

EVALUACIÓN DEL USO POTENCIAL DE LAS VINAZAS DE MELAZA COMO AGUAS DE
REÚSO EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Jairo Alejandro Hurtado Álvarez

Trabajo de investigación para optar al título de
Magister en Ciencias Ambientales

Asesor

Profesor Carlos A. Peláez J.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

CORPORACIÓN ACADÉMICA AMBIENTAL

GRUPO INTERDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS MOLECULARES

RECUPERACIÓN ENERGÉTICA Y MATERIAL DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

MEDELLÍN

2015

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABLAS	6
1. RESUMEN.....	8
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 Introducción.....	9
2.2 Fermentación alcohólica.....	10
Tabla 1. Caracterización de los residuales de la producción de alcohol.....	11
Figura 1. Esquema de producción de etanol a partir de caña de azúcar.	11
2.3 Vinazas	12
Figura 2. Proceso de obtención de las melazas	13
Tabla 2. Composición química de las vinazas provenientes de diferentes fuentes de alimento, todos los valores, excepto pH están expresados como mg L ⁻¹	14
2.4 Técnicas de disposición de vinazas	15
Figura 3. Diagrama de flujo de las principales alternativas el uso/descarga de las vinazas de caña de azúcar	16
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general	19
Evaluar el uso potencial de las vinazas como aguas de reúso en procesos de fermentación alcohólica.	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. METODOLOGÍA	20
4.1 Medio de fermentación (mosto a 19-20 °Brix).	20
4.2 Condiciones de Fermentación	20
4.3 Obtención de las vinazas	20

4.4	Metanización	20
4.5	Utilización del efluente de metanización como sustrato para la dilución de melazas.....	21
	Figura 4. Diagrama de flujo de las principales alternativas el uso/descarga de las vinazas de caña de azúcar.	21
4.6	Experimentos de diluciones en diferentes proporciones de efluente	21
4.7	Microorganismo	22
4.8	Ensayo de viabilidad y vitalidad-determinación del poder de acidificación.....	22
4.9	Rendimientos del proceso.	23
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1	Metanización	23
	Tabla 3. Parámetros físico-químicos del reactor híbrido de lecho de lodos con filtro anaerobio.....	24
	Figura 5. Comportamiento del metano con la relación AVG/ALK. Modelo de calibración: Metano en biogás = $1/(0.0126833 + 0.0127374 * \text{AVG Alcalinidad}^2)$	25
	Tabla 4. Parámetros físico-químicos del reactor híbrido de lecho de lodos con filtro anaerobio.....	26
	Figura 6. Comportamiento de los AVG/ALK con la carga orgánica (DQO). Modelo de calibración: $\text{AVG/ALK} = (4728.55/\text{DQO alimento})^2$	27
5.2	Fermentación	27
	Figura 7. Comparación de las fermentaciones entre los diferentes tratamientos.	28
5.3	Test de vitalidad y viabilidad	28
	Tabla 5. Porcentaje de supervivencia y poder de acidificación (PA) de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> luego de la fermentación.....	29
	Figura 8. Test de vitalidad. Poder de acidificación PA (Δ pH) de las células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenidas después de la fermentación en cada uno de los tratamientos	30
5.4	100% reúso de efluente	30
	Figura 9. Comparación de fermentaciones entre efluentes 100%. Efluente sin cambio de pH: E 100 %. Efluente con cambio de pH: E 100 % - pH.....	32

Tabla 6. Comparación de fermentaciones entre efluentes al 100% y diferentes fuentes de carbono..	33
Figura 10. Efecto amortiguador/buffer en diferentes medios de fermentación	34
5.5 Ahorro de agua	35
Tabla 7. Relación de ahorro de consumo de agua utilizando el efluente como agua de reúso en el proceso de fermentación.	37
6. Conclusiones	388
7. Bibliografía	39
8. Anexos.....	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 1. Caracterización fisicoquímica de la melaza diluida a 19 ° Brix	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 2. Caracterización fisicoquímica de la vinaza	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 3. Caracterización fisicoquímica del efluente metanización ...	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 4. Comparación de la fermentación entre los diferentes tratamientos	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 5. Esquema simplificado que muestra la competencia de glicerol-3-P deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa (ADH) por NADH ₂ durante la fermentación alcohólica de levadura.	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de producción de etanol a partir de caña de azúcar.	11
Figura 2. Proceso de obtención de las melazas	13
Figura 3. Diagrama de flujo de las principales alternativas el uso/descarga de las vinazas de caña de azúcar	16
Figura 4. Diagrama de flujo de las principales alternativas el uso/descarga de las vinazas de caña de azúcar.	21
Figura 5. Comportamiento del metano con la relación AVG/ALK. de calibración: Metano en biogás = $1/(0.0126833 + 0.0127374 * \text{AVG Alcalinidad}^2)$	Modelo 25
Figura 6. Comportamiento de los AVG/ALK con la carga orgánica (DQO). Modelo de calibración: $\text{AVG/ALK} = (4728.55/\text{DQO alimento})^2$	27
Figura 7. Comparación de las fermentaciones entre los diferentes tratamientos.	28
Figura 8. Test de vitalidad. Poder de acidificación PA (Δ pH) de las células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenidas después de la fermentación en cada uno de los tratamientos	30
Figura 9. Comparación de fermentaciones entre efluentes 100%. Efluente sin cambio de pH: E 100 %. Efluente con cambio de pH: E 100 % - pH.	32
Figura 10. Efecto amortiguador/buffer en diferentes medios de fermentación	34
Figura 11. Esquema de experimentación de operaciones utilizando efluente de digestión anaeróbica de las vinazas.	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de los residuales de la producción de alcohol.....	11
Tabla 2. Composición química de las vinazas provenientes de diferentes fuentes de alimento, todos los valores, excepto pH están expresados como mg L ⁻¹	14
Tabla 3. Parámetros físico-químicos del reactor híbrido de lecho de lodos con filtro anaerobio.....	24
Tabla 4. Parámetros físico-químicos del reactor híbrido de lecho de lodos con filtro anaerobio.....	26
Tabla 5. Porcentaje de supervivencia y poder de acidificación (PA) de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> luego de la fermentación.....	29
Tabla 6. Comparación de fermentaciones entre efluentes al 100% y diferentes fuentes de carbono. Efluente: E 100 % fuente de carbono melazas. Efluente con cambio de pH + melaza: E 100 % - pH +melaza. Efluente: E 100 %-Sac: efluente sin cambio de pH + sacarosa. E 100 %-Sac-pH: efluente con cambio de pH + sacarosa.	33
Tabla 7. Relación de ahorro de consumo de agua utilizando el efluente como agua de reúso en el proceso de fermentación.....	377

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1. Caracterización fisicoquímica de la melaza diluida a 19 ° Brix; **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 2. Caracterización fisicoquímica de la vinaza **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 3. Caracterización fisicoquímica del efluente metanización **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo 4. Comparación de la fermentación entre los diferentes tratamientos; **Error! Marcador no definido.**
- Anexo 5. Esquema simplificado que muestra la competencia de glicerol-3-P deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa (ADH) por NADH₂ durante la fermentación alcohólica de levadura. **¡Error! Marcador no definido.**

1. RESUMEN

Las actuales perspectivas a nivel mundial de incrementar la producción de alcohol a partir de jugos y melazas para su empleo como combustible automotor que es considerado como un tipo de energía verde, tiene como punto en contra el gran volumen de efluentes que generan problemas ambientales cuando la disposición es inadecuada, además de la alta demanda de consumo de agua. La idea fundamental de una biorrefinería es el aprovechamiento integral de la biomasa en la generación de producto de valor comercial. En esta vía, poder minimizar la carga contaminante generada en procesos industriales es uno de los pilares fundamentales en los que viene construyéndose desde hace varios años el concepto de producción limpia, buscando alternativas que no solo beneficien al medio ambiente, sino que además traigan con síglo beneficios económicos a las empresas. En esta investigación se desarrolló un sistema integrado de uso de vinazas para producción de energía en forma de metano, y el re-uso del efluente de metanización en un 100% fue utilizado en lugar de agua en la preparación del medio de fermentación. El sistema de metanización de vinazas en el biodigestor (del reactor híbrido de lecho de lodos con filtro anaerobio) obtuvo una cantidad máxima de metano en el biogás del 83%. Por otro lado, el efluente como agua de reúso representó un ahorro de agua de aproximadamente un 12,5%, esto significa un ahorro de 125000 L/día para una planta que produce aprox. 100000 L de alcohol/día. Este es un proceso de importancia económica para aplicaciones industriales, con la ventaja añadida de la eliminación no contaminante de los residuos potencialmente contaminantes y el ahorro de agua, temas de creciente importancia en el mundo hoy en día.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

Las actuales perspectivas a nivel mundial de incrementar la producción de alcohol a partir de jugos y melazas para su empleo como combustible automotor que es considerado como un tipo de energía verde tiene como punto en contra el gran volumen de efluentes que generan problemas ambientales cuando su disposición es inadecuada (Pereira and Pereira 2008).

En los últimos años ha tomado fuerza el concepto de Biorrefinería, las cuales son consideradas como instalaciones industriales que pretenden la utilización integral de la biomasa, de forma sostenible, para la producción simultánea de biocombustibles, energía, materiales y productos químicos, preferentemente de valor añadido (SIADEB 2013). La idea fundamental de una biorrefinería es el aprovechamiento integral de la biomasa en la generación de producto de valor comercial.

