorci per a la Gestió  
9  
10 dels Residus del Vallès Oriental (Granollers, Barcelona, Spain).  
11  
12  
13

14 Wood chips were added as bulking agent to provide an adequate porosity (Ruggieri  
15 et al. 2009) and regulate moisture of the mixture. Wood chips were obtained from  
16 Trabede Jorba composting plant (Jorba, Barcelona, Spain) and crushed to a size mainly  
17 between 16 mm and 3.15 mm and mixed in a ratio 1:1 (v:v) with the waste and compost  
18  
19 mixture. Table 1 shows the characterization of the residues used in this work. Moisture  
20  
21 content of the mixture was between 55% and 70% in all cases.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

## 31 *2.2. SSF Materials and experimental set up*

32  
33  
34  
35

36 SSF was carried out in 10 L (working volume) adiabatic reactors (Figure 1) described in  
37 previous works (Ballardo et al. 2017). Reactors consist of Dewar-glasses with an  
38 adapted outside metallic coverage and an adjusted cap to close the vessel hermetically.  
39  
40 The inward part of the cap is covered with isolating material. In the bottom of the glass,  
41  
42 a double plastic net was placed to provide support to the fermentable waste, create a  
43  
44 space for leachate and distribute evenly the inlet air flow. In the cap, there are three  
45  
46 connexions, two for inlet and outlet gases respectively and one for a temperature probe.  
47  
48 Inside the reactor, a plastic pipe conducts the inlet air to the bottom of the reactor, below  
49  
50 the plastic net. The oxygen content of exhausted gases was measured by an  
51  
52 electrochemical oxygen sensor and data were collected using a personal computer. Air  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 flow is set by a controller (Bronkhorst Hitec, The Netherlands) and output oxygen  
2 percentage is measured by an electrochemical O<sub>2</sub>-A2 oxygen sensor (Alphasense,  
3 United Kingdom). Data were collected using a personal computer HP Compaq  
4 LA1951g Intel core ISvpro (Hewlett-Packard, USA), equipped with Ubuntu operation  
5 system. Data analysis was performed by non-commercial tailor-made software which  
6 calculates the respiration rates explained below and shows them graphically together  
7 with the measured temperature (Transmisor CCPI/T-120, Seneca, Italy). Air flow was  
8 supplied to the reactors ensuring that oxygen was always above 10% in output gases.  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19 sOUR (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> dry matter (DM) h<sup>-1</sup>) was calculated during solid state  
20 fermentation as a respiration indicator of the biological activity of the mixture (Ballardo  
21 et al. 2017) and expressed as one hour average values (sOUR<sub>1h</sub>). The calculation of  
22 sOUR was carried out according to equation 1:  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

$$31 \quad sOUR (g O_2 kg^{-1} DM h^{-1}) = \frac{32 F (0.209 - O_2) 60 P}{R T DM} \quad (\text{Eq 1})$$

32  
33  
34  
35

36 Where sOUR is the Specific Oxygen Uptake rate (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup>); F is the air  
37 flow (L min<sup>-1</sup>); 0.209 is the molar fraction of oxygen in air; P is the pressure of the  
38 system (101325 Pa); 32 is the molecular weight of oxygen (g O<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>); 60 is the  
39 conversion factor minutes to hours; R is the constant of ideal gases (8310 Pa L K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>);  
40 T is the temperature at which flow is measured (K); O<sub>2</sub> is the molar oxygen fraction  
41 measured at the exit of the reactor and DM is the dry matter inside the reactor (kg).  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

### 53 *2.3. Cellulase activity recovery – Downstream*

54  
55  
56  
57

#### 58 *2.3.1. Reference value*

59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 To obtain the total cellulase activity value an extraction in agitated mode at 1:15 solid:  
2 solvent ratio and buffer citrate mono hydrated 0.05 M solution at pH 4.8 (BC) as solvent  
3 was performed during half an hour (Chandra et al. 2010; Lau and Dale, 2010).  
4  
5  
6

7 The choice of the standard extraction conditions are based on the extraction  
8 conditions described in the determination methodology for overall cellulases activity in  
9 literature (Pirota et al. 2013).  
10  
11  
12  
13

### 14 2.3.2. Activity recovery

15 Activity recovery was calculated according to equation 2 expressing the activity  
16 obtained in the extraction at a given condition as a percentage of the activity in the  
17 standard extraction, performed as described above.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

$$26 \quad \% \text{ Activity recovery} = \frac{\text{Cellulase activity (IU g}^{-1} \text{ DM)}}{\text{Standard Cellulase activity (IU g}^{-1} \text{ DM)}} \times 100 \quad (\text{Eq 2})$$

27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34 Three independent replicates of each extraction were performed. Each replicate would  
35 be discarded when the deviation from the average was higher than 25%. Finally, no  
36 replicate was discarded.  
37  
38  
39  
40  
41  
42

### 43 2.3.3. Extraction parameters

44 The experimental parameters assayed were solvent type, extraction mode and  
45 solid:solvent (w:v) ratio. The variations of each parameter were chosen in order to  
46 determine the highest possible cellulase recovery using low-cost operation conditions:  
47  
48  
49  
50  
51

- 52 a) *Solvent type*: Two different solvents were used to perform cellulase extractions,  
53 distilled water (DW) and buffer citrate solution (BC).  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- b) *Extraction mode*: The extraction modes were three: 1) no agitation (static mode),  
ii) orbital agitation at 120 rpm and iii) recirculation of the solvent through a  
column packed with the waste at  $140 \text{ mL min}^{-1}$ , which resulted in the renewal of  
the whole volume of liquid in the column 5 times during the extraction time.
- c) *Waste to solvent ratio (weight:volume)*: Assayed ratios of solid:solvent for  
cellulase extraction were 1:2, 1:3 and 1:5. For rice fibre, the minimum ratio  
assayed was 1:1 instead of 1:2 due to the particle size (the smallest of the three  
residues), as the waste was totally covered by the liquid at this ratio. In the case  
of the other two residues 1:2 ratio was required to submerge the entire residue.

The different combinations of the tested variables are shown in Table 2.

Between 300 and 500 g of raw solid residue were used in extractions. The whole raw  
residue was homogenized before sampling, and afterwards, small quantities of few  
grams were picked from at least four different parts of the whole sample in order to  
obtain a representative sample. The solid and the solvent were in contact for 30 min  
under the different operational conditions stated above. Then the liquid phase was  
decanted and centrifuged during 10 minutes at 10000 rpm. Cellulase activity of the  
supernatant was measured and referred to the value considered the total extracted  
activity (see point 2.3.1.).

Static and agitated extractions were carried out using a set of plastic vessels of  
equal dimension and shape, where solvent and solid were placed. For agitated mode  
extractions, the plastic vessels were placed in a Sanyo orbital shaker IOC402.XX1.C  
(Sanyo UK) at 120 rpm and room temperature.

