



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

“Pre-tratamiento de vinaza de etanol hidratado por un microorganismo ligninolítico en un reactor de lecho fluidizado y su efecto al ser acoplado a un reactor UASB”

Tesis que presenta

M. en C. Elda Isaura España Gamboa

En opción al título de

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN ENERGÍA  
RENOVABLE**

Mérida, Yucatán

Noviembre, 2015



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis, la Dra. Liliana Alzate Gaviria por todo su apoyo, confianza, motivación, paciencia y ayuda en la elaboración de esta tesis.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Blondy Canto Canché por todo su apoyo, palabras de aliento y consejos para la elaboración de esta tesis.

A mi tutora externa, la Dra. Teresa Vicent Huguet por recibirme en su laboratorio en la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y enseñarme el manejo de los biorreactores en solamente tres meses.

A mi tutor externo el Dr. Xavier Font Segura de la UAB y mi tutor interno el Dr. Javier Mijangos Cortés del CICY, por todas sus recomendaciones en el transcurso de la elaboración de la tesis.

A mis revisores de tesis interno y externo, el Dr. Raúl Tapia Tussell (CICY) y Dr. Juan Enrique Ruiz Espinoza (UADY).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. y en especial a las unidades de Energía Renovable y Biotecnología, por proporcionar las facilidades para desarrollar este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Barcelona, en especial a la facultad de Ingeniería Química, por las instalaciones y facilidades proporcionadas para el desarrollo de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca No. 234317 otorgada.

A la Dra. Silvia Maribel Contreras del CIATEJ y a la Dra. Sara Solís Pereira del Tecnológico de Mérida, por su ayuda proporcionada para la estandarización del protocolo de actividad enzimática.

A las doctoras Paqui Blánquez y Gloria Caminal, por su ayuda proporcionada durante mi estancia en la Universidad Autónoma de Barcelona. De igual forma, a la M.C. Lucía Delgado, por su ayuda técnica en los experimentos elaborados.

Al M.C. Jorge Domínguez Maldonado, técnico académico de la unidad de energía renovable del CICY, por su amistad y apoyo prestado en la realización de esta tesis.

Al M.C. Miguel Tzec, técnico académico de la unidad de biotecnología del CICY, por toda la ayuda técnica otorgada.

A todos mis amigos que estuvieron apoyándome hasta el último momento. A Melissa y Patricia que no permitieron que me rindiera y creyeron en mí hasta el final. A Francisco y Gerardo que me ayudaron en la parte técnica para que pudiera continuar con los experimentos. A Elda, Harvey, Katia, Harbey, Muriel, Arely, Daniel, etc... Todos mis amigos que convertían al CICY en un ambiente agradable para trabajar. A mis amigos y compañeros de la UAB, Lászlo, Jorge, Laura, Cesc, Marina, Rebeca, etc... Que me apoyaron en lo técnico y en lo personal para realizar este proyecto. A mis amigos de la primera generación de energía renovable: Ana, Arely, Angélica, Frank y Andrés, que siempre me apoyaron.



## **DEDICATORIA**

*A mi madre Elda Gamboa, por todo su amor, sus consejos y palabras de aliento para seguir adelante.*

*A mi padre Alvar España, por su preocupación y por siempre confiar en mí.*

*A mi hermano Noé, mi cuñada Brenda y en especial mi sobrino Fernando, que con su frase “quiero ser científico como tú” hizo que me esforzara más.*

*A Liliana Alzate, Blondy Canto y Teresa Vicent, a las que considero mis tres madres adoptivas y sin sus consejos no hubiese podido terminar este trabajo.*

*A todas esas personas que estuvieron conmigo en esta etapa de mi vida, algunas solo estuvieron un corto tiempo y otras se quedaron hasta el final, muchas gracias y les dedico esta tesis.*



## ÍNDICE

ÍNDICE .....	vii
LISTADO DE TABLAS.....	ix
LISTADO DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	4
Objetivo principal.....	4
Objetivos secundarios .....	4
ANTECEDENTES.....	5
1.1. Caracterización de vinazas de diferentes fuentes de materia prima .....	5
1.1.1. Vinazas de azúcar de caña.....	7
1.1.2. Vinazas de azúcar de remolacha.....	7
1.1.3. Vinazas de sorgo dulce. ....	8
1.1.4. Vinazas de uva. ....	8
1.2. Propuestas de tratamiento para vinazas.....	8
1.2.1. Tratamiento anaerobio de vinazas .....	10
1.2.1.1. Reactor de película fija (RPF) .....	11
1.2.1.2. Reactor anaerobio de lecho fluidizado (RANLEF) .....	13
1.2.1.3. Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (UASB por sus siglas en inglés) .....	15
1.2.2. Tratamientos biológicos para la remoción de color en vinazas.....	19
1.2.2.1. Remoción de color por bacterias.....	20
1.2.2.2. Remoción de color por hongos.....	23
1.3. Tipos de reactores empleados para el tratamiento de aguas residuales utilizando hongos .....	24
HIPÓTESIS .....	29
METODOLOGÍA.....	30
2.1. Procedencia y caracterización de las vinazas de etanol hidratado.....	30
2.2. Microorganismos ligninolíticos .....	31
2.2.1. <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	31



2.2.2. Hongos ligninolíticos.....	32
2.3. Evaluación a nivel matraz de la degradación de vinazas empleando microorganismos ligninolíticos.....	32
2.4. Ensamble del biorreactor de lecho fluidizado (BILEF).....	34
2.4.1. Operación en lote del BILEF inoculado con “pellets” de <i>T. versicolor</i> .....	35
2.4.2. Operación en lote del BILEF inoculado con “discos” de B19-01-7(7).....	36
2.4.3. Operación en continuo del BILEF inoculado con “pellets” de <i>T. versicolor</i> ..	36
2.5. Reactor UASB para el tratamiento de vinazas de etanol hidratado.....	37
Sistema 1: Vinaza diluida.....	37
Sistema 2: Acoplamiento BILEF-UASB.....	38
2.6. Análisis estadístico .....	38
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	39
3.1. Caracterización de vinazas.....	39
3.2. Evaluación de la degradación de vinazas empleando microorganismos ligninolíticos a nivel matraz.....	40
3.3. Operación en lote del BILEF inoculado con “pellets” de <i>T. versicolor</i> en condiciones estéril y no estéril.....	46
3.4. Operación en lote del BILEF inoculado con “discos” de <i>A. versicolor</i> en vinaza 10% estéril .....	51
3.5. Operación en continuo del BILEF inoculado con <i>T. versicolor</i> en condición no estéril	53
3.6. Reactor UASB para el tratamiento de vinazas de etanol hidratado.....	55
Conclusiones.....	60
Bibliografía .....	61

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Caracterización de vinazas procedentes de la fermentación de diferentes sustratos .....	9
Tabla 1.2. Diferentes opciones para el tratamiento de vinazas.....	10
Tabla 1.3. Tratamiento anaerobio de vinazas en diferentes tipos de reactores y diferentes procesos.....	19
Tabla 3.1. Caracterización física-química de las vinazas empleadas en el estudio.	39
Tabla 3.2. Caracterización del influente y efluente en los sistemas 1 y 2.....	55

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructuras de melanoidinas de bajo peso molecular y su enlace con proteínas.....	6
Figura 1.2. Reactor con un sistema de biopelícula.....	25
Figura 1.3. Secuencia de tratamiento anaerobio/aerobio.....	26
Figura 1.4. Esquema del reactor.....	27
Figura 1.5. Esquema del Biorreactor de Lecho Fluidizado (BILEF).....	28
Figura 1.6. Reactor BioFlo 110, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ..	29
Figura 2.1. Instalaciones del ingenio “La Gloria”.....	30
Figura 2.2. Reactivación de la cepa bacteriana <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	32
Figura 2.3. BILEF utilizado para la decoloración de vinazas de etanol hidratado.	34
Figura 2.4. Equipos empleados durante la digestión anaerobia de las vinazas de etanol hidratado.....	37
Figura 3.1. Absorbancia a 475 nm (determinación de color) en dos diferentes diluciones de vinaza (10 y 50%) inoculando a <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	41
Figura 3.2. Absorbancia a 475 nm (determinación de color) en vinazas inoculadas con hongos ligninolíticos en vinaza 50%.....	43
Figura 3.3. Crecimiento de <i>Aspergillus versicolor</i> .....	44
Figura 3.4. Absorbancia a 475 nm (medición de color) en vinaza 10% tratada con los hongos <i>A. versicolor</i> y <i>T. versicolor</i> .....	45
Figura 3.5. Compuestos fenólicos en vinaza 10% tratada con los hongos <i>A. versicolor</i> y <i>T. versicolor</i> .....	45
Figura 3.6. Desempeño del BILEF en condiciones estéril y no estéril.....	47
Figura 3.7. Cambio de coloración en las muestras del BILEF con respecto al tiempo utilizando al hongo <i>T. versicolor</i> .....	49
Figura 3.8. Desempeño del BILEF en condición estéril utilizando <i>A. versicolor</i> ...	52
Figura 3.9. Desempeño del BILEF en condición no estéril operado en continuo..	53
Figura 3.10. Comportamiento de la producción de biogás y contenido de metano en el sistema 1 y sistema 2.....	59

## RESUMEN

Durante la producción de etanol es generada la vinaza. Los compuestos fenólicos y las melanoidinas contribuyen a su color característico y convierten a la vinaza en un agua residual de difícil degradación. Aunque la digestión anaerobia es factible, la presencia de estos compuestos inhibitorios afecta severamente a este proceso. Una opción para la eliminación de compuestos fenólicos y melanoidinas es el uso de microorganismos ligninolíticos. En la literatura se ha encontrado que *Trametes versicolor* es capaz de eliminar el 82% de color y 77% de demanda química de oxígeno (DQO) en vinazas cuando son añadidos nutrientes, sin embargo, estos autores no presentan datos sobre la degradación de fenol. Esta información hace de *T. versicolor* una opción prometedora para el tratamiento de vinazas, sin embargo, para una aplicación industrial es necesario evaluar el desempeño de degradación en un biorreactor.

Este estudio demostró la posibilidad de usar un BILEF para la eliminación de compuestos fenólicos ( $67 \pm 19\%$ ) y DQO ( $38 \pm 5\%$ ) en condición no estéril por *T. versicolor*, sin embargo, la eliminación de color no fue posible, probablemente debido a la ausencia de otras enzimas clave involucradas en este proceso. La operación en continuo del BILEF fue llevada a cabo exitosamente por 26 días, siendo este el mayor valor encontrado respecto a lo existente en la literatura. Cuando el BILEF fue acoplado al reactor UASB se registró una mejor calidad de efluente para disposición al ambiente y un mayor contenido de metano ( $74 \pm 6\%$ ) en el biogás producido, sin embargo, el rendimiento de metano fue menor ( $0.18 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg COD}_{\text{removida}}$ ) que el sistema sin acoplar el BILEF ( $0.28 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg COD}_{\text{removida}}$ ), posiblemente debido a una menor disposición de materia orgánica de fácil degradación o inhibición microbiana en la digestión anaerobia.

El acoplamiento de un BILEF a un reactor UASB es una tecnología prometedora ambiental para el tratamiento de las vinazas de etanol hidratado y para la producción de un biocombustible como el metano.

## ABSTRACT

Vinasse is a byproduct generated in the production of ethanol. Phenolic compounds and melanoidins contribute to its characteristic color and make vinasse a difficult wastewater for degradation. Although anaerobic digestion is feasible, the presence of these inhibitory compounds severely hinders this process. An option for the elimination of phenolic compounds and melanoidins is the use of ligninolytic microorganisms. Previously it was found that *Trametes versicolor* is able to eliminate 82% of color and 77% of chemical oxygen demand (COD) in vinasse when nutrients were added. The authors do not present data regarding phenol degradation. This information makes *T. versicolor* a promising option for the treatment of vinasse. Nevertheless for an industrial application it is necessary to evaluate the performance of degradation in a bioreactor.

This study demonstrates the possibility of using a fluidized bed reactor for the elimination of phenolic compounds ( $67 \pm 19\%$ ) and COD ( $38 \pm 5\%$ ) at non-sterile conditions by *T. versicolor*. The elimination of color was not possible probably due to the absence of other key enzymes involved in this process. Continuous operation of the fluidized bed bioreactor was carried out successfully for 26 days, being this period the higher value found in the literature. When the fluidized bed bioreactor was coupled to the UASB reactor it was registered a better quality of effluent for disposal and higher methane content ( $74 \pm 6\%$ ) in the biogas produced. The methane yield ( $0.18 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg COD}_{\text{removal}}$ ) was less than in the system without coupling the fluidized bed bioreactor ( $0.28 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg COD}_{\text{removal}}$ ) possibly due to a microbial inhibition in the anaerobic digestion.

The coupling of fluidized bed bioreactor to UASB is a promising environmental technology for the treatment of hydrous ethanol vinasse and the production of methane as a biofuel.

## INTRODUCCIÓN

La producción de etanol para combustible, uso farmacéutico, industrial y bebidas alcohólicas se ha incrementado en los últimos años a nivel mundial. En el año 2013 esta producción alcanzó los 88.6 billones de litros, siendo Estados Unidos de América el mayor productor, seguido por Brasil y la Unión Europea [1]. En México el 2 de febrero de 2008 entró en vigor la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, la cual tiene como objetivo la diversificación de las fuentes de energía renovable y crear condiciones que permitan de manera sustentable el crecimiento económico y la protección de los ecosistemas. De acuerdo a la Secretaría de Energía (SENER), ante la situación actual del sector cañero, y con el ánimo de contribuir al desarrollo rural del país, existe la disposición en la Dirección General de Petróleos Mexicanos (PEMEX) de adquirir el etanol para permitir desarrollar un mercado para este biocombustible en el país. Se propone ejecutar un esquema regional de introducción de etanol anhidro al 5.8% (E6) en gasolinas magna para impulsar algunos proyectos que abastezcan cantidades moderadas de etanol en Terminales de Almacenamiento y Reparto (TAR) aptas para tal efecto, y así generar experiencia en el manejo de este combustible. Se pretende que en Chiapas, Colima, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas y Veracruz, a través de 19 TAR puedan recibir y utilizar etanol como componente de gasolina, con requerimientos aproximados para el año 2020 de hasta 498 millones de litros anuales. Cabe mencionar que en función de las cartas de intención de ventas recibidas, en una primera etapa únicamente se licitarán 8 TAR ubicadas en Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz con requerimientos aproximados para el año 2020 de hasta 190 millones de litros anuales. Dependiendo de los resultados de esta primera etapa se decidirá si se procede o no a una licitación de las 11 TAR restantes [2]. En México, en el año 2013 se produjeron 17 millones de litros de alcohol hidratado (96% de concentración), por lo tanto, para alcanzar el objetivo propuesto por la SENER se necesita incrementar la producción en los próximos años [3].

La producción de etanol en las destilerías consiste principalmente de cuatro pasos: preparación del sustrato, el cual depende de la fuente de insumo, fermentación, destilación y almacenamiento [4]. Durante todo este proceso se generan grandes cantidades de residuos conocidos como vinazas, cuyas características dependen en gran medida de la

materia prima utilizada en la obtención del etanol. En el caso del uso de granos de maíz, cebada y trigo existe una gran parte de sólidos insolubles, los cuales son separados por centrifugación y mezclados con un almíbar obtenido de los sólidos solubles. Esta mezcla es posteriormente deshidratada y al producto final se le conoce como granos secos de destilación con solubles (DDGS por su abreviatura en inglés), los cuales son utilizados como alimento en la ganadería. En el caso de la caña de azúcar, remolacha, uva, agave y sorgo dulce, las vinazas generalmente contienen una gran cantidad de sólidos solubles. De este tipo de materia prima se pueden obtener entre 9 a 14 litros de vinazas por cada litro de alcohol hidratado obtenido, las cuales poseen un pH ácido (3.5 - 5) y una demanda química de oxígeno (DQO) entre 50-150 g/L. Además, la presencia de compuestos fenólicos (8,000 – 10,000 mg/L), melanoidinas (resultantes de la reacción de los azúcares y las proteínas por la reacción de Maillard), caramelos y furfurales contribuyen a su color café oscuro y convierten a la vinaza en un residuo de difícil degradación [5-9]. En la literatura se ha encontrado que las vinazas tienen un alto valor de fertilizante, debido a su contenido de materia orgánica y micronutrientes, por lo tanto, es frecuentemente reutilizada en ferti-irrigación de cultivos. Sin embargo, cuando es usada en grandes cantidades, las vinazas pueden saturar el suelo con compuestos recalcitrantes como los fenoles y polifenoles que producen efectos negativos sobre los microorganismos y las plantas de las zonas de descarga, además la alta coloración café, no permite el paso de luz, evita la fotosíntesis y produce condiciones anaerobias [10-14]. En México, se ha observado que la aplicación de vinaza cruda a los cultivos de caña de azúcar deteriora el crecimiento de los cultivos sin reducir la cantidad de fertilizante, por lo tanto es necesario diluir las vinazas a 10% v/v con agua para poder ser utilizadas en ferti-irrigación [15]. Recientemente, González y Mejía [16], determinaron el efecto de la ferti-irrigación con vinaza durante 50 años sobre la calidad de un acuífero en el este central de la región de México, indicando que este acuífero tiene el potencial de estar contaminado por la profunda percolación de la vinaza irrigada. Todos estos problemas convierten a las vinazas en un grave pasivo ambiental; por lo tanto, es necesario un tratamiento de acondicionamiento de estos residuos antes de su disposición. Existen diferentes tecnologías para el tratamiento de las vinazas, entre las cuales, el tratamiento anaerobio se ha considerado como la mejor opción debido su capacidad de procesar altas cargas orgánicas (hasta 100 kg DQO/m<sup>3</sup>.día), obteniendo además la producción de un biocombustible como es el metano [5, 17, 18]. La digestión anaerobia puede ser llevada a cabo en una amplia variedad de reactores, pero los principalmente

utilizados en el tratamiento de vinazas son: Reactor de Película Fija (RPF), Reactor de Lecho Fluidizado (RANLEF) y Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (UASB por sus siglas en inglés). Las principales ventajas que presenta el UASB con respecto a los otros reactores son un menor costo de inversión y al no tener un material de soporte, como es el caso del RPF y el RANLEF, se elimina la posibilidad de obstrucciones; esto lo convierte en una de las mejores opciones para el tratamiento anaerobio de las vinazas [6, 19]. Sin embargo, Jiménez *et al.* [5], mencionaron que aunque la digestión anaerobia de muchos tipos de vinazas es factible y totalmente atractiva desde el punto de vista energético, la presencia de sustancias inhibitorias tales como los compuestos fenólicos y las melanoidinas obstaculizan severamente al proceso de la digestión anaerobia. Esto disminuye la cinética y reduce la producción de metano y los coeficientes de rendimiento, por tal motivo, ellos propusieron eliminar estos compuestos complejos antes de la digestión anaerobia. Además, la presencia de compuestos fenólicos en las aguas de irrigación y para beber representa un problema para la salud y el medio ambiente [20].

Una opción para la eliminación de compuestos fenólicos y melanoidinas es el uso de organismos lignocelulósicos, entre los cuales se encuentran los hongos de podredumbre blanca. Estos microorganismos, bajo condiciones apropiadas, producen fenol oxidasa extracelular, llamada lacasa [21]. La lacasa cataliza la oxidación de varios compuestos aromáticos, específicamente compuestos fenólicos (*orto*- y *para*- difenoles, aminofenoles y polifenoles), anilinas, poliaminas y aril diaminas al igual que algunos iones inorgánicos, mientras simultáneamente reduce el oxígeno molecular a agua [22, 23].

*T. versicolor* es un hongo de podredumbre blanca capaz de degradar y/o mineralizar un amplio rango de contaminantes resistentes a otros microorganismos, tales como colorantes, policlorobifeniles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas, pentaclorofenoles y disruptores endocrinos [24-26]. Benito *et al.* [27] probaron que *T. versicolor* en matraces es capaz de eliminar el 82 % de color y 77 % de DQO en vinazas cuando fue añadido sacarosa y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , sin embargo estos autores no presentan datos sobre la degradación de fenol. Esta información convierte a *T. versicolor* en una opción prometedora para el tratamiento de vinazas, sin embargo, para una aplicación industrial es necesario evaluar el desempeño de la degradación de vinazas en un biorreactor. Blánquez *et al.* [28] mencionaron que su grupo de investigación desarrolló un proceso continuo para la degradación del colorante textil Gris Lanaset G y además de una amplia experiencia en la degradación de otros tipos



de contaminantes, como son disruptores endocrinos, tricloroetileno y tetracloroetileno usando *T. versicolor* en forma de pellet en un biorreactor de lecho fluidizado.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Desarrollar un proceso de tratamiento integrado utilizando un biorreactor de lecho fluidizado (BILEF) inoculado con un microorganismo ligninolítico para degradar compuestos fenólicos y color presentes en vinazas de etanol hidratado y posteriormente aplicar un tratamiento anaerobio en un reactor UASB para la producción de biogás.

### **Objetivos específicos**

1. Comparar la capacidad de eliminación de los compuestos fenólicos y el color presentes en vinazas de etanol hidratado a nivel matraz de *T. versicolor* (ATCC 42530) con respecto a un conjunto de organismos ligninolíticos preseleccionados en el CICY u obtenidos de bancos de colección.
2. Evaluar la degradación de los compuestos fenólicos y decoloración en el BILEF operado en lote en condiciones estériles y no estériles.
3. Operar en forma continua el BILEF de acuerdo a los parámetros obtenidos en la operación en lote.
4. Realizar el acoplamiento del BILEF+UASB y evaluar la recuperación de energía en forma de metano y calidad del efluente obtenido durante el tratamiento de vinazas de etanol hidratado.

# CAPÍTULO 1

## ANTECEDENTES

### 1.1. Caracterización de vinazas de diferentes fuentes de materia prima

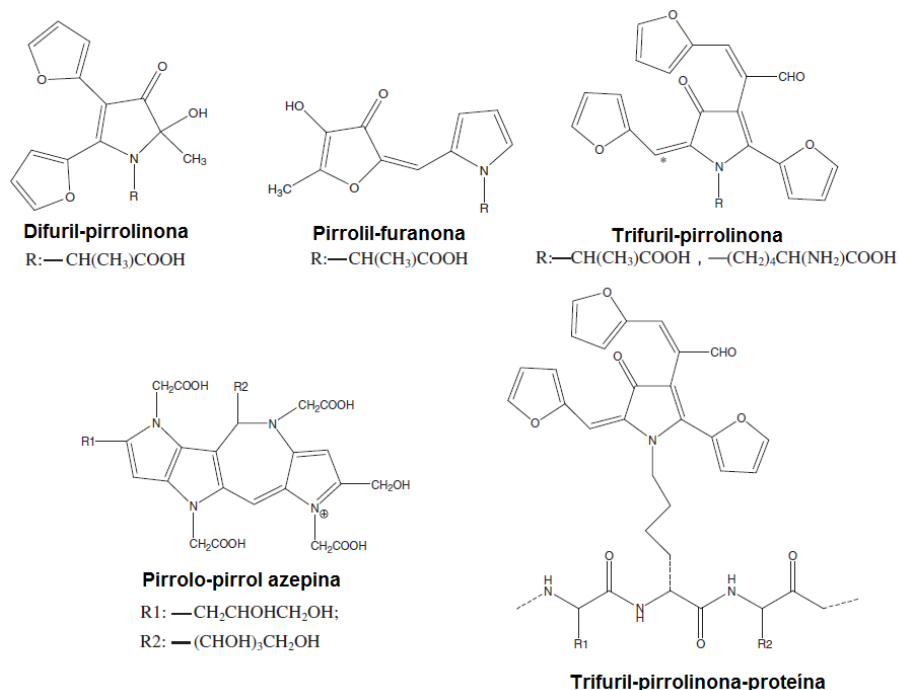
El etanol posee diferentes usos y dependiendo de éstos varía su grado de pureza. En el tipo combustible se necesita un 99.9% de pureza, mientras que, en una bebida alcohólica se encuentra en un intervalo de 5 al 40%. Las características de las vinazas generadas durante la producción de un alcohol hidratado o tipo combustible son químicamente más complejas que las producidas en las bebidas alcohólicas. Esto se debe a que durante el proceso de destilación, las melanoidinas, cetonas, compuestos aromáticos, ésteres, entre otros, se encuentra en las vinazas en una mayor cantidad, mientras que en el caso de las bebidas alcohólicas una parte de estos compuestos permanecen en las bebidas, contribuyendo al sabor y al aroma [29].

Las características de las vinazas también dependen de la procedencia de la materia prima utilizada para la producción de etanol, las cuales son clasificadas en 4 principales fuentes [30-32].