La viabilidad de las tecnologías que solucionan problemas ambientales está directamente relacionada con su rentabilidad. En el caso de los efluentes de agroindustrias, las estrategias de tratamiento deben apuntar a la optimización de los procesos fabriles, empleando modos de agotamiento. Cuando razones técnico-económicas lo permitan, deben explorarse las posibilidades de aprovechamiento de las descargas. Para el caso de la industria de destilería se debe tener en cuenta que la composición química de sus residuos varía considerablemente y está determinada por la materia prima utilizada, el método y sistemas de fermentación alcohólica y la levadura utilizada (Perera 2009).

Colombia en la actualidad es el tercer mayor productor de bioetanol de América, luego de Estados Unidos y Brasil. En los últimos años, la producción de etanol y biodiesel ha crecido en Colombia de manera proporcional al aumento del área de cultivos de caña de azúcar y palma de aceite. Este crecimiento se ha expandido a varios departamentos, lo cual ha generado una mayor demanda hídrica y por tanto una amenaza a la disponibilidad de este recurso en los próximos años. Debido a que estos departamentos tienden a tener poca disponibilidad de agua a causa de periodos de sequía prolongados, a la deforestación en las partes altas de las cuencas hidrográficas y a los efectos del cambio climático mundial, es necesario implementar estrategias que permitan mantener una oferta hídrica suficiente para suplir las necesidades de la población, la industria y el sector agrícola principalmente (Lasso & Ramírez, 2011).

Existen normas internacionales que regulan la calidad de las aguas residuales para su reúso en la agricultura, pero muchos países no tienen implementadas normas propias adaptadas a sus condiciones técnico-económicas y ambientales. Y peor aún, algunos las emplean sin ningún tipo de tratamiento (Lorenzo et al., 2009). En Colombia en el artículo 5 de la ley 373 de 1997 se establece el “Reúso Obligatorio del Agua” para las aguas utilizadas, sean éstas de origen superficial, subterráneo o lluvias, en cualquier actividad que genere afluentes líquidos, deberán ser reutilizadas en actividades primarias y secundarias cuando el proceso técnico y económico así lo ameriten y aconsejen según el análisis socioeconómico y las normas de calidad ambiental. Aunque la norma no es clara y aún no define los casos y los tipos de proyectos en los cuales se obligaría al reúso de las aguas residuales es importante entrever que muchas actividades económicas que generan aguas de reúso no tendrían de por medio una reglamentación para ser aplicadas ya que podrían estar enmarcadas dentro de conceptos de mejoramiento ambiental, social y por supuesto económico de procesos.

Colombia actualmente tiene una de las leyes más estrictas para vertimientos en Latinoamérica, (El Decreto 3930, artículo 63 del 2010, por el cual se busca la reutilización o reciclaje de subproductos o materias primas, relacionados con la generación de vertimientos dentro del Plan de Reconversión a Tecnologías Limpias en Gestión de Vertimientos (PRTLGV). Con esto se obliga a las industrias de cualquier sector a buscar estrategias de manejo del recurso.

2.2 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica, es un proceso anaeróbico realizado por levaduras y algunas clases de bacterias. Donde el sustrato celular; mono y di sacáridos en su mayoría, son transformados principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono; con la generación de equivalentes de reducción de los compuestos NADH/NAD^+ y NADHP/NADP^+ y enlaces de alta energía de fosfato, ATP (Nielsen 2003). La energía se sintetiza como ATP a partir de un proceso de glicólisis al que sigue el metabolismo del piruvato. De este modo la fermentación complementa la glucólisis y hace posible producir energía en ausencia de oxígeno (Nielsen, 2003).

Las fuentes con alto contenido de azúcares son materias primas que poseen un alto contenido de azúcares simples y fermentables, como la glucosa, la fructosa, la galactosa y la sacarosa. Las más importantes incluyen caña de azúcar, frutas, melazas, tubérculos y azúcar de remolacha. La ventaja de utilizar este

tipo de fuentes consiste en que no es necesario realizar tratamientos previos para obtener los azúcares fermentables, ya que estos se encuentran presentes.

Tabla 1. Caracterización de los residuales de la producción de alcohol

Indicador	Mieles	Jugo
pH	4.2-5.0	3.7-4.6
DBO (mg/l)	25 000	6 000-16 500
DQO (mg/l)	65 000	15 000-33 000
Sólidos totales (mg/l)	81 500	23 700
Sólidos volátiles (mg/l)	60 000	20 000
Nitrógeno (mg/l)	450-1610	150-700
Fósforo P ₂ O ₅ (mg/l)	180-290	10-210
Potasio (mg/l)	450-5100	130-1540
Relación C/N	16.0-16.3	19.7-21.1
Materia orgánica (mg/l)	63 400	19 500
Azúcares reductores (mg/l)	9500	7 900

La denominación melaza se aplica al efluente final obtenido en la preparación del azúcar mediante una cristalización repetida. El proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido tres veces hasta el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permiten una cristalización adicional de la sacarosa (Swan y Karalazos, 1990) (Figura. 1)

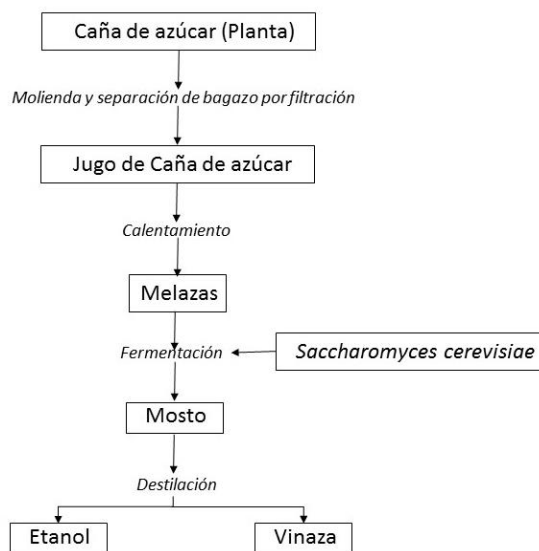


Figura 1. Esquema de producción de etanol a partir de caña de azúcar. Figura modificada de (Christofolletti et al., 2013)

2.3 Vinazas

Las vinazas son el residuo principal generado durante el proceso de destilación del etanol. La producción de bioetanol genera de 1-14 L de residuos por litro de producto dependiendo de lo tecnificado del proceso. Este efluente de destilería está caracterizado por su alto contenido de materia orgánica, color oscuro, naturaleza ácida (bajos pH), y una alta concentración de sólidos. Las vinazas están compuestas por un 93% de agua, 2% de compuestos inorgánicos (potasio, calcio, sulfatos, cloruros, nitrógeno, fósforo, etc.). La vinaza es producida en diferentes concentraciones que varía entre un 10% y 75% de sólidos aproximadamente (Galvão et al., 2013).

El tratamiento de estos residuos es uno de los temas más importantes y difíciles en la producción industrial del etanol (Navarro, Del C. Sepúlveda, and Rubio 2000). Las características de las aguas residuales de la destilería varían considerablemente en función de la materia prima de la fermentación y la ubicación (G.J. Sheehan 1980).

La fabricación de etanol a partir de caña de azúcar se puede realizar con una de las siguientes materias primas:

- Miel pobre (tipo c) o melazas, el ingenio mantiene la misma producción de azúcar y utiliza una destilería anexa para procesar las melazas agotadas que resultan del proceso de producción de azúcar para fabricar etanol (Figura 2). La composición de la melaza es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de la caña de azúcar, suelo, clima, periodo de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica. La melaza de caña de azúcar se caracteriza por tener grados Brix o sólidos disueltos de 68-75% y un pH de 5.0-6.1 (Fajardo y Sarmiento 2007)
- Miel rica (tipo b), cuando existe interés en producir más etanol, no se agotan por completo las mieles, produciendo menos azúcar y dedicando una mayor parte para el etanol.
- Jugo de caña directo, en este caso se desvía el jugo de caña hasta el punto en que ya no se produce azúcar, lo que aumenta considerablemente la producción de etanol.

De estos procesos de obtención de etanol se generan vinazas con unas características distintas según el origen, por lo que las vinazas no son iguales: cuando la materia prima de la destilería es jugo de caña, la vinaza es relativamente diluida y muy biodegradable. Pero cuando la materia prima de la destilería es melaza de caña (miel final) la vinaza es muy concentrada y menos biodegradable, debido a que tiene una alta carga máxima DQO (Demanda Química de Oxígeno) de 85.170 mg/L en los mejores casos

(Fitzgibbon, F. J., Nigam, P., Singh, D., & Marchant 1995); además contiene inhibidores como compuestos fenólicos, los cuales provienen de la parte fibrosa de la caña, se derivan de los metabolitos de los fenilpropanos. En la fermentación, estos fenoles pueden tener actividad inhibitoria (Demeke et al. 2013).