The experimental set up used in liquid recirculation extraction was composed of  
a peristaltic Watson-Marlow 403U/L2 Ultra compact twin channel pump with variable  
rotor speed from 0 to 99.9 rpm (Watson-Marlow Alitea, England) and a 2 L plastic

1 vessel with two adaptors, one at the top and one at the bottom, connected by plastic  
2 tubes to the pump input and output. Inside the vessel, a device was coupled to let the  
3 water fall over the biomass in a drop-shower mode, in order to achieve a homogenous  
4 contact with the solid in a percolation mode. Material was placed inside the vessel and  
5 solvent added. The flowrate was set up in the pump and liquid circulation lasted for half  
6 an hour, resulting in a removal of the liquid phase five times.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

#### 17 *2.3.4. Number of extraction stages*

18 Enzyme recovery from consecutive extraction stages was assayed performing three  
19 consecutive extractions to the same material for orange peel and rice fibre and four  
20 consecutive extractions for apple pomace. Between extractions, the biomass was  
21 drained to reduce its moisture as much as possible. 1:3 solid:solvent (w:v ratio) static  
22 mode and DW as solvent were chosen because the activity recovery obtained in  
23 previous experiments under these conditions showed no statistical differences with the  
24 highest recovery for the three residues.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

#### 39 *2.3.5. Lyophilisation*

40 Samples of 5 mL of centrifuged supernatant from cellulase extractions were frozen at -  
41 80°C inside plastic falcons and lyophilised using a Virtis 5L sentry lyophiliser 248627  
42 (Virtis, Gardiner, USA) connected to an Edwards vacuum pump RV5 A653\_01\_903  
43 (Edward, United Kingdom). After lyophilisation, the solid obtained was redissolved  
44 with distilled water to the original 5 mL. Activity was measured and compared to the  
45 value obtained in the fresh extract, and cellulase activity recovery was calculated.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57

#### 58 *2.4. Zero waste strategies*

1  
2 In order to reach a cellulase production process without wastes, zero waste strategies  
3  
4 were applied to the solid after extraction. The two strategies assayed were biogas  
5  
6 production through anaerobic digestion and the aerobic stabilization of the waste for its  
7  
8 use as organic soil amendment.  
9  
10

#### 11 12 13 14 *2.4.1. Biochemical Methane Potential (BMP)* 15

16 Fermented material was tested after extraction of cellulase as feedstock for biogas  
17  
18 production through anaerobic digestion. Anaerobically digested sludge from a  
19  
20 municipal WWTP in Sabadell (Barcelona) was used as inoculum.  
21  
22

23  
24 The methodology used was a modified method of the protocol described by the  
25  
26 German Institute for Standardization and reported by the Ordinance on environmentally  
27  
28 compatible storage of waste from human settlements (German Federal Ministry for the  
29  
30 Environment, 2001). Inoculum and biomass from SSF were mixed in 1:2 feed to  
31  
32 inoculum (F:I) ratio of initial SV, and placed in hermetic closed bottles of 250 mL. Each  
33  
34 sample was tested in triplicate. A triplicate with only inoculum was also tested as  
35  
36 control and its biogas production subtracted from the sample tests.  
37  
38  
39  
40

41 All the bottles were placed in an incubator Memmert In750 (Memmert,  
42  
43 Germany) working at 37°C for 25 days. The amount of biogas produced was calculated  
44  
45 from the biogas pressure, measured by an ISE 30A-01-P vacuum switch  
46  
47 (SMCpneumatics.com, USA), temperature and headspace volume. Bottles were  
48  
49 manually agitated before and after measurement and biogas was periodically released to  
50  
51 avoid overpressure. Measurements were carried on every 24 h at the beginning of the  
52  
53 experiment and lately every 3 days approximately.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2 Measures of methane percentage in the biogas were done at different days of  
3 incubation. Percentages of methane and carbon dioxide in the biogas were measured  
4 using a gas chromatograph 5890A with a column 17066\_F ParcpackQ (250C), support  
5 100/120, tube 3m 1/8"x 5.5 mm. Initial oven temperature was 70°C, final oven  
6 temperature was 120°C, determination time was 8 min, injector temperature was 150°C  
7 and detector temperature was 180°C. Methane peak was detected at 0.8 minutes. 100 µl  
8 of gas sample were required for the analysis.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

#### 20 *2.4.2. Aerobic stabilization*

21 Solid material after cellulase extraction was stabilized in order to test its suitability as a  
22 possible organic amendment. Experiments were carried out in 10 L working volume  
23 reactors previously described. The aerobic stabilization was performed with air supplied  
24 under manual control, ensuring aerobic conditions during the whole process (Puyuelo et  
25 al. 2010). Biological activity was monitored through  $sOUR_{1h}$ , as explained previously.  
26 Temperature was also measured, as it is related to the degree of hygenization achieved  
27 and again to the biological activity, as metabolic heat is generated during degradation of  
28 the organic matter.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

#### 44 *2.4.3. Respirometric tests*

45 Dynamic respiration tests were performed on the residues before cellulase extraction  
46 and after aerobic stabilization to determine material stability (German Federal Ministry  
47 for the Environment, 2001) (The U.S. Department of Agriculture and the U.S.  
48 Composting Council, 2001). A dynamic respirometer constructed following the method  
49 described by Adani et al. (2006) was used. The experimental device was described by  
50 Pognani et al. (2011). According to Gea et al. (2004) the test was carried out at a  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 constant temperature of 37°C. All the experiments were performed in triplicate.  
2 Dynamic Respiration Index (DRI<sub>24h</sub>) and cumulative oxygen consumption (AT<sub>4</sub>), were  
3  
4 obtained according to Adani et al. (2006). DRI<sub>24h</sub> (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup>) was calculated as  
5  
6 the average of the instantaneous sOUR values (Eq. 1) during the 24 h period of  
7  
8 maximum consumption. AT<sub>4</sub> (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM) was the total oxygen consumed over the  
9  
10 period of 4 days of maximum consumption.  
11  
12  
13

## 14 15 *2.5. Analytical methods*

### 16 17 *2.5.1. Cellulase activity determination*

18  
19 Cellulase activity was measured using filter paper analysis as described by Ghose  
20  
21 (1987). The extract was centrifuged 10 min at 10000 rpm and the supernatant was  
22  
23 analysed. An International Unit (IU) or Filter paper unit (FPU) is defined as 1 µg of  
24  
25 glucose released in one hour under the assay conditions.  
26  
27  
28  
29  
30  
31

### 32 33 *2.5.2. Routine analytical methods*

34  
35 pH was calculated by soaking 10 g of sample in 50 mL of distilled water and stirring for  
36  
37 30 min. After, the supernatant was centrifuged at 10000 rpm during 10 min. pH of the  
38  
39 centrifuged supernatant was measured with a pH meter Crison micro pH 2001. Volatile  
40  
41 solids (%VS) and moisture content (%H) were measured according to TMECC (The  
42  
43 U.S. Department of Agriculture and the U.S. Composting Council, 2001), by duplicate.  
44  
45 Fibre content (lignin, cellulose and hemicellulose) was determined by the method of  
46  
47 Van Soest et al. (1991).  
48  
49  
50  
51  
52  
53

## 54 55 *2.6. Statistics*

56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 One way ANOVA analysis was performed to compare mean values of activity recovery  
2 differing one experimental parameter, t-student mean analysis was used to compare  
3  
4 activity recovery results when they did not fulfil the requirements for one way ANOVA  
5  
6 analysis. Sigmaplot 11.0 (Systat software, Inc) was used for t-student analysis  
7  
8 performance. Microsoft Excel 2013 was used to carry on one way ANOVA analysis.  
9  
10 Since three replicates of extractions under the same experimental conditions were  
11  
12 performed, the rule of 25% was applied, discarding the values that differ more than 25%  
13  
14 from the average.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

### 23 **3. Results and discussion**

#### 24 25 26 27 *3.1. Solid state fermentation*

28  
29  
30  
31 The suitability of orange peel, apple pomace and rice fibre for cellulase production was  
32  
33 evaluated through solid state fermentation experiments. Each residue was mixed with  
34  
35 compost and bulking agent in the proportions specified previously and fermented in a  
36  
37 10 L reactor.  
38  
39  
40

41  
42 Characterization of the residues is shown in Table 1. Total fibre content  
43  
44 (cellulose, hemicellulose and lignin), as shown, is low for the three residues, less than a  
45  
46 25% on a dry basis, compared to other agricultural wastes like coffee husk, which  
47  
48 presents more than 50% (Cerda et al. 2017). Wheat bran has been also used for cellulase  
49  
50 production presenting a 24% of cellulose (Bansal et al. 2012).  
51  
52

53  
54 Figures 2a, 2b and 2c show the profiles of temperature and oxygen uptake rate  
55  
56 (sOUR<sub>1h</sub>) obtained during solid state fermentation experiments for orange peel, apple  
57  
58 pomace and rice fibre respectively.  
59  
60  
61  
62