1. *Sacarosa*, una de las más atractivas debido a que los azúcares se encuentran en una forma más simple. Ésta se encuentra en caña de azúcar, remolacha, uva y sorgo dulce.
2. *Inulina*, es un polisacárido compuesto de fructosa y se encuentra en varias plantas como bardana y diversas especies de Agave y Dioscorea.
3. *Almidón*, es un carbohidrato que presenta mayor complejidad molecular que los anteriores, por lo que necesita ser transformado en azúcares más simples, lo que requiere un paso inicial adicional. Los cereales como el maíz, trigo y cebada, al igual que tubérculos como yuca, camote y papa forman parte de este tipo de fuente.
4. *Lignocelulosa*, es la más abundante, pero su complejidad estructural hace que su conversión a carbohidratos fermentables sea difícil. Entre sus fuentes se encuentra la madera, residuos agrícolas y forestales.

En general en la literatura se describe que un gran problema de las vinazas son los colorantes, los cuales presentan un tono café oscuro. Esto se debe principalmente a la presencia de caramelos de azúcares sobrecalentados, furfurales generados en la hidrólisis con ácidos, compuestos fenólicos como el ácido tánico y húmico y melanoidinas resultantes

de la reacción de Maillard, en la cual los azúcares (carbohidratos) se conjugan con los grupos amino de las proteínas [6, 30]. En la Figura 1.1 se presentan algunos ejemplos de melanoidinas. Estos productos de la reacción de Maillard presentan efectos de inhibición del crecimiento microbiano debido al secuestro de amonio, aminoácidos y péptidos; de igual forma, impiden la formación de enlaces en las cadenas polipeptídicas y secuestran cationes metálicos esenciales [33].



**Figura 1.1. Estructuras de melanoidinas de bajo peso molecular y su enlace con proteínas [34].**

Asimismo, los compuestos fenólicos pueden afectar negativamente las actividades enzimáticas y por lo tanto la actividad microbiana. Por ejemplo, en ambientes acuosos, los ácidos carboxílicos y los polifenoles son ionizados e interactúan con el grupo amino protonado de las proteínas, confiriéndoles un carácter más hidrofóbico, lo que ocasiona su precipitación y pérdida de actividad enzimática [5, 12, 35]. Desafortunadamente, estas características de las melanoidinas y los compuestos fenólicos representan una importante limitante en las propuestas del tratamiento biológico de las vinazas, lo que hace que sea un reto tecnológico.

Con base en el interés de este trabajo solo se describirán las características de las vinazas generadas en la producción de etanol a partir de fuentes ricas en sacarosa.

#### **1.1.1. Vinazas de azúcar de caña.**

Los jugos frescos de la caña de azúcar tienen un alto contenido de sacarosa; este disacárido puede ser descompuesto por las levaduras durante el proceso de producción del etanol por lo que no se requiere de una hidrólisis previa a la fermentación. De igual forma, el etanol se puede producir a partir de las melazas, las cuales al igual que el jugo de caña presentan un alto contenido de sacarosa; las melazas son un subproducto generado durante la concentración y precipitación del azúcar en el proceso de cristalización [12, 30, 32].

Como se puede observar en la Tabla 1.1, las vinazas generadas cuando se usan melazas de caña poseen un mayor valor de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), de demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno, fósforo, potasio y sulfatos, en comparación con las vinazas generadas cuando se usa el jugo de caña. Esto se debe a que las melazas poseen un alto contenido de compuestos orgánicos no fermentables, procedentes del proceso de cristalización del azúcar, que permanecen en las vinazas después del proceso de fermentación y recuperación del alcohol [30].

La información disponible en la literatura sugiere que los compuestos orgánicos más abundantes en las vinazas provenientes de la fermentación de sacarosa son glicerol, etanol, ácido láctico, ácido acético, oxalato, malato y un alto contenido de compuestos fenólicos [12]. De igual forma, existe presencia de nitrógeno, el cual se origina principalmente de las células de los microorganismos y las proteínas presentes en el sustrato [30].

#### **1.1.2. Vinazas de azúcar de remolacha.**

Al igual que la caña, la remolacha es utilizada para la producción de sacarosa y el etanol es generalmente producido a partir de las melazas del azúcar de remolacha. La remolacha contiene un compuesto rico en nitrógeno llamado betaína, el cual tolera una temperatura de hasta 200 °C y es considerado como un compuesto difícil de degradar, por lo tanto, éste se convierte en el principal componente de las vinazas cuando se produce etanol a partir de la fermentación del azúcar de remolacha [12]. Se han proporcionado datos de que las vinazas de remolacha poseen un mayor contenido de proteínas que las vinazas de caña de azúcar, y los principales ácidos orgánicos presentes son oxalato, lactato, acetato, malato y piruvato [12, 36]. Como se puede observar en la tabla 1.1, estas vinazas presentan altas

concentraciones de nitrógeno total, donde aproximadamente el 40% corresponde a nitrógeno orgánico [12, 30]. De igual forma, presentan un alto contenido de potasio y sulfatos, éstos últimos debido al proceso de sulfatación usado en la producción del azúcar [36].

### **1.1.3. Vinazas de sorgo dulce.**

Esta materia prima contiene dos tipos de carbohidratos, sacarosa y almidón, pero es considerado como una fuente de sacarosa debido a que su proporción es mayor que la del almidón [30]. La vinaza del sorgo dulce posee un mayor valor biológico que el bagazo de caña de azúcar cuando es usado como alimento para animales, debido a que es rico en nutrientes y minerales. De igual forma, esta vinaza contiene niveles de celulosa similares al bagazo de caña de azúcar, y por lo tanto es un buen prospecto para la obtención de pulpa [37]. Las características de este tipo de vinaza se puede observar en la Tabla 1.1.

### **1.1.4. Vinazas de uva.**

En los pasos de fermentación y clarificación del vino las vinazas alcanzan un alto contenido de materia orgánica (presencia de bacterias, levaduras vivas o muertas, residuos de uva) y nitrógeno total (Tabla 1.1). Sin embargo, el contenido de nitrógeno total es bajo en comparación con otras fuentes como azúcar de caña y remolacha. Los niveles de potasio son elevados debido a la presencia de tartrato ácido de potasio, el cual se encuentra en el zumo de la uva. También presentan un alto contenido de magnesio debido a sales solubles de magnesio presentes en los productos utilizados en la industria del alcohol. La concentración de manganeso en el vino está entre 1 y 3 mg/L, debido a que se encuentra en la semilla de la uva. El uso de hexacianoferrato de potasio para la eliminación de hierro en el vino genera precipitación de zinc, por lo cual, está presente en las vinazas. El pH ácido de las vinazas hace que se favorezca la solubilización del plomo (metal pesado) tanto de las tinajas fermentadoras como en los equipos destiladores del etanol [10, 30, 38, 39]. Los ácidos orgánicos generalmente encontrados en este tipo de vinazas son: ácido láctico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético y ácido málico. Los compuestos fenólicos se encuentran entre 29 y 474 mg/L expresado en ácido cafeico [10].

## **1.2. Propuestas de tratamiento para vinazas**

Desde el inicio de los 70's estos residuos han sido depositados directamente sobre suelos, debido a que poseen un cierto valor como fertilizante. Sin embargo, esta práctica genera

aumento de la carga orgánica, putrefacción y malos olores [39]. Chandra *et al.* [40] estudiaron el efecto de fertilizar semillas de *Phaseolus mungo* L con diferentes concentraciones de vinaza, encontrando que la vinaza puede ser utilizada como fertilizante cuando se encuentra en una concentración de 10%, mientras que, a mayor concentración produce un efecto dañino sobre las plantas y el suelo.

**Tabla 1.1. Caracterización de vinazas procedentes de la fermentación de diferentes sustratos.**

	Fuente de materia prima				
	Jugo de caña	Melaza de caña	Melaza de remolacha	Sorgo dulce	Uvas (Vino)
pH	4.04 - 4.6	4.46 - 4.8	4.3 - 5.35	4.5	3 - 4.2
DBO (g/L)	16.7	39.5	27.5 - 44.9	46	14.54 - 16.3
DQO (g/L)	30.4	84.9 - 95	55.5 - 91.1	79.9	26 - 50.2
N <sub>T</sub> (mg/L)	102 - 628	153 - 1230	1800 - 4750	800	104.9 - 650
P <sub>T</sub> (mg/L)	71 - 130	1 - 190	160 - 163	1990	65 - 118.4
K (mg/L)	1733 - 1952	4893 - 11000	10000 - 10030	nd	118 - 800
S <sub>T</sub> (mg/L)	1356	1500 - 3480	3500 - 3720	nd	120
Cu (mg/L)	4	0.27 - 1.71	2.1 - 5*	37	0.2 - 3.26
Cd (mg/L)	nd	0.04 - 1.36	<1*	nd	0.05 - 0.08
Pb (mg/L)	nd	0.02 - 0.48	<5*	nd	0.55 - 1.34
Fe (mg/L)	16	12.8 - 157.5	203 - 226*	317	0.001 - 0.077
Fenoles (mg/L)	nd	34 - 10000	450*	nd	29 - 474
RV (L/L <sub>Etanol</sub> )	13	12 - 20	9 - 15	14.3 - 16	11.6
Referencia	[30, 41-43]	[30, 41, 44-47]	[5, 30, 47-50]	[30, 43, 51]	[10, 30, 52]

N<sub>T</sub>, nitrógeno total; P<sub>T</sub>, fósforo total; S<sub>T</sub>, sulfato total; RV, rendimiento de vinaza, nd, dato no disponible.

\*Unidades en mg/Kg

Las diferentes tecnologías que han sido exploradas para reducir las características contaminantes de las vinazas se clasifican en dos principales grupos, los tratamientos biológicos y los físico-químicos (tabla 1.2).

Los tratamientos biológicos consisten en la introducción de microorganismos que utilizan como sustrato a los compuestos orgánicos presentes y de esta forma reducen el aspecto contaminante. Estos tratamientos pueden ser clasificados como aerobios o anaerobios, dependiendo del tipo de microorganismo utilizado. El alto contenido orgánico de las vinazas hace al tratamiento anaerobio más atractivo en comparación con los otros tratamientos [6, 19], debido a que una porción significativa de la DQO (>50%) puede ser transformada en

una fuente de energía renovable (biogás), la producción de lodo es baja y requiere menor cantidad de nutrientes [19, 30]. Sin embargo, se ha observado que los compuestos que le confieren la coloración a las vinazas (fenoles, furfurales y melanoidinas de la reacción de Maillard), son difíciles de degradar por digestión anaerobia y muchos de estos compuestos pueden llegar a ser tóxicos e interferir con la actividad de los microorganismos metanógenos [6].

**Tabla 1.2. Diferentes opciones para el tratamiento de vinazas.**

Tratamientos	Vinaza	%remoción DQO	%remoción color	Referencia	
Anaerobio	UASB Lecho fijo Lecho fluidizado	Concentrada	60-82.5	dg	[53-56]
Aerobio	Bacteriano	Pretratamiento anaerobio/Diluida	46-77.4	7.33-91.2	[29, 57, 58]
	Fúngico	Diluida	99	48-86.33	[59-61]
	Cultivo mixto	Pretratamiento Anaerobio/Diluida	51	67	[53]
	Algas	Diluida	61	52-60	[6, 62, 63]
Físico-químico	Absorción	Pretratamiento Anaerobio/Diluida	76-88	93-95	[64]
	Coagulación-floculación	Pretratamiento Anaerobio/Concentrada	74	87	[65, 66]
	Ozonización	Diluida	27-62	35-87	[67, 68]
	Oxidación electroquímica	Diluida	40-92	83-99	[69-71]
	Electrocoagulación	Diluida	63-76	98-99	[72, 73]

dg: difícil de degradar.

En el caso de los compuestos fenólicos, éstos inhiben el gradiente electroquímico de protones desarrollado en la membrana celular, resultando en una reducción del transporte de electrones y de producción de energía. Esta toxicidad es influenciada por la auto-oxidación, apolaridad, tipo, tamaño y número de sustituciones en el anillo aromático de la molécula. Por lo tanto, los fenoles perturban la cadena trófica establecida entre los microorganismos, afectando la producción de ácidos grasos, hidrógeno y consecuentemente, metano [35]. Como consecuencia, se han implementado los pretratamientos físico-químicos o post-tratamientos de afinación para la reducción de DQO y color [53, 69, 72, 74]; de igual forma pueden ser aplicados como único paso de tratamiento cuando las vinazas se encuentran diluidas [59, 67, 69, 70]. Sin embargo estos procesos de tratamiento físico-químicos presentan desventajas debido a los altos costos de operación, consumo de agentes químicos y la producción de un gran volumen de residuos. Por lo tanto,

muchas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de procesos biológicos aerobios que sean más amigables con el medio ambiente y competitivos en costos con respecto a los tratamientos físico-químicos [6, 75, 76].

### **1.2.1. Tratamiento anaerobio de vinazas**

Existe una gran variedad de reactores anaerobios para el tratamiento de vinazas. A continuación se presentan los más comunes.

#### **1.2.1.1. Reactor de película fija (RPF)**

También es conocido como de lecho fijo, consiste en la inmovilización de microorganismos sobre un soporte inerte para limitar la pérdida de biomasa e incrementar la actividad microbiana por unidad de volumen de reactor. Como consecuencia se puede obtener una mayor remoción de DQO en menores tiempos de retención hidráulico (TRH) y se tiene mejor tolerancia a cargas orgánicas tóxicas [4, 19]. El soporte inerte o empaquetado dentro del reactor proporciona una mayor área de superficie de contacto para el crecimiento microbiano. El afluente pasa a través del medio y los microorganismos anaerobios se fijan por sí mismos, creando una capa delgada de bacterias anaerobias llamada biopelícula, la cual le da al digester su nombre. En estos reactores se han empleado una gran variedad de materiales de soporte entre los que se encuentran poliuretano, cerámica, carbón activado granular, cloruro de polivinilo y medio plástico [4, 19]. Algunas características ideales para estos materiales son que posean una alta porosidad, una gran área superficial, propiedades de superficie adecuadas para la adherencia de pesos ligeros y que sean económicos [54].

Acharya *et al.* [54] investigaron tres tipos de empaque (carbón, fibra de coco y fibra de nylon), con el fin de identificar el soporte que permita mantener la mayor biomasa bacteriana dentro de un reactor anaerobio de película fija de flujo ascendente operado a 37 °C, y por lo tanto mejorar la eficiencia de biodegradación de vinazas procedentes de la producción de etanol hidratado a partir de melaza de caña. Los resultados demostraron que el empaque realizado con fibra de coco presentó una mayor estabilidad en el reactor, obteniendo una remoción de DQO de 60% y una producción de biogás de  $7.25 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{reactor}}\cdot\text{día}$ , con un contenido de metano de 52%, al aplicar una carga orgánica de  $23.25 \text{ kg DQO}/\text{m}^3\cdot\text{día}$ . Por otro lado, el empaque de carbón con esta misma carga obtuvo una remoción de DQO de 16% y una producción de biogás de  $1.8 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{reactor}}\cdot\text{día}$  con un contenido de metano de 28%,



mientras que utilizando el empaque de nylon, el reactor no presentó producción de biogás ni remoción de DQO. Estos autores registraron que el desarrollo de la biopelícula fue visiblemente más notable sobre el soporte de coco y carbón, pero no sobre nylon. Esta diferencia en el desarrollo de la biopelícula fue atribuida a la naturaleza hidrofóbica y a la superficie lisa del material de las fibras de nylon, lo que evita que el sustrato se adhiera a la superficie. Por otro lado, la alta porosidad y mayor área superficial de la fibra de coco ayudaron al predominio de los microorganismos metanogénicos y favorecer la producción de metano.

Bories y Ranyal [55] investigaron a escala piloto el comportamiento de un reactor de película fija con un volumen de  $10 \text{ m}^3$ , en el cual se utilizaron anillos corrugados de PVC con un índice de porosidad de 95% como medio de soporte para el tratamiento de vinazas de melaza de caña de azúcar. Este reactor fue operado en flujo descendente a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 220 días y se incrementó la carga orgánica de  $9.2 \text{ kg DQO/m}^3\cdot\text{día}$  hasta un valor de  $20.4 \text{ kg DQO/m}^3\cdot\text{día}$ . Este incremento en la carga orgánica no perturbó el sistema y las concentraciones de acetato y propionato permanecieron bajas a lo largo del experimento. Se observó que la remoción de DQO fue de 71 a 73.8 % a una carga orgánica de  $9.2 \text{ kg DQO/m}^3\cdot\text{día}$  y ésta decreció a 61.9% al aumentarla a  $20.4 \text{ kg DQO/m}^3\cdot\text{día}$ . Sin embargo, a lo largo de todo el experimento la producción de biogás fue  $21.4 \text{ m}^3$  por  $\text{m}^3$  de vinaza; el biogás estaba compuesto por 50-55% de metano y 40-45% de dióxido de carbono. Al finalizar el experimento se realizó la cuantificación de la biopelícula, encontrando 0.8 g de sólidos totales por gramos de material de soporte, lo que es equivalente a una concentración de 47 g de sólidos totales por litro de reactor, comprobando que la retención de los microorganismos sobre el material de soporte fue óptima.

Cho *et al.* [77] estudiaron el efecto de la forma de inoculación sobre el desempeño de un reactor empacado con partículas de polietileno y operado a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  para el tratamiento de vinaza sintética, la cual estaba compuesta por alcohol (etanol), ácidos volátiles (ácido acético), azúcar (sacarosa) y nutrientes ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  y extracto de levadura). Estos autores realizaron una división de un inóculo inicial de 1.7 L, obtenido de una planta para el tratamiento de aguas residuales sanitarias, en 1, 2, 3 y 4 inoculaciones, registrando una producción de metano de 9.8, 14.6, 18.9 y  $19.0 \text{ L/día}$  y una eficiencia final de remoción de DQO de 50, 75, 84 y 84% respectivamente, empleando una carga orgánica de  $6.6 \text{ kg DQO/m}^3\cdot\text{día}$ . En este trabajo al comparar entre 1 y 4 inoculaciones con la misma cantidad de lodo, claramente se pudo apreciar que la

acumulación de biomasa en los reactores se incrementó con el número de inoculaciones y como consecuencia se registró un aumento en la eficiencia de producción de biogás así como la de remoción de DQO.

En un estudio comparativo entre un reactor de película fija con un medio plástico como material de soporte y un UASB para el tratamiento de vinazas diluidas de melaza de caña, se observó que el UASB pudo operar a una carga orgánica máxima de 20.4 kg DQO/m<sup>3</sup>.día, alcanzando una remoción de DQO de 58%, una producción de biogás de 0.42 m<sup>3</sup>/kg DQO<sub>removido</sub> y un contenido de metano de 55%. Mientras que, el RPF solamente pudo operar a una carga orgánica máxima de 12.3 kg DQO/m<sup>3</sup>.día, con una remoción de DQO de 56%, una producción de biogás de 0.40 m<sup>3</sup>/kg DQO<sub>removido</sub> y un contenido de metano de 66%. Estos autores concluyeron que el UASB fue capaz de tolerar una mayor carga orgánica comparado con el RPF, debido a que el UASB desarrolló lodo granular durante la etapa inicial de funcionamiento, además de que el RPF presentó problemas de incrustaciones en el medio de soporte [78].

#### **1.2.1.2. Reactor anaerobio de lecho fluidizado (RANLEF)**

Este tipo de reactor contiene un medio inorgánico (roca, arena, carbón activado, resinas de intercambio aniónico o catiónico) denominado transportador, en el cual se adhieren los microorganismos y permanecen en crecimiento. Este transportador se mantiene en estado fluidizado debido a las fuerzas de resistencia producidas al introducir el sustrato al reactor y como consecuencia se provee de una mayor área superficial para la formación de biopelícula en el mismo [17]. Por lo tanto, este reactor es considerado como un sistema microbiano mezclado completamente, que puede alcanzar altas concentraciones de biomasa (cerca de 40 kg/m<sup>3</sup>) y altas velocidades de flujo (10-50 m/h) [79, 80], lo que permite que puedan ser operados a mayores cargas orgánicas y presentar una mayor resistencia a inhibidores [4, 17, 19]. Buffière *et al.* [81], enfatizan el papel que ejerce el desarrollo de biopelícula en este tipo de reactor, señalando que la biomasa adherida en el transportador afecta la hidrodinámica del lecho, modificándolo en tamaño y densidad aparente, lo que ha permitido observar un arreglo de las biopartículas (estratificación) de acuerdo a su velocidad terminal.

Fernández *et al.* [82], investigaron la influencia de la carga orgánica, el nivel de fluidización y el diámetro de partícula del transportador ( $D_p$ ), sobre el desempeño de dos reactores de lecho fluidizado a escala laboratorio. Estos autores estudiaron el tratamiento de vinazas de

melaza de caña, utilizando zeolita natural como material de soporte y operados a una temperatura de 30 °C. Durante la parte experimental se evaluaron en cada reactor dos diferentes cargas orgánicas (2.5 kg DQO/m<sup>3</sup>.día y 3.5 kg DQO/m<sup>3</sup>.día), y dos valores de nivel de fluidización (20% y 40%). El reactor R1 operó con partículas de zeolita entre 0.2 y 0.5 mm en diámetro ( $D_p$ ), mientras que el reactor R2 usó partículas con  $D_p$  entre 0.5 y 0.8 mm. Este trabajo mostró que el aumento en la carga orgánica ocasionó un mayor gradiente de concentración entre el líquido y la biopelícula, lo que favoreció el incremento de la remoción de materia orgánica (de 40% hasta 70% de remoción de DQO). De igual manera, el incremento en el nivel de fluidización mejoró el contacto entre los microorganismos adheridos en el soporte y el sustrato, lo que ocasionó que la remoción de DQO aumentara de 40% hasta 60%. Finalmente, R2 operó con una mayor remoción de DQO (40% - 75%) comparado con R1 (40% - 65%); esto se atribuyó a que el incremento en  $D_p$  redujo la posibilidad de una pérdida de biomasa del reactor. Por otro lado, estos autores observaron que la mayor producción metano (1 L/día) fue alcanzada cuando el reactor fue operado a la mayor carga orgánica (3.5 DQO/m<sup>3</sup>.día) y el mayor nivel de fluidización (40%), con lo que concluyeron que la producción de metano está influenciada por estos dos parámetros, pero no por el diámetro de la partícula.

Andalib *et al.* [80] investigaron el tratamiento de vinazas, obtenidas en la producción de alcohol hidratado a partir de maíz, usando un RANLEF con zeolita de diámetro promedio de 425-610  $\mu\text{m}$  como transportador. En este reactor el medio fue fluidizado a una velocidad de 1.4 cm/s y operado a una temperatura de 37 °C. Se señaló que en general, el proceso de acumulación de biomasa dentro del reactor comprende de dos pasos: la fijación de biomasa durante el periodo de aclimatación y el crecimiento de biomasa durante el proceso. En este trabajo, la concentración inicial de biomasa fijada fue 12.5 mg de sólidos volátiles suspendidos (SVS) por gramo de zeolita, la cual fue incrementando lentamente durante los 120 días que tardó la puesta en marcha del reactor. El coeficiente de variación de la biomasa fijada entre el día 140 y 170 fue de 2%, lo que indicó que se alcanzó una biopelícula estable y por lo tanto una excelente capacidad de mantener biomasa activa en el medio. Esto originó que el RANLEF a una carga orgánica de 29 kg DQO/m<sup>3</sup>.día registrara una remoción de DQO de 88% y una producción de metano de 160 L/día equivalente a 40 litros de metano por litro de vinaza.

### **1.2.1.3. Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (UASB por sus siglas en inglés)**

El reactor UASB es el digestor más popular en el tratamiento de varios tipos de residuos, debido principalmente a las siguientes ventajas [6, 17]:

- Este tipo de tecnología requiere menor inversión cuando se compara con un sistema de película fija o de lecho empacado.
- No existe un empaque de relleno, por lo tanto se elimina la posibilidad de obstrucciones.
- El consumo de potencia es baja, debido a que se puede utilizar el biogás producido para cubrir los requerimientos energéticos del sistema.

El UASB consiste de dos partes: una columna cilíndrica o rectangular y un separador de gas-líquido-sólido. El lodo semilla se introduce en la parte inferior del reactor y bajo condiciones apropiadas, las partículas ligeras saldrán mientras que los componentes más pesados serán retenidos. Por consiguiente, se forman gránulos o flóculos que consisten de materiales inorgánicos, orgánicos inertes y pequeños conglomerados de bacterias que se encuentran en el lodo semilla. Después de cierto periodo (usualmente entre 2 y 8 meses), dependiendo de las condiciones de operación y las características del agua residual y el lodo semilla, se desarrolla un lecho de lodos muy denso y con altas propiedades de sedimentación que puede ser granular o floculento. Por encima del lecho denso de lodos, hay una zona de manto de lodos con crecimiento más difuso y menores velocidades de sedimentación de partícula. Las reacciones biológicas se llevan a cabo tanto en el lecho de lodo altamente activo y en la zona del manto. Debido a que el flujo de alimentación es ascendente, el biogás producido y el lodo que flota debido a las burbujas de gas son separados del efluente por el separador gas-líquido-sólido, en el cual se evita la pérdida de los microorganismos o lodo granular flotante debido a la sedimentación de estos sólidos [17, 83].