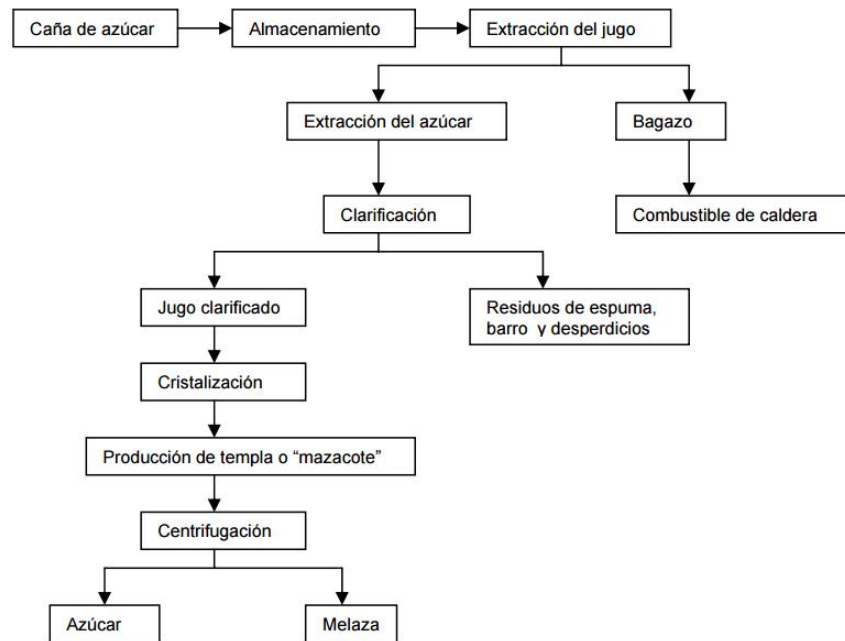


Figura 2. Proceso de obtención de las melazas (Fajardo y Sarmiento, 2007)

La vinaza proveniente de miel B es un caso intermedio. En el proceso de producción de etanol a partir de caña de azúcar las vinazas es el mayor residuo líquido, además de encontrarse como uno de los residuales orgánicos de mayor efecto contaminante del planeta. La descarga de vinaza en cuerpos de agua libera un olor desagradable y contribuye a difundir enfermedades endémicas tales como malaria, amebiasis, y esquistosomiasis; la descarga de vinazas a suelos tiene efectos negativos, causando una saturación de sales que al ser lixiviadas llevan iones a aguas subterráneas. En otras investigaciones se conoce que las vinazas producen toxicidad a organismos acuáticos (Tejada, et al., 2006; Laime, et al., 2011; Christofolletti et al., 2013; Alves, et al., 2015). Las vinazas tienen un alto potencial de contaminación, aproximadamente cien veces más que las aguas residuales de los hogares, debido al alto contenido de materia orgánica, causando un agotamiento de oxígeno, alta corrosividad, y altos niveles de demanda bioquímica de oxígeno (DBO). La problemática principal radica en que, por cada litro de

alcohol producido a partir de miel final, se obtienen de manera adicional 1 a 14 litros de vinaza como producto residual, con una Demanda Química de Oxígeno (DQO₅) entre 60 y 70 g/l y un pH alrededor de 4. Una destilería con una producción de 1000 toneladas de etanol por día produce más de 1000 toneladas de DQO por día, lo que es equivalente a la descarga de contaminantes de una población de 10 millones de habitantes (Perera, 2009; Christofolletti et al., 2013; Páez, et al., 2016).

Por esto se considera un residuo líquido muy agresivo que provoca serios problemas ambientales sobre los recursos hídricos y suelos donde se descarga. Para su tratamiento se han ensayado métodos fisicoquímicos, químicos y biológicos siendo estos últimos los más apropiados por la gran cantidad de compuestos orgánicos biodegradables que presentan en su composición. Dentro de estas posibilidades tecnológicas para la eliminación o reciclaje de las vinazas están la fermentación; combustión; vertido de vinaza cruda al suelo; incineración, producción de levadura, fertirrigación. Otra estrategia de tratamiento y disposición final de vinazas es el de biometanización o metanogénesis (Baez-smith, 2006; De Oliveira, 2011; Gamboa et al., 2012).

La importancia de este proyecto es el estudio de un proceso alternativo con el cual se logre pasar de un escenario actual donde se consume energía, para llevar la vinaza para un escenario prospectivo donde se aproveche para producir energía. Con esto se busca contribuir a la productividad de la agroindustria de la caña de azúcar y a la reducción de sus impactos ambientales.

Tabla 2. Composición química de las vinazas provenientes de diferentes fuentes de alimento, todos los valores, excepto pH están expresados como mg L⁻¹ (Christofolletti et al, 2013).

Parameters	Vinasse			
	Sugarcane	Grape (wine)	Beet	Sweet Sorghum
pH	3.9	2.9	5.1	4.5
BOD	5046	18900	78300	46
DQO	13380	na	na	na
Potassium	2056	118–800	10.000–10.030	na
Socium	50.2	na	3.79	na
Sulfate	710	120	0.62	na
Calcium	719	na	0.71	na
Magnesium	237	na	1.23	na
Total	190	83	91	1990
Phosphorus				
Hardness	2493	na	na	na
As	na	na	na	na
Ba	0.41	na	na	na
Cd	na	0.05–0.08	<1*	na
Cr	0.04	na	na	na
Cu	0.35	0.2–3.26	2.1–5*	37
Hg	0.0019	na	na	na
Mo	0.008	na	na	na
Ni	0.03	na	na	na
Pb	na	0.55–1.34	<5*	na
Se	na	na	na	na
Zn	1.66	na	na	na

Evaluando las ventajas y desventajas de los usos actuales de la vinaza en la región, y conociendo que la composición química (tabla 2) de este efluente puede limitar su aplicación como fertilizante en el largo plazo, se estudian tecnologías alternativas como la integración de procesos fisicoquímicos y anaerobios generadores de biocombustibles, encontrando que esta puede ser una opción energética y ambientalmente viable para el aprovechamiento de vinazas (<http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/buscan-aprovechamiento-de-las-vinazas-de-cana-de-azucar.html>).

En Colombia se producen cerca de un millón de litros de bioetanol por día y eso arroja aproximadamente 10 millones de litros de vinaza diluida compuesta en un 90 % por agua y un 10 % por materia orgánica y sales minerales (Hernández Saavedra, 2009). En el proceso de fermentación varias industrias reúsan las vinazas como sustrato para la fermentación alcohólica con la levadura con *Saccharomyces cerevisiae*, en la región del Valle del Cauca en Colombia, se ubican algunas plantas productoras de etanol a partir de caña de azúcar, se tiene como alternativa para disminuir los impactos ambientales de la vinaza, retornar al proceso cerca del 70 % de la vinaza diluida y el resto se concentra por medio de evaporación alcanzando una concentración en sólidos de hasta el 35% para luego utilizarla en la producción de abono orgánico a través del compostaje con cachaza (Navarro et al., 2000; Hernández Saavedra, 2009) o mediante la digestión anaerobia para producir gas metano (Conil, 2006; Moraes et al. 2014).

Es sobre la base de estos estudios, y en conjunto con la nueva tendencia de tecnologías limpias y las necesidades energéticas crecientes y cuidados del agua, que este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal evaluar el uso potencial del efluente proveniente de procesos de metanización de vinazas en procesos de fermentación alcohólica como agua de reúso para la dilución de melazas de caña de azúcar. Esto permite plantear mecanismos y estrategias que podrían ser utilizadas para la recuperación de las vinazas de una manera más amigable en términos sociales, ambientales y económicos

2.4 Técnicas de disposición de vinazas

El potencial de energía a partir de la vinaza de una sola biorrefinería de caña de azúcar es comparable a la demanda de suministro de electricidad de una ciudad de aproximadamente 130.000 habitantes. Un combustible alternativo, es el biogás, el cual podría reemplazar hasta un 40% de la oferta anual de diesel en las operaciones agrícolas de una biorrefinería de caña de azúcar y continuar proporcionando aproximadamente 14 MW h anualmente de energía de cogeneración. Por otro lado, una investigación demostró un ahorro significativo en términos de emisiones de gases de efecto invernadero que podrían beneficiarse financieramente a biorrefinerías debido a la comercialización de créditos de carbono. Tales

ingresos sería más que suficiente para cubrir los costos de operación de una planta de digestión anaerobia (Bruna S Moraes et al. 2014).

Desde los inicios de la industria de destilería la disposición de las vinazas ha sido un reto, por esto se han venido estudiando diferentes alternativas a esta problemática. La industria azucarera por mucho tiempo fue la encargada de buscar alternativas en países como India, Brasil, Estados Unidos, entre otros. Uno de las principales alternativas de uso/descarga de las vinazas de caña de azúcar está representado en el esquema siguiente (ver fig. 3).

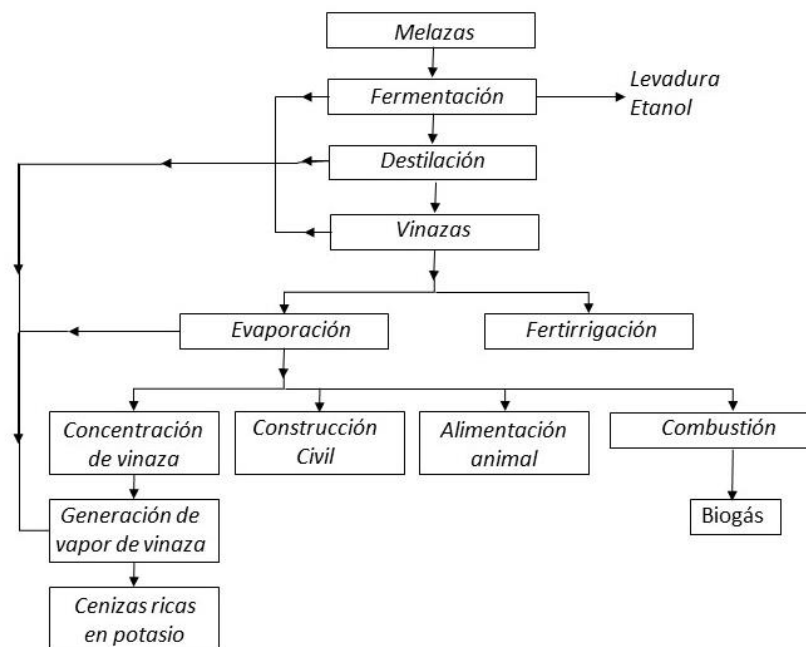


Figura 3. Diagrama de flujo de las principales alternativas el uso/descarga de las vinazas de caña de azúcar (Christofolletti et al., 2013)

Algunos de los métodos existentes para la disposición de las vinazas son la aplicación directa al suelo y la producción de metano. En Brasil existe la aplicación directa de la vinaza cruda sobre la caña, aunque con riesgos ambientales. Debido a que la vinaza cruda puede cambiar el pH haciéndolo más ácido, destruir cosechas debido a que puede ser fitotóxicos e inhibe la germinación. Otras opciones que se han probado son la concentración-incineración como fuente de energía (Navarro, Del C. Sepúlveda, and Rubio 2000). Otros métodos usuales de disposición de las vinazas de la caña de azúcar: obtención de biopolímeros (PHA) (Kalia et al., 2003); disposición en lagunas y ríos (tiene implicaciones ambientales); producción de proteína unicelular mediante *Phanerochaete chrysosporium*; producción de biodiesel con

microalgas y vinazas (De Oliveira 2011); uso para el control de áfidos en el algodón en la India; aditivo en nutrición animal; compostaje con la cachaza y residuos de caña de azúcar (Larrahondo Aguilar 2009).