1 Cumulative oxygen consumption during SSF process for the three residues was  $80 \pm 10$   
2 mL O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DM for apple pomace,  $455 \pm 58$  mL O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DM for orange peel and  $509 \pm 60$   
3 mL O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DM for rice fibre. Temperature never reached thermophilic range ( $> 45^\circ\text{C}$ )  
4 for apple pomace while orange peel maintained thermophilic temperatures for more  
5 than a day. Temperatures higher than  $50^\circ\text{C}$  were only reached in the case of rice fibre  
6 fermentation. The highest sOUR<sub>1h</sub> values (peaking to  $8 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$  at day 7 of  
7 SSF process) correspond also to rice fibre demonstrating that this material was the most  
8 biodegradable of the three residues under the operation conditions.  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19 As seen in figures 2a), b) and c) initial cellulase activity of orange peel, apple  
20 pomace and rice fibre mixtures (with bulking agent and compost) was the maximum  
21 achieved through the whole process, presenting values of  $2.8 \pm 0.2 \text{ IU g}^{-1} \text{ DM}$ ,  $5 \pm 1 \text{ IU}$   
22  $\text{g}^{-1} \text{ DM}$  and  $2.1 \pm 0.2 \text{ IU g}^{-1} \text{ DM}$ , respectively.  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29 As observed in figures 2a) and b), both orange peel and apple pomace  
30 fermentations showed a decrease of pH from initial values, closer to 7, to acid values  
31 close to 4. According to Torrado et al. (2011) sugar content in orange peel presents  
32 values of 29 – 44% while apple pomace sugar content value was reported as  $39 \pm 8 \%$  in  
33 dry basis (Sato et al. 2010). These high sugar contents compared to other agricultural  
34 residues like rice straw (0.071%), or sugarcane bagasse (0.55%) (El-Tayeb et al. 2012)  
35 could be the reason why cellulase production was not observed, as it could be explained  
36 by the degradation of monosaccharides through an acidic pathway. Novotny et al.  
37 (2008) reported the degradation of glucose and fructose into formic, acetic and  
38 propionic acids, which could lead to the pH drop and a hampering of the degradation  
39 process. As shown in figure 2c), A drop in pH value was also observed in rice fibre  
40 fermentation, but no lower than 5, and the recovery to values around 8 occurred in less  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

than 6 days. Cellulase activity values decrease along the fermentation, being also the initial value the highest observed.

Cellulase activities measured for the residues previously to mixing with compost and bulking agent were  $8 \pm 1$  IU g<sup>-1</sup> DM for apple pomace,  $7.8 \pm 0.1$  IU g<sup>-1</sup> DM for orange peel and  $3.0 \pm 0.7$  IU g<sup>-1</sup> DM for rice fibre. It is possible to find in literature many agricultural wastes used for cellulase production and the activities achieved. Using sugarcane bagasse as a substrate, 1.5 IU g<sup>-1</sup> DM was achieved by Bansal et al. (2012) inoculating *Aspergillus niger* NS-2 at a laboratory scale of 5 g and a value up to 12 IU g<sup>-1</sup> DM at bench scale operating with a mixture of sugarcane bagasse and wheat bran and cultivating the fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b in packed bed bioreactors (Mendes et al. 2017). Filter paper cellulase activity achieved inoculating *Aspergillus niger* NS-2 in orange peels and rice husk at laboratory scale of 5 g, was 1.9 and 3.1 (FPU g<sup>-1</sup> DM) respectively (Bansal et al. 2012).

In view of the results found in literature, extraction of cellulase from the raw residues used in the present work will be a profitable alternative since it avoids equipment and operation costs for SSF performance, reporting cellulase activity in the range of 8 IU g<sup>-1</sup> DM for apple pomace and orange peel, higher than most of the activities after fermentation reported above. Although rice fibre cellulase content is not as high as in the other residues, the fact that no fermentation process is required make it profitable. So, as literature offers scarce information about the recovery of cellulase from the solid matrix and plenty of data referred to fermentation, conditions for cellulase activity recovery using fresh wastes were assessed.

### 3.2. Downstream

#### 3.2.1. Cellulase recovery

1 Table 2 shows the different extraction methods used in cellulase recovery experiments  
2 from the three wastes and the results obtained for activity recovery. Previous results in  
3 cellulase extraction from coffee husk showed no significant differences between activity  
4 recovery in agitated mode and in static mode, and no difference between extracting  
5 agent, that is why in this work agitated mode and buffer citrate extraction were only  
6 assayed at one extraction ratio (1:3). Chandra et al. (2010) reported optimum enzyme  
7 extraction using a ratio 1:4.  
8  
9

10 For apple pomace, results showed that among the different extractions  
11 performed, the maximum activity recovery was  $104 \pm 27\%$ , obtained in the experiments  
12 with distilled water at ratio 1:2 and static mode, finding only statistical differences with  
13 the extractions carried on in recirculated mode with distilled water and the one  
14 performed with buffer citrate as solvent. Activity recovery obtained from experiments in  
15 recirculated mode was significantly lower than the recovery under other extraction  
16 conditions. Thus, these experimental conditions were not assessed with other wastes.  
17  
18

19 Variations of pH and conductivity between different conditions were minimal as  
20 shown in Table 2. Conductivity was never higher than  $1.2 \text{ mS cm}^{-1}$ , whereas pH  
21 oscillated around 3.8 in all extracts. The exception was the extraction performed with  
22 citrate buffer, in which conductivity reached values of  $4.2 \pm 0.3 \text{ mS cm}^{-1}$  and pH 4.72.  
23  
24

25 In the case of orange peel, extraction ratio seemed to have greater influence than  
26 in apple pomace experiments. The highest activity recovery ( $106 \pm 7\%$ ) was obtained  
27 using 1:5 ratio, static mode and distilled water as extracting agent. No significant  
28 differences were observed between maximum activity recovery and results obtained in  
29 agitated and static mode and 1:3 ratio.  
30  
31

32 pH for all extracts was close to 4.6, with a minimum variation. In this case,  
33 buffer citrate extracts just present a difference of 0.1 in pH values. As happened for  
34  
35

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

apple pomace, conductivity increases as the extraction ratio decreases, with the highest value of  $1.5 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ , similar to that obtained for apple pomace.

Maximum activity recovery obtained from rice fibre was  $139 \pm 11\%$ , at 1:3 ratio w:v, with no agitation and distilled water. Statistical differences were observed with extractions performed at 1:5 ratio, which showed the lowest yield. Maximum recovery can be also obtained using a ratio 1:1 solid:solvent, distilled water as solvent and static mode.

Conductivity of supernatant obtained in these experiments was very low, about  $250 \mu\text{S cm}^{-1}$ , while pH obtained for this residue presented values closer to 7.7. As happened for apple pomace, buffering effect of the citrate did not show any improvement in activity recovery. Pathak et al. (2014) compared filter paper activity obtained performing extraction at ratio 1:1, 1:2 and 1:3 from fermented waste from forestry, agriculture and agro-industry using BC 4.8, obtaining values of  $2.34 \pm 0.11$ ,  $2.95 \pm 0.13$  and  $3.25 \pm 0.09 \text{ IU g}^{-1} \text{ DM}$  respectively. Comparing standard deviation provided by the author it could be said that ratio 1:2 and 1:3 are comparable, as it happens for the extraction performed on apple pomace and orange peel.

In all cases, activity recovery using citrate buffer as extracting agent presented one of the lowest values. As cellulase is expected to have different characteristics depending on the waste, one explanation to the lowest results obtained with BC may be related with the salt concentration in the solvent, which can hind solubilisation of the enzyme (Ndamitso and Abulude, 2014), or a buffer pH close to the isoelectric point of the protein (Ikasari and Mitchell, 1996). To validate these hypotheses further characterization of the enzymes is needed. Pirota et al. (2013) assayed the activity recovery in endoglucanase extraction from 10 g of fermented wheat bran, finding that distilled water presented recovery values on the same order of magnitude as those

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

obtained with other solvents (0.2 M acetate buffer pH 4.8, 0.05 M citrate buffer pH 4.8 and 0.1% Tween-80 solution). These results agree with the data obtained in this work, in which more ionic solvent produces lower extraction yield.