La efectividad y estabilidad del UASB depende fuertemente de la puesta en marcha, la cual es afectada por numerosos factores físicos, químicos y biológicos, tal como el tipo de agua residual, las condiciones de operación y disponibilidad de poblaciones microbianas activas en el lodo semilla. Se requiere un periodo de aclimatación antes de aplicar altas cargas orgánicas, este periodo dura típicamente entre 2 y 8 meses, e incluso puede ser de mayor tiempo en un UASB para aplicaciones industriales. Aunque un UASB puede funcionar eficientemente sin gránulos, la formación de éstos durante el arranque permite alcanzar una alta eficiencia de remoción de DQO en menor periodo de tiempo y por lo tanto el tratamiento

de mayores volúmenes de aguas residuales. Estos gránulos son biopelículas esféricas desarrolladas por la auto-agregación de las células microbianas presentes en el reactor y se ha observado que éstos poseen un diámetro de 1-5 mm; el UASB puede soportar cargas orgánicas por arriba de los 40 kg DQO/m<sup>3</sup>.día. El desarrollo de estos gránulos puede ser dividido en cuatro pasos; (1) Transporte de las células a un sustrato; (2) Adsorción inicial reversible al sustrato por fuerzas físico-químicas; (3) Adhesión irreversible de las células al sustrato por apéndices microbianos y/o biopolímeros; (4) Multiplicación de las células y desarrollo de gránulos. Se ha observado que la adición de cationes multivalentes (Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>), de polímeros naturales (Quitano, extracto de semillas de *Moringa oleifera*, Carbón de bambú), así como de polímeros sintéticos y comerciales y polímeros híbridos orgánicos-inorgánicos, han mejorado el arranque y granulación de los UASB. También se ha reportado que el metanógeno acetotrófico *Methanosaeta* juega un papel clave sobre la granulación, por lo tanto, la presencia de este microorganismo en el lodo semilla y su crecimiento adecuado puede incrementar la formación de gránulos en el UASB [83-85].

Jhung y Choi, operaron un UASB a una temperatura de 35 °C para el tratamiento de vinazas concentradas de melaza de caña. Con la finalidad del desarrollo de gránulos se suministraron cargas orgánicas bajas (0.5 a 1.0 kg DQO/m<sup>3</sup>.día) durante el arranque, pero después de un año el lodo granular no se había desarrollado. Posteriormente, se evaluaron diferentes cargas orgánicas y encontraron que a 7.2 kg DQO/m<sup>3</sup>.día se registró una remoción de DQO de 71%, una producción de biogás de 0.42 m<sup>3</sup>/kg DQO<sub>removido</sub> y un contenido de metano de 57%. Al incrementar la carga orgánica a 12.5 kg DQO/m<sup>3</sup>.día, tanto la remoción de DQO, como la producción de biogás y el contenido de metano disminuyeron a 52%, 0.32 m<sup>3</sup>/kg DQO<sub>removido</sub> y 49%, respectivamente. Estos autores atribuyen que el buen desempeño del UASB solamente a bajas cargas orgánicas fue debido a que funcionó como un reactor en suspensión, ya que el lodo granular no se desarrolló y como consecuencia se presentó un lavado de los microorganismos al incrementar la carga orgánica.

Harada *et al.* [56] trabajaron con el tratamiento de vinazas diluidas de melaza de caña (10 g DQO/L) utilizando una carga orgánica de 28 kg DQO/m<sup>3</sup>.día en un UASB operado de forma termofílica (55 °C). Estos autores obtuvieron una remoción de DQO entre 39 - 50%, una remoción de DBO entre 80-95% y una producción de metano de 0.29 m<sup>3</sup> /kg DQO<sub>removido</sub>. En este estudio se realizó una prueba de biodegradabilidad que reveló que solo el 10% del DQO añadido fue convertido en metano en este tipo de vinaza, mientras que en vinazas de whisky más del 60% es convertido. Esto sugiere que la biodegradabilidad de las

vinazas varía considerablemente de acuerdo con el origen de los materiales de fermentación y el proceso de destilación. Algunos compuestos orgánicos, como los fenoles, producidos por oxidación y causantes de una coloración café oscuro, son reportados como recalcitrantes y tóxicos para los metanógenos. Estos compuestos fueron probablemente la causa de los bajos rendimientos en la remoción de DQO.

Goodwin y Stuart [86], estudiaron el desempeño de dos UASB operados a temperatura mesofílica (35 °C) para el tratamiento de vinazas de la producción de whisky. Durante este trabajo se emplearon diferentes cargas orgánicas, modificando el TRH y/o la proporción de vinaza en la alimentación. Durante los primeros 99 días de operación se incrementó la carga orgánica de 1.7 kg DQO/m<sup>3</sup>.día hasta 9.3 kg DQO/m<sup>3</sup>.día y la eficiencia de remoción de DQO fue aumentando gradualmente hasta alcanzar un valor de 90%. En este periodo la concentración de propionato en el efluente se estabilizó en 200 mg/L y el acetato en 300 mg/L. Sin embargo, cuando fue introducida al reactor una carga orgánica de 18.2 kg DQO/m<sup>3</sup>.día utilizando un afluente con una concentración de 70% de vinaza, se observó un decaimiento en el desempeño de ambos reactores, lo que fue seguido por un incremento sustancial de los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) en el efluente (1,500 - 2,300 mg/L). Esto fue atribuido a la alta concentración de vinaza y a la reducción del pH en el afluente. Posteriormente, utilizando bicarbonato de sodio como buffer para mantener el pH neutro dentro del reactor, se fue aumentando la concentración de vinaza de 40 hasta 90%, manteniendo una carga orgánica entre 10.3 y 15.2 kg DQO/m<sup>3</sup>.día; durante toda esta etapa ambos reactores presentaron un desempeño estable. Sin embargo, cuando se aumentó la carga orgánica a 22.8 kg DQO/m<sup>3</sup>.día, manteniendo el 90% de vinaza en el influente, uno de los reactores colapsó mientras que otro toleró el incremento sin ningún efecto de intoxicación. Esto probablemente se debió a que el último desarrolló una mayor actividad metanogénica, lo que previno la acumulación de AGVs en el efluente. El análisis indicó que mucha de la DQO en el efluente estaba presente como AGVs durante aquellas etapas donde se vio una disminución en el desempeño del reactor, indicando que la eficiencia del tratamiento está limitada por la velocidad de degradación de los AGVs. El tratamiento de las vinazas de whisky con este reactor durante el periodo estable tuvo una eficiencia de remoción de DQO de 90% en un intervalo de 10.3 a 15.2 kg DQO/m<sup>3</sup>.día; a mayores cargas orgánicas se producía inestabilidad y decaimiento en el reactor. Uzal *et al.* [87] emplearon dos UASB conectados en serie y en condiciones mesofílicas (35 °C) para el tratamiento de vinazas de whisky; estos reactores fueron inoculados con lodos granulares provenientes de

una planta de tratamiento de aguas residuales. Durante la parte experimental, la carga orgánica en el sistema UASB de dos etapas se incrementó de 0.6 a 27.5 kg DQO/m<sup>3</sup>.día de manera progresiva. En este periodo, la concentración de DQO del afluente fue elevada de 1,000 a 33,866 mg/L en la primera etapa. En el día 29, el TRH y la carga orgánica de la primera y segunda etapa del sistema UASB fueron 5.2 h y 15.3 kg DQO/m<sup>3</sup>.día y 5.2 h y 3.7 kg DQO/m<sup>3</sup>.día, respectivamente. La remoción de DQO en la primera etapa fue 76% y en la segunda etapa fue 39%. En el día 45, el TRH y la carga orgánica de la primera y segunda etapa fueron 9.7 h y 27.5 kg DQO/m<sup>3</sup>.día y 9.7 h y 13.3 kg DQO/m<sup>3</sup>.día, respectivamente. La remoción de DQO en la primera etapa fue 52% y en la segunda etapa fue 47%. A partir de este momento, la calidad del efluente de la primera etapa comenzó a deteriorarse. Se observó un cambio de coloración en el lodo granular de negro a café, que se atribuyó a la reducción de la actividad metabólica debido al efecto tóxico del agua residual y al incremento en el potencial de oxidación-reducción. Por otro lado, en la segunda etapa del reactor no se observaron efectos negativos debido al incremento de la carga orgánica en la primera etapa del sistema UASB.

La tecnología de Manto de Lodo Granular Expandido (MLGE) es una forma modificada del UASB, en donde se aplica una mayor velocidad de líquido superficial (5-10 m/h comparado con 3 m/h para aguas residuales solubles y 1-1.25 m/h para aguas residuales parcialmente solubles en un UASB). Debido a esta velocidad de ascensión, una parte importante del manto de lodo granular se encontrará expandido o en estado fluidizado en las regiones más altas del mismo, ocasionando un mejor contacto entre el residuo y el lodo [17, 53]. El tratamiento anaerobio a 20 °C en un reactor MLGE a escala piloto, con volumen de 225.5 L de vinazas procedentes de la producción de bebidas alcohólicas (550-825 mg/L de DQO), removió arriba del 80% de la DQO, aplicando una carga orgánica de 12.6 kg DQO/m<sup>3</sup>.día, un TRH de 1.2 h y una velocidad de ascensión de 7.2 m/h. Estos resultados mostraron que el tratamiento de aguas residuales con bajo contenido de materia orgánica puede llevarse a cabo en este tipo de reactores a una temperatura relativamente baja (20 °C) y que un factor importante para alcanzar altas eficiencias de remoción de DQO es el mezclado hidráulico, el cual se puede conseguir al disminuir el TRH y aumentar la velocidad de ascensión [53].

En el CICY se realizó un estudio para el tratamiento de vinazas en un UASB, estas vinazas fueron obtenidas de la producción de etanol hidratado a partir de melaza de caña y el reactor presentó una carga orgánica de operación óptima de 17.05 kg DQO/m<sup>3</sup>.día con una

remoción de DQO de 69% y un rendimiento de metano de 0.26 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg DQO<sub>añadido</sub> cuando las vinazas fueron suministradas sin dilución previa [88]. Al igual que lo encontrado por Kumar *et al.* [89], cuando se aplicaron cargas orgánicas mayores (18.55 - 22.16 kg DQO/m<sup>3</sup>.día), disminuyó la eficiencia del reactor, lo cual fue atribuido a la acumulación de sulfuro [90]. En la Tabla 1.3., se compara el desempeño de cada uno de los reactores utilizados para el tratamiento de vinazas, en términos de remoción de DQO y producción de metano.

**Tabla 1.3. Tratamiento anaerobio de vinazas en diferentes tipos de reactores y diferentes procesos**

Origen de Vinaza	Reactor	Carga orgánica (kg DQO/m <sup>3</sup> .día)	TRH (días)	DQO <sub>removido</sub> (%)	Producción metano (m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> / kg DQO <sub>removido</sub> )	Temperatura (°C)	Referencia
Vinaza	UASB	28.00	2.8	67.0	0.29	55	[56]
Cerveza	UASB	0.48	5.0	50.0	0.31	19 - 24	[91]
	UASB	1.53	0.8	91.0	0.32	19 - 24	[91]
	UASB	2.91	0.5	85.0	0.34	19 - 24	[91]
	UASB	15.00	2.1	90.0	nd	nd	[4]
Whisky	UASB	5.46	2.1	80.0	nd	35	[86]
	MLGE	12.60	0.1	80.0	nd	20	[53]
Cerveza	RPF (nylon)	6.20	30.0	62.0	2.90 *	37	[54]
Vinaza	RPF (carbón)	23.25	8.0	16.0	0.50 *	37	[54]
	RPF (carbón)	6.20	30.0	80.0	2.40 *	37	[54]
	RPF (fibra de coco)	23.25	8.0	60.0	7.25 *	37	[54]
	RPF (fibra de coco)	6.20	30.0	80.0	2.90 *	37	[54]
	RPF (PVC)	11.40	4.0	71.6	5.60 *	37	[55]
Vinaza***	RPF (PVC)	20.40	2.7	61.9	8.00 *	37	[55]
	RANLEF	20.00	nd	80.0	nd	30	[82]
	RANLEF	4.50	3.3	85.0	nd	35	[4]
Vinaza	RANLEF	32.30	0.5	82.5	nd	55	[53]
Vinaza	UASB	17.05	7.5	66.0	0.26**	30	[92]

\* m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>-día, \*\* m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/ kg DQO<sub>añadido</sub> \*\*\* Material de empaque entre paréntesis, nd= dato no disponible

### 1.2.2. Tratamientos biológicos para la remoción de color en vinazas

En el caso de las vinazas y otros residuos que presentan coloración, se debe prestar atención a la eliminación o reducción de color, ya que éste es considerado una forma de contaminación y genera un impacto sobre los ecosistemas donde los residuos son descargados [93]. Los compuestos que contribuyen a la coloración café oscuro de las



vinazas son las melanoidinas formadas en la reacción de Maillard de azúcares (carbohidratos) con proteínas (aminoácidos), así como los fenoles y furfurales [6, 76, 93]. Como se mencionó anteriormente, estos compuestos no son degradados durante la digestión anaerobia de las vinazas, por lo que se necesita utilizar un tratamiento de afinamiento para la remoción del color [53].

La decoloración biológica es una alternativa más amigable con el medio ambiente y más económica con respecto al tratamiento físico-químico, por lo que se han estudiado una gran diversidad de microorganismos como hongos y bacterias. Los microorganismos capaces de realizar la decoloración biológica contienen un sistema enzimático ligninolítico, donde un complejo enzimático extracelular de peroxidasas y lacasas, es capaz de degradar lignina, melanoidinas y compuestos aromáticos que no pueden ser degradados por otros microorganismos [6, 75, 76].

#### **1.2.2.1. Remoción de color por bacterias**

En el tratamiento de las vinazas con bacterias, se sugiere que las melanoidinas son oxidadas por la actividad de especies reactivas de oxígeno ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ) producidas por reacciones enzimáticas [6]. Células inmovilizadas de *Pseudomonas fluorescens* sobre un medio de celulosa, bajo condiciones estériles fueron capaces de decolorar el 90% de un agua residual de melaza de caña en un periodo de 4 días; solamente el 76% de la decoloración fue observada bajo condiciones no estériles. El pH del medio disminuyó de 6.0 a 3.5 en 5 días. La diferencia entre estos porcentajes se atribuyó a que la estabilidad de las melanoidinas cambia con respecto a la temperatura, y por lo tanto a mayor temperatura durante la esterilización, las melanoidinas se descomponen en compuestos de bajo peso molecular [94].

Sirianuntapiboon *et al.* [76] evaluaron la cepa de la bacteria acetogénica No. BP103 en la degradación de color en vinazas de melaza de caña crudas (U-MWW por sus siglas en inglés) y en vinazas previamente tratadas en una laguna anaerobia (An-MWW por sus siglas en inglés). Esta bacteria se cultivó 5 días a 30 °C en un medio con solamente vinaza (U-MWW o An-MWW) y otro medio donde además de las vinazas se añadió glucosa (3.0%), extracto de levadura (0.5%),  $KH_2PO_4$  (0.1%) y  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.05%). La cepa No. BP103 mostró una mayor actividad de decoloración en U-MWW y An-MWW cuando los nutrientes fueron suplementados. La decoloración de esta cepa en este caso fue 32.3% y 73.5% en, U-MWW y An-MWW respectivamente, en comparación con 9.75% y 44.36% en U-MWW y

An-MWW sin nutrientes, respectivamente. Esta cepa requirió de glucosa para la decoloración de vinazas, lo que sugirió que la actividad de decoloración puede ser una oxidasa de azúcar como se ha observado en *Coriolus* sp. Posteriormente, estos autores realizaron una cromatografía de filtración en gel con la finalidad de comparar la distribución de las fracciones de peso molecular en las vinazas (U-MWW y An-MWW) tratadas por la bacteria acetogénica No. BP103. Se registró, que las fracciones de menor peso molecular en U-MWW fueron rápidamente decoloradas mientras que las fracciones de mayor peso molecular permanecieron en el medio de cultivo. Pero en el caso de An-MWW, esta cepa pudo remover todos los tipos de fracciones de peso molecular, lo que hace a An-MWW más adecuada para la decoloración utilizando este microorganismo.

Santal *et al.* [95] estudiaron la capacidad de una cepa de *Alcaligenes faecalis* para degradar la coloración en vinazas obtenidas en la producción de etanol hidratado, que previamente pasaron por un tratamiento primario (digestión anaerobia) y un tratamiento secundario (aerobio). Encontrando que la máxima decoloración fue de 46% cuando las vinazas se encontraban diluidas al 5% en volumen, e incrementando a 63% cuando se utilizó sacarosa o glucosa como fuente adicional de carbono. Posteriormente, se evaluó la toxicidad de las vinazas tratadas y sin tratamiento con *A. faecalis* mediante su efecto en la germinación de *Vigna radiata*, encontrándose que las semillas que fueron embebidas con vinazas tratadas con *A. faecalis* mostraron un inicio de germinación al tercer día. Las semillas embebidas con vinazas sin tratamiento no presentaron germinación. Como consecuencia, los autores concluyeron que un proceso de decoloración en los efluentes de vinazas, disminuyó el efecto tóxico sobre la germinación de semillas. Estos autores señalan que la inhibición de la germinación es debido a la elevada cantidad de sólidos disueltos en los efluentes sin tratar, además de la presencia de compuestos tóxicos como, escatol, indol, fenol y compuestos de sulfuro, los cuales se han observado que afectan el contenido de clorofila, proteína y biomasa en las plantas. Por lo tanto es necesario un proceso de degradación microbiano como una etapa secundaria o terciaria para el tratamiento de las vinazas, antes de su descarga al ambiente.

Bajo condiciones facultativas, *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 mostró un alto potencial para la decoloración de vinazas obtenidas de la producción de etanol hidratado a partir de melaza de caña. En ese estudio, se evaluó vinaza cruda y vinaza tratada en una laguna anaerobia operada a un TRH de 60 días. Ambas vinazas fueron diluidas con agua destilada hasta alcanzar un valor de densidad óptica de 3.5 a 475 nm. Se ajustó el pH a 5.0

y se adicionó glucosa (2%), extracto de levadura (0.4%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1%) y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.05%). La bacteria fue incubada por 8 días a 30 °C en estas soluciones. Tanto en las vinazas crudas como en las tratadas por digestión anaerobia, el crecimiento celular y los rendimientos de decoloración de la cepa incrementaron a mayor tiempo de incubación, de igual forma, se pudo observar que el pH del efluente disminuyó a un valor de 3.0. La mayor remoción de color fue de 76.6% y se obtuvo cuando la cepa fue inoculada sobre vinazas previamente tratadas por digestión anaerobia. Las vinazas crudas solamente alcanzaron una remoción de color de 55%, lo que lleva a concluir que el tratamiento anaerobio previo de las vinazas favorece la eliminación de color utilizando esta cepa [57].

Bharagava *et al.* [96] aislaron tres bacterias aerobias degradadoras de melanoidinas a partir de suelo contaminado por vinazas obtenidas en la producción de cerveza (RNBS1, RNBS3 y RNBS4). De acuerdo a la información del ARNr 16S, RNBS1 correspondía a *Bacillus licheniformis*, RNBS3 a *Bacillus* sp. y RNBS4 a *Alcaligenes* sp. Las cepas RNBS1, RNBS3 y RNBS4 presentaron una eficiencia de remoción de 52.69, 48.92 y 59.64 % respectivamente en la degradación de melanoidinas en las vinazas procedentes de la producción de cerveza. Cuando se realizó un cultivo mixto con estas cepas se encontró una eficiencia de remoción mayor (69.83%). Los datos obtenidos del cultivo mixto revelaron que la presencia de cada cepa bacteriana en el medio de cultivo tuvo un efecto de incremento acumulativo sobre el crecimiento y la degradación de melanoidinas en lugar de presentar una inhibición. En este estudio, la degradación de melanoidinas fue llevada a cabo principalmente por la actividad de dos enzimas, manganeso peroxidasa (MnP) y peroxidasa independiente de manganeso (MIP). El orden de la actividad de MnP y MIP que presentaron los cultivos bacterianos fue: cultivo mixto > RNBS1 > RNBS4 > RNBS3.

La degradación del color en las vinazas utilizando bacterias ha sido menos estudiada en comparación con la degradación por hongos, por lo tanto, existe una gran variedad de bacterias que podrían ser evaluadas para este fin. Bugg *et al.* [97] señalaron que una cepa de *Rhodococcus erythropolis* aislada de los intestinos de la termita *Reticulitermes speratus* es capaz de degradar compuestos aromáticos, constituyentes del petróleo (n-alcanos, iso-alcanos y ciclo alcanos) y realizar el mecanismo ligninolítico, por lo que se podría evaluar su capacidad para degradar compuestos recalcitrantes y color en las vinazas.

### 1.2.2.2. Remoción de color por hongos

Desde 1980 se ha propuesto el uso de los hongos de la podredumbre blanca como una alternativa para la decoloración de efluentes, debido a que poseen un sistema enzimático extracelular no específico, capaz de romper una gran cantidad de enlaces químicos [93]. En el caso de las vinazas, un amplio número de hongos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Flavodon flavus*, *Trametes versicolor*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* han mostrado la capacidad de degradar el color [59].

Ferreira y Aguiar [93] evaluaron la degradación de color en vinazas de jugo de caña de azúcar que poseían un valor total de DQO de 42 g/L, por medio de dos diferentes grupos de hongos: basidiomicetos (*Pleurotus sajor-caju*, *Phanaerochaete chrysosporium*, *Pleurotus* sp. 068, *Pleurotus shimeji* y *Ganoderma* sp.) y ascomicetos (*Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* y *Mucor pusilus*), encontrando que aquellos que pertenecían al grupo basidiomiceto lograban mejor decoloración (98 – 65%) comparada con los ascomicetos (65 – 48%), cuando fueron incubados 12 días en vinaza al 100%. Debido a que *Pleurotus sajor-caju* demostró el mayor porcentaje de remoción del color (98%) se estudiaron las enzimas que produjo, encontrando que no mostró producción de lignina peroxidasa, pero sí de lacasa y de manganeso peroxidasa, alcanzando la máxima producción de lacasa (400 U/L) al noveno día después de su incubación y al doceavo día esta producción bajó a un valor de 40 U/L. Sin embargo se observó que en este día (12) la producción de manganeso peroxidasa alcanzó su mayor valor (60 U/L).

Por otro lado, con la finalidad de encontrar hongos capaces de tolerar altas temperaturas para el tratamiento de decoloración de las vinazas, Chairattanamakorn *et al.* [59] evaluaron 38 cepas de hongos, seleccionando 13 que fueron capaces de crecer a 43 °C. Estos hongos, produjeron mayor cantidad de manganeso peroxidasa y peroxidasa independiente de manganeso en comparación con la lacasa, y no fue detectada actividad de lignina peroxidasa. En este trabajo, la cepa *Pycnoporus coccineus* fue la que presentó el mejor porcentaje de remoción de fenol total (20%) y color en las vinazas (45%), aumentando a 70 y 55% respectivamente en un periodo de 13 días, cuando el micelio fue inmovilizado sobre poliuretano. La máxima producción de manganeso peroxidasa, peroxidasa independiente de manganeso y lacasa fue registrada al noveno día, alcanzando los valores de 16, 16 y 0.8 U/L respectivamente; esta producción aumentó a 69.5, 68.5 y 17.7 U/L respectivamente cuando el micelio se inmovilizó sobre poliuretano. En este trabajo se observó que el color y los fenoles disminuyeron cuando aumentó la actividad de

manganeso peroxidasa, lo que sugiere que esta enzima juega un papel importante en la degradación de color en las vinazas.

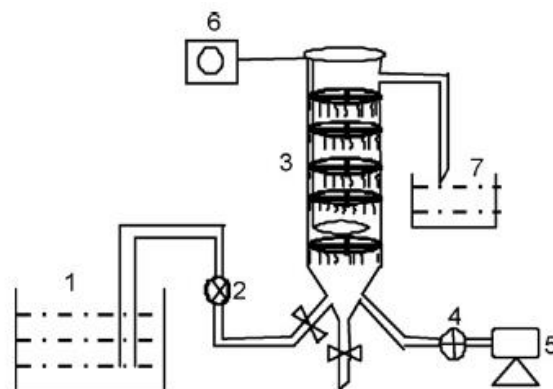
Vahabzadeh *et al.* [98] estudiaron la decoloración con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* de vinazas provenientes de la producción de etanol hidratado a partir de melaza de caña. En este trabajo se encontró que en vinazas diluidas al 10%, el porcentaje de remoción de color al tercer día de incubación fue de 60%, y la actividad de las enzimas lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa fueron detectadas a partir del día 2 y 3 de incubación. Los niveles de la actividad enzimática se incrementaron a su máximo valor el día 4, con valores de 20 y 210 U/L para manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa respectivamente. Al quinto día, la actividad de la lignina peroxidasa comenzó a decaer (185 U/L) mientras que la manganeso peroxidasa permaneció constante con un valor de 20 U/L, alcanzando para este día la máxima decoloración con un valor de 75%. De igual forma se evaluó el efecto sobre la decoloración al añadir glucosa como una fuente adicional de carbono, encontrándose un considerable decremento en la decoloración y la actividad de lignina peroxidasa, alcanzando valores de 38% y 40 U/L respectivamente. Esto demostró que para el caso particular de este hongo, una fuente adicional de carbono no es favorecedora. Sin embargo, existen otros estudios donde se ha demostrado que la adición de una fuente de carbono incrementa el porcentaje de remoción de color en las vinazas. Pant y Adholeya [6] reportaron que *Coriolus versicolor* obtuvo una remoción de color de 48% en vinazas diluidas al 30% y sin ninguna fuente adicional de carbono, y esta incrementó a 71% cuando se añadió una fuente de carbono.