Algunas destilerías buscan comercializar la vinaza concentrada como fertilizante o la recirculación de las vinazas en las cubas de fermentación para reducir la cantidad vertida, (ver figura 3, Christofolletti et al., 2013). Otras opciones de tratamiento son los lodos activados, lagunas anaerobias, filtros percoladores, contactores biológicos, oxidación avanzada, tratamiento en rellenos sanitarios (Sheehan, 1980; Christofolletti et al., 2013). En Colombia la gran mayoría de estos métodos han sido aplicados. En el caso de reúso de las vinazas como medio de fermentación se tiene poca información de su implementación.

La digestión anaeróbica es un proceso alternativo de gran interés para el uso de las vinazas. Esta biodigestión es una tecnología en la que se produce metano (biogás, figura 2), éste tiene un gran poder calorífico. Pero es sabido que aún se requieren mejoras en su eficiencia. Los tratamientos de este tipo muestran una disminución de la DBO de las vinazas significativo, reduciendo el poder contaminante de la vinaza. En este proceso varios grupos de microorganismos trabajan en cooperación, estos microorganismos están presentes en la naturaleza en ambientes anaeróbicos, como los fondos de estanques, pantanos, rumen de herbívoros, heces de los animales y los seres humanos. Después del proceso de metanización las vinazas elevan su pH sin la adición de compuestos alcalinos (De Oliveira 2011).

La industria de la caña de azúcar es uno de los sectores con las mayores demandas de agua y, además, las vinazas son una fuente importante de contaminación orgánica, combinada con el hecho de que Colombia en la actualidad es el tercer mayor productor de bioetanol de América hace que sea aún más importante.

El reúso y la recirculación del agua se convierten en herramientas que apuntan al uso eficiente del recurso hídrico. En la industria de los biocombustibles existe un elevado consumo de agua, además se espera que en los próximos años aumente (Keeney, 2006; Chavez-rodriguez et al., 2013). En este caso específico la reutilización de vinaza en la etapa de fermentación en la producción de etanol posterior a su aprovechamiento energético (después de la metanización) es una técnica que podría ser utilizada para la reducción del consumo de agua y nutrientes en el proceso de fermentación. En el caso de recirculación de vinazas en el proceso de fermentación sin ser metanizadas, existe un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la levadura por subproductos que permanecen en las vinazas. Cuando se incrementa el

número de reúsos, disminuye el número de posible de recirculaciones (Navarro et al., 2000; Castro & Caicedo, 2015). Los sólidos solubles presentes en la vinaza, principalmente las vinazas a partir de melaza, son hidratos de carbono y sales no fermentables, así como compuestos inhibidores de crecimiento de levadura (Maiorella, et al., 1983). Sin embargo, este problema puede ser disminuido si se remueven estos productos, principalmente ácidos orgánicos volátiles, esto permite aumentar el número de recirculaciones sin afectar el proceso de producción de etanol (Castro and Caicedo 2015). En la industria se han hecho esfuerzos aislados en este campo, pero no han sido sometidos a divulgación científica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el uso potencial de las vinazas como aguas de reúso en procesos de fermentación alcohólica.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar los parámetros fisicoquímicos de las vinazas crudas y de los efluentes del proceso de fermentación anaerobia.
- Evaluar la capacidad de producción de metano de las vinazas en procesos de fermentación anaerobia.
- Evaluar diferentes proporciones del efluente de metanización como sustrato de dilución de melazas para el proceso de fermentación alcohólica.
- Determinar la eficiencia de los procesos fermentativos en la producción de etanol.

4. METODOLOGÍA

4.1 Medio de fermentación (mosto a 19-20 °Brix).

La preparación de los medios de fermentación (mosto) a 19-20 °Brix se realiza diluyendo 8 kg de melaza comercial con un contenido de sólidos de 75 °Brix en 30 litros del solvente escogido (agua corriente, efluente de metanización). Para el proceso de pasteurización se llevó a 85 °C por 10 min. Utilizando una resistencia a 220 V.

4.2 Condiciones de Fermentación

Todas las fermentaciones fueron llevadas a cabo en un reactor de 40 L en acero inoxidable a 33-35 °C, en condiciones estériles por 24 horas en ausencia de aire. Para la determinación de los sólidos disueltos se utilizó un refractómetro marca Brixco modelo 3030. La conductividad fue determinada con un conductímetro Ohaus modelo Starter 3100. Previa centrifugación a 6000 rpm por 15 min. Las concentraciones de azúcares totales solubles se realizaron por método espectrofotométrico con antrona. El contenido de etanol fue determinado usando un cromatógrafo de gases marca agilent modelo 6890 N.

4.3 Obtención de las vinazas

Para la obtención de las vinazas, se realizaron fermentaciones a partir de la mezcla melaza y agua, se realizó un análisis fico-químico de la mezcla (Anexo 1). La fermentación culminó a las 24 horas. Una vez finalizada, se procedió a destilar el fermento a una temperatura de 78 ± 3 °C, en un destilador convencional a presión atmosférica. Luego de la obtención de vinazas, se realizó un análisis fico-químico al vino, tal como indica el anexo 2.

Las vinazas fueron llevadas a procesos de metanización con el objetivo de reducir la carga orgánica expresada como Demanda Química de Oxígeno (DQO), para la producción de biogás.

4.4 Metanización

Se utilizó un reactor híbrido de lecho de lodos con filtro anaerobio de 35 L para el proceso de metanización de las vinazas. El bioreactor fue alimentado con vinaza diluida con un caudal de 0,21 L/h empezando con 7428 mg/L de DQO, aumentado gradualmente hasta 16.300 mg/L. Con un tiempo de retención hidráulica de 6,9 días. La concentración de metano se determinó con el detector multi gas

marca: RKI; referencia: GX 2012. El efluente luego de la metanización fue recuperado para los procesos de fermentación, para ser usada como agua de reúso. A éste se le hizo un análisis fisicoquímico (Anexo 3).

4.5 Utilización del efluente de metanización como sustrato para la dilución de melazas

En el proceso de fermentación alcohólica se utilizó el efluente de la metanización de las vinazas como agua de reúso para realizar las diluciones Figura 4.

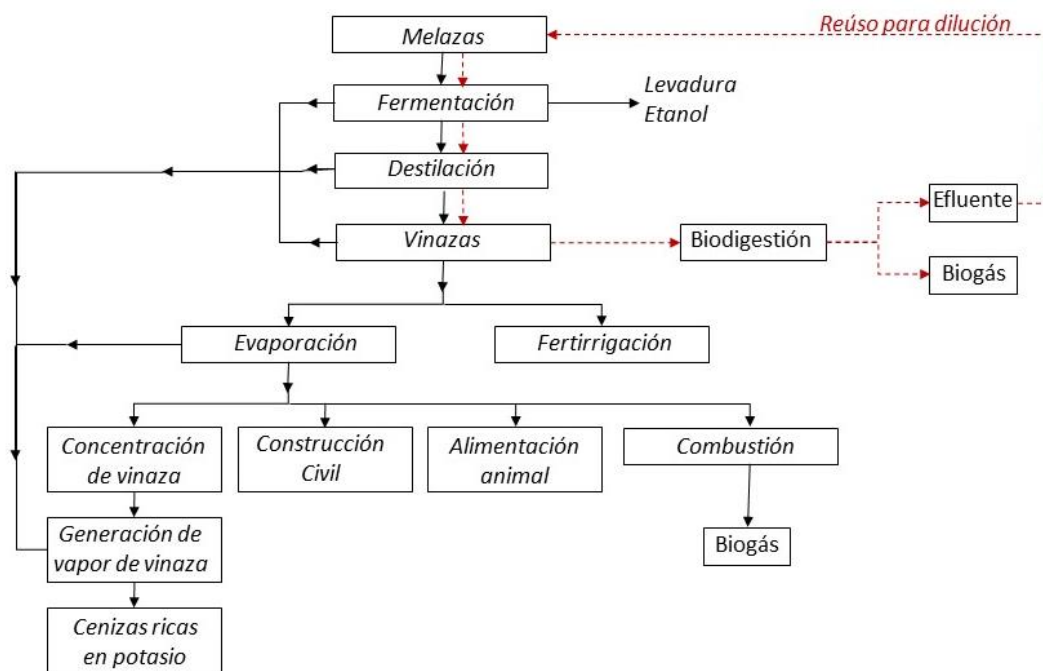


Figura 4. Diagrama de flujo de las principales alternativas el uso/descarga de las vinazas de caña de azúcar, modificado de Christofolletti et al. (2013). Las líneas punteadas rojas indican la alternativa de uso del efluente proveniente de la biodigestión de vinazas como agua de reúso para la dilución de melazas para producción de etanol.