Differences between static and agitated mode did not show any statistic difference for rice fibre and apple pomace. De Sousa et al. (2012) studied the influence of the extraction ratio on poligalacturonase extraction, finding no significant difference between agitation at 150 rpm and 50 rpm. Recovery in agitated and static modes for orange peel neither shows statistic differences. Bender et al. (2008) reported an increase of inulinase recovery from sugarcane bagasse related with the increase of the stirring ratio, assaying 50, 100 and 150 rpm.

To sum up, the maximum recovery for apple pomace and rice fibre can be obtained using the minimum ratios w:v assayed, which were 1:2 and 1:1 respectively, using DW as extracting agent and in static mode. These are also the most favourable conditions from an economic point of view and for scaling-up purposes. For orange peel, 1:3 ratio in static mode and DW will provide maximum activity recovery. The need of a higher ratio is probably due to particle size, larger in the case of orange peel than for the other two residues. In all cases, after statistical analysis, no improvement using BC or agitated mode was observed.

Consecutive extractions were performed on the same material for orange peel and apple pomace in order to assure that one stage extraction was enough for a full recovery. Results are displayed in figures 3 a), b) and c). In the case of orange peel, two replicates showed an activity recovery in the first extraction in the range of 70% of the total activity units obtained after 3 consecutive extractions. The third replicate shows a less efficient first extraction, in which the activity recovery was lower than in the second extraction. Thus, for orange peel, only one extraction is recommended, as in two

1 of the replicates a second extraction would not be economically profitable. No  
2 references at bench scale have been found for consecutive extractions in literature, only  
3  
4 at laboratory scale (around 10 g).  
5  
6

7 On the other hand, apple pomace shows a maximum difference of 20% between  
8 first and second consecutive extractions, and a real significant decrease in activity  
9 recovery during the third and fourth extractions. According to these results, two  
10 consecutive extractions on apple pomace would be recommended. Similar results were  
11 obtained after three consecutive extractions on rice fibre: difference between activity on  
12 the first extraction and second extraction was almost 10% of the total activity extracted.  
13 The difference increases drastically for the third extraction, so two consecutive  
14 extractions are also recommended for rice fibre.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26 As previously, Pirola et al. (2013) results are similar to the ones obtained for  
27 orange peel in which, using distilled water as extracting agent, almost 35 IU g<sup>-1</sup> DM  
28 were obtained in the first extraction and 5 IU g<sup>-1</sup> DM in the second extraction, being  
29 recommended only one extraction. Also Pathak et al. (2014) compared activity after 3  
30 consecutive extractions with the activity obtained using the same volume in one  
31 extraction, obtaining a 29.2% more recovery of IU g<sup>-1</sup> DM in consecutive extractions,  
32 showing the effectiveness of this strategy in some cases.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

### 46 3.2.2. Lyophilisation

47 Lyophilisation of the crude extract can be used as a way of concentrating the enzyme  
48 for further use and to preserve its activity for a longer period, as well as facilitating  
49 storage. This is why activity recovery after a lyophilisation was assayed in this work  
50 (Abu Yazid et al. 2016; de Jesus and Maciel Filho, 2014).  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Table 3 shows the activity recovery from lyophilised and redissolved cellulose extracts compared to fresh ones. As observed, for apple pomace and orange peel, conservation of activity resulted higher in the distilled water extracts than in those obtained with citrate buffer, with a difference of about 30%. Rice fibre presents a low activity conservation,  $66 \pm 2\%$ , compared to the values obtained for apple pomace and orange peel:  $117 \pm 9\%$  and  $125 \pm 119\%$ , respectively. Similar results were found in the lyophilisation of purified xylanase obtained from SSF of agricultural residue (Shah and Madamwar, 2005). The enzyme showed a loss of 5% of its activity during the process and no significant activity loss after 6 months storage at  $0^{\circ}\text{C}$ .

During the last decades the stabilization of proteins using sugars as an additive has increased. Two different theories of the mechanism by which this occurs have been proposed, through vitrification or water replacement (Mensink et al. 2017). In our case, crude extract from the three residues contained soluble sugars which, according to vitrification theory, may have helped to preserve activity through the lyophilisation process. Pikal-Cleland and Carpenter (2001) observed protein denaturation due to pH changes in the media due to precipitation of less soluble components of the buffer during freezing process. In this study, this could be an explanation for activity losses observed in citrate buffer extracts that are higher than activity losses using distilled water as solvent.

Thus, it can be concluded that lyophilisation can be considered an efficient way of concentration and preservation of the cellulase activity obtained from the three residues studied.

### 3.3. Zero waste strategies

1 After the extraction of cellulases, the remaining solid has to be properly managed. As  
2 this solid has not been fermented, it still possesses a high fraction of biodegradable  
3 mater and a high water content. In order to achieve a clean cellulase production process  
4 with no residues as well as to obtain benefit from the remaining solid, two strategies  
5 were assayed: aerobic stabilization of the solid to be used as soil amendment and  
6 anaerobic digestion for biogas production. In literature, it is possible to find some works  
7 trying to achieve a zero waste process. Chintagunta et al. (2016) obtained ethanol and  
8 biomanure from potato waste, although co-inoculation and enrichment of the solid after  
9 ethanol production was needed.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

### 23 *3.3.1. Aerobic stabilization*

24 After extraction, the wet wastes were stabilized aerobically. Moisture of the solid waste  
25 increased after cellulase extraction, so a drying stage, which consists of pressing the  
26 solid inside a permeable cloth, similar to the press filters used for sludge, was required  
27 in order to reach the recommended water content in the final mixture (Kim et al. 2016).  
28 Wood chips as bulking agent in a 1:1 (v : v) ratio were added to all residues after  
29 pressing, based in previous works by Cerda et al. (2017), to provide porosity to the  
30 residue, and then the mixtures were stabilized inside 10 L reactors.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 Two stabilization processes were performed with apple pomace waste, the first  
43 one with material from one step extraction, and the second process with apple pomace  
44 from the four consecutive extractions. Both stabilization processes lasted 14 days, and  
45 the average oxygen consumption of both processes was  $335 \pm 5 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM}$ . Values of  
46  $\text{AT}_4$  and  $\text{DRI}_{24}$  were, after aerobic stabilization,  $44 \pm 5 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM}$  and  $0.5 \pm 0.1 \text{ g O}_2$   
47  $\text{kg}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$  respectively for the residue after a single extraction and  $33 \pm 4 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1}$   
48  $\text{DM}$  and  $0.43 \pm 0.03 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$  respectively for the residue extracted 4 times  
49 (Table 1), showing that consecutive extractions had no remarkable influence in the  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 stabilization process, as both materials presented similar oxygen consumption and final  
2 respiration indices. Temperatures did not reach the thermophilic range in any of them.  
3  
4 In both cases moisture presented values near 70% during the whole process; initial pH  
5 was around 4.5 in both cases and increased up to 6.5-7 at the end of the process.  
6  
7

8  
9 Orange peel from all the single extraction experiments was also pressed, mixed  
10 with wood chips and aerobically stabilized, achieving, after stabilization (24 days), an  
11  $AT_4$  value of  $30 \pm 16 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM}$  and a  $DRI_{24}$  value of  $0.4 \pm 0.2 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ .  
12  
13 Three replicates were performed. During stabilization, oxygen consumption presented  
14 deviations of approximately 30%, being the mean value after 11 days of stabilization  
15  $847 \pm 292 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM}$ , more than twice the value achieved by apple pomace.  
16  
17 Thermophilic temperature range was never reached. As for pH, initial values were 3.6-  
18 4.6 and increased up to 7.5-8 at the end of the process. The moisture increased through  
19 the process from initial 71% approximately to 76-78% in the three independent  
20 replicates. This increment in moisture produced a deficient oxygen transfer, causing  
21 acidification for one of the replicates. Kim et al. (2016) recommended moisture between  
22 40% and 60%, as high moisture can lead to anaerobic conditions, filling the pores of the  
23 matrix with water. During the stabilization process of orange peel, water was generated.  
24  
25 The fact that the stabilization was carried on in a hermetically closed reactor and that  
26 temperature did not reach high values that would favour evaporation hamper the  
27 removal of this water from the reactor and so the moisture increment. To avoid  
28 acidification as it happened in one of the replicates, another kind of operational  
29 conditions would be recommended, like static pile composting, where natural  
30 convection produces a decrease in the initial moisture.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55 As for stabilization of rice fibre, only one replicate was performed due to limited  
56 availability of the material. The process lasted 13 days and oxygen consumption was  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
715 g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM, in the range of orange peel consumption. Respiration data for the  
stabilization of rice fibre after extraction is not available, but after 13 days the measured  
sOUR<sub>1h</sub> was 0.88 g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup>.