### **1.3. Tipos de reactores empleados para el tratamiento de aguas residuales utilizando hongos**

Uno de los factores importantes para llevar a cabo el tratamiento de las vinazas por medio de microorganismos ligninolíticos es el tipo de reactor a utilizar. En el caso de las vinazas, existe muy poca información sobre sistemas de reactores; en la literatura generalmente se realizan a escala de matraz de Erlenmeyer. Por lo tanto, en este apartado se describirán algunos reactores empleados en el tratamiento fúngico de distintos tipos de aguas residuales.

Yang *et al.* [99] utilizaron un reactor con un sistema de biopelícula (figura 1.2) para la degradación de colorantes sintéticos azo y para el tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria textil. El reactor fue construido en una columna de vinilo y se

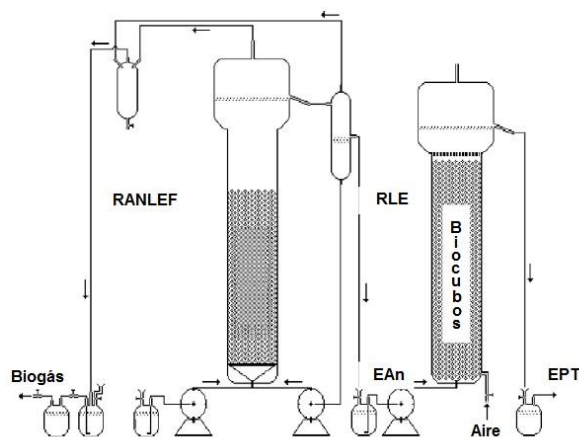
colocaron unos discos de fibra de polietileno, presentando un volumen efectivo de 4.5 L. Para la operación del reactor se inoculó 1 L de un consorcio microbiano obtenido de madera podrida y suelo, posteriormente fueron añadidos 3 L de un medio enriquecido para el cultivo de hongos, el cual estaba compuesto por glucosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y extracto de levadura. Durante la formación de la biopelícula sobre los discos de polietileno, el reactor fue operado con un flujo de aire de 40 L/min y fue suplementado cada 3 días con un lote de medio fresco. Estos autores registraron que con este tipo de reactor solo era necesario 24 horas para la decoloración del agua residual estudiada, y que durante los tres meses de operación del reactor, la relación de hongos y bacterias (hongo:bacterias) sobre la biopelícula se encontraba entre 6.8:1 y 51.8:1. Por medio de análisis moleculares se identificó que las levaduras pertenecientes al género *Candida* ocuparon cerca del 70% de los hongos predominantes sobre la biopelícula. Este microorganismo ha sido ampliamente estudiado en la degradación de diversos colorantes y puede producir peroxidasa dependiente de manganeso.



**Figura 1.2. Reactor con un sistema de biopelícula: (1) influente; (2) bomba de líquidos; (3) reactor de biopelícula; (4) medidor de flujo de aire; (5) bomba de aire; (6) controlador de temperatura; (7) efluente [99].**

Ortega-Clemente *et al.* [100] evaluaron el post-tratamiento de un efluente recalcitrante anaerobio (licor negro débil) por medio de un proceso aerobio. Para ello, el efluente tratado (denominado efluente anaerobio; EAn) de un RANLEF fue alimentado a un reactor aerobio de lecho empacado de flujo ascendente (RLE) construido con una columna de vidrio de 1.5 L de volumen total. El medio de empaque que se utilizó fue 0.75 L de pequeños cubos de madera de Encina de 5 mm de lado, “biocubos”, sobre los cuales el hongo *Trametes*

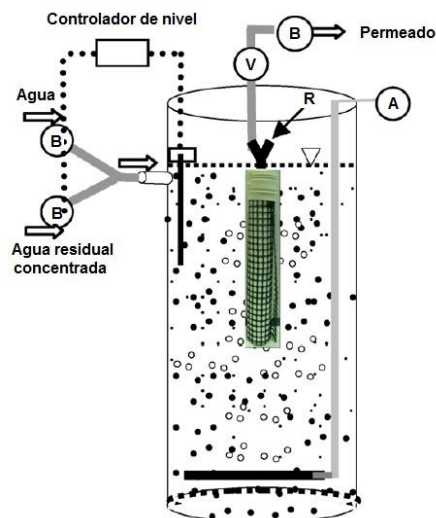
*versicolor* fue inmovilizado (Figura 1.3). El RLE fue operado 60 días a un TRH de 5 días (Etapa 1) y posteriormente por 30 días a un TRH de 2.5 días (Etapa 2), presentando una remoción de DQO promedio de 30% y 32%, respectivamente. De igual forma, en ambas etapas se obtuvo una remoción de color de 60% y el contenido de ligninoides fue reducido en un 52%. El RLE pudo mantener este desempeño por 90 días en operación continua, sin añadir fuentes de carbono solubles. La actividad de manganeso peroxidasa y lacasa fue encontrada durante todo el periodo de operación del reactor, mientras que la actividad de la lignina peroxidasa prácticamente desapareció en la etapa 2.



**Figura 1.3. Secuencia de tratamiento anaerobio/aerobio. RANLEF: Reactor Anaerobio de Lecho Fluidizado; RLE: Reactor de lecho empacado (cubos de madera con *Trametes versicolor* inmovilizado); EPT: Efluente del post-tratamiento; EAn: Efluente anaerobio [100].**

Hai *et al.* [101] evaluaron el desempeño de un reactor fúngico de membrana sumergida por un periodo de 170 días, mientras un agua residual sintética que contenía dos diferentes colorantes azo (Naranja II y Poly S119) fue continuamente alimentada. El biorreactor consistió de un cilindro de PVC con un volumen útil de 11.8 L, dentro del cual se colocó una membrana (diámetro=4.5 cm, altura=22 cm) de micro-poro (0.4  $\mu\text{m}$ ) obtenida de Mitsubishi Rayon, Japón (Figura 1.4.). El aire fue continuamente suplementado desde el fondo del reactor a través de un difusor con un flujo de 5 L/min, con el objetivo de obtener una mezcla completa y suplementar el oxígeno disuelto a los microorganismos. El sistema fue inoculado con 2.5 g de *Coriolus versicolor* (peso seco) crecido previamente por dos semanas en matraces de Erlenmeyer. El reactor fue mantenido bajo aireación por 2 semanas y después fue operado de manera continua con un TRH de 1 día. En estudios previos realizados por

estos autores reportaron que en cultivos puros operado en lote, la decoloración de Poly S119 era mucho más lenta que la del colorante Naranja II. Bajo una carga de colorante de 0.1 g/L-día se registró una remoción de 99% de Poly S119 en el reactor de membrana sumergida. Posteriormente, se calculó la remoción del colorante en el sobrenadante del reactor y en el permeado de la membrana encontrándose con valores de 63.8% y 99.9% respectivamente. Esto mostró la importante contribución de la membrana sobre la remoción de color en el sistema. Por otro lado, el colorante Naranja II presentó una remoción de 93%. La calidad de sobrenadante del reactor (82%) fue mejor que en el caso de Poly S119 (63.8%), indicando que la degradación de Naranja II ocurre de manera más rápida en el reactor. Sin embargo, como éste mostró una menor adsorción sobre la biomasa, la membrana no pudo retener este colorante tan efectivamente como al Poly S119.

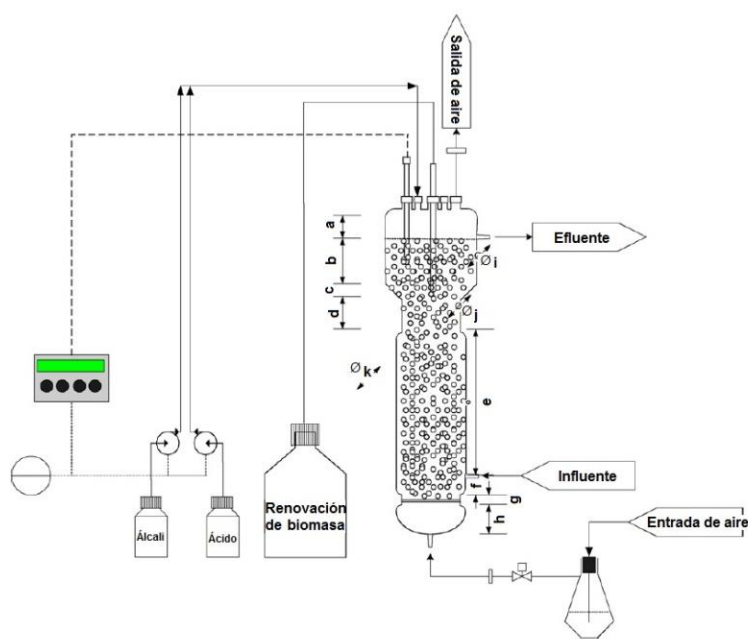


**Figura 1.4. Esquema del reactor. A, bomba de aire; R, retiro del flujo de aire; V, control de vacío; B, bomba [101].**

Blánquez *et al.* [102] desarrollaron un reactor para el tratamiento en continuo de aguas residuales textiles a través de “pellets” de *Trametes versicolor*. El biorreactor contó con un volumen útil de 10 L y estaba compuesto de tres zonas: La parte inferior, el aire fue introducido por medio de un difusor con un tamaño de poro de 1 mm; para retener los “pellets” fúngicos dentro del reactor fue colocada una zona cilíndrica central; y en la parte superior del reactor para facilitar la separación de la fase gas-líquido y minimizar la



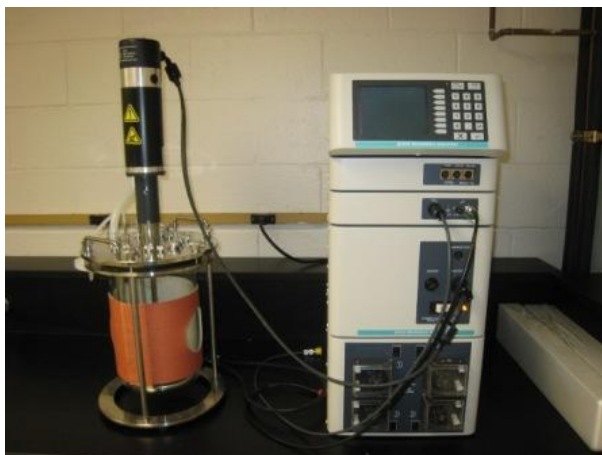
formación de espuma un diámetro mayor que al anterior se implementó (Figura 1.5). Durante este experimento se obtuvo una decoloración del 90% de una solución estéril del colorante Grey Lanaset G de concentración 150 mg/L, en un TRH de 48 horas. Posteriormente, se realizaron cambios operacionales en el reactor, con el objetivo de adaptar el proceso a condiciones industriales como la utilización de una solución no estéril del colorante, el uso de agua de grifo en lugar de agua destilada para las diluciones y el empleo de macronutrientes y micronutrientes grado industrial en lugar de grado reactivo. Bajo estas condiciones, el reactor fue capaz de operar de manera continua durante 3 meses, alcanzando un 70% de decoloración.



**Figura 1.5. Esquema del Biorreactor de lecho fluidizado (BILEF). Las dimensiones están en cm: a, 7; b, 9; c, 3.5; d, 9.5; e, 33; f, 3; g, 9; h, 6; Øi (diámetro interno), 18; Øj (diámetro interno), 10; Øk (diámetro interno), 140 [102]**

Nitayavardhana y Khanal [103] evaluaron la producción de biomasa de *Rhizopus microsporus* en vinaza obtenidas de la fermentación de melazas de caña. Este hongo tiene un 43% de contenido de proteína (peso seco) con varios aminoácidos esenciales, incluyendo 1.8% de lisina, 1.8% de metionina, 1.5% de treonina y 0.3% de triptófano, motivo por el cual es utilizado como un insumo para el alimento de peces en acuacultivos. Los experimentos en lote fueron llevados a cabo en un biorreactor de 5 L BioFlo 110 (Figura 1.6.) con un volumen de trabajo de 2 L. El biorreactor fue operado a 30 °C con una velocidad

de agitación de 150 rpm, una tasa de aireación de 1 vvm ( $\text{volumen}_{\text{aire}}/\text{volumen}_{\text{liquido}}/\text{minuto}$ ) y un tiempo de cultivo de 3 días. En este trabajo se obtuvo un rendimiento de producción de biomasa fúngica de 0.21 g de biomasa incrementado/g inicial x g de DQO soluble removido, obteniendo una remoción de 42.02% de DQO soluble por cada experimento en lote.



**Figura 1.6. Reactor BioFlo 110, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ.**

Con base en lo encontrado en la literatura y en la experiencia previa obtenida en la digestión anaerobia de las vinazas, este trabajo investigó un proceso para el tratamiento de vinazas generadas industrialmente en la producción de etanol hidratado a partir de melaza de caña. El proceso constó de un biorreactor de lecho fluidizado inoculado con un microorganismo ligninolítico (*Trametes versicolor*) acoplado a un reactor UASB, donde en el primero se llevó a cabo la remoción de compuestos fenólicos y color, que no son degradados en un reactor anaerobio. Obteniendo al mismo tiempo un efluente amigable al medio ambiente y una fuente renovable de producción de metano como biocombustible.

## **HIPÓTESIS**

El proceso de tratamiento de vinaza, proveniente de la producción de etanol hidratado a partir de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*), constituido por dos etapas: una aerobia utilizando a un microorganismo ligninolítico y otra etapa anaerobia, mejorará la producción de metano así como la calidad del efluente, en cuanto a coloración y compuestos fenólicos.

## CAPÍTULO 2

### METODOLOGÍA

#### 2.1. Procedencia y caracterización de las vinazas de etanol hidratado

Las vinazas empleadas en este estudio fueron proporcionadas por el ingenio azucarero “La Gloria”, localizado en el municipio Úrsulo de Galván, Veracruz, México. “La Gloria” produce al año aproximadamente 30 millones de litros de etanol hidratado a partir de la fermentación de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), generando aproximadamente 1 millón de litros de vinaza por día (Figura 2.1).



**Figura 2.1. Instalaciones del ingenio “La Gloria”: a) Planta de producción de etanol hidratado, b) Recepción y almacenamiento de vinazas**

Para la caracterización de las vinazas, las concentraciones de DQO, nitrógeno total (NT), nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ), fósforo total ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y sulfato total ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) fueron determinadas por métodos colorimétricos (Hach Company DR-890), mientras el pH fue determinado de acuerdo al *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* [104]. Para la medición de color, las muestras fueron centrifugadas a 1,037 g por 10 minutos y diluidas a 10% v/v con agua destilada, posteriormente se encontró la longitud de onda dominante (475 nm) de acuerdo al método de longitud de onda múltiple [104], por lo tanto el color fue representado como la absorbancia a 475 nm [93].

El contenido total de compuestos fenólicos se estimó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo a una modificación de los métodos reportados por Box [105] y de

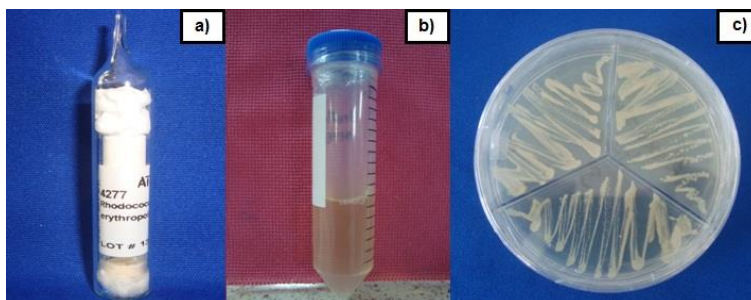
Albuquerque y Ferreira [106]; para ello se colocaron 20 µl de la muestra y 1.58 ml de agua destilada en un frasco de color ámbar, posteriormente se añadió 300 µl de una solución de carbonato de sodio (20% peso/volumen) e inmediatamente se agregó 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló y se dejó reaccionar por 60 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción se midió en un espectrofotómetro Cole Parmer S2100-UV + (Cole Parmer, USA) a una longitud de onda de 765 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar a concentraciones de 500, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 mg/L.

Los ácidos grasos volátiles (AGVs) en las vinazas se determinaron por medio de cromatografía de gases. Para ello, las muestras fueron filtradas en papel filtro Whatman No. 41 (20-25 µm) y fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500, equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna EC<sup>TM</sup>-1000 (30 m de longitud y 0.32 mm de diámetro), se utilizó nitrógeno como gas acarreador y las temperaturas de operación fueron 230, 250 y 230 °C para el inyector, horno y detector, respectivamente.

## **2.2. Microorganismos ligninolíticos**

### **2.2.1. *Rhodococcus erythropolis***

Se evaluó la capacidad de remoción de color en vinazas de etanol hidratado de la cepa bacteriana *Rhodococcus erythropolis* (4277), la cual se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) y se realizó la reactivación de acuerdo a las instrucciones de la ATCC. Para ello, se disolvió la pastilla en 600 µl de extracto de malta y levadura estéril y posteriormente se transfirió a un tubo Falcon con 10 ml del mismo medio. A partir de esta dilución, se tomó 1 ml para inocular 5 tubos con 10 ml de caldo estéril de extracto de malta y levadura, y se incubaron por 2 días a 26 °C. Terminado el período de incubación, las bacterias se transfirieron a cajas Petri conteniendo el medio de extracto de malta y levadura gelificado (Figura 2.2). La cepa se preservó a -25 °C en medio de extracto de malta y levadura con 10 % en volumen de glicerol; de igual forma se realizaron subcultivos cada 3 semanas en cajas Petri.



**Figura 2.2. Reactivación de la cepa bacteriana *Rhodococcus erythropolis*: a) Pellet obtenido de la ATCC, b) Medio líquido de extracto de malta y levadura, c) *Rhodococcus erythropolis*.**

### **2.2.2. Hongos ligninolíticos**

Se evaluó la capacidad de degradación en vinazas de etanol hidratado, utilizando 7 hongos de la colección perteneciente a la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán (Laboratorio de la Dra. Blondy Canto), clasificados como B13-6, B19-01-7(7), B10-2-(4), B10-3(1)EN, Ccent1, Ccent2, y Ccent3. Estos hongos fueron aislados de muestras de residuos de plátanos colectadas en el estado de Tabasco, México y previamente fueron seleccionados por producir enzimas ligninolíticas como lignina peroxidasa, lacasa y manganeso peroxidasa [107]. De igual forma se incluyó un hongo modelo del tratamiento de vinazas, *Trametes versicolor* (ATCC#42530), el cual fue proporcionado por la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona (Laboratorio de la Dra. Teresa Vicent). Este microorganismo ha sido utilizado para degradar una amplia variedad de contaminantes, tales como colorantes textiles, fenoles, clorofenoles e hidrocarburos aromáticos cíclicos, entre otros [108]. El medio utilizado para la preservación de todos los hongos fue papa-dextrosa-agar (PDA) a excepción del *T. versicolor*, para el cual se utilizó extracto de malta al 2%.

### **2.3. Evaluación a nivel matraz de la degradación de vinazas empleando microorganismos ligninolíticos**

Se realizó un ensayo utilizando a B13-6, B19-01-7(7), B10-2-(4), B10-3(1)EN, Ccent1, Ccent2, Ccent3 y *Rhodococcus erythropolis* con el objetivo de seleccionar a la mejor cepa para la biodegradación de las vinazas de etanol hidratado.

En el caso de *Rhodococcus erythropolis* se realizó un pre-cultivo en un matraz de 250 ml utilizando 100 ml de caldo de extracto de malta y levadura. Se colocaron 5 colonias de la bacteria y se incubó a 30 °C y 100 rpm por dos días. Al finalizar los días de incubación se

midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, con la finalidad de observar el crecimiento bacteriano [109]. Posteriormente, se colocaron en matraces de 250 ml, 100 ml de vinaza concentrada y diluida a 10 y 50%, utilizando agua destilada como diluyente. El pH fue ajustado a un valor de 7 añadiendo una solución de bicarbonato de sodio (1M). Los matraces se esterilizaron a 121 °C por 15 min y fueron inoculados con 10 ml del pre-cultivo de *Rhodococcus erythropolis*. Se incluyó un testigo adicionando 10 ml de agua estéril en lugar del pre-cultivo. Los matraces se incubaron a 30 °C bajo condiciones de agitación a 150 rpm por 7 días. El cambio de coloración se evaluó al día 0, 5 y 7, tomando una muestra de 10 ml, la cual fue centrifugada a 1,037 g por 10 min, con la finalidad de precipitar las bacterias y sólidos suspendidos de la muestra [110]. La decoloración fue calculada de acuerdo a la fórmula utilizada por Sirianuntapiboon *et al.* [111], en donde las mediciones de absorbancia fueron registradas a 475 nm:

$$\text{Decoloración (\%)} = \left[ \frac{\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia inicial}} \right] \times 100$$

Por otro lado el ensayo con los hongos ligninolíticos consistió en utilizar vinaza diluida a 50% con agua destilada. Para ello en tubos Falcon de 50 ml se añadieron 20 ml de vinaza y se esterilizaron a 121 °C por 15 min. Posteriormente, los tubos fueron inoculados con una muestra de 0.17 cm<sup>2</sup> del hongo respectivo, el cual fue macerado en un tubo Eppendorf con 1 ml de la dilución correspondiente de vinaza. Se incubaron a 30 °C en condiciones de agitación de 150 rpm por 7 días. Se midió la variación de color a los 0, 5 y 7 días, de acuerdo al procedimiento previamente descrito. Para cada uno de los ensayos, se utilizaron controles abióticos, en los cuales se emplearon las diluciones correspondientes de vinaza pero sin inoculación del microorganismo.

Debido a que B19-01-7(7) fue el único microorganismo que presentó crecimiento en una dilución de vinaza de 50%, se realizó su identificación molecular, la cual fue llevada a cabo por el M. C. Miguel Tzec, perteneciente a la unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, a través de la secuenciación del ITS y siguiendo la metodología de Conde-Ferrández *et al.* [112].

Se comparó la capacidad de degradación de vinaza de B19-01-7(7) con respecto a *T. versicolor* ya que se ha observado en la literatura que éste último es capaz de degradar una amplia variedad de compuestos tóxicos y es un hongo modelo para el tratamiento de

vinazas [100, 102, 108]. El ensayo se llevó a cabo en matraces de 250 ml se añadieron 60 ml de vinaza diluida a 10% utilizando agua destilada como diluyente y se esterilizaron a 121 °C por 15 min. Posteriormente, fueron inoculados con 3 “discos” de 0.17 cm<sup>2</sup> del hongo respectivo. Los matraces se incubaron a 30 °C bajo condiciones de agitación a 150 rpm por 12 días. Se evaluó la variación de color, fenol total y DQO al día 7 y 12 de incubación.

#### 2.4. Ensamble del biorreactor de lecho fluidizado (BILEF)

Un biorreactor de lecho fluidizado (BILEF), el cual ha sido descrito y reportado por Blánquez *et al.* [102] como un biorreactor adecuado para el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de color utilizando “pellets” de *T. versicolor*, fue seleccionado para este estudio. Este biorreactor, posee un volumen útil de 2 L (Figura 2.3a); el aire es introducido en la parte inferior de manera constante y es distribuido por una placa porosa (Figura 2.4b). En la parte superior el BILEF cuenta con varias boquillas, las cuales son utilizadas para la introducción de la sonda de pH, del afluente, de la solución ácida o básica para la estabilización del pH dentro del reactor, salida de aire, toma de muestras y renovación de biomasa.