4.6 Experimentos de diluciones en diferentes proporciones de efluente

Experimento I: 100% reúso de efluente obtenido después de la metanización de vinazas

Las condiciones de fermentación fueron llevadas a cabo como se describe anteriormente (4.1). Las vinazas obtenidas de la primera fermentación, luego de pasar por el proceso de metanización fueron

utilizadas como medio para la dilución, diluyendo 8 kg de melaza comercial con un contenido de sólidos de 75 °Brix en 30 litros de efluente. Una vez finalizada la fermentación se determinaron algunos parámetros fisicoquímicos y se evaluó el efecto de la fermentación en las levaduras por medio del ensayo de viabilidad y vitalidad-determinación del poder de acidificación.

Experimento II: 60% reúso de efluente después de la metanización de vinazas

Se realizó el mismo proceso del experimento I. Se utilizó para la dilución de melazas 40% de agua potable y 60% del efluente proveniente de la metanización de vinazas.

Experimento III: 30% reúso de efluente después de la metanización de vinazas

Se realizó el mismo proceso del experimento I. Se utilizó para la dilución de melazas 70% de agua potable y 30% del efluente proveniente de la metanización de vinazas.

Experimento IV: 100% reúso de efluente después de la metanización de vinazas + sacarosa

Se realizó el mismo proceso del experimento bajo las mismas condiciones de fermentación como se describe anteriormente en el apartado (4.1). Se utilizó como fuente de carbono sacarosa y para la dilución de sacarosa efluente al 100% proveniente de la metanización de vinazas hasta lograr una solución de 20 °Brix.

Experimento V: Capacidad amortiguadora del sistema Melaza/Efluente – Melaza/Agua

Se determinó la capacidad amortiguadora del sistema Melaza/Efluente – Melaza/Agua bajando el pH con ácido clorhídrico al 0,1029 M, midiendo en 20 min cuanto volumen requería hasta volverse constante el pH. Para esto se utilizaron sistemas diferentes con el fin de observar la posible capacidad buffer de cada sustancia.

4.7 Microorganismo

Saccharomyces cerevisiae fue obtenido de la casa comercial Instant Success como levadura seca instantánea y mantenida en nevera a 4 °C. Para la inoculación en el reactor la levadura fue activada por 5 min a 35 – 38 °C en una solución de melaza diluida a 20 °Brix a razón de 8 g/L de mosto a inocular, como complemento nutricional para la levadura se adiciono 2,0 g/L de Diamonio Fosfato.

4.8 Ensayo de viabilidad y vitalidad-determinación del poder de acidificación

El ensayo de vitalidad fue una adaptación de Kara et al., (1988). Se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min alícuotas de 50 ml de las muestras suspendidas en el medio a estudiar (después de la fermentación)

previamente homogenizadas. Posteriormente, se realizaron 4 lavados por suspensión y centrifugación con 15 ml de agua destilada a 4 °C para remover material enlazado a la superficie de la levadura que puede influir en el ensayo. Los precipitados de la levadura obtenidos se suspendieron en 10 ml de agua destilada fría. Después se sumergieron en 90 ml de agua destilada a 25 °C en continua agitación magnética registrándose el pH cada minuto durante 10 min. A ese tiempo se agregaron 5 ml de glucosa (20,2% p/v) y se continuó el registro durante 10 min más con el fin de obtener el valor de GAP. Las mediciones de pH se realizaron con un equipo pHmetro Ohaus modelo Starter 3100 C Para estimar la viabilidad celular se utilizó el método de tinción con azul de metileno, el protocolo se llevó a cabo de acuerdo a (Jenkins, et ., 2011)

4.9 Rendimientos del proceso.

Los rendimientos en la producción de alcohol etílico serán evaluados bajo la Norma Técnica Colombiana NTC 5113 usando un Cromatógrafo de Gases Agilent modelo 6890 N.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Metanización

Las melazas tienen un pH entre 5,5-6,5; un pH bajo es atribuible a la presencia de ácidos alifáticos y al bajo pH de la clarificación. Las vinazas son aún más ácidas debido al proceso de fermentación, en esta investigación los valores de las vinazas fluctuaron en un rango de 4,5-4,8. Para lograr la estabilización del sistema fue necesario ajustar el pH de las vinazas con bicarbonato de sodio en un intervalo 6.5-7.2 (Tabla 3) previa adición al reactor metanogénico, las condiciones óptimas para este proceso son de un pH entre 6.5 y 7.6, se deben prevenir los pH menores a 6.2, valor en que no trabajan las bacterias metanogénicas. La estabilización se realizó con Bicarbonato de Sodio debido a que la elevada alcalinidad bicarbonato disminuye el índice AGV/AKL del sistema y aumenta el porcentaje de eficiencia de remoción (Cajigas, et al., 2005).

En las primeras etapas del proceso se alcanzaron remociones del 42,5 % en la carga orgánica, una vez alcanzada una mejor estabilización del biodigestor se obtuvieron remociones de hasta el 65,8%. El ensayo se realizó con carga de entrada para el reactor que oscilaba entre los 7500-16267 de mg/L como DQO y con un caudal máximo de 0,21 L/hora, donde se obtuvo una generación de metano en biogás máxima del 83 %.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos del reactor híbrido de lecho de lodos con filtro anaerobio

DQO alimento (mg/L)	Ácidos Grasos Volátiles (AGV) /alcalinidad	Metano en biogás (%)	pH de entrada (alimento)	pH efluente	DQO efluente (mg/L)
7428	0,30	72	6,7	7,65	-
7428	0,36	75	6,9	7,75	-
7428	0,38	71	7,0	7,55	-
10000	0,33	67	6,4	8,30	-
10000	0,60	57	7,2	7,35	-
10694	0,16	67	7,1	8,34	3660
10694	0,21	80	7,0	8,30	-
16267	0,15	59	7,0	8,19	-
16267	0,15	83	7,1	8,50	7200

La relación Ácidos Grasos Volátiles (AGV) /alcalinidad (ALK) se mantuvo entre un rango de 0,16 a 0,38. Valores superiores a 0.3 en esta relación indican la ocurrencia de disturbios en el proceso de digestión anaerobia, la figura 5 muestra que al disminuir la relación ácidos grasos-alcalinidad aumenta la producción de metano en el biogás, una relación similar es descrita por el trabajo realizado por (Moraes et al. 2015 a). Por otro lado, dependiendo del agua residual, es posible que la estabilidad del proceso ocurra para valores de ácidos grasos/alcalinidades diferentes a 0.3, siendo prudente la verificación para cada caso en particular tal como indica Cajigas et al., (2005) en su investigación.

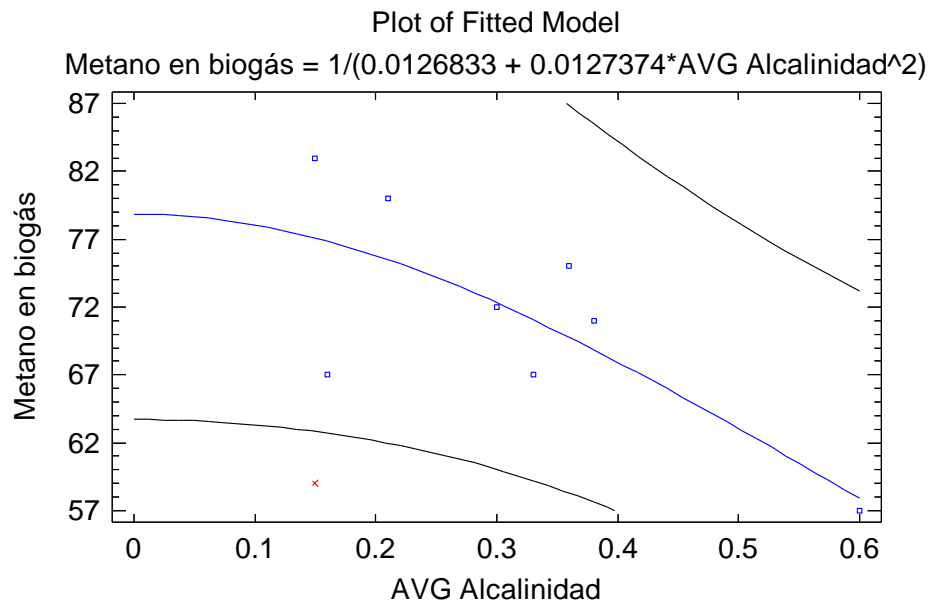


Figura 5. Comportamiento del metano con la relación AVG/ALK.

Modelo de calibración: Metano en biogás = $1/(0.0126833 + 0.0127374 \cdot \text{AVG Alcalinidad}^2)$

Por otro lado, se observa una relación importante entre la carga orgánica de entrada y la concentración de los ácidos orgánicos en el sistema de operación. A medida que la carga del alimento aumenta se observa una disminución en la relación AVG/ALK. Esto puede interpretarse desde la capacidad del reactor para aceptar cargas orgánicas mayores sin sufrir perturbaciones en el desarrollo de los procesos que allí se dan. Pero esto no puede interpretarse como un sistema que no presenta límites en la carga de entrada ya que un exceso significaría sistemas con efluentes con menos remoción de materia orgánica (fig. 6). La relación tendría un mayor significado en procesos de altas cargas orgánicas, pero a caudales bajos.