7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
Barrena et al. (2011) classified different organic wastes in highly biodegradable  
(respiration activity higher than 5 mg O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> OM h<sup>-1</sup>), moderately biodegradable waste  
(respiration activity within 2 to 5 mg O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> OM h<sup>-1</sup>) and waste with low  
biodegradability (respiration activity lower than 2 mg O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> OM h<sup>-1</sup>). Due to the high  
organic matter content of the three residues (almost 100%) (Table 1) the results  
obtained in this work (related to DM) can be compared directly to the values proposed  
by Barrena et al. (2011). According to this classification, orange peel, apple pomace and  
rice fibre went from moderately biodegradables as fresh waste, to low biodegradable  
waste after extraction and stabilization.

### 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65

*3.3.2. Biomethane Potential (BMP) - Anaerobic digestion*

Methane production after 25 days for the three residues after cellulose extraction was  
552 ± 66, 543 ± 47 and 633 ± 40 mL biogas g<sup>-1</sup> VS for orange peel, apple pomace and  
rice fibre, respectively. Wikandari et al. (2015) reported a production of 217 mL  
methane g<sup>-1</sup> VS after 33 days incubation for orange peel, lower than the value obtained  
in this work. Wikandari et al. (2015) removed limonene from orange peel after  
extraction as a previous step to anaerobic digestion in order to increase methane  
production, as limonene has been reported to be an anti-microbial compound. For apple  
pomace, biogas production results are very similar to orange peel. Kuprys-Caruk and  
Kolodziejcki (2014) reported a production of 559 mL of biogas g<sup>-1</sup> VS from ensilaged  
apple pomace, which is a similar production than the one obtained in this work. For rice  
fibre, extraction of cellulase could have caused a similar effect than that of orange peel

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

in the removal of limonene or other inhibitors, as non-extracted material produced, after the same period of digestion, a 31% less biogas  $\text{g}^{-1}$  VS than the extracted material. As a comparison, Kashi et al. (2017) reported a production of 648, 1381, 168 and 879 mL biogas  $\text{g}^{-1}$  VS from waste activated sludge from a WWTP, grease trap waste, wastewater treatment sludge from a second WWTP and meat processing waste respectively, all inoculated at a rate of 1:4 F:I in a VS base with anaerobic sludge and after 35 days of anaerobic digestion. Ponsá et al. (2011) reported biogas production of the organic fraction of municipal solid waste with mechanical pre-treatment at 21 days of  $224 \pm 92$  NmL biogas  $\text{g}^{-1}$ DM, and a production of  $221 \pm 53$  NmL biogas  $\text{g}^{-1}$ DM from a mechanical pre-treated municipal solid waste in the same conditions, all in an F:I ratio of 1:1 in volatile solid basis. Comparing the results obtained in this work, anaerobic digestion for biogas production is a recommendable strategy, as biogas production is high when compared to literature values. Additionally, no dewatering step will be needed for the remaining solid after extraction if anaerobic digestion is applied instead of aerobic stabilization.

#### 4. Conclusions

Apple pomace, orange peel and rice fibre present a high initial cellulase content that did not increase during a solid state fermentation process. Thus, extraction of cellulases from the fresh waste is recommended. The use of distilled water as extracting agent in static mode is recommended for the three wastes at a 1:2 solid:solvent extraction ratio for apple pomace, 1:1 for rice fibre and 1:3 for orange peel. These conditions are favourable from an economical point of view when compared to agitation mode and the use of buffer citrate as solvent that did not increase cellulase activity recovery for the studied wastes and conditions.

1 Aerobic stabilization of the solid residue after enzyme extraction is possible in  
2 order to obtain a soil amendment. However, hampering of the oxygen transport can be  
3  
4 observed in orange peel stabilization process due to an increase in the moisture content.  
5  
6 High biogas production has been obtained from anaerobic digestion of the solid residue  
7  
8 after extraction when compared to literature data.  
9  
10

11  
12 Consequently, orange peel, apple pomace and rice fibre can be successfully  
13  
14 valorised through the recovery of cellulases from the raw waste followed by biogas  
15  
16 production with the remaining solid as a zero waste strategy.  
17  
18  
19  
20

## 21 **Acknowledgements**

22  
23  
24  
25 The authors would like to thank the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad,  
26  
27 which gave financial support (Project CTM2015-69513-R) to this work. Maria Marín  
28  
29 also thanks the Universitat Autònoma de Barcelona for a predoctoral scholarship and  
30  
31 finally to Aida Carretero for her invaluable help.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## References

- 1  
2 Abu Yazid, N., Barrena, R., Sánchez, A., 2016. Assessment of protease activity in  
3  
4 hydrolysed extracts from SSF of hair waste by and indigenous consortium of  
5  
6 microorganisms. *Waste Manage.* 49, 420–426.  
7  
8  
9 Adani, F., Ubbiali, C., Genevini, P., 2006. The determination of biological stability of  
10  
11 composts using the Dynamic Respiration Index: the results of experience after two  
12  
13 years. *Waste Manage.* 26, 41–48.  
14  
15  
16 Ballardo, C., Barrena, R., Artola, A., Sánchez, A., 2017. A novel strategy for producing  
17  
18 compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of  
19  
20 biowaste and inoculation with *Bacillus thuringiensis*. *Waste Manage.* 70, 53-58.  
21  
22  
23 Bansal, N., Tewari, R. Soni, , R., Soni, S.K., 2012. Production of cellulases from  
24  
25 *Aspergillus niger NS-2* in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste  
26  
27 residues. *Waste Manage.* 32 (7), 1341-1346.  
28  
29  
30 Barrena, R., Gea, T., Ponsá, S., Ruggieri, L., Artola, A., Font, X., Sánchez, A., 2011.  
31  
32 Categorizing raw organic material biodegradability via respiration activity  
33  
34 measurement: A review. *Compost Sci. Util.* 19 (2), 105-113.  
35  
36  
37 Bender, J.P., Mazutti, M.A., Di Luccio, M., Treichel, H., 2008. Extraction of inulinase  
38  
39 obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces*  
40  
41 *marxianus NRRL Y-7571*. *Appl. Biochem. Biotech.* 149 (3), 195-203.  
42  
43  
44 Byadgi, S.A., Kalburgib, P.B., 2016. Production of Bioethanol from Waste Newspaper,  
45  
46 International Conference on Solid Waste Management, 5IconSWM 2015. *Procedia*  
47  
48 *Environ. Sci.* 35, 555-562.  
49  
50  
51 Cerda, A., Gea, T., Vargas-García, M.C., Sánchez, A., 2017. Towards a competitive  
52  
53 solid state fermentation: Cellulases production from coffee husk by sequential batch  
54  
55 operation and role of microbial diversity. *Sci. Total Environ.* 589, 56-65.  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Chandra, M.S., Viswanath, B., Reddy, B.R., 2010. Optimization of extraction of  $\beta$ -endoglucanase from the fermented bran of *Aspergillus niger*. *Indian J. Microbiol.* 2010 (50), 122–126.
- Chintagunta, A.D., Jacob, S., Banerjee, R., 2016. Integrated bioethanol and biomanure production from potato waste. *Waste Manag.* 49, 320–325.
- De Jesus, S.S., Maciel Filho, R., 2014. Drying of  $\alpha$ -amylase by spray drying and freeze-drying: A comparative study. *Braz. J. of Chem. Eng.* 31 (3), 625-631.
- De Sousa, C.A.B., da Silva, F.L.H., Conrado, L.S., 2012. Leaching of polygalacturonases produced by solid state fermentation of peel and albedo of passion fruit. *Rev. Bras. Eng. Agr. Amb.* 16 (7), 790-794.
- Dhillon, G.S., Kaur, S., Brar, S.K., Verma, M., 2012. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulose bioproduction through solid-state fermentation. *Ind Crop Prod.* 38, 6-13.
- El-Tayeb, T.S., Abdelhafez, A.A., Ali, S.H., Ramadan, E.M., 2012. Effect of acid hydrolysis and fungal biotreatment on agro-industrial wastes for obtainment of free sugars for bioethanol production. *Braz J Microbiol.* 43 (4), 1523-1535.
- Eurostat, Agricultural Production Crops, 2017. *Statistics Explained* <http://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/> (accessed 5 January 2018).
- Gea, T., Barrena, R., Artola, A., Sánchez, A., 2004. Monitoring the biological activity of the composting process: Oxygen uptake rate (OUR), respirometric index (RI), and respiratory quotient (RQ). *Biotechnol. Bioeng.* 88 (4), 520-527.
- German Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety, Ordinance on environmentally compatible storage of waste from human settlements and on biological waste treatment facilities of 20 February (2001).