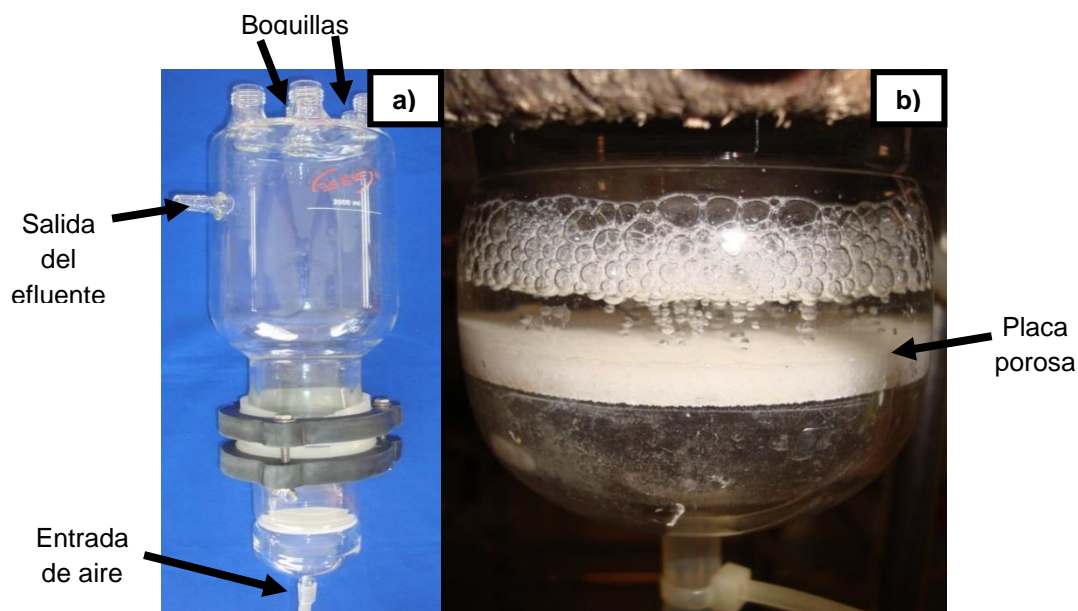


Figura 2.3. BILEF utilizado para la decoloración de vinazas de etanol hidratado: a) BILEF b) Placa porosa para la distribución del aire.



#### **2.4.1. Operación en lote del BILEF inoculado con “pellets” de *T. versicolor***

La operación en lote fue llevada a cabo en condiciones estériles y no estériles. Para ello, la vinaza fue diluida a 10% con agua destilada, debido a que los cultivos en México son actualmente irrigados a esa concentración [15], y por cada litro de vinaza diluida fue añadido cuatro gotas de antiespumante (Braun Biotech DF7960). El BILEF fue inoculado con 64 g de “pellets” húmedos del microorganismo, equivalente a una concentración de 2.4 g de peso seco de “pellets” por litro en ambas condiciones (estéril y no estéril). La formación de los “pellets” se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento reportado por Blánquez *et al.* [113]. El cual consistió en generar una suspensión micelial de *T. versicolor* mediante la inoculación en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 150 ml del medio de extracto de malta y levadura con 4 “discos” de 1 cm<sup>2</sup> de micelio crecido en placas con el mismo medio con agar. Los matraces fueron colocados en un agitador (130 rpm) a 25 °C. Después de 4-5 días, se formó una masa micelial gruesa, la cual fue homogenizada utilizando un homogenizador HG-300D (HSIANGTAI). La suspensión micelial resultante fue guardada en una solución salina estéril (0.80% NaCl) a 4 °C. Esta suspensión fue utilizada para obtener “pellets”, inoculando 1 ml de la suspensión en 250 ml de medio de extracto de malta y levadura (ajustando el pH a 4.5 con HCl 4M) en un matraz Erlenmeyer de 1 L. El matraz fue incubado en un agitador (130 rpm) a 25 °C por 5 - 6 días. Los “pellets” obtenidos fueron guardados en una solución salina estéril (0.8% NaCl) a 4 °C, donde pueden mantenerse activos hasta dos meses, sin perder su morfología.

Dentro del BILEF la biomasa fúngica fue mantenida con un flujo de aire de 10 L/h generado por una bomba de aire. El pH no fue controlado y la temperatura fue mantenida a 25 °C. Para condiciones estériles el biorreactor y la vinaza diluida fueron esterilizados en un autoclave a 121 °C por 20 min. Muestras de 20 ml fueron recolectadas diariamente durante los primeros dos días y subsecuentemente cada segundo día durante los 15 días de experimentación. Las muestras fueron usadas para medir pH, DQO, fenol total y color de acuerdo a las técnicas mencionadas en el apartado de caracterización de las vinazas. De igual forma, se cuantificó la actividad de lacasa, mediante un ensayo espectrofotométrico continuo, siguiendo la oxidación del compuesto cromógeno ABTS. La mezcla de reacción (1 ml de volumen total) contenía 600 µl de agua destilada, 100 µl de amortiguador de acetato (100 mM a pH 5.0) y 300 µl del extracto enzimático. La mezcla se preincubó durante un minuto a 37 °C y la reacción se inició con la adición de 100 µl de ABTS 5 mM como sustrato. Se midió el incremento de la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro Cole



Parmer S2100-UV+ (Cole Parmer, USA); las reacciones se monitorearon durante 4 min, tomando lecturas cada 15 segundos. La actividad enzimática se expresó como unidades internacionales, equivalente a la cantidad de enzima necesaria para oxidar un  $\mu\text{mol}$  del sustrato por minuto bajo las condiciones de ensayo y en función del volumen (U/L). El coeficiente de extinción molar del ABTS a 420 nm es de  $36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [114].

#### **2.4.2. Operación en lote del BILEF inoculado con “discos” de B19-01-7(7)**

Debido a que no se observó un crecimiento de B19-01-7(7) en el BILEF al ser inoculado en “pellets” se procedió a inocular este microorganismo en forma de “discos” de micelio para el tratamiento de vinazas diluidas a 10% y estériles. Para ello se colocaron 60 “discos” de un área de  $0.17 \text{ cm}^2$  en 2 L de vinaza. Las condiciones de operación del biorreactor fueron idénticas a las de operación en lote con *T. versicolor*. Muestras de 20 ml fueron recolectadas diariamente durante los primeros dos días y subsecuentemente cada segundo día durante los 15 días de experimentación. Las muestras fueron usadas para medir pH, DQO, fenol total, color y actividad de lacasa.

#### **2.4.3. Operación en continuo del BILEF inoculado con “pellets” de *T. versicolor***

El biorreactor fue operado en continuo con vinaza diluida a 10% (v/v) en condiciones no estériles por 26 días. El pH fue mantenido a 4.5 utilizando un controlador de pH (ALPHA PH 560, Thermo Scientific), el cual activó unas bombas peristálticas (Inceltech) para añadir una solución de HCl (1M) y NaOH (1M). El tiempo de retención hidráulico (TRH) fue de 6 días, el cuál fue establecido con base a los resultados obtenidos en el experimento en lote. Con el objetivo de extender el tiempo de operación fue utilizada la metodología de renovación de biomasa reportada por Blázquez *et al.* [115], esta estrategia debe permitir una operación en continuo prolongada para mantener porcentajes de degradación satisfactorios y producción enzimática extracelular. La cantidad de inóculo suministrado, el flujo de aire y la temperatura fueron los mismos al del experimento en lote. Muestras de 20 ml fueron cosechadas diariamente durante los primeros seis días y subsecuentemente cada segundo día. Las muestras fueron utilizadas para medir DQO, fenol total, color y actividad de lacasa.

## 2.5. Reactor UASB para el tratamiento de vinazas de etanol hidratado

Como se puede observar en la Figura 2.4a, la digestión anaerobia se llevó a cabo en un UASB construido de PVC de 4.2 L de volumen útil, con una salida para el biogás en la parte superior conectada a un sistema de milligascounter® (Figura 2.4b), el cual posee la capacidad de medir un flujo máximo de gas de 4 L/h.



**Figura 2.4. Equipos empleados durante la digestión anaerobia de las vinazas de etanol hidratado: a) Reactor Anaerobio de Manto de Lodos, b) Milligascounter®**

Para el tratamiento de las vinazas se propusieron dos procesos, los cuales son descritos a continuación.

### **Sistema 1: Vinaza diluida**

El reactor UASB fue inoculado con una mezcla de consorcios microbianos no anaerobio conformado por suelo profundo (30 g/L), excreta vacuna (300 g/L) y excreta porcina (150 g/L) [116]. El reactor UASB fue operado en condiciones mesofílicas ( $30 \pm 5$  °C) y con un TRH de 6 días. Fue alimentado diariamente con 700 ml de vinazas de etanol hidratado diluidas a 7% utilizando agua destilada, equivalente a una carga orgánica de 1.2 kg

DQO/m<sup>3</sup>.día. Un pH cercano a 7 fue mantenido utilizando bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) como amortiguador. El UASB fue operado por 26 días consecutivos (4 veces el TRH) y durante este tiempo las concentraciones de DQO, compuestos fenólicos, color, NT, N-NH<sub>3</sub>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> fueron medidas cada segundo día, se consideró que el reactor se encontraba en estado estable cuando los valores de DQO y compuestos fenólicos presentaron una variación igual o menor a 5% [117]. La producción del biogás fue registrada diariamente por medio del milligascounter®. De igual forma el contenido de metano en el biogás fue medido diariamente, mediante un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500, equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) empleando la columna Molesieve (30 m de longitud y 0.53 mm de diámetro), utilizando nitrógeno como gas acarreador y las temperaturas de operación fueron 75, 30 y 200 °C para el inyector, horno y detector respectivamente. Los AGVs fueron determinados diariamente de acuerdo al método reportado por Jobling *et al.* [118].

### **Sistema 2: Acoplamiento BILEF-UASB**

El mismo reactor UASB fue operado en condiciones idénticas al sistema 1, en cuanto a TRH, pH y temperatura. La única diferencia fue la alimentación diaria, la cual fue 700 ml del efluente obtenido del BILEF inoculado con *T. versicolor* para el tratamiento de vinazas diluidas al 10%, esta cantidad es equivalente a una carga orgánica de 1.2 kg DQO/m<sup>3</sup>.día. La adquisición de los parámetros de monitoreo del sistema fue similar al sistema 1.

### **2.6. Análisis estadístico**

Los muestreos fueron realizados por triplicado y las diferencias estadísticas fueron determinadas usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una prueba de rangos múltiples utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Caracterización de vinazas

Los resultados de la caracterización de la vinaza utilizada en este estudio se encuentran en la tabla 3.1. En general, los valores de cada uno de sus componentes se encuentran en los límites superiores reportados en la literatura. La concentración de la DQO fue de  $110,065 \pm 11,486$  mg/L, este valor es tres veces mayor en comparación con los obtenidos de la producción de bebidas alcohólicas como el vino [10, 30, 52]. En la literatura se encuentra que la concentración de fenoles en vinazas de melazas de caña de azúcar es muy variable. Jiménez *et al.* [5] registraron una concentración de 450 mg/L expresado en ácido gálico y Acharya *et al.* [54] reportaron un valor entre 8,000 y 10,000 mg/L expresado en fenol. En la tabla 3.1, se puede observar que la concentración de fenol total en las vinazas de este estudio se encuentra en el rango descrito por Acharya *et al.* [54], lo que la clasifica como un agua residual muy contaminante, ya que la presencia de compuestos fenólicos en agua para consumo e irrigación de cultivos representa problemas de salud y ambientales [20].

**Tabla 3.1. Caracterización física-química de las vinazas empleadas en el estudio**

Parámetro	Vinaza de "La Gloria"
pH	$4.39 \pm 0.006$
Color *	$1.30 \pm 0.12$
Compuestos fenólicos **	$10,834 \pm 1,476$
DQO	$110,065 \pm 11,486$
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	$5,300 \pm 1,416$
S <sup>-</sup>	$241 \pm 114$
N <sub>Total</sub>	$1,720 \pm 217$
N-NH <sub>3</sub>	$68 \pm 9$
N <sub>org</sub>	$1652 \pm 219$
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	$415 \pm 67$
Ácido acético	$433 \pm 100$
Ácido propiónico	$36 \pm 9$
Ácido butírico	$301 \pm 49$

<sup>a</sup> Todos los valores en mg/L a excepción del pH y color

\* Absorbancia a 475 nm

\*\*Expresado en ácido gálico

Los compuestos fenólicos como el ácido cafeico, ácido gálico, ácido vanílico, tirosol, catecol, ácido protocatecuico y 4-hidroxibenzoico, pueden inhibir la actividad microbiana y por lo tanto causar dificultades en la bioremediación para las aguas residuales que los contenga [35]. FitzGibbon *et al.* [119], estudiaron el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos sobre la remediación de vinazas de melaza de caña utilizando diferentes hongos. Se encontró que *Corioli* *versicolor* resiste concentraciones arriba de 1,700 mg/L de ácido vanílico, mientras tiene un notorio efecto inhibitorio del crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* cuando el ácido vanílico excedía 840 mg/L y cuando el ácido gálico se encontraba sobre 4,000 mg/L.

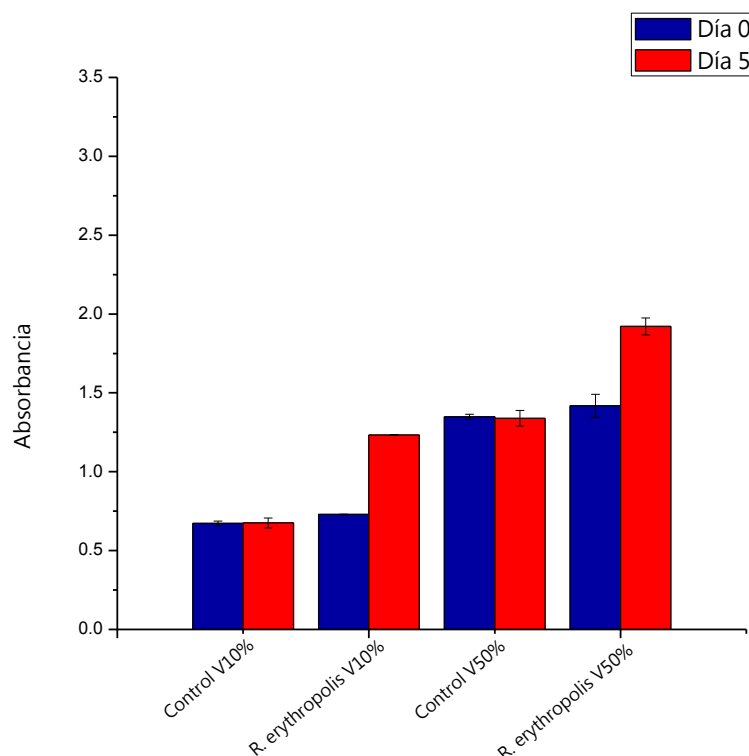
Los ácidos carboxílicos como el acético y el propiónico son sustratos para el proceso de digestión anaerobia. No obstante, Parawira *et al.* [120] han demostrado que valores por arriba de 10,000 mg/L de AGVs pueden causar un efecto inhibitorio debido a la reducción del pH del sistema, lo que impide la producción de metano si no se cuenta con un amortiguador del pH. Las vinazas en este estudio poseen una concentración total de AGVs de aproximadamente 1,000 mg/L, valor por debajo al inhibitorio (10,000 mg/L) señalado por Parawira *et al.* [120], sin embargo, registra un pH ácido ( $4.39 \pm 0.006$ ), por lo que se tendrá que valorar la adición de un amortiguador ( $\text{NaHCO}_3$ ) para prevenir una disminución del pH en el sistema durante el tratamiento anaerobio de este tipo de aguas residuales. Asimismo, se ha reportado que el ácido propiónico posee actividad antimicótica, ya que se observó un incremento en los valores de índice de inhibición sobre *Aspergillus parasiticus* cuando se aumentó en placa la concentración de ácido propiónico de 129 a 516 ppm al ser cultivado [121]. Esta inhibición se atribuye a que las formas no disociadas de muchos ácidos débiles son liposolubles y pueden estimular el flujo de  $\text{H}^+$  dentro de la célula, incrementando la permeabilidad de la membrana plasmática y afectando su función biológica [122]. Todas estas características que poseen las vinazas de etanol hidratado hacen que su tratamiento sea un verdadero reto biotecnológico.

### **3.2. Evaluación de la degradación de vinazas empleando microorganismos ligninolíticos a nivel matraz**

#### **Rhodococcus erythropolis**

El pre-cultivo de *Rhodococcus erythropolis* al finalizar los días de incubación alcanzó una densidad óptica de 1.834 a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente, se procedió

a evaluar la degradación de color en vinaza en dos diferentes diluciones (10 y 50%). Los valores de densidad óptica a 475 nm de las vinazas al inicio y al final del experimento son presentados en la figura 3.1. Para medir la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro se realizó una dilución de 1:10 v/v utilizando agua destilada como diluyente.



**Figura 3.1. Absorbancia a 475 nm (determinación de color) en dos diferentes diluciones de vinaza (10 y 50%) inoculando a *Rhodococcus erythropolis***

Como se puede observar en la figura 3.1, al día 5 de incubación con la bacteria, no se observó decoloración de la vinaza diluida a 10% ni diluida a 50%. Por lo contrario, se observó un aumento de absorbancia de 68 y 35 % respectivamente para las concentraciones de 10 y 50% de vinaza. Un resultado semejante fue observado por Krzywonos y Seruga [123], quienes evaluaron la decoloración producida por cuatro cepas bacterianas (*Weissella soli*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus parvulus* y *Lactobacillus plantarum*) sobre vinazas de remolacha (25% v/v) diluida en un medio con extracto de levadura (5.31 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.75 g/L) y glucosa (50 g/L); observaron que mientras *P. parvulus* y *L. plantarum* decoloraron las vinazas desde el primer día de

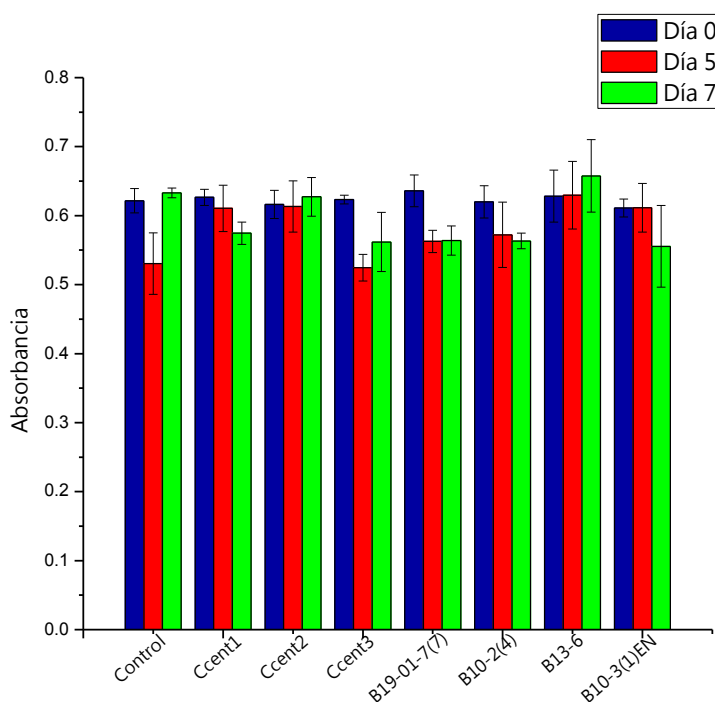
incubación, *P. pentosaceus* y *W. soli* causaron que el color del efluente incrementara, lo que indica que estos microorganismos transformaron a los compuestos presentes en las vinazas en metabolitos más ricos en color.

Por otro lado, Yadav y Chandra [124] reportaron que la adición de fuentes de nitrógeno a un consorcio bacteriano, incrementa su capacidad de decoloración sobre las melanoidinas de la melaza. Sin embargo, una concentración mayor de 0.1% (peso/volumen) de nitrógeno orgánico mostró un efecto inhibitorio. De igual forma, Mohana *et al.* [75], encontraron que una concentración de 0.05% de nitrógeno orgánico produjo un efecto supresor sobre la decoloración y degradación de efluente de destilería tratado anaeróbicamente. En nuestro estudio la concentración de nitrógeno total (peso/volumen) en vinaza diluida 10 y 50% es de aproximadamente 0.02, y 0.09 % respectivamente, valores cercanos a los reportados por los anteriores autores como inhibidores. Las cepas de *Rhodococcus erythropolis* poseen un gran conjunto enzimático capaz de llevar a cabo un enorme número de reacciones bio-catalíticas y degradaciones. Se ha encontrado que es capaz de metabolizar, como única fuente de carbono y energía, altas concentraciones de alcanos, terpenos, alcoholes y compuestos aromáticos [125]. Sin embargo, en nuestro estudio no se pudo apreciar una degradación de color en las vinazas. Probablemente esto fue debido a que la cepa no se encontraba adaptada para las condiciones a las que se sujetó al ser inoculada en vinaza. Carvalho [125] durante su estudio logró adaptar a *R. erythropolis* para degradar n-alcanos y alcoholes bajo condiciones extremas (4 – 37 °C, pH 3 – 11 y un porcentaje mayor de 7.5% de cloruro de sodio), logrando de esta forma degradar compuestos a condiciones que antes no lo hacía.

### **Hongos ligninolíticos de la colección CICY**

A partir del quinto día se apreció visualmente el crecimiento de las cepas Ccent1, Ccent3 y B19-01-7(7) en 50% de vinaza. Como se puede observar en la figura 3.2 el hongo B19-01-7(7) fue el que registró la mayor decoloración, con un valor de 11%; los hongos restantes solamente alcanzaron una remoción de color entre 8 y 9%. Estos valores se encuentran por debajo del intervalo de 48 y 95% de decoloración que ha sido reportado por diversos autores en el tratamiento de vinazas [6, 59, 93, 98].

La capacidad de B19-01-7(7) de crecer sobre una concentración de vinaza de 50% de etanol hidratado y presentar el mayor porcentaje de remoción de color, lo hizo atractivo para continuar con el estudio.



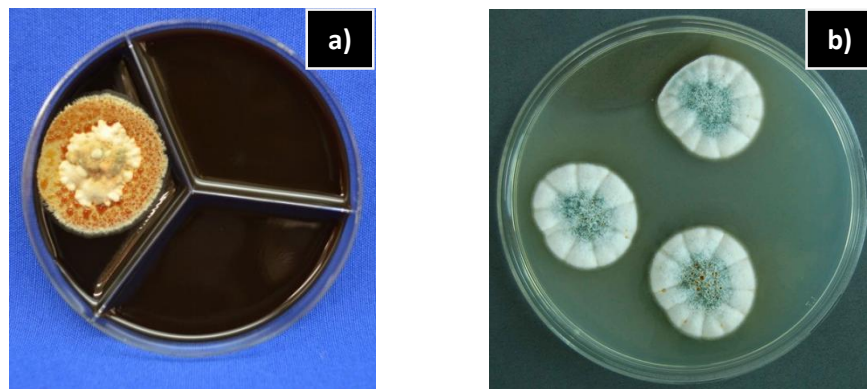
**Figura 3.2. Absorbancia a 475 nm (determinación de color) en vinazas inoculadas con hongos ligninolíticos en vinaza 50%.**

El ADN genómico fue exitosamente aislado del micelio de B19-01-7(7). Este ADN fue sujeto a una amplificación por PCR de la región ITS. El producto de PCR amplificado fue secuenciado y de acuerdo con el alineamiento con la base de datos de GenBank, la secuencia presentó 99% de homología con el ITS de *Aspergillus versicolor* (número de accesión JX232271.1). La figura 3.3 muestra a este hongo en su cultivo sobre medio de vinaza concentrada y sobre medio de PDA. De acuerdo a la información depositada en la base de datos del GenBank este hongo ha sido aislado e identificado como un hongo endófito de pasto marino tropical; también se ha descrito que puede ser aislado de suelo, heno, algodón, paredes húmedas, pastos, colchones y alimentos comestibles [126]. Investigaciones recientes han demostrado que *A. versicolor* es capaz de producir carboximetilcelulasa bajo la inducción de carboximetil celulosa, obteniendo la mayor actividad enzimática a pH 4 y 30 °C [127]. De igual forma se ha observado que este microorganismo es capaz de degradar el 4-nonilfenol, el cual es un compuesto xenobiótico



que es formado principalmente de la degradación microbiana de nonilfenol polietoxilado, surfactante ampliamente utilizado en la industria y productos domésticos [128].

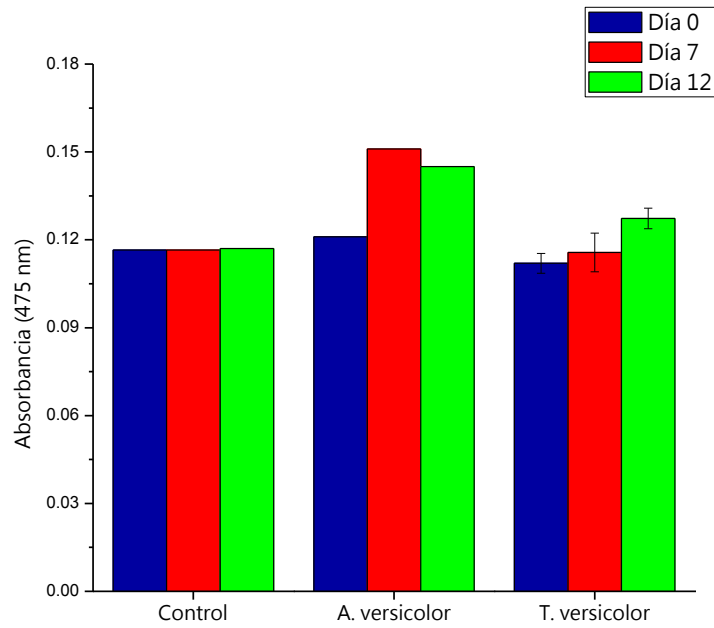
Se realizó una comparación en la degradación de vinaza entre *A. versicolor* (B19-01-7(7)) y *T. versicolor*. Para ello, se empleó una dilución de vinaza de 10% v/v utilizando agua destilada como diluyente y se evaluó la eliminación de color, compuestos fenólicos y DQO.