Al relacionar las dos ecuaciones de las figuras 5 y 6 se aprecia una dependencia de la producción de metano con la carga del alimento suministrado. Es importante anotar que esta relación solo es directa hasta valores de carga orgánica cercanos a los 4000 mg/L DQO (Tabla 4). De allí en adelante la producción de metano no sobrepasa el 79%. Este valor refleja el límite superior aproximado en la producción de metano en un sistema de este tipo. Las amplias variaciones en la producción de metano a partir de vinaza puede explicarse por las características complejas de este sustrato, que depende principalmente de la materia prima (por ejemplo, remolacha azucarera, caña de azúcar, sorgo dulce,

maíz), las prácticas agrícolas que influyen en la composición de la planta y el proceso industrial de etapas de fermentación y destilación (Moraes et al. 2015 a).

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos del reactor híbrido de lecho de lodos con filtro anaerobio

DQO alimento (mg/L)	Metano en biogás (%)
100	0,001
250	0,048
500	0,763
1.000	10,662
2.000	56,330
4.000	76,922
6.000	78,457
8.000	78,721
10.000	78,793
12.000	78,820
14.000	78,831
16.000	78,836
18.000	78,839
20.000	78,841
22.000	78,842

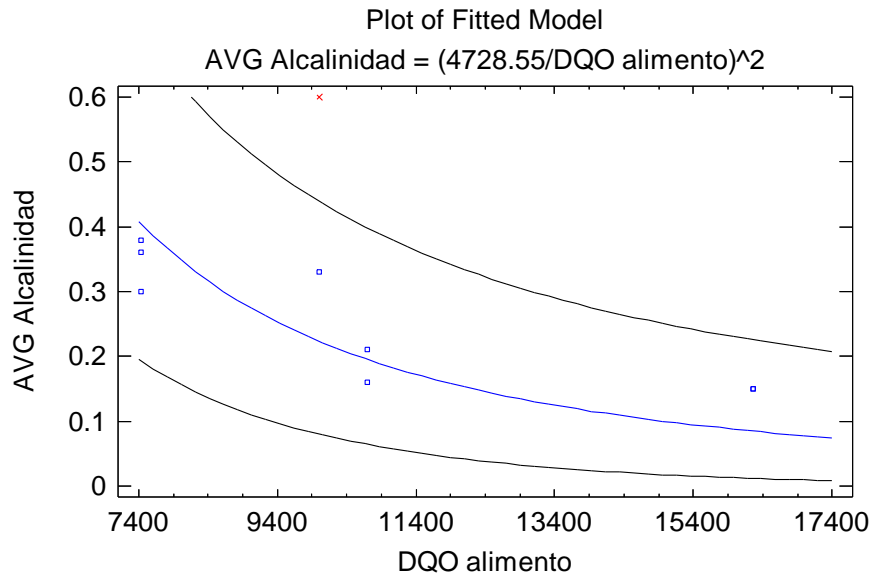


Figura 6. Comportamiento de los AVG/ALK con la carga orgánica (DQO).

Modelo de calibración: $AVG/ALK = (4728.55/DQO \text{ alimento})^2$

5.2 Fermentación

En los experimentos I, II y III (Tabla 4) se muestra la comparación entre las diferentes proporciones de efluente utilizado en la dilución de melazas para la fermentación (30, 60 y 100 %). El análisis El método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de comparación múltiple de Duncan, las variables tienen un nivel del 95,0% de confianza. No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los 3 tratamientos con efluente, mientras que existe una diferencia significativa entre los tratamientos 60 y 100 % respecto al control ($p < 0,05$) (Anexo 4).

Dado que no hubo uno daños en la viabilidad y vitalidad de las células de *Saccharomyces cerevisiae* entre los tratamientos (30 %, 60 % y 100 % del efluente), además de una diferencia significativa en la producción de etanol, las siguientes fermentaciones se realizaron con efluente al 100%, considerando que en este punto se reusa mayor volumen de efluente como agua de reúso en el proceso de fermentación de melazas de caña de azúcar.

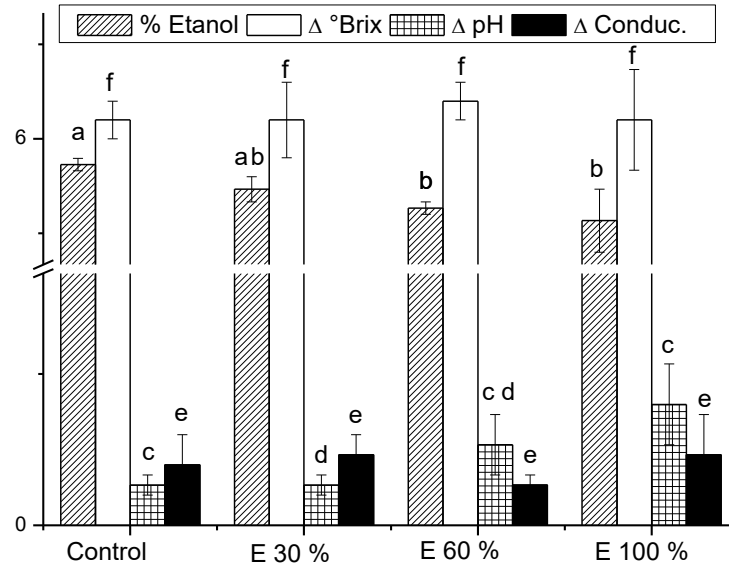


Figura 7. Comparación de las fermentaciones entre los diferentes tratamientos. Control: agua + melaza. E 100%: 100 % Efluente + melaza. E 60 %: 60 % Efluente + melaza. E 30 %: 30 % Efluente + melaza.

5.3 Test de vitalidad y viabilidad

La prueba de poder de acidificación (AP) fue superior a 2,0 en todos los ensayos (E 30%, E 60%, E 100% y agua del grifo) y la viabilidad de las células de levadura fue superior al 80% (Tabla 5), lo que sugiere que la estructura y función normal de las células no se alteraron, y que la levadura era muy activa y tenía un buen potencial de fermentación. Por tanto, la alta capacidad de acidificación proporcionó información sobre la capacidad metabólica de las células y sobre su capacidad para mantener diferentes concentraciones intracelulares y extracelulares de iones de hidrógeno (Gabriel et al. 2008). Durante los primeros 10 minutos de la prueba, AP-E 100% mostró una alta capacidad de acidificación (Figura 8), una mayor tasa de cambio de pH y una pendiente más pronunciada de la curva de pH-tiempo (Esto indica el flujo de protones), aunque no hubo glucosa en el medio durante este tiempo. Esto quizás se debió a la presencia de sacarosa en el espacio periplásmico, ya que había melaza en el medio de fermentación. La melaza está compuesta principalmente por un 45 a 60% (p / p) de sacarosa, 5 a 20% (p / p) de glucosa y fructosa. En *S. cerevisiae*, el consumo de sacarosa comienza con su hidrólisis por invertasa en el espacio periplásmico (Marques et al. 2016). La invertasa descompone el disacárido sacarosa en monosacáridos glucosa y fructosa. En *S. cerevisiae*, la hidrólisis de sacarosa puede ocurrir tanto intracelularmente como

extracelularmente (Dijken 1994). La levadura *S. cerevisiae* produce dos formas de invertasa, formas secretadas y no secretadas (Sainz-Polo et al. 2013). En la mayoría de los casos, la absorción de disacáridos por las levaduras está mediada por sistemas de importe de protones. Cuando la sacarosa es metabolizada por la vía de hidrólisis intracelular, el único protón que se capta junto con la sacarosa debe ser expulsado por la ATPasa de la membrana plasmática (Pma1p) para mantener la fuerza motriz del protón a través de esta membrana y prevenir la acidificación del citoplasma (K. Wang et al. 2014). Sin embargo, los movimientos de protones también pueden ser causados por otros procesos metabólicos, incluida la actividad de la ATPasa y la producción de metabolitos ácidos (Dijken 1994). El comportamiento de la pendiente de la curva de pH-tiempo para 100% AP-E (Figura 8) solo ocurrió cuando el 100% del efluente se reutilizó para fermentación, por lo que es probable que la levadura se inhibiera temporalmente para la hidrólisis de sacarosa, y cuando estaba en un medio sin este efecto estresante, reactivó su metabolismo.

Tabla 5. Porcentaje de supervivencia y poder de acidificación (PA) de células de *Saccharomyces cerevisiae* luego de la fermentación.

Ensayos	Viabilidad (%)	Etanol (%)	PA (Δ pH)
Control	80,5	5,6	1,0
E 30 %	89,5	5,4	1,2
E 60 %	93,3	5,0	1,0
E 100 %	86,7	4,7	1,2

En la Figura 8, las pendientes AP de los tratamientos AP-E 30%, AP-E 60% y AP-E 100% muestran que las levaduras son potencialmente activas. Sin embargo, en comparación con el agua del grifo, la producción de etanol se redujo cuando se utilizó el 60% y el 100% del efluente para diluir la melaza de caña de azúcar para la fermentación (Tabla 5), lo que sugiere que la reducción en la producción de etanol se debió a un efecto no permanente y podría ser condicionado por melaza y por el porcentaje de efluente en el medio de fermentación. La melaza es bastante inhibidora de varios organismos debido a su salinidad, osmolaridad y a su contenido de elementos tóxicos e inhibidores de la fermentación (Lino, Basso, and Sommer 2018). Además, la digestión anaeróbica es eficaz para tratar la fracción degradable de materia orgánica en vinazas (Robles-González et al. 2012); sin embargo, siempre hay componentes biológicamente recalcitrantes que permanecen después del tratamiento anaeróbico (Yan et al. 2019). Esto indicó que algunos de los componentes de la melaza y el efluente (ADEV) en la fermentación etanólica

podrían inhibir *S. cerevisiae*. También, Los resultados para este trabajo indicaron que el bajo Δ pH de los tratamientos donde se utilizó como diluyente de las melazas efluente, no significo una afectación de la vitalidad, ya que, el Δ pH del control es similar a los tratamientos.