1 URL:<http://www.bmu.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/ablagerungsverordnu>  
2 ng.pdf (Accessed 25 July 2017).  
3

4 Ghose, T.K., 1987. Measurement of Cellulase Activities. *Pure Appl. Chem.* 59 (2), 257-  
5 268.  
6

7  
8  
9 Grigorevski de Lima, A.L., Pires Do Nascimento, R., Da Silva Bon, E.P., Coelho,  
10 R.R.R., 2005. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial  
11 by products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme*  
12 *Microb. Tech.* 37 (2), 272-277.  
13  
14  
15  
16

17  
18  
19 Ikasari, L., Mitchell, D.A., 1996. Leaching and characterization of *Rhizopus*  
20 *oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Tech.* 19  
21 (3), 171-175.  
22  
23  
24  
25

26  
27 Kashi, S., Satari, B., Lundin, M., Horváth, I.S., Othman, M., 2017. Application of a  
28 mixture design to identify the effects of substrates ratios and interactions on  
29 anaerobic co-digestion of municipal sludge, grease trap waste, and meat processing  
30 waste. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 6156–6164.  
31  
32  
33  
34  
35

36  
37 Kim, E., Lee, D.H., Won, S., Ahn, H., 2016. Evaluation of Optimum Moisture Content  
38 for Composting of Beef Manure and Bedding Material Mixtures Using Oxygen  
39 Uptake Measurement. *Asian Austral. J. Anim.* 29 (5), 753-758.  
40  
41  
42

43  
44 Kupryś-Caruk, M., Kołodziejcki, R., 2014. Evaluation of ensilaged apple pomace  
45 usefulness for biogas production. *Adv. Sci. Tech. in Agri-Food Industry.* 69 (1), 5-  
46 13.  
47  
48  
49

50  
51 Lau, M.W., Dale, B., 2010. Extraction of solubles and microbial growth stimulants from  
52 lignocellulosic biomass and methods related thereto. US Application  
53 US20100267999A1, <http://europepmc.org/patents/PAT/US2010267999> (Accessed  
54 10 April, 2018)  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Masutti, D.C., Borgognone, A., Scardovi, F., Vaccari, C., Setti, L., 2015. Effects on the Enzymes Production from Different Mixes of Agro-Food Wastes. Chem. Engineer. Trans. 43, 487-492.
- Mendes, F.B., Ibraim D., Atala, P., Thoméo, J.C., 2017. Is cellulase production by solid-state fermentation economically attractive for the second generation ethanol production?. Renew. Energ. 114, 525-533.
- Mensink, M.A., Frijlink, H.W., Van der Voort Maarschalk, K., Hinrichs, W.L.J., 2017. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. Eur. J. Pharm. Biopharm. 114, 288–295.
- Mohd Azhar, S.H., Abdulla, R., Jambo, S.A., Marbawi, H., Gansau, J.A., Mohd Faik, A.A., Rodrigues, K.F., 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. Biochem. & Biophysics Reports. 10, 52-61.
- Ndamitso, M.M., Abulude, F.O., 2014. Effect of different salt concentrations on protein solubility of mushroom varieties obtained in Akure, Nigeria. Americ. J. of Food Nutri. 2 (1), 7-10.
- Novotný, O., Cejpek, K., Velíšek, J., 2008. Formation of carboxylic acids during degradation of monosaccharides. Czech J. Food Sci. 26 (2), 117-131.
- Pathak, P., Kant Bhardwaj, N., Singh, A.K., 2014. Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. Appl. Biochem. Biotechnol. 172, 3776–3797.
- Pikal-Cleland K.A., Carpenter J.F., 2001. Lyophilization-induced protein denaturation in phosphate buffer systems: Monomeric and tetrameric  $\beta$ -galactosidase. J. Pharm. Sci. 90 (9), 1255-1268.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Pirola, R.D.P.B., Miotto, L.S., Delabona, P.S., Farinas, C.S., 2013. Improving the extraction conditions of Endoglucanase produced by *Aspergillus Niger* under solid-state fermentation. *Braz. J. Chem. Eng.* 30 (1), 117 – 123.
- Pognani, M., Barrena, R., Font, X., Adani, F., Scaglia, B., Sanchez, A., 2011. Evolution of Organic Matter in a Full-Scale Composting Plant for the Treatment of Sewage Sludge and Biowaste by Respiration Techniques and Pyrolysis-GC/MS. *Bioresource Technol.* 102 (6), 4536–4543.
- Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2011b. Short-time estimation of biogas and methane potentials from municipal solid wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1121-1124.
- Puyuelo, B., Gea, T., Sánchez, A., 2010. A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate. *Chem. Eng. J.* 165 (1), 161-169.
- Ruggieri, L., Gea, T., Artola, A., Sánchez, A., 2009. Air filled porosity measurements by air pycnometry in the composting process: A review and correlation analysis. *Biores. Technol.* 100, 2655-2666.
- Sangwan, P., Mor, V., Dhankhar, R., Sukhani, S., 2015. Optimization of process parameters for cellulase and xylanase production using rice husk. *Int. J. Pharma. Bio. Sci.* 6 (4), 755-762.
- Sato, M.F., Vieira, R.G., Zardo, D.M., Falcao, L.D., Nogueira, A., Wosiacki, G., 2010. Apple pomace from eleven cultivars: an approach to identify sources of bioactive compounds. *Acta Sci-Agron.* 32 (1), 29-35.
- Shah, A.R., Madamwar, D., 2005. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World J. Microb. Biot.* 21 (3), 233-243.



- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Shalini, R., Gupta, D., 2010. Utilization of pomace from apple processing industries: a review. *J. Food Sci Tech.* 47 (4), 365-371.
- Soares de Castro, R.J., Sato, H.H., 2015. Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization. *Waste Biomass Valor.* 6, 1085–1093.
- Srivastava<sup>1</sup>, N., Srivastava, M., Manikanta, A., Singh, P., Ramteke, P.W., Mishra<sup>1</sup>, P.K., Malhotra, B. D., 2017. Production and Optimization of Physicochemical Parameters of Cellulase Using Untreated Orange Waste by Newly Isolated *Emericella varicolor* NS3. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183, 601–612.
- The U.S. Department of Agriculture and the U.S. Composting Council (2001) Test Methods for the Examination of Composting and Compost, Edaphos International, Houston.
- Torrado, A.M., Cortés, S., Salgado, J.M., Max, B., Rodríguez, N., Bibbins, B.P., Converti, A., Domínguez, J.M., 2011. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. *Braz J Microbiol.*, 42 (1), 94-409.
- Uncu, O.N., Cekmecelioglu, D., 2011. Cost-effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology. *Waste Manag.*, 31, 636–643.
- USDA Foreign Agricultural Service, Global Agricultural Information Network, 2016, GAIN Report Number: SP1637, <https://www.fas.usda.gov/> (accessed 5 January 2018).
- Van Soest, P., Robertson, J., Lewis, B., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74 (10), 3583-3597.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., Patil, S., 2014. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *J. of Environ. Chem. Eng.* 2, 573-584.
- Wikandari, R., Nguyen, H., Millati, R., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., Horváth, I.S., 2015. Improvement of Biogas Production from Orange Peel Waste by Leaching of Limonene. *Biomed. Res. Int.* 2015, 6.
- Xu, Z., Huang, F., 2014. Pretreatment Methods for Bioethanol Production. *Appl. Biochem. Biotech.* 174 (1), 43-62.
- Zulkarnain D., Zuprizal, Wihandoyo, Supadmo, 2016. Effect of Cellulase Supplementation on *in vitro* Digestibility and Energy, Crude Fiber and Cellulose Content of Sago Palm (*Metroxylon sp.*) Waste as Broiler Chicken Feed. *Pak. J. Nutr.* 15 (11), 997-1002.

## Figure captions

1  
2  
3 Figure 1. 10 L reactor scheme.  
4  
5  
6

7  
8 Figure 2. Temperature (solid line),  $sOUR_{1h}$  (dotted line), pH (black dots) and cellulase  
9 activity (empty dots) profiles from SSF of (a) Orange peel inoculated with compost, (b)  
10 Apple pomace inoculated with compost and (c) Rice fibre inoculated with compost.  
11  
12  
13  
14  
15  
16

17  
18 Figure 3. Percentage of cellulase activity recovery obtained in consecutive extractions,  
19 being 100% the total IU recovered after the consecutive extractions. Three independent  
20 triplicates are shown. Extractions were performed in static mode, distilled water as  
21 solvent and 1:3 solid:solvent extraction ratio: (a) Orange peel inoculated with compost,  
22  
23  
24  
25  
26  
27 (b) Apple pomace inoculated with compost and (c) Rice fibre inoculated with compost.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Table 1. Characterization of waste used as substrates in SSF and compost used as inoculum.

Parameter		Apple pomace	Orange Peel	Rice Fibre	Compost
pH		3.90 ± 0.05	4.64 ± 0.01	7.7 ± 0.2	7.6 ± 0.5
Conductivity (mS cm <sup>-1</sup> )		0.43 ± 0.03	0.79 ± 0.03	0.21 ± 0.07	6.3 ± 0.2
Moisture (%wb.)		82 ± 1	81.81 ± 0.03	67.75 ± 0.09	35 ± 1
Organic matter (% db.)		97 ± 3	98 ± 4	93 ± 6	n.m.
AT <sub>4</sub> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> DM)	<i>Fresh Residue</i>	165 ± 1	276 ± 6	306 ± 63	14.6 ± 0.4
	<i>Stabilized Residue</i>	33 ± 4	30 ± 16		
DRI <sub>24</sub> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> DM h <sup>-1</sup> )	<i>Fresh Residue</i>	2.02 ± 0.05	3.5 ± 0.1	6 ± 1	0.207 ± 0.007
	<i>Stabilized Residue</i>	0.43 ± 0.03	0.4 ± 0.2		
Cellulose (% db.)		5.0	4.8	11.7	10 ± 1
Hemicellulose (% db.)		11.0	10.9	3.76	10.2 ± 0.1
Lignin (% db.)		6.0	1.9	3.21	14 ± 1
Protein (% db.)		3.3	7.8	65.03	

wb: wet basis. db: dry basis; n.a.: not available. Values are the average of independent experiments and its standard deviation. Stabilization values were measured after 14 days of process for apple pomace and 24 days of process for orange peel.

Table 2. Summary of cellulose extraction experiments (30 min extraction time): extraction conditions, activity recovery, pH and conductivity of the extract.

<b>Apple pomace cellulase extraction</b>			
<b>Extraction mode</b>	<b>Activity recovery (%)</b>	<b>pH</b>	<b>Conductivity (mS cm<sup>-1</sup>)</b>
2-Static-DW a	105 ± 27	3.77 ± 0.07	1.14 ± 0.06
3-Static-DW <sub>a,b</sub>	98 ± 32	3.76 ± 0.06	0.91 ± 0.01
3-Agitated-DW <sub>a,b</sub>	96 ± 14	3.80 ± 0.04	0.98 ± 0.01
5-Static-DW <sub>a,b</sub>	81 ± 4	3.90 ± 0.05	0.43 ± 0.03
3-Static-BC b	75 ± 12	4.72 ± 0.04	4.2 ± 0.3
3-Recirculated-DW	56 ± 8		
<b>Orange peel cellulase extraction</b>			
<b>Extraction mode</b>	<b>Activity recovery (%)</b>	<b>pH</b>	<b>Conductivity (mS cm<sup>-1</sup>)</b>
5-Static-DW a	106 ± 7	4.64 ± 0.01	0.79 ± 0.03
3-Agitated-DW <sub>a, b</sub>	97 ± 13	4.62 ± 0.00	1.3 ± 0.1
2-Static-DW b	87 ± 1	4.59 ± 0.02	1.50 ± 0.02
3-Static-DW <sub>a, b</sub>	84 ± 19	4.61 ± 0.01	1.12 ± 0.01
3-Static-BC b	81 ± 12	4.72 ± 0.02	5.9 ± 0.4
<b>Rice fibre cellulase extraction</b>			
<b>Extraction mode</b>	<b>Activity recovery (%)</b>	<b>pH</b>	<b>Conductivity (mS cm<sup>-1</sup>)</b>
3-Static-DW a	139 ± 11	7.8 ± 0.2	0.22 ± 0.03
3-Agitated-DW a	138 ± 2	7.73 ± 0.05	0.28 ± 0.07
1-Static-DW <sub>a, b</sub>	115 ± 10	7.4 ± 0.1	0.32 ± 0.05
3-Static-BC <sub>a, b</sub>	103 ± 27	5.21 ± 0.02	5.07 ± 0.10
5-Static-DW b	92 ± 13	7.7 ± 0.2	0.21 ± 0.07

BC: Buffer citrate mono hydrate pH 4.8; DW: distilled water; 2: extraction ratio 1:2 (w:v), 3: extraction ratio 1:3 (w:v), 5: extraction ratio 1:5 (w:v). Subscript indicates the groups of extractions that are considered equal according to t-student test. Values are the average of independent experiments.

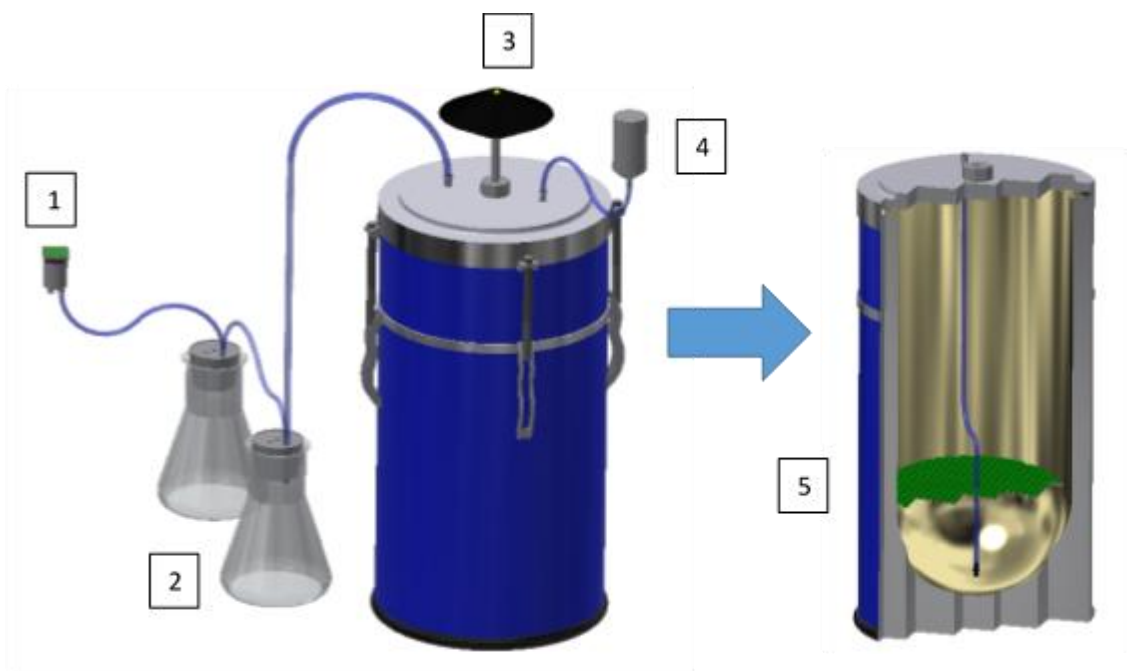
Table 3 Cellulase activity recovery after lyophilisation