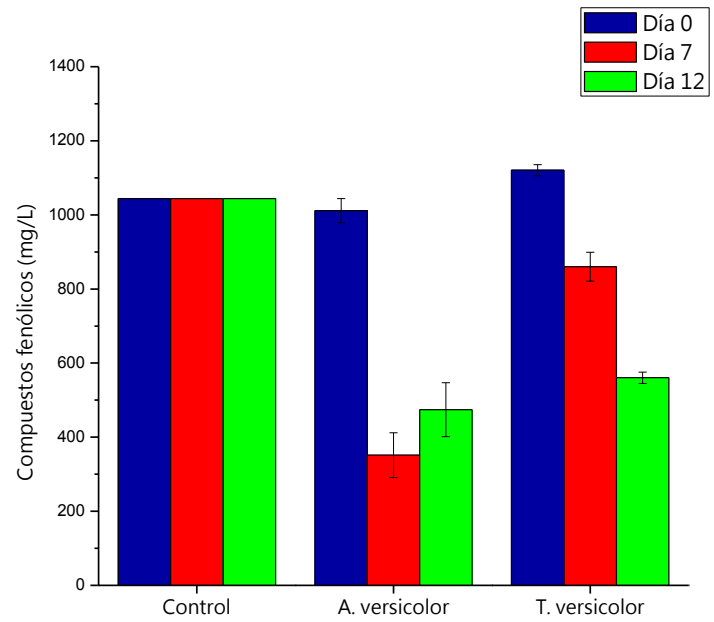
**Figura 3.3. Crecimiento de *Aspergillus versicolor*, a) en vinaza concentrada b) en PDA.**

Como se puede ver en las figuras 3.4 y 3.5, ambos microorganismos lograron crecer a esta concentración de vinazas. *A. versicolor*, fue mejor, removiendo 53% del contenido de compuestos fenólicos y 48% de la DQO, mientras que *T. versicolor* removió 50% el contenido de compuestos fenólicos y 21% de la DQO. Sin embargo, *A. versicolor* registró un aumento de color de 20%, el cual es un valor mayor al 14% alcanzado con *T. versicolor*. El pH final obtenido en el cultivo de ambas cepas fue cercano a 8.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar claramente que la remoción de compuestos fenólicos no está directamente relacionada con el cambio de color, ya que aunque ambas cepas presentaron una remoción considerable de compuestos fenólicos, el color (absorbancia a 475 nm) fue incrementando con respecto al tiempo.



**Figura 3.4. Absorbancia a 475 nm (medición de color) en vinaza 10% tratada con los hongos *A. versicolor* y *T. versicolor*.**



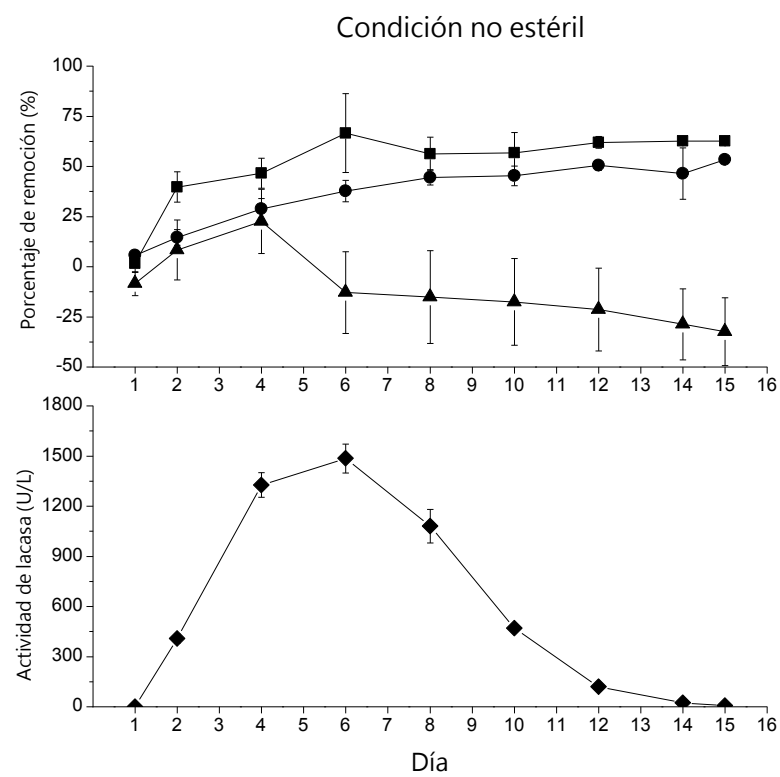
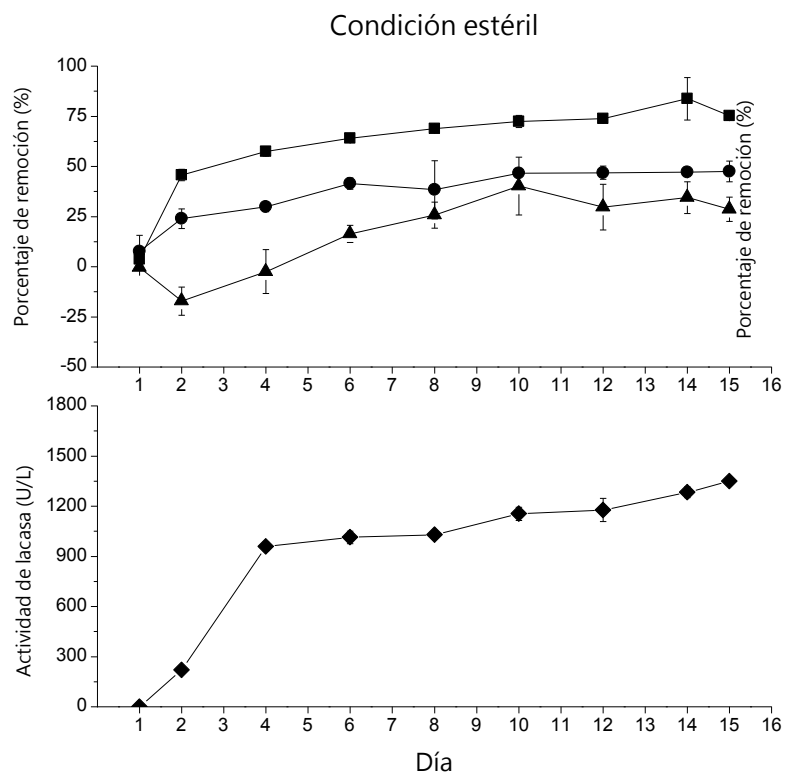
**Figura 3.5. Compuestos fenólicos en vinaza 10% tratada con los hongos *A. versicolor* y *T. versicolor*.**

Debido a que ambos microorganismos presentaron remoción de compuestos fenólicos se procedió a evaluar su desempeño en el BILEF operado en lote y con el fin de seleccionar el microorganismo adecuado para el tratamiento aerobio de las vinazas.

### **3.3. Operación en lote del BILEF inoculado con “pellets” de *T. versicolor* en condiciones estéril y no estéril**

El efecto de las condiciones estéril y no estéril sobre el desempeño del BILEF se muestra en figura 3.6. En ambas condiciones se observó que *T. versicolor* es capaz de remover compuestos fenólicos. La concentración inicial de fenol total en el BILEF fue  $1,122 \pm 59$  mg/L y en el día 6 fue registrado un valor de remoción de  $64 \pm 0.21\%$  y  $67 \pm 19\%$  en condiciones estéril y no estéril respectivamente, estos valores permanecieron casi constantes hasta el último día de experimentación (día 15). Un comportamiento similar fue registrado para la remoción de DQO, la concentración inicial de DQO fue  $12,120 \pm 496$  mg/L y en el día 6 en condición estéril fue observado un valor de remoción de  $41 \pm 3\%$  y en condición no estéril fue  $38 \pm 5\%$ . Los porcentajes de remoción de ambos parámetros, fenol total y DQO, no mostraron diferencias significativas de acuerdo al análisis estadístico ANOVA.

Debido a que el BILEF será usado como un pre-tratamiento para la digestión anaerobia, es deseable que mucha de la carga orgánica sea removida en el reactor UASB, por lo tanto el pre-tratamiento aeróbico debe remover la mayor cantidad de compuestos fenólicos sin eliminar mucha materia orgánica. Los resultados obtenidos en ambas condiciones (estéril y no estéril) son muy interesantes, ya que, el contenido original de fenol fue reducido sustancialmente con una disminución de la DQO alrededor de 40%. Un resultado similar fue obtenido por García-García *et al.* [129] durante la fermentación en lote con un reactor de mezcla completa usando vinaza estéril y a los hongos *Aspergillus terreus* y *Geotrichum candidum*. El grado de remoción, en la fermentación con *A. terreus*, de fenol total y o-difenoles fue 66 y 94%, respectivamente, la disminución total en DQO fue cerca del 29%. En el caso de *G. candidum*, los resultados fueron 70 y 91%. La disminución de DQO en este caso fue cerca de 28%.



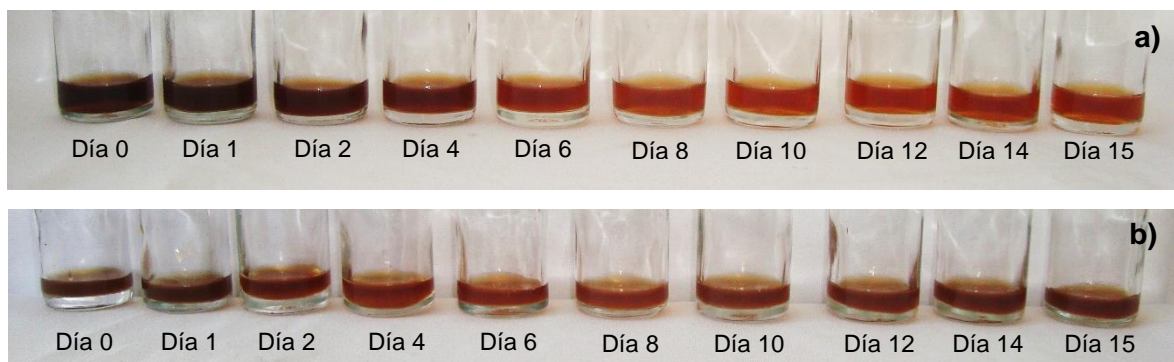
**Figura 3.6. Desempeño del BILEF en condiciones estéril y no estéril. Remoción de compuestos fenólicos (■), remoción de DQO (●), remoción de color (▲), y actividad de lacasa (◆).**

Debido a que el BILEF será usado como un pre-tratamiento para la digestión anaerobia, es deseable que mucha de la carga orgánica sea removida en el reactor UASB, por lo tanto el pre-tratamiento aeróbico debe remover la mayor cantidad de compuestos fenólicos sin eliminar mucha materia orgánica. Los resultados obtenidos en ambas condiciones (estéril y no estéril) son muy interesantes, ya que, el contenido original de fenol fue reducido sustancialmente con una disminución de la DQO alrededor de 40%. Un resultado similar fue obtenido por García-García *et al.* [129] durante la fermentación en lote con un reactor de mezcla completa usando vinaza estéril y a los hongos *Aspergillus terreus* y *Geotrichum candidum*. El grado de remoción, en la fermentación con *A. terreus*, de fenol total y o-difenoles fue 66 y 94%, respectivamente, la disminución total en DQO fue cerca del 29%. En el caso de *G. candidum*, los resultados fueron 70 y 91%. La disminución de DQO en este caso fue cerca de 28%.

Por otro lado, La actividad de lacasa (figura 3.6) presentó un comportamiento diferente entre las condiciones evaluadas; en condición estéril la lacasa registró un valor de  $960 \pm 23$  U/L en el día 4, la cual continuó incrementando ligeramente hasta el día 15. Mientras que en condición no estéril, el máximo valor fue observado en el día 6 ( $1485 \pm 86$  U/L) y luego la actividad fue disminuyendo en el tiempo. Un dato interesante que se pudo observar en condición no estéril es que la remoción de compuestos fenólicos permaneció casi constante aunque la actividad de la lacasa disminuyó, esto sugiere la posible existencia de otras enzimas en *T. versicolor* para la degradación de fenoles. Yemendzhiev *et al.* [130], indicaron que la especie *T. versicolor* ha sido extensivamente investigada por su notable actividad de lacasa, realizaron un estudio sobre la capacidad de utilizar fenol como única fuente de carbono y de energía. Reportaron que el metabolismo fúngico de los compuestos aromáticos ocurre vía orto-fisión, y las enzimas involucradas en este proceso catabólico son fenol hidroxilasa y la *cis*-muconato lactonasa.

Con respecto a la variación de color (figura 3.6 y figura 3.7), los resultados también fueron diferentes en ambas condiciones. En condición estéril, en el día 2 y 4 fue observado un incremento del color y fue hasta el día 6 cuando fue registrado un valor de remoción de  $16 \pm 4\%$ , alcanzando el máximo en el día 10, con una remoción de  $40 \pm 14\%$ . Por otro lado, en condiciones no estériles, se registraron valores negativos lo que significa que hubo un incremento del color en estas condiciones.

En la condición estéril el pH inicial fue 4.07, el cual fue incrementando hasta un valor de 5.6 en el día 12, permaneciendo constante hasta el día 15. Por otro lado, en condición no estéril el pH se encontró entre 4 y 6 durante los primeros seis días de operación del biorreactor, incrementando a 8 en los siguientes días de operación.



**Figura 3.7. Cambio de coloración en las muestras del BILEF con respecto al tiempo utilizando al hongo *T. versicolor*. a) condición estéril, b) condición no estéril.**

Benito *et al.* [27], realizaron un tratamiento en lote con *T. versicolor* sobre vinaza de una fermentación alcohólica industrial de melaza de remolacha, la cual ha sido sujeta a un tratamiento convencional anaeróbico-aeróbico para remover la DQO. Fue añadido 3 g/L de sacarosa y 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a la vinaza y se ajustó el pH a 5. Ellos registraron una eliminación de color de cerca de 82% en el cuarto día y una remoción de DQO de 77%. Por otro lado, Watanabe *et al.* [131] usaron *Coriolus* sp. No. 20 para decolorar 80% de los pigmentos de melanoidinas en presencia de 2.5% de glucosa y sorbosa, pH 4.5 y una temperatura de 35 °C. En otro estudio, durante el tratamiento de agua residual de una fermentación alcohólica de melaza de remolacha, *Aspergillus niger* alcanzó una eliminación máxima de color de 45% cuando 5 g/L de sacarosa fue añadida a las vinazas [132]. Estos valores son mayores a los encontrados en este estudio, el mayor porcentaje de remoción de color fue  $40 \pm 14\%$  en condición estéril y no fue observado remoción de color en condición no estéril. Es probable que existió una mejor eliminación de color en condición estéril debido a los cambios estructurales de los compuestos cuando el agua residual fue tratada a una alta temperatura. En nuestro estudio, no se añadieron nutrientes (por ejemplo sacarosa) y ésta pudo haber sido una razón en ambos casos por la cual no se registró una mayor decoloración. Paradójicamente, los primeros estudios sobre el sistema enzimático

involucrado en la decoloración de vinazas no estaban enfocados en enzimas ligninolíticas. De hecho, se consideró que enzimas intracelulares como glucosa oxidasas tuvieran un papel más importante en la decoloración [133]. Se demostró que la enzima catalizadora de la decoloración de melanoidinas fue L-sorbosa oxidasa. Sin embargo, glucosa oxidasa también decoloró pigmentos de melanoidinas. Se sugirió que la melanoidina fue decolorada por el oxígeno activo ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) producido por las reacciones con las oxidasas, porque la reacción con la enzima pura fue acompañada por la oxidación de la glucosa a ácido glucónico [131]. Es probable que las enzimas oxidantes de azúcar no estuvieron presentes durante el tratamiento de las vinazas en el biorreactor de lecho fluidizado y que por eso la decoloración fue menor con respecto a los otros autores. En ambas condiciones, en el biorreactor fue apreciada la inducción de la actividad de lacasa pero no se observó una clara relación con la decoloración del efluente.

Otro factor muy importante para la eliminación del color es el pH, Benito *et al.* [27] observaron que cuando la vinaza con nutrientes tenía un valor de pH de 8, *T. versicolor* casi no mostró crecimiento, la remoción de DQO no fue producida y solamente una ligera eliminación de color (10%) fue obtenida. En la figura 3.7, se puede ver que la mayor decoloración estuvo presente en condición estéril, este biorreactor mantuvo un valor de pH entre 4 y 6, a diferencia de la condición no estéril donde el pH incrementó a un valor mayor de 8, por lo tanto, se puede sugerir que el pH afectó la decoloración en el BILEF en condición no estéril. Sun *et al.* [134] reportó que para el tratamiento de vinazas de melaza diluidas con *Coriolus hirsutus*, el pH óptimo para la producción de lacasa fue 4.5, ellos registraron una remoción de DQO de 63% y un rendimiento de decoloración de 42%. Observaron que el incremento del pH del cultivo de 5 a 6 fue desfavorable para la activación de la enzima y fue responsable de la disminución de la producción de lacasa. Este descubrimiento podría ser atribuido a la acumulación de metabolitos fúngicos producidos en el cultivo de crecimiento, los cuales inactivan a la lacasa o inhiben su biosíntesis, o debido a la acción de enzimas proteolíticas. Esto coincide con la decoloración de vinazas por *Aspergillus-UB2* en matraces, donde la máxima decoloración fue 84% a las 41 h del experimento. Después de alcanzar el valor máximo, la eficiencia de decoloración disminuyó significativamente, mientras el pH se incrementó. Los autores lo atribuyen a la repolimerización de las melanoidinas [135]. En el tratamiento de vinazas de Amarula (27 g/L de DQO y 866 mg/L de compuestos fenólicos) con *Trametes pubescens*, Strong [136] obtuvo una remoción de DQO de aproximadamente 73% y una degradación de compuestos

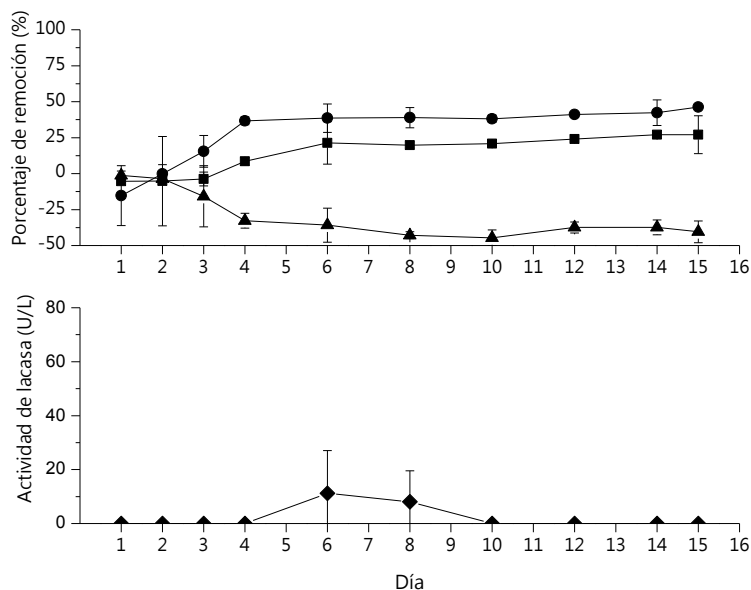
fenólicos de 86%; el color se incrementó significativamente y después de un lapso de tiempo disminuyó. Él reportó que la concentración de compuestos fenólicos producía un gran incremento en el color si el pH era incrementado de 3.8 a neutro. El cambio de color podía ser atribuido a la conversión de los fenoles a otros compuestos conocidos como quinonas, las cuales se producen mediante la eliminación del catión hidrógeno del grupo OH del fenol, los intermediarios de quinonas pueden reaccionar espontáneamente entre sí para formar oligómeros coloridos, dependiendo del sustrato y las condiciones ambientales [137]. De acuerdo a esta información, podemos sugerir que en condición no estéril, *T. versicolor* produce compuestos coloridos que incrementan el color inicial de las vinazas además de que la lacasa es afectada por el pH. También es conocido que el primer paso para la degradación por hongos es la adsorción [113, 136], y el pH afecta este paso porque la pared fúngica está compuesta por polisacáridos (ejemplo, quitina y quitosan), proteínas, lípidos y melanina con varios grupos funcionales (tales como amino, carboxilos, tiol, y grupos fosfato) capaces de enlazarse con varias moléculas orgánicas. Las formas iónicas de estos compuestos orgánicos en solución y la carga eléctrica superficial de la biomasa dependen del pH de la solución. Por lo tanto, la interacción entre el soluto y el sorbente es principalmente afectada por los estados de ionización de los grupos funcionales de ambos, la molécula y la superficie del sorbente. En el hongo *N. intermedia* el pH más adecuado para la adsorción es 3, y existió un decremento en el potencial de bio-adsorción con el incremento del pH en la solución [138].

Debido a que en la literatura es mencionado que los compuestos fenólicos son los que afectan severamente al proceso de digestión anaerobia [5, 129] y se obtuvo una remoción de compuestos fenólicos similar en ambas condiciones, estéril y no estéril, se decidió continuar el estudio en condición no estéril, debido a que esto representa una ventaja en una futura aplicación industrial.

#### **3.4. Operación en lote del BILEF inoculado con “discos” de *A. versicolor* en vinaza 10% estéril**

*A. versicolor* no fue capaz de crecer en el BILEF en condición no estéril y en forma de “pellet”. Por tal motivo, se procedió a inocular en “discos” y en vinaza estéril. Como se puede observar en la figura 3.8 en el día 4 se registró una remoción de DQO de 38%, valor que permaneció casi constante durante la mayoría de todo el experimento y fue hasta el día 15 cuando se registró el mayor valor de remoción alcanzando un 46%.





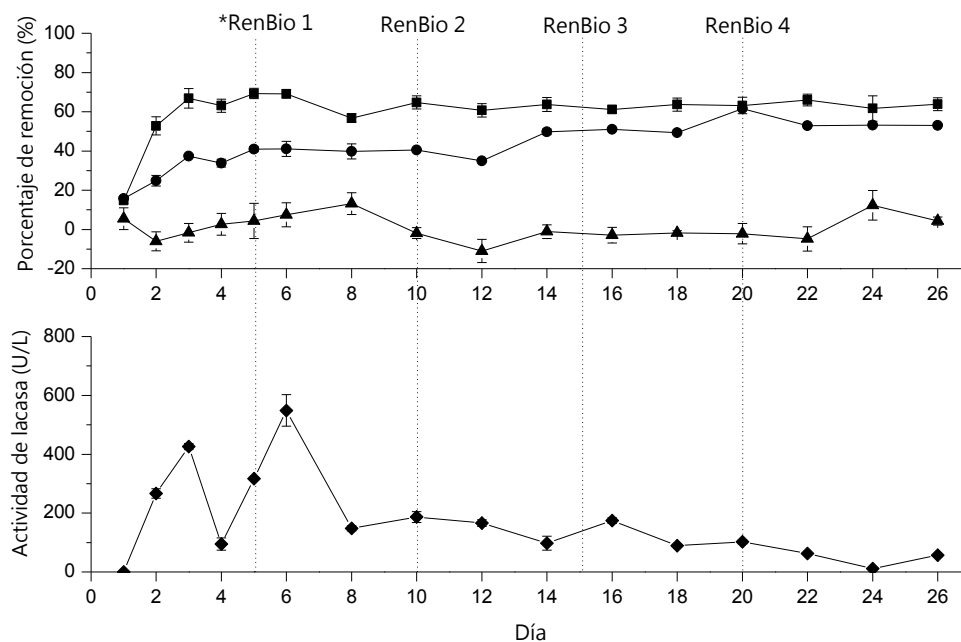
**Figura 3.8. Desempeño del BILEF en condición estéril utilizando *A. versicolor*. Remoción de compuestos fenólicos (■), remoción de DQO (●), remoción de color (▲), y actividad de lacasa (◆).**

La degradación de los compuestos fenólicos presentes en las vinazas estériles utilizando *A. versicolor* es menor al ser comparada con los resultados obtenidos por *T. versicolor*. En el día 6 se observó una reducción del 21% en la concentración de fenol total, y ésta no presentó cambio significativo durante los días restantes de operación del reactor (figura 3.9). Asimismo, *A. versicolor* solamente presentó actividad enzimática de lacasa en los días 6 y 8 de operación del BAPA, además, los valores registrados fueron inferiores a lo obtenido previamente con *T. versicolor*. El pH en el BILEF estuvo entre 4 y 6 durante los primeros 3 días de operación del biorreactor, incrementándose hasta 8 en los días posteriores. Con respecto al cambio en la coloración, como se puede observar en la figura 3.9, no existe una variación en los primeros tres días de operación del reactor y posteriormente se registró un incremento, alcanzando un valor de 44% por encima del color registrado inicialmente. De acuerdo a los resultados obtenidos en el BILEF con *A. versicolor* se pudo apreciar que este microorganismo tiene menor capacidad para la degradación de vinazas de etanol hidratado al compararse con los valores registrados por *T. versicolor*. Por lo tanto, se

procedió a evaluar la degradación de vinazas diluidas a 10% en el BILEF operado de forma continua y no estéril utilizando a *T. versicolor*.