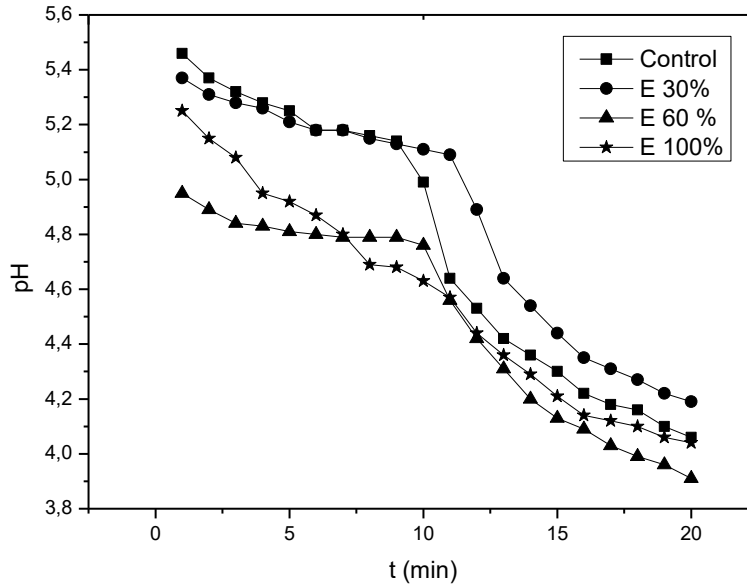


Figura 8. Test de vitalidad. Poder de acidificación PA (Δ pH) de las células de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas después de la fermentación en cada uno de los tratamientos

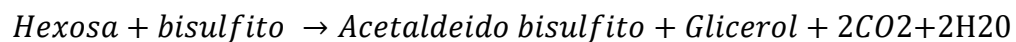
5.4 100% reúso de efluente. Determinación de la capacidad tampón de los medios de fermentación

Dado que los medios de fermentación compuestos por melazas o efluentes mostraron gran capacidad para resistir disminuciones de pH, se evaluó la capacidad amortiguadora de los medios de fermentación y el efecto del pH inicial en la producción de bioetanol. Los resultados de la titulación con HCl 0.1029 M mostraron claramente que los sistemas compuestos por melaza, efluente o una combinación de ambos tenían gran capacidad para resistir disminuciones en el pH del medio. El efecto amortiguador del efluente estuvo principalmente en el rango de 7,5 a 5,5. En el caso de la melaza, la regulación del pH cubrió un rango más ácido, de 5,0 a 3,0 (Olbrich, 1963). El efecto se volvió sinérgico cuando se utilizó la mezcla efluente-melaza, consumiendo 0,44 g de HCl por 13,3 g de melaza diluida para reducir el pH de 7,04 a 3,07.

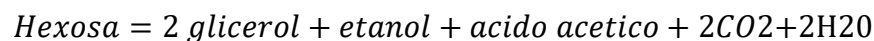
Para observar el efecto del efluente en la producción de etanol, se reemplazó la melaza por sacarosa. Se observó que al reutilizar el 100% del efluente, sustituyendo la melaza por sacarosa como fuente de carbono para la fermentación sacarosa E100% (80,6 g / L), la eficiencia de producción de etanol aumentó alrededor de un 20%, en comparación con el medio de fermentación melazas E 100% (38,4 g / L). La diferencia probablemente se debe a que la melaza, a pesar de ser una fuente barata de carbono, ampliamente utilizada en la producción de combustible de etanol, tiene inhibidores de fermentación, así como alta salinidad y osmolaridad (Lino, Basso, and Sommer 2018). Por lo tanto, la melaza podría influir en la producción de etanol ya que el medio de fermentación que contenía sacarosa E 100% la cual tuvo un aumento de 5.6% en la producción de etanol en comparación con el agua del grifo más melaza (43.3 g / L), a pesar de utilizar el efluente (ADEV) para la dilución de sacarosa (Tabla 6).

La figura 9 muestra la comparación entre los tratamientos E100 % y E100 %-pH, entre los cuales no hay una diferencia significativa en la producción de etanol, mientras que si hay diferencias respecto al control. Es importante anotar que el consumo de azúcares expresado en °Brix es igual en todos los tratamientos y el control. Esto indica que hay una gran probabilidad de que el consumo del carbono en los tratamientos no se vaya a la producción de etanol sino de otros compuestos para obtener energía. En una investigación realizada por (Olbrich, 1963) describen la competencia de glicerol-3-P deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa por NADH₂ durante la fermentación alcohólica de levadura (Anexo 5). La disminución en la producción de etanol se debe quizás a que las melazas pueden causar estrés osmótico, además de la presencia de inhibidores como los sulfitos, provocando que parte de la glucosa sea metabolizada para la producción de glicerol.

La producción de glicerol está relacionada para *Saccharomyces cerevisiae* con dos tipos de métodos uno basado en la asimilación de acetaldehído por iones bisulfito a un pH alrededor de 7:



El otro método es quizás el que está relacionado con el sistema evaluado en esta investigación, es la producción de glicerol combinando tipos de estrés como es el estrés osmótico y el estrés por presencia de sulfito (Wang, et al., 2001). La reacción global es:



Las melazas pueden llegar a contener hasta 50% (p/v) de sacarosa y, aunque se suelen diluir unas 10 veces, las concentraciones resultantes son suficientes para generar la respuesta a estrés osmótico por parte

de la levadura (Jiménez 2010). En la concentración osmótica, se produce una diferencia de potencial osmótico entre el interior y el exterior celular que tiene como consecuencia la salida de agua de la célula. La acumulación de osmolitos aumenta el potencial osmótico del interior celular, haciendo que se iguale con el de su exterior. Los osmolitos compatibles más utilizados son los polialcoholes, siendo el glicerol el osmolito acumulado por *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann 1997). En *S. cerevisiae*, la acumulación de glicerol es controlada a dos niveles, retención y producción. La retención de glicerol forma parte de la respuesta inmediata de la célula frente a un choque osmótico, la presencia de este canal permite a la célula controlar y ajustar la permeabilidad de la membrana al glicerol. En condiciones de estrés osmótico, el canal está cerrado y el glicerol se acumula en el interior celular. Posteriormente el canal se abre y se cierra sucesivamente, con el objeto de controlar el nivel de glicerol (Wuytswinkel et al. 2000).

En una investigación realizada por Navarro et al. (2000) describe el potencial del uso de las vinazas en lugar de agua en la preparación del medio de fermentación. Donde, la vinaza final presento una cantidad significativa de subproductos de importancia comercial tales como glicerol (12,6 g/L), encontrando que al concentrar la vinaza había un incremento en la producción de glicerol debido a que posiblemente el medio era hipertónico.

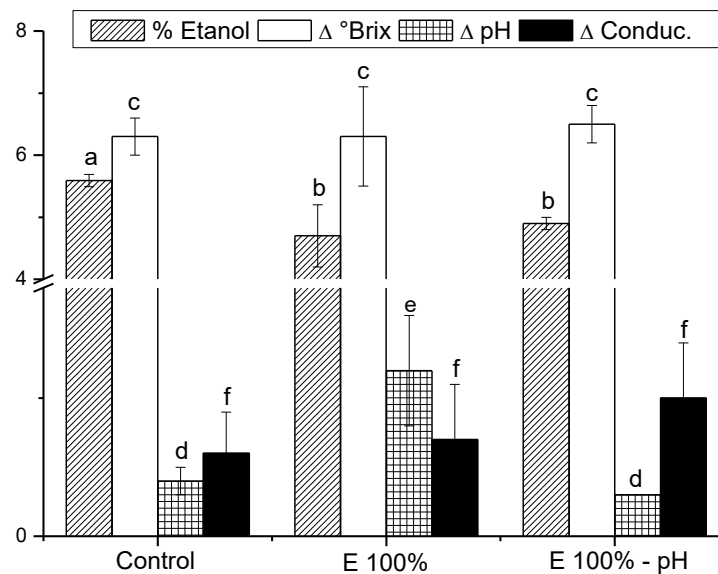


Figura 9. Comparación de fermentaciones entre efluentes 100%. Efluente sin cambio de pH: E 100 %. Efluente con cambio de pH: E 100 % - pH.

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* pueden llegar a formar cantidades de glicerol que varían entre 4.2 a 10.4 g/L. La formación de glicerol no sólo depende de la cepa de levadura, sino también en gran

medida de la composición del medio de fermentación y la sinergia con los factores de estrés. Para el caso de la producción de azúcar el efecto inhibidor de sulfito es otro problema industrial ya que se utiliza y está presente en la melaza y jugo de caña. El sulfuro de sodio en las melazas de caña está presente en un intervalo entre 200 a 700 mg/L, y hasta 300 mg SO₂/L en el mosto. El dióxido de azufre es una sustancia muy reactiva y su acción inhibidora está directamente relacionada con el pH, se caracteriza por dos constantes de disociación. En los valores de pH más bajos coexisten bisulfito (HSO₃⁻) y dióxido de azufre (SO₂) pK₁ = 1,77, mientras que en pH 5.0 a 9,0, hay una composición mixta de bisulfito y sulfito (SO₃⁻²) pK₂ = 6,9. Una vez que el pH de la fermentación es ácido, el sulfito es la forma más tóxica (SO₂ y HSO₃⁻) (Oliva-neto et al. 2013; Moraes, et al., 2015 b). Es probable que la diferencia en la producción de etanol del control con los tratamientos del efluente al 100 % se deba a un efecto sinérgico entre los componentes inhibitorios del efluente y la matriz (melaza).