<b>Extraction mode</b>	<b>Residue</b>	<b>Cellulase activity recovery (%) after lyophilisation</b>
3-Static-DW	Rice fibre	66 ± 2
3-Static-DW	Apple pomace	117 ± 9
3-Static-BC	Apple pomace	78 ± 2
3-Static-DW	Orange peel	125 ± 19
3-Static-BC	Orange peel	86 ± 6

Results are the average of 2 independent replicates. BC: Buffer citrate mono hydrate pH 4.8; DW: distilled water; 2: extraction ratio 1:2 (w:v), 3: extraction ratio 1:3 (w:v), 5: extraction ratio 1:5 (w:v).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

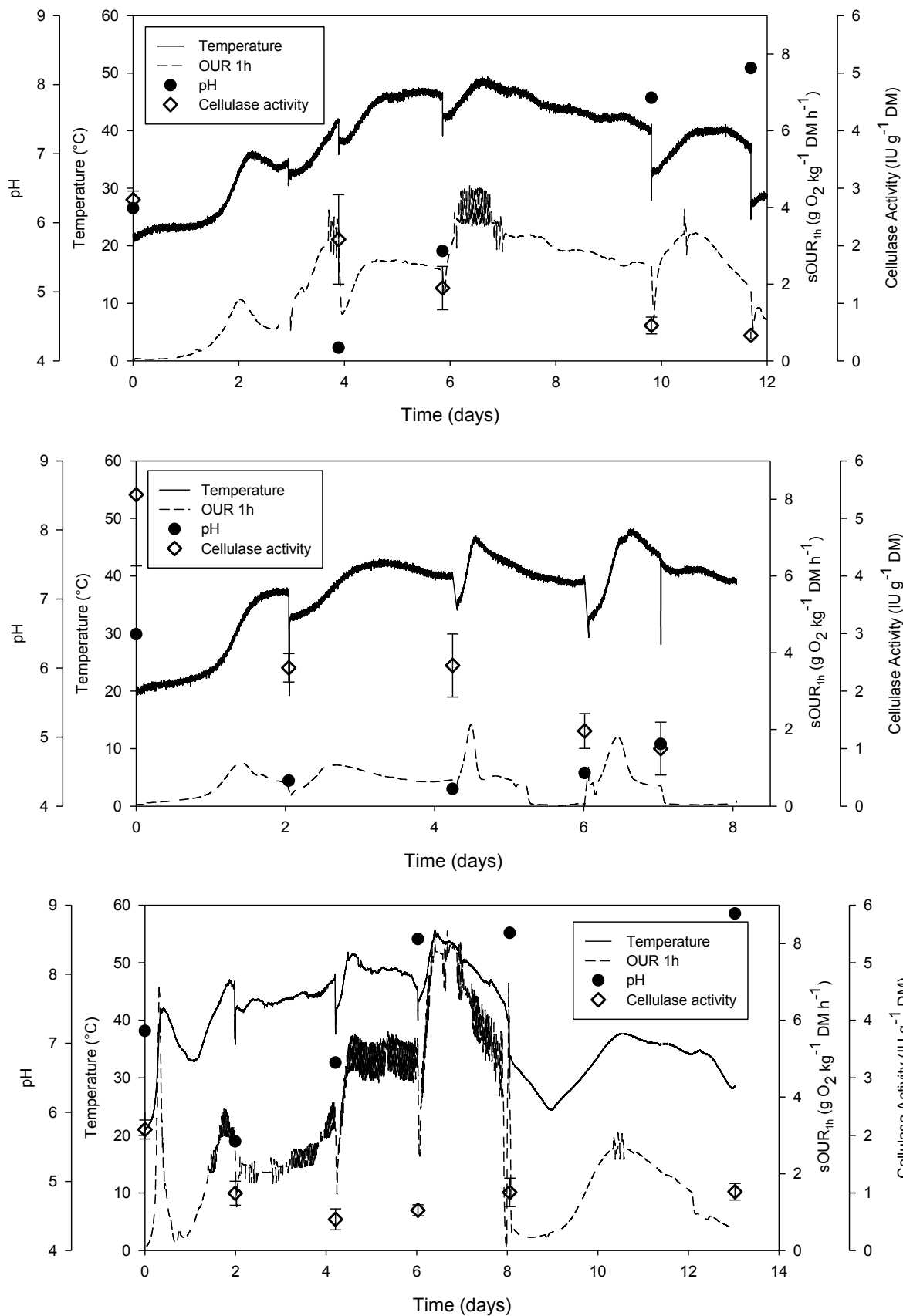
Figure 1



1: Electrochemical O<sub>2</sub> sensor, 2: water traps, 3: temperature probe, 4: mass flow-meter,  
5: inside of the reactor.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure 2

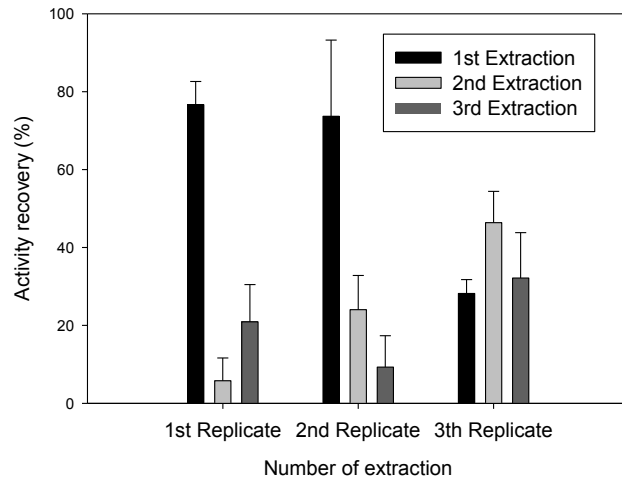


57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

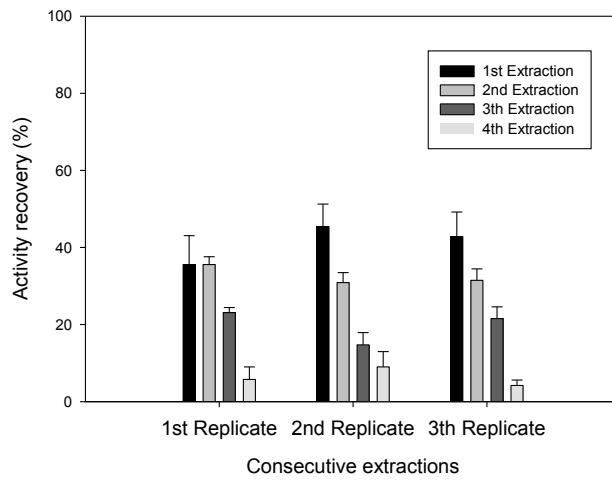


Figure 3

a)



b)



c)