### 3.5. Operación en continuo del BILEF inoculado con *T. versicolor* en condición no estéril

Con el objetivo de obtener el afluente para el reactor UASB, el BILEF fue operado en modo continuo empleando vinaza diluida a 10% y se renovó la biomasa cada 5 días, retirando un tercio del contenido del reactor y siguiendo la metodología de Blánquez *et al.* [115]. En la figura 3.9 se muestra el desempeño del biorreactor. La concentración inicial de los compuestos fenólicos en el BILEF fue  $1,247 \pm 31$  mg/L y en el día 3 fue registrada una remoción de  $66 \pm 5\%$ , este valor permaneció casi constante hasta el último día de experimentación (día 26).



**Figura 3.9. Desempeño del BILEF en condición no estéril operado en continuo. Remoción de compuestos fenólicos (■), remoción de DQO (●) remoción de color (▲), y actividad de lacasa (◆). \*Ren Bio 1, 2, 3 y 4, se refiere a las renovaciones de biomasa de *T. versicolor* dentro del BILEF.**

La concentración inicial de DQO en el BILEF fue  $10,095 \pm 31$  mg/L, alcanzando al tercer día una remoción de  $37 \pm 0.8\%$ ; esta remoción continuó incrementándose ligeramente hasta

alcanzar un valor mayor a 50%. La remoción de DQO es diferente a lo encontrado en la operación en lote, sugiriendo que la operación en continuo favorece la degradación de este parámetro.

Con respecto a la variación de color, el comportamiento es similar a la operación en lote debido a que no se observó un alto valor de remoción durante todo el experimento (figura 3.9). La actividad de lacasa registró un máximo valor de  $550 \pm 53$  U/L en el día 6, el cual disminuyó en el tiempo. Este valor no incrementó aunque la biomasa fúngica fue renovada. De nuevo, los resultados obtenidos sugieren la posible existencia de otras enzimas en *T. versicolor* para la degradación de fenoles [130].

Existe poca información sobre la degradación de vinazas con hongos en un biorreactor operado en modo continuo y muchos de los trabajos están enfocados a la eliminación de color y DQO. Por ejemplo, Shayegan *et al.* [74], durante la decoloración continua de vinazas digeridas previamente en un reactor UASB, suficientes microorganismos de *Aspergillus-UB2* fueron cultivados y transferidos a un tanque de aeración y alcanzó un máximo nivel de decoloración de 84%. La eficiencia cayó drásticamente después de 96 horas de operación. Una evaluación microscópica demostró que debido a contaminación microbiana la actividad de UB2 disminuyó. Estos autores concluyeron que era imposible trabajar con tal reactor por más de 3 días y mantener el sistema sin contaminación. En otro estudio, un reactor de burbujeo de columna operado en continuo fue utilizado para tratar vinazas. Este reactor fue inoculado con “pellets” de *Coriolus versicolor* y se añadió glucosa (0.5%) y peptona (0.05%); con estas condiciones se alcanzó una eficiencia de decoloración de 75% en 20 horas de operación, sin embargo, esta condición no pudo mantenerse por más tiempo y la eficiencia de decoloración disminuyó gradualmente después de 25 horas de reacción. El micelio se redujo en tamaño debido al estrés del burbujeo y fue lavado del reactor o experimentó autólisis [139]. Miranda *et al.* [132], investigaron la degradación de vinaza en un reactor tubular enchaquetado, la operación comenzó en lote y cuando la remoción de color estaba alrededor de 40% (3 días), el reactor fue alimentado continuamente con el agua residual y los nutrientes determinados en un flujo de 1 L/día (TRH de 5 días). La máxima remoción de color durante el proceso continuo fue 37% y se mantuvo constante entre 3 y 4 días; después de este tiempo la absorbancia del efluente se incrementó y la remoción de DQO estuvo alrededor de 69%. Por lo tanto, los resultados obtenidos por estos autores en la operación en continuo señalan una remoción de color pero solamente por un periodo corto de tiempo.

En nuestro estudio, el BILEF inoculado con *T. versicolor* en condiciones no estériles no mostró valores altos de actividad de lacasa. La inhibición de la lacasa puede ocurrir por la modificación del residuo aminoácido, quelación del cobre o cambios conformacionales de la enzima. De igual forma, puede ser inhibida por aniones pequeños que se enlazan a los átomos de cobre T2 y T3, y afectan la transferencia interna de electrones. Aunque algunas sustancias pueden inhibir a la actividad de lacasa, la adición de ciertos compuestos puede incrementar su eficiencia. Por ejemplo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  han demostrado mejorar la actividad de lacasa producida por *Sinorhizobium meliloti* CE52G [140]. Sin embargo, en nuestro estudio, aunque no hubo mucha actividad de lacasa (183 U/L en promedio), el biorreactor fue capaz de mantener altas remociones de compuestos fenólicos ( $66 \pm 5\%$ ) y DQO ( $41 \pm 11\%$ ) por 26 días, el cual es un valor de operación de reactor mayor a los datos encontrados en la literatura.

### 3.6. Reactor UASB para el tratamiento de vinazas de etanol hidratado

La tabla 3.2 muestra la caracterización de afluentes y efluentes obtenidos en el sistema 1 y 2. De acuerdo al análisis estadístico (ANOVA), el efluente generado en el reactor UASB en cada sistema presentó diferencias significativas en todos los parámetros a excepción de la DQO y  $\text{PO}_4^{3-}$ , sugiriendo que el efluente del UASB del sistema 2 posee mejor calidad para disposición ambiental debido a que presenta valores menores de los parámetros medidos en el sistema 1.

**Tabla 3.2. Caracterización del influente y efluente en los sistemas 1 y 2.**

Parámetro	Sistema 1		Sistema 2		
	Vinaza (diluida 7%)	Efluente del UASB	Vinaza (diluida 10%)	Efluente del BILEF	Efluente del UASB
DQO	7,704 ± 800	4,000 ± 570 <sup>a</sup>	11,000 ± 1,000	7,000 ± 93	3,940 ± 42 <sup>a</sup>
Fenol total	758 ± 100	840 ± 42 <sup>a</sup>	1,083 ± 150	460 ± 40	729 ± 38 <sup>b</sup>
Color*	0.10 ± 0.001	0.11 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.012	0.13 ± 0.003	0.14 ± 0.005 <sup>b</sup>
$\text{SO}_4^{2-}$	371 ± 90	200 ± 56 <sup>a</sup>	530 ± 141	540 ± 50	70 ± 40 <sup>b</sup>
$\text{N}_{\text{Total}}$	120 ± 15	723 ± 52 <sup>a</sup>	172 ± 21	688 ± 79	408 ± 91 <sup>b</sup>
$\text{N-NH}_3$	5 ± 0.6	57 ± 1 <sup>a</sup>	7 ± 1	5 ± 0.7	31 ± 4 <sup>b</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$	29 ± 5	49 ± 6 <sup>a</sup>	41 ± 7	22 ± 2	46 ± 7 <sup>a</sup>

\* Color es la absorbancia a 475 nm

Aunque no existe una diferencia significativa en la DQO presente en los efluentes de los reactores UASB de ambos sistemas, de la tabla 3.2 se puede calcular que el sistema 1 tuvo una remoción de DQO de  $48 \pm 2\%$ , mientras que, en el sistema 2 se registró una remoción

de DQO total de  $64 \pm 3\%$ , esto concuerda con lo reportado en otros estudios, donde se señala que acoplar otras técnicas de tratamiento con el proceso de digestión anaerobia mejora la eficiencia de remoción de DQO [141].

Strong [142] estudió, a nivel matraz y en condiciones estériles, las características de 14 vinazas de vino distintas y el uso de *Trametes pubescens* MB 89 para disminuir el contenido de DQO, compuestos fenólicos y color, posteriormente trató estos residuos por medio de digestión anaerobia. Este autor obtuvo una concentración de compuestos fenólicos arriba de 95 mg/L y valores de DQO entre 665 y 12,600 mg/L en las vinazas estudiadas y observó que el tipo de vinaza afecta el tratamiento fúngico de la misma, obteniendo remociones de DQO entre 45 y 84%. El pretratamiento fúngico antes de la digestión anaerobia aparentemente no ofreció una ventaja con respecto a la post-digestión de las concentraciones de DQO, debido a que al final de la digestión anaerobia, la concentración promedio de DQO fue 484 mg/L para las muestras no tratadas y 359 mg/L para las muestras tratadas previamente con *T. pubescens*. Esto es semejante a lo obtenido en el sistema 1 y 2 de nuestro estudio, ya que no hubo diferencia significativa en el contenido de DQO en los efluentes finales de cada sistema.

Con respecto a los compuestos fenólicos, el sistema 1 no removió compuestos fenólicos. Strong [142], encontró que la digestión anaerobia removió compuestos fenólicos tanto en vinazas previamente tratadas con *T. pubescens* como vinazas no tratadas. Las eficiencias de remoción finales fueron generalmente mejores para la digestión anaerobia que para el tratamiento fúngico. Sin embargo, es evidente que *T. pubescens* disminuyó la concentración de compuestos fenólicos en dos días mientras que la digestión anaerobia lo realizó en dos semanas. Cervantes *et al.* [143], señaló que el fenol puede ser degradado anaeróbicamente por cultivos puros utilizando aceptores de electrones alternativos como el sulfato, y en el caso de sedimentos orgánicos el humus puede servir como aceptor de electrones. Por tal motivo, estos autores estudiaron, en botellas de suero de vidrio, la capacidad de dos diferentes tipos de lodos granulares anaerobios para la oxidación de compuestos fenólicos (fenol y p-cresol) con 2-6-disulfonato de antraquinona (AQDS), presente en el humus, como aceptor de electrones. Ellos observaron que después de 30 días el lodo granular comenzó a consumir los compuestos fenólicos. Según lo reportado por Strong [142] y Cervantes *et al.* [143], para que exista una degradación de los compuestos fenólicos por medio de la digestión anaerobia, es necesario un lapso de tiempo largo, en el cual se produce el crecimiento de las bacterias responsables de la degradación

y el desarrollo de los sistemas enzimáticos involucrados en la ruta de degradación. A partir de esta información podemos sugerir que en el sistema 1 no se pudo apreciar una degradación de los compuestos fenólicos debido a que el reactor estuvo en operación 26 días, tiempo en el cual, probablemente no fue el suficiente para desarrollar las bacterias y procesos enzimáticos necesarios para la degradación de los compuestos fenólicos.

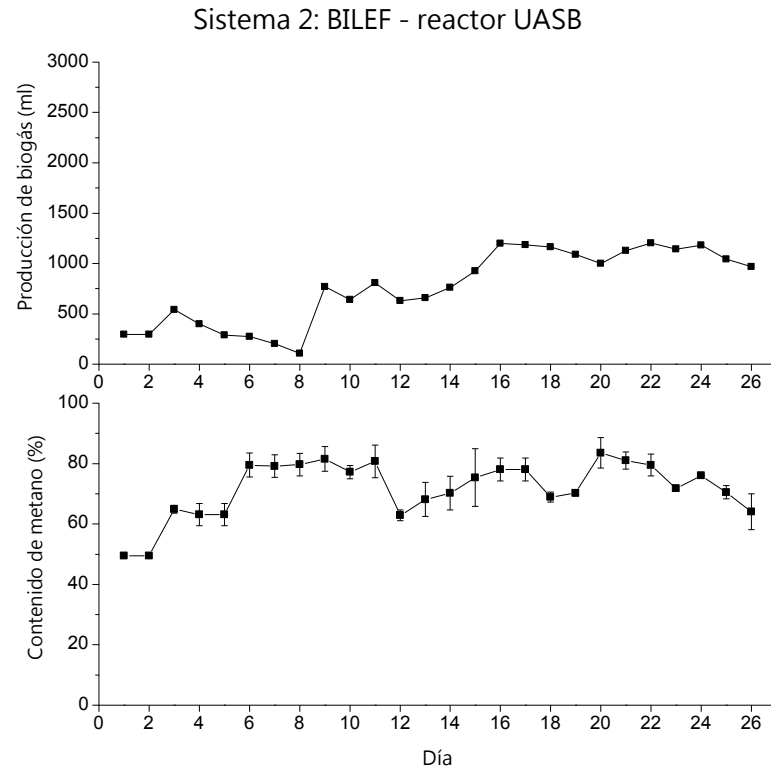
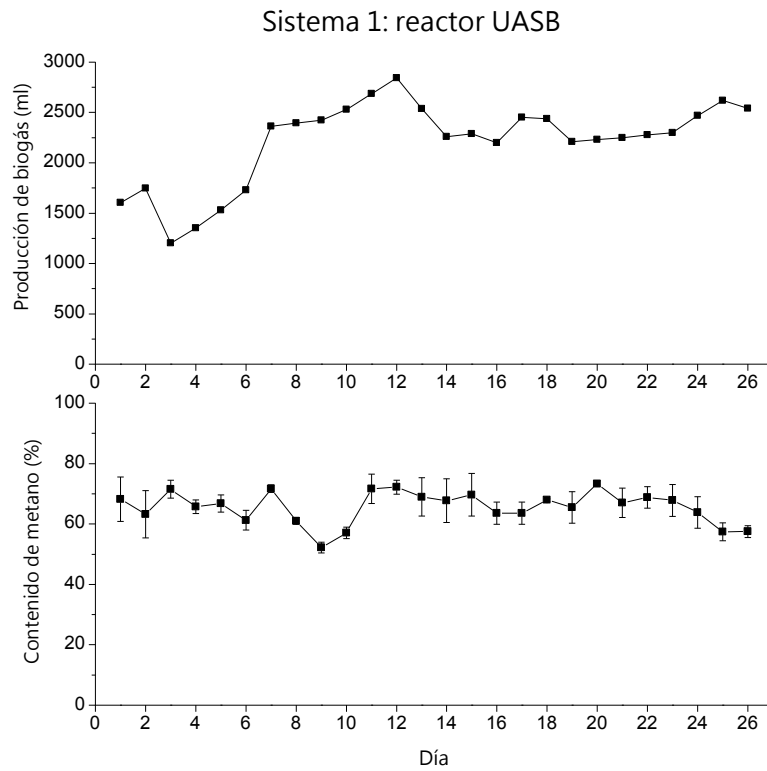
Por otro lado, el sistema 2 alcanzó una remoción de compuestos fenólicos de  $33 \pm 5\%$ , sin embargo se pudo detectar que el efluente del UASB mostró mayor cantidad de compuestos fenólicos comparado con el efluente del BILEF. Kumar *et al.* [144], mencionaron que la biomasa fúngica y bacteriana ha sido utilizada para la remoción de compuestos fenólicos a través de la adsorción, por lo tanto, investigaron el uso de micelio muerto de *T. versicolor polyporus* para la remoción de compuestos fenólicos en soluciones acuosas. Estos autores obtuvieron un máximo porcentaje de remoción de fenol de 90% a un pH cercano a 6 y observaron que la capacidad de adsorción de estos compuestos sobre el micelio disminuyó al incrementarse el pH, esto fue atribuido a la repulsión entre los iones fenolatos formados y los grupos de carga similar sobre la superficie de los hongos. Probablemente, ocurrió algo similar en el sistema 2 de nuestro estudio, es decir, durante la alimentación del reactor UASB micelio de *T. versicolor* fue introducido y al someterse a un cambio de pH (4.5 a 7), los compuestos adsorbidos sobre el micelio fueron liberados dentro del UASB reflejándose en un incremento de los compuestos fenólicos en el efluente. De igual manera, pudo existir una lisis celular del micelio introducido como fue observado por Strong [142].

Con respecto al color, en nuestro estudio, en ambos sistemas permaneció constante entre el afluente y efluente (tabla 3.2), sugiriendo que la digestión anaerobia a nuestras condiciones de operación no tiene un efecto sobre el color de las vinazas. Este resultado es contrario a lo obtenido por Strong [142], donde reportó que las muestras tratadas fúngicamente tenían un valor inicial de color bajo y que al ser tratadas con digestión anaerobia este color se incrementó. Este autor atribuye ese incremento de la coloración a la re-polimerización de los compuestos que fueron des-polimerizados por el tratamiento fúngico o posiblemente debido al incremento en el pH, porque como se mencionó anteriormente este parámetro es muy importante en la remoción de color.

En la figura 3.10 se presenta la producción de biogás y contenido de metano para ambos sistemas. El sistema 1 registró la mayor producción de biogás ( $2,370 \pm 149$  ml/día) comparado con el sistema 2 ( $1,102 \pm 83$  ml/día), sin embargo, el sistema 2 alcanzó un mayor contenido de metano ( $74 \pm 6\%$ ) que el sistema 1 ( $65 \pm 5\%$ ), el análisis estadístico

demonstró que estos valores presentan diferencias significativas. Con estos resultados encontramos que el rendimiento de metano fue  $0.28$  y  $0.18 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removida}}$  para el sistema 1 y 2 respectivamente. La cantidad de AGVs total (expresado en  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) fue  $423 \pm 93$  y  $347 \pm 86 \text{ mg/L}$  para el sistema 1 y 2 respectivamente.

Jiménez *et al.* [5], empleando vinazas de melaza de remolacha, demostraron que el pretratamiento de las vinazas con *Penicillium decumbens* reduce el 67.7% del contenido inicial de compuestos fenólicos, disminuyendo de esta forma su bio-toxicidad. Posteriormente sometieron a digestión anaerobia, en un reactor de agitación continua, las vinazas previamente tratadas con *P. decumbens* y no tratadas. Estos autores obtuvieron un rendimiento de metano de  $0.2 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{añadido}}$  empleando un TRH de 53 días y una carga orgánica de  $1.5 \text{ kg DQO}/\text{m}^3 \cdot \text{día}$  de vinaza no tratada; así mismo, al utilizar esa misma carga orgánica pero con vinazas previamente tratadas, obtuvieron un rendimiento de metano de  $0.225 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{añadido}}$  en un TRH de 15 días. Registrando un incremento del 12% en su rendimiento. En nuestro estudio, empleando una carga orgánica similar a la de Jiménez *et al.* [5] ( $1.2 \text{ kg DQO}/\text{m}^3 \cdot \text{día}$ ) se obtuvo mejores rendimientos de metano para ambos sistemas ( $0.28$  y  $0.18 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removida}}$  para el sistema 1 y 2 respectivamente) y a un TRH menor (6 días). Sin embargo, a diferencia de estos autores nuestro rendimiento de metano no aumentó en el sistema 2, debido a que existió una disminución en la producción de biogás, probablemente debida a que la materia orgánica de fácil degradación fue eliminada en el BILEF, interrumpiendo de esta forma la cadena trófica precedente a la metanogénesis y por lo tanto a la producción de biogás [35, 145]. No obstante, cabe recalcar que el biogás obtenido en el sistema 2 posee una concentración de metano de  $74 \pm 6\%$ , convirtiéndolo en un gas con mayor poder calorífico que el obtenido en el sistema 1 y por lo tanto ser utilizado para la producción de energía eléctrica [146, 147].



**Figura 3.10. Comportamiento de la producción de biogás y contenido de metano en el sistema 1 y sistema 2.**



## Conclusiones

- A nivel matraz se observó que las cepas que presentaron una mayor remoción de fenoles sobre vinaza diluidas fueron B19-01-7(7) y *T. versicolor*. Sin embargo al ser operadas en el reactor BILEF, *T. versicolor* alcanzó mayores valores de remoción de fenol y DQO comparado con B19-01-7(7).
- La Cepa B19-01-7(7) fue identificada como *Aspergillus versicolor*, un microorganismo que ha sido reportado como apto para degradar compuestos recalcitrantes como el 4-nonilfenol.
- Nuestros resultados demuestran que los fenoles no son necesariamente los responsables del color.
- Además, este estudio demostró la posibilidad de usar un BILEF para la eliminación de compuestos fenólicos ( $67 \pm 19\%$ ) y DQO ( $38 \pm 5\%$ ) en condiciones no estériles utilizando *T. versicolor*. Sin embargo al igual que en los experimentos realizados a nivel matraz, la eliminación de color no fue posible. La operación en continuo del BILEF fue llevado a cabo exitosamente por 26 días, el cual es el mayor tiempo de operación logrado en un reactor aerobio para el tratamiento de vinazas respecto a lo encontrado en la literatura.
- En los dos sistemas evaluados para el tratamiento de vinazas, el sistema 2 (BILEF+UASB) tuvo una mejor calidad de efluente para la disposición al ambiente y un mayor contenido de metano en el biogás. Esto lo convierte en una tecnología prometedora para la obtención de un biocombustible (metano) a partir de una fuente renovable como lo son las vinazas.

## Bibliografía

1. R. F. Association, Ethanol Industry Outlook, 2013.
2. SENER, *Análisis y propuesta para la introducción de etanol anhidro en las gasolinas que comercializa PEMEX*. 2014.
3. U. N. d. Cañeros, Estadísticas de la Agroindustria de la Caña de Azúcar 2005-2014, 2014.
4. Y. Satyawali; M. Balakrishnan, Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review, *J environ manage*. 86, 481-497, 2008.
5. A. Jiménez; R. Borja; A. Martín; F. Raposob, Kinetic analysis of the anaerobic digestion of untreated vinasses and vinasses previously treated with *Penicillium decumbens*, *J Environ Manage*. 80, 303-310, 2006.
6. D. Pant; A. Adholeya, Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review, *Bioresource Technol*. 98, 2321-2334, 2007.
7. E. España-Gamboa; J. Mijangos-Cortés; L. Barahona-Perez; J. Dominguez-Maldonado; G. Hernández-Zárate; L. Alzate-Gaviria, Vinasse: characterization and treatments, *Waste Manage Res*. 29, 1235-1250, 2011.
8. C. M. d. Reis; M. F. Carosia; I. K. Sakamoto; M. B. A. Varesche; E. L. Silva, Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anerobic fluidized bed reactor, *Int J Hydrogen Energ*. 40, 8498-8509, 2015.
9. B. K. Acharya; H. Pathak; S. Mohana; Y. Shouche; V. Singh; D. Madamwar, Kinetic modelling and microbial community assessment of anaerobic biphasic fixed film bioreactor treating distillery spent wash, *Water Res*. 45, 4248-4259, 2011.
10. M. Bustamante; C. Paredes; R. Moral; J. Moreno; A. Pérez; M. Pérez, Uses of winery and distillery effluents in agriculture: characterization of nutrient and hazardous components, *Water Sci Technol*. 51, 145-151, 2005.
11. F. Espinoza; C. Pelayo; J. Corona; Y. González; A. Bories; H. Gutiérrez, Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane, *Biomass Bioenerg*. 33, 14-20, 2008.
12. V. Parnaudeau; N. Condom; R. Oliver; P. Cazevielle; S. Recous, Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material,

- fermentation and concentration processes, *Bioresource Technol.* 99, 1553-1562, 2008.
13. J. F. Marinho; J. E. Correia; A. C. d. C. Marcato; J. Pedro-Escher; C. S. Fontanetti, Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia, *Ecotox Environ Safe.* 110, 239-245, 2014.
  14. C. Raghukumar; G. Rivonkar, Decolorization of molasses spent wash by the white-rot fungus *Flavodon flavus*, isolated from a marine habitat, *Appl Microbiol Biotechnol.* 55, 510-514, 2001.
  15. I. Quiroz-Guerrero, Percepción actitud de productores cañeros sobre el uso de composta de cachaza y vinaza en la zona de abasto del ingenio La Gloria, Veracruz, México., Colegio de Postgraduados, Veracruz, México, 2010.
  16. L. González; M. Mejía, Impact of ferti-irrigation with vinasse on ground water quality, *Irrig Drain.* 64, 400-407, 2015.
  17. K. V. Rajeshwari; M. Balakrishnan; A. Kansal; K. Lata; V. V. N. Kishore, State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment, *Renew Sust Energ Rev.* 4, 135-156, 2000.
  18. A. Vlyssides; E. M. Barampouti; S. Mai; A. Stamatoglou; E. Tsimas, Alternative biological systems for the treatment of vinasse from wine, *Water Sci Technol.* 62, 2899-2904, 2010.
  19. R. Sowmeyan; G. Swaminathan, Effluent treatment process in molasses-based distillery industries: A review, *J Hazard Mater.* 152, 453-462, 2008.
  20. D. Ryan; W. Leukes; S. Burton, Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*, *Bioresource Technol.* 98, 579-587, 2007.
  21. N. K. Pazarlioglu; M. Sariisik; A. Telefoncu, Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing, *Process Biochem.* 40, 1673-1678, 2005.
  22. P. Giardina; V. Faraco; C. Pezzella; A. Piscitelli; S. Vanhulle; G. Sannia, Lacasses: a never-ending story, *Cell Mol Life Sci.* 67, 369-385, 2010.
  23. L. Gianfreda; F. Xu; J.-M. Bollag, Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes, *Bioremediat J.* 3, 1-26, 1999.
  24. S. V. Srinivasan; D. V. S. Murthy, Statistical optimization for decolorization of textile dyes using *Trametes versicolor*, *J Hazard Mater.* 165, 909-914, 2009.

25. M. Placková; K. Svobodová; T. Cajthaml, Laccase activity profiling and gene expression in PCB-degrading cultures of *Trametes versicolor*, *Int Biodeter Biodegr.* 71, 22-28, 2012.
26. C. Cruz-Morató; L. Ferrando-Climent; S. Rodríguez-Mozaz; D. Barceló; E. Marco-Urrea; T. Vicent; M. Sarra, Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor, *Water Res.* 47, 5200-5210, 2013.
27. G. G. Benito; M. P. Miranda; D. R. d. I. Santos, Decolorization of wastewater from an alcoholic fermentation process with *Trametes versicolor* *Bioresource Technol.* 61, 33-37, 1997.
28. P. Blánquez; M. Sarra; T. Vicent, Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions, *Process Biochem.* 43, 1-7, 2008.
29. T. Janhom; S. Wattanachira; P. Pavasant, Characterization of brewery wastewater with spectrofluorometry analysis, *J Environ Manage.* 90, 1184-1190, 2009.
30. A. Wilkie; K. Riedesel; J. Owens, Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks, *Biomass Bioenerg.* 19, 63-102, 2000.
31. N. Nishio; Y. Nakashimada, Review recent development of anaerobic digestion processes for energy recovery from wastes, *J. Biosci Bioeng.* 103, 105-112, 2007.
32. C. Cardona; O. Sánchez, Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities, *Bioresource Technol.* 98, 2415-2457, 2007.
33. R. Chandra; R. N. Bharagava; V. Rai, Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluents and its degradation, *Bioresource Technol.* 99, 4648-4660, 2008.
34. H. Y. Wang; H. Qian; W. R. Yao, Review: Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity, *Food Chem.* 128, 573-584, 2011.
35. J. E. Hernandez; R. G. J. Edyvean, Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge, *J Hazard Mater.* 160, 20-28, 2008.
36. K. Stemme; B. Gerdes; A. Harms; J. Kamphues, Beet-vinasses (condensed molasses solubles) as an ingredient in diets for cattle and pigs-nutritive value and limitations, *J Anim Physiol An N.* 89, 179-183, 2005.

37. B. Reddy; S. Ramesh; P. Reddy; B. Ramaiah; P. Salimath; K. Kachapur, Sweet sorghum- a potential alternate raw material for bio-ethanol and bioenergy, *International Sorghum and Millets Newsletter*. 46, 79-86, 2005.
38. M. Perez; R. Rodriguez; L. Romero; D. Sales, Anaerobic thermophilic digestion of cutting oil wastewater: Effect of co-substrate, *Biochem Eng J*. 29, 250-257, 2006.
39. X. Melamane; P. Strong; J. Burgess, Treatment of wine distillery wastewater: A review with emphasis on anaerobic membrane reactors, *S Afr J Enol Vitic* 28, 25-36, 2007.
40. R. Chandra; S. Yadav; D. Mohan, Effect of distillery sludge on seed germination and growth parameters of green gram (*Phaseolus mungo* L.), *J Hazard Mater*. 152, 431-439, 2008.
41. C. Baez-Smith, Anaerobic Digestion of Vinasses for the Production of Methane in the Sugar Cane Distillery, *SPRI Conference on Sugar Processing*. 268-287, 2006.
42. K. R. Salomon; E. E. S. Lora, Estimate of the electric energy generating potential for different source of biogas in Brazil, *Biomass Bioenerg*. 33, 1101-1107, 2009.
43. R. Cail; J. Barford, A comparison of an Upflow Floc (Tower) digester and UASB system treating cane juice stillage, *Agr Wastes*. 14, 291-299, 1985.
44. H. Pathak; C. Joshi; A. Chaudrary; R. Chaudrary; N. Kalra; M. Dwiwedi, Soil amendment with distillery effluent for wheat and rice cultivation, *Water Air Soil Poll*. 113, 133-140, 1999.
45. A. Kannan; R. Upetri, Influence of distillery effluent on germination and growth of mung bean (*Vigna radiata*) seeds, *J Hazard Mater*. 153, 609-615, 2008.
46. C. Chidankumar; S. Chandraju; R. Nagendraswamy, Impact of distillery spentwash irrigation on the yields of top vegetables (Creepers), *World Appl Sci J*. 6, 1270-1273, 2009.
47. M. Hutnan; M. Hornak; I. Bodík; V. Hlavacka, Anaerobic treatment of wheat stillage, *Chem Biochem Eng Q*. 17, 233-241, 2003.
48. M. Decloux; A. Bories; R. Lewandowski; C. Fargues; A. Mersad; M. Lameloise; F. Bonnet; B. Dherbecourt; L. Nieto, Interest of electrodialysis to reduce potassium level in vinasses. Preliminary experiments, *Desalination*. 146, 393-398, 2002.
49. M. Tejada; J. Gonzalez, Effects of two beet vinasse forms on soil physical properties and soil loss, *Catena*. 68, 41-50, 2006.

50. E. Madejón; R. López; J. Murillo; F. Cabrera, Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain), *Agr Ecosyst Environ.* 84, 55-65, 2001.
51. E. Gnansounou; A. Dauriat; C. Wyman, Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of north China, *Bioresource Technol.* 96, 985-1002, 2005.
52. A. Vlyssides; E. Barampouti; S. Mai, Wastewater characteristics from Greek wineries and distilleries, *Water Sci Technol.* 51, 53-60, 2005.
53. S. Mohana; B. Acharya; D. Madamwar, Review: Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications, *J Hazard Mater.* 163, 12-25, 2009.
54. B. K. Acharya; S. Mohana; D. Madamwar, Anaerobic treatment of distillery spent wash- A study on upflow anaerobic fixed film bioreactor, *Bioresource Technol.* 99, 4621-4626, 2008.
55. A. Bories; J. Raynal, Anaerobic digestion of high-strength distillery wastewater (cane molasses stillage) in a fixed-film reactor, *Biol Waste.* 67, 251-267, 1988.
56. H. Harada; S. Uemura; A. Chen; J. Jayadevan, Anaerobic treatment of a recalcitrant distillery wastewater by a thermophilic UASB reactor, *Bioresource Technol.* 55, 215-221, 1996.
57. T. Tondee; S. Sirianuntapiboon, Decolorization of molasses wastewater by *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861, *Bioresource Technol.* 99, 6258-6265, 2008.
58. T. Tondee; S. Sirianuntapiboon; S. Ohmomo, Decolorization of molasses wastewater by yeast strain *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246, *Bioresource Technol.* 99, 5511-5519, 2008.
59. P. Chairattananokorn; T. Imai; R. Kondo; M. Sekine; T. Higuchi; M. Ukita, Decolorization of alcohol distillery wastewater by thermotolerant white rot fungi, *Appl Biochem Micro.* 41, 583-588, 2005.
60. D. Pant; A. Adholeya, Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation, *Biodegradation.* 18, 647-659, 2007.
61. S. Sirianuntapiboon; P. Zohsalam; S. Ohmomo, Decolorization of molasses wastewater by *Citeromyces* sp. WR-43-6, *Process Biochem.* 39, 917-924, 2004.

62. D. F. Kalavathi; L. Uma; G. Subramanian, Degradation and metabolization of the pigment-melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181, *Enzyme Microb Tech.* 29, 246-251, 2001.
63. L. Valderrama; C. D. Campo; C. Rodríguez; L. d. Bashan; Y. Bashan, Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*, *Water Res.* 36, 4185-4192, 2002.
64. Y. Satyawali; M. Balakrishnan, Removal of color from biomethanated distillery spentwash by treatment with activated carbons, *Bioresource Technol.* 98, 2629-2635, 2007.
65. J. Beltran; J. Dominguez; E. Partido, Physico-chemical treatment for the depuration of wine distillery wastewaters (vinasses), *Water Sci Technol.* 51, 159-166, 2005.
66. V. Migo; M. Matsumara; E. Rosario; H. Kataoka, Decolorization of molasses wastewater using an inorganic flocculant, *J Ferment Bioeng.* 75, 438-442, 1993.
67. T. Sreethawong; S. Chavadej, Color removal of distillery wastewater by ozonation in the absence and presence of immobilized iron oxide catalyst, *J Hazard Mater.* 155, 486-493, 2008.
68. P. C. Sangave; P. R. Gogate; A. B. Pandit, Combination of ozonation with conventional aerobic oxidation for distillery wastewater treatment, *Chemosphere.* 68, 32-41, 2007.
69. R. K. Prasad; S. N. Srivastava, Electrochemical degradation of distillery spent wash using catalytic anode: Factorial design of experiments, *Chem Eng J.* 146, 22-29, 2009.
70. P. Piya-areetham; K. Shenchunthichai; M. Hunsom, Application of electrooxidation process for treating concentrated wastewater from distillery industry with a voluminous electrode, *Water Res.* 40, 2857-2864, 2006.
71. P. Manisankar; S. Viswanathan; C. Rani, Electrochemical treatment of distillery effluent using catalytic anodes, *Green Chem.* 5, 270-274, 2003.
72. C. H. Thakur; V. C. Srivastava; I. D. Mall, Electrochemical treatment of a distillery wastewater: Parametric and residue disposal study, *chem Eng J.* 148, 496-505, 2009.

73. N. Kannan; G. Karthikeyan; N. Tamilselvan, Comparison of treatment potential of electrocoagulation of distillery effluent with and without activated *Areca catechu* nut carbon, *J Hazard Mater. B137*, 1803-1809, 2006.
74. J. Shayegan; M. Pazouki; A. Afshari, Continuous decolorization of anaerobically digested distillery wastewater, *Process Biochem. 40*, 1323-1329, 2005.
75. S. Mohana; C. Desai; D. Madamwar, Biodegradation and decolourization of anaerobically treated distillery spent wash by a novel bacterial consortium, *bioresource Technol. 98*, 333-339, 2007.
76. S. Sirianuntapiboon; P. Phothilangka; S. Ohmomo, Decolorization of molasses wastewater by a strain No. BP103 of acetogenic bacteria, *Bioresource Technol. 92*, 31-39, 2004.
77. J. K. Cho; S. K. Beom; C. P. Soon; S. C. Yong; N. C. Ho, Effect of stepwise seeding on the performance of four anaerobic biofilters treating a synthetic stillage waste, *Biomass Bioenerg. 10*, 25-35, 1996.
78. J. K. Jhung; E. Choi, A comparative study of UASB and anaerobic fixed film reactors with development of sludge granulation, *Wat Res. 29*, 271-277, 1995.
79. D. Zhiyi; W. Chaohai; Z. Xiufeng, Start-up and performance of a novel reactor- jet biogas inter-loop anaerobic fluidized bed, *Chinese J Chem Eng. 16*, 143-150, 2008.
80. M. Andalib; H. Hafez; E. Elbeshbishy; G. Nakhla; J. Zhu, Treatment of thin stillage in a high-rate anaerobic fluidized bed bioreactor (AFBR), *Bioresource Technol. 121*, 411-418, 2012.
81. P. Buffière; J. P. Steyer; C. Fonade; R. Moletta, Modeling and experiments on the influence of biofilm size and mass transfer in a fluidized bed reactor for anaerobic digestion, *Wat Res. 32*, 657-668, 1998.
82. N. Fernández; S. Montalvo; R. Borja; L. Guerrero; E. Sánchez; I. Cortés; M. F. Colmenarejo; L. Travieso; F. Raposo, Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater, *Renew Energ. 33*, 2458-2466, 2008.
83. S. Chong; T. K. Sen; A. Kayaalp; H. M. Ang, The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment - A state-of-the-art review, *Water Res. 46*, 3434-3470, 2012.



84. J. Steyer; P. Buffière; D. Rolland; R. Moletta, Advanced control of anaerobic digestion processes through disturbances monitoring, *Wat Res.* 33, 2059-2068, 1999.
85. L. W. Hulshoff-Pol; S. I. d. Castro-Lopes; G. Lettinga; P. N. Lens, Anaerobic sludge granulation, *Water Res.* 38, 1376-1389, 2004.
86. J. Goodwin; J. B. Stuart, Anaerobic digestion of malt whisky distillery pot ale using upflow anaerobic sludge blanket reactors, *Bioresource Technol.* 49, 75-81, 1994.
87. N. Uzal; C. Gokacay; G. Demirer, Sequential anaerobic/aerobic biological treatment of malt whisky wastewater, *Process Biochem.* 39, 279-286, 2003.
88. E. España-Gamboa; J. Mijangos-Cortés; G. Hernández-Zárate; J. Domínguez-Maldonado; L. Alzate-Gaviria, Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor, *Biotechnol Biofuels.* 5, 1-9, 2012.
89. G. Kumar; S. Gupta; G. Singh, Biodegradation of distillery spent wash in anaerobic hybrid reactor, *Water Res.* 41, 721-730, 2007.
90. E. España-Gamboa; J. Mijangos-Cortés; G. Hernández-Zárate; J. Domínguez-Maldonado; L. Alzate-Gaviria, Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor, *Biotechnology for Biofuels.* 5, 2012.
91. C. Cronin; K. V. Lo, Anaerobic treatment of brewery wastewater using UASB reactors seeded with activated sludge, *Bioresource Technol.* 64, 33-38, 1998.
92. E. España-Gamboa, Obtención de metano mediante el tratamiento de vinazas de etanol hidratado utilizando un Reactor Anaerobio de Manto de Lodos modificado, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2010.
93. L. F. Ferreira; M. Aguiar, Selection of vinasse degrading microorganisms, *World J Microb Biot.* 26, 1613-1621, 2010.
94. J. Dahiya; D. Singh; P. Nigam, Decolourisation of molasses wastewater by cells of *Pseudomonas fluorescens* immobilised on porous cellulose carrier, *Bioresource Technol.* 78, 111-114, 2001.
95. A. R. Santal; N. P. Singh; B. S. Saharan, Biodegradation and detoxification of melanoidin from distillery effluent using an aerobic bacterial strain SAG<sub>5</sub> of *Alcaligenes faecalis*, *J Hazard Mater.* 193, 319-324, 2011.
96. R. Bharagava; R. Chandra; V. Rai, Isolation and characterization of aerobic bacteria capable of the degradation of synthetic and natural melanoidins from distillery effluent, *World J Microb Biot.* 25, 737-744, 2009.

97. T. Bugg; M. Ahmad; E. Hardiman; R. Singh, The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation, *Curr Opin Biotech.* 22, 394-400, 2011.
98. F. Vahabzadeh; M. Mehranian; A. R. Saatari, Color removal ability of *Phanerochaete chrysosporium* in relation to lignin peroxidase and manganese peroxidase produced in molasses wastewater, *World J Microb Biot.* 20, 859-864, 2004.
99. Q. Yang; C. L. H. Li; Y. Li; N. Yu, Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor, *Biochem Eng J.* 43, 225-230, 2009.
100. A. Ortega-Clemente; S. Caffarel-Méndez; M. T. Ponce-Noyola; J. Barrera-Cortés; H. M. Poggi-Varaldo, Fungal post-treatment of pulp mill effluents for the removal of recalcitrant pollutants, *Bioresource Technol.* 100, 1885-1894, 2009.
101. F. I. Hai; K. Yamamoto; F. Nakajima; K. Fukushi, Removal of structurally different dyes in submerged membrane fungo reactor-Biosorption/PAC-adsorption, membrane retention and biodegradation, *J Membrane Sci.* 325, 395-403, 2008.
102. P. Blánquez; M. Sarrà; T. Vicent, Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions, *Process Biochem.* 43, 1-7, 2008.
103. S. Nitayavardhana; S. K. Khanal, Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: Production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient, *Bioresource Technol.* 101, 9078-9085, 2010.
104. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21, Washington DC, USA, 2005;
105. J. D. Box, Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters, *Water Res.* 17, 511-525, 1983.
106. D. M. d. Albuquerque; M. J. Ferreira, Metabisulfite interference in biosensing and Folin-Ciocalteu analysis of polyphenols, *Microchim Acta.* 167, 253-258, 2009.
107. G. M. Castillo-Ávila, Aislamiento y caracterización de hongos lignocelulolíticos, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2010.
108. X. Font; G. Caminal; X. Gabarrell; S. Romero; T. Vicent, Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets, *J Chem Technol Biot.* 78, 548-554, 2003.
109. C. W. Liu; H. S. Liu, *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors, *Process Biochem.* 46, 202-209, 2011.

110. S. Yadav; R. Chandra; V. Rai, Characterization of potential MnP producing bacteria and its metabolics products during decolourisation of synthetic melanoidins due to biostimulatory effect of D-xylose at stationary phase, *Process Biochem.* **46**, 1774-1784, 2011.
111. S. Sirianuntapiboon; P. Sihanonth; P. Somchai; P. Atthasampunna; S. Hayashida, An adsorption mechanism for melanoidin decolorization by *Rhizoctonia* sp., *Biosci Biotechnol Biochem.* **59**, 1185-1189, 1995.
112. L. Conde-Ferrález; R. Grijalva-Arango; A. C. James-Kay, A rapid DNA extraction method from mycelium which is suitable for PCR, *Rev Latinoam Microbiol.* **50**, 3-4, 2008.
113. P. Blánquez; N. Casas; X. Font; X. Gabarrell; M. Sarra; G. Caminal; T. Vicent, Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*, *Water Res.* **38**, 2166-2172, 2004.
114. X. Mena-Espino; F. Barahona-Pérez; L. Alzate-Gaviria; R. Rodríguez-Vázquez; M. Tzec-Simá; J. Domínguez-Maldonado; B. B. Canto-Canché, Saccharification with *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* enzymatic extracts of pretreated banana waste, *Afr J Biotechnol.* **10**, 3824-3834, 2011.
115. P. Blánquez; M. Sarra; T. Vicent, Study of the cellular retention time and the partial biomass renovation in a fungal decolourisation continuous process, *Water Res.* **40**, 1650-1656, 2006.
116. H. M. Poggi-Varaldo; L. Alzate-Gaviria; A. Pérez-Hernández; V. G. Nevarez-Morillón; N. Rinderknecht-Seijas, A side-by-side comparison of two systems of sequencing coupled reactors for anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste, *Waste Manage Res.* **23**, 270-280, 2005.
117. B. Rincón; R. Borja; J. M. González; M. C. Portillo; C. Sáiz-Jiménez, Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial communities of one-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue, *Biochem Eng J.* **40**, 253-261, 2008.
118. B. J. P. Jobling; S. M. Thai; T. Fritz; S. R. Esteves; R. M. Dinsdale; A. J. Guwy, An improved titration model reducing over estimation of total volatile fatty acids in anaerobic digestion of energy crop, animal slurry and food waste, *Water Res.* **61**, 162-170, 2014.

119. F. FitzGibbon; D. Singh; G. McMullan; R. Marchant, The effect of phenolic acids and molasses spent wash concentration on distillery wastewater remediation by fungi, *Process Biochem.* 33, 799-803, 1998.
120. W. Parawira; J. S. Read; B. Mattiasson; L. Björnsson, Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion, *Biomass Bioenerg.* 32, 44-50, 2008.
121. M. Molina; L. Giannuzzi, Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*, *Food Res Int.* 32, 677-682, 1999.
122. A. B. Lourenco; J. R. Ascenso; I. Sá-Correia, Metabolic insights into the yeast response to propionic acid based on high resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, *Metabolomics.* 7, 457-468, 2011.
123. M. Krzywonos; P. Seruga, Decolorization of sugar beet molasses vinasse, a high-strength distillery wastewater by lactic acid bacteria, *Pol J Environ Stud.* 21, 943-948, 2012.
124. S. Yadav; R. Chandra, Biodegradation of organic compounds of molasses melanoidin (MM) from biomethanated distillery spent wash (BMDS) during the decolourisation by a potential bacterial consortium, *Biodegradation.* 23, 609-620, 2012.
125. C. C. C. R. d. Carvalho, Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions, *Res Microbiol.* 163, 125-136, 2012.
126. S. Veraldi; A. Chiaratti; H. Harak, Onychomycosis caused by *Aspergillus versicolor*, *Mycoses.* 53, 363-365, 2009.
127. S. Qaisar; R. R. Zohra; A. Aman; S. A. U. Qader, Enhanced production of cellulose degrading CMCase by newly isolated strain of *Aspergillus versicolor*, *Carbohydr Polym.* 104, 199-203, 2014.
128. M. Krupinski; R. Szewczyk; J. Długonski, Detoxification and elimination of xenoestrogen nonylphenol by the filamentous fungus *Aspergillus versicolor*, *Int Biodeter Biodegr.* 82, 59-66, 2013.
129. I. García-García; J. L. Bonilla-Venceslada; P. R. Jiménez-Peña; E. Ramos-Gómez, Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*, *Water Res.* 31, 2005-2011, 1997.

130. H. Yemendzhiev; M. Gerginova; A. Krastanov; I. Stoilova; Z. Alexieva, Growth of *Trametes versicolor* on phenol, *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35, 1309-1312, 2008.
131. Y. Watanabe; R. Sugi; Y. Tanaka; S. Hayashida, Enzymatic decolorization of melanoidin by *Coriolus* sp. No. 20, *Agric Biol Chem.* 46, 1623-1630, 1983.
132. M. P. Miranda; G. G. Benito; N. S. Cristobal; C. H. Nieto, Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*, *Bioresource Technol.* 57, 229-235, 1996.
133. T. González; M. C. Terrón; S. Yagüe; H. Junca; J. M. Carbajo; E. J. Zapico; R. Silva; A. Arana-Cuenca; A. Téllez; A. E. González, Melanoidin-containing wastewaters induce selective laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes* sp. I-62, *Res Microbiol.* 159, 103-109, 2008.
134. W. Sun; M. Xu; C. Xia; A. Li; G. Sun, Enhanced production of laccase by *Coriolus hirsutus* using molasses distillery wastewater, *Front Environ Sci Eng.* 7, 200-210, 2013.
135. J. Shayegan; M. Pazouki; A. Afshari, Continuous decolorization of anaerobically digested distillery wastewater, *Process Biochem.* 40, 1323-1329, 2005.
136. P. J. Strong, Fungal remediation of Amarula distillery wastewater, *World J Microb Biot.* 26, 133-144, 2010.
137. J. A. Majeau; S. K. Brar; R. D. Tyagi, Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants, *Bioresource Technology.* 101, 2331-2350, 2010.
138. G. Kaushik; I. S. Thakur, Adsorption of colored pollutants from distillery spent wash by native and treated fungus: *Neurospora intermedia*, *Environ Sci Pollut Res.* 20, 1070-1078, 2013.
139. S. Ohmomo; N. Itoh; Y. Watanabe; Y. Kaneko; Y. Tozawa; K. Ueda, Continuous decolorization of molasses waste water with mycelia of *Coriolus versicolor* Ps4a, *Agric Biol Chem.* 49, 2551-2555, 1985.
140. P. J. Strong; H. Claus, Laccase: A review of its past and its future in bioremediation, *Crit Rev Env Sci Tec.* 41, 373-434, 2011.
141. S. Apollo; M. Onyango; A. Ochieng, An integrated anaerobic digestion and UV photocatalytic treatment of distillery wastewater, *J Hazard Mater.* 261, 435-442, 2013.
142. P. J. Strong, Fungal remediation and subsequent methanogenic digestion of sixteen winery wastewaters, *S Afr J Enol Vitic.* 29, 85-93, 2008.

143. F. J. Cervantes; S. v. d. Velde; G. Lettinga; J. A. Field, Quinones as terminal electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of phenolic compounds, *Biodegradation*. 11, 313-321, 2000.
144. N. S. Kumar; V. M. Boddu; A. Krishnaiah, Biosorption of phenolic compounds by *Trametes versicolor polyporus* fungus, *Adsorpt Sci Technol*. 27, 31-46, 2009.
145. Y. Chen; J. J. Cheng; K. S. Creamer, Inhibition of anaerobic digestion process: A review, *Bioresource Technol*. 99, 4044-4064, 2008.
146. R. Chandra; V. K. Vijay; P. M. V. Subbarao; T. K. Khura, Performance evaluation of a constant speed IC engine on CNG, methane enriched biogas and biogas, *Appl Energ*. 88, 3969-3977, 2011.
147. F. Mohseni; M. Magnusson; M. Görling; P. Alvfors, Biogas from renewable electricity- Increasing a climate neutral fuel supply, *Appl Energ*. 90, 11-16, 2012.