Tabla 6. Comparación de fermentaciones entre efluentes al 100% y diferentes fuentes de carbono.

Ensayos	°Brix _i	°Brix _f	Δ°Brix	pH _i	pH _f	Δ pH	Cond _i	Cond _f	Δ Cond	% Etanol
E 100 %	19,8	13,5	6,3	6,4	5,2	1,2	21,8	22,3	0,8	4,7
E 100 % -pH	20,2	13,7	6,5	5,2	4,9	0,3	21,0	22,0	1,0	4,9
E 100 %-Sac	20,2	7,6	12,6	8,5	4,9	3,5	4,9	4,6	0,3	10,3
E 100 %-Sac-pH	20,2	9,0	11,2	5,4	2,9	2,5	4,7	6,2	1,5	11,0

Efluente con fuente de carbono melaza: E 100 %; Efluente con cambio de pH + melaza: E 100 % - pH +melaza; Efluente sin cambio de pH + sacarosa: E 100 %-Sac; Efluente con cambio de pH + sacarosa: E 100 %-Sac-pH.

En un trabajo realizado por (Olbrich, 1963), describe que las melazas poseen una acción de amortiguación y que esto se debe principalmente a los compuestos no azucarados, como son: 33% SiO₂, 27% CaO, 2 % P₂O₅, CO₂, SO₃, MgO, Al₂O₃ and Fe₂O₃. Quizás es por esto por lo que, aunque la disminución de °Brix es similar en E 100 % y E 100 %-pH, el Δ pH es mayor E 100 % respecto a E 100 % - pH (tabla 5).

Los resultados muestran que los sistemas compuestos por melaza o efluente o una combinación de ellos presentan una gran capacidad para resistir descensos en el pH del medio. El efluente muestra este efecto en el rango de 7.5 a 5.5 principalmente. Para el caso de la melaza el espectro de regulación cubre un rango más ácido, 5.0 a 3.0. El efecto se hace sinérgico cuando se utiliza su mezcla, llegando a consumir 0.44 g de HCl por cada 13,3 g de melaza diluida para bajar el pH desde 7,04 hasta 3,07. Para contrastar

este fenómeno se decidió también medir de manera paralela la solución sacarosa-agua y sacarosa-efluente. En el primer caso no existe ningún efecto buffer ya que con la adición de solo 0,5 ml de ácido clorhídrico 0,1029 M el pH desciende de 6.5 a 3.0, no siendo así en el sistema sacarosa-efluente. En el caso del efluente se encuentra la explicación en la adición de bicarbonato que se realiza al alimento (vinazas) del reactor metanogénico con el propósito de subir el pH a niveles no tóxicos para los microorganismos. El citrato de sodio se muestra como ejemplo de un sistema amortiguador conocido. Se ha descrito que las melazas muestran el efecto de buffer en un rango de pH 3.0 a 7,07.

Para definir cuál de los sustratos provocaba dicha diferencia se determinó la capacidad amortiguadora de los sistemas: melaza-agua, melaza-efluente, efluente, agua y como controles los sistemas sacarosa-agua, sacarosa-efluente y citrato al 1%, al adicionar ácido clorhídrico (HCl) diluido (ver figura 10).

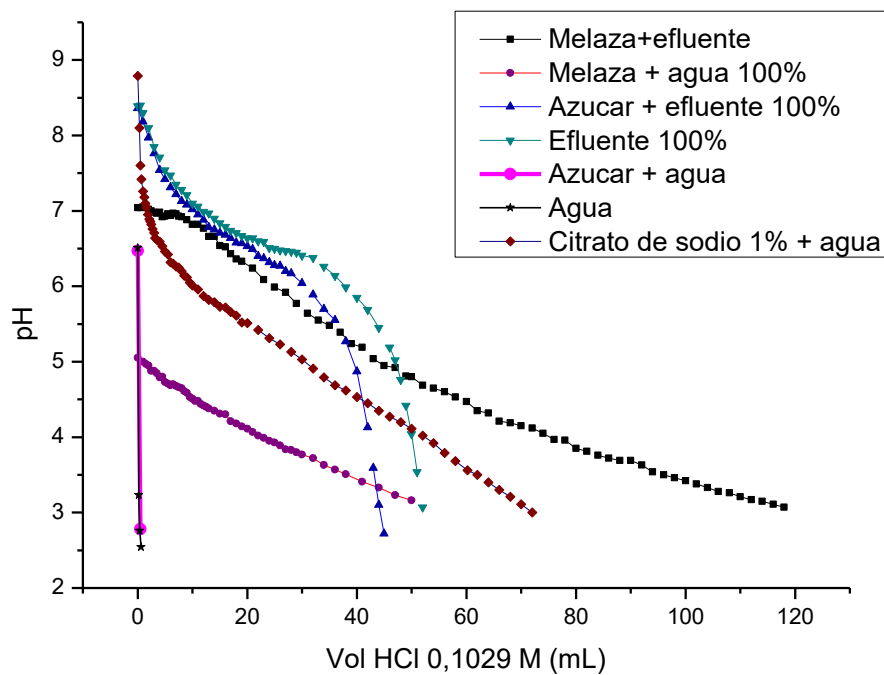


Figura 10. Efecto amortiguador/buffer en diferentes medios de fermentación

La melaza sin importar su origen, sólo se diferencian en el grado, pero no en la naturaleza de sus efectos amortiguadores; el almacenamiento de melazas de remolacha muestra sólo ligeras variaciones causadas por las diferencias en las cantidades y composiciones de las sustancias no azucaradas. En relación con la capacidad amortiguadora de melaza, es una consecuencia importante de la naturaleza química de las

sustancias no azucaradas, en la que su acción tampón aumenta cuanto menor es el pH; disminuye alrededor del punto neutro. La adición de 2 ml de ácido clorhídrico 0,10 N a una melaza con un pH inicial de 5.18 desplaza el pH por 0,48 unidades, pero la adición de 2 ml de 0,10 N de NaOH cambia el pH a 6,94, es decir, un cambio de 1,76 unidades de pH (Olbrich, 2006). Esto explicaría de porque la levadura a pesar de acidificar el medio éste no desciende de manera significativa al final de la fermentación. *Saccharomyces cerevisiae* tiende acidificar el medio, debido a la presencia de H^+ -ATPasa, en su membrana plasmática. La principal función de la H^+ -ATPasa es expulsar activamente protones y generar el gradiente electroquímico de protones que suministra la energía para la captación de nutrientes, que son esenciales para la supervivencia del organismo (Jiménez, 2010). El efecto de esta capacidad amortiguadora del pH que tiene tanto la melaza como el efluente es disminuir la eficiencia en el consumo de azúcares no fermentables por parte de la levadura ya que al no permitir el proceso de hidrólisis ácida de estos azúcares se disminuye sustancialmente el contenido de monosacáridos fermentables, además de que el proceso de bombear protones al medio para bajar el pH del medio la levadura consume los azúcares que si están disponibles para la obtención de energía en la producción de otros metabolitos diferentes al etanol. Sin embargo, los protones liberados al medio pueden ser neutralizados por la acción buffer del medio de fermentación. Por otro lado, la célula tiende al equilibrio osmótico, por lo que trata de ajustar el pH alcalino del medio externo consumiendo energía (Anderson and Ievinsh 2008).

El amplio rango de efecto amortiguador (Figura 3) del sistema de fermentación con la mezcla melaza-efluente podría haber tenido un efecto negativo en las células de levadura, resultando en una reducción en la producción de etanol (Tabla 3). Hay pocos informes sobre el efecto de un medio con una amplia gama de tampones sobre el rendimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y sobre la producción de etanol. Por lo tanto, fue difícil evaluar el efecto tampón de reutilizar el efluente para la dilución de melazas, principalmente cuando se reutiliza al 100%. Sin embargo, cabe señalar que, si el efluente se reutiliza al 100% para la dilución de sacarosa, se obtiene una alta producción de etanol, y este efecto se incrementa a medida que el pH alcanza niveles ácidos, reutilizando el efluente al 100% y sacarosa con ajuste de pH (Suc -E 100% - pH) la producción de etanol se incrementó en 86,4 g / L (Tabla 3).

5.5 Ahorro de agua

Cuando se construye una planta de etanol, el agua es un importante recurso a consideración y parte del proceso de permisos. El uso del agua de consumo por las plantas de etanol proviene en gran parte de la

evaporación durante el enfriamiento y la descarga de aguas residuales. Una planta de etanol es capaz de producir 40 millones de galones de etanol por año, donde puede llegar a utilizar hasta 330.000 litros de agua por día o 120 millones de galones de agua al año. Esto es equivalente al agua utilizada por una ciudad de 5.000 personas o un campo de golf de tamaño estándar. El hogar promedio utiliza 107.000 galones de agua por año. Una persona promedio utiliza 50 galones de agua cada día.

Debido a las políticas energéticas del país, se producen biocombustibles desde el año 2005 (bioetanol a partir de caña de azúcar). Actualmente Colombia produce 30 millones de litros mensuales de etanol a partir de caña. Este consumo aumentará una vez entre en vigencia la ley que obliga a que todos los automóviles nuevos tengan motores flex-fuel (Los cuales funcionan con mezclas de hasta 85% de etanol), frente al consumo actual que es de 10% en etanol. Todo esto lleva en un aumento considerable por año de producción de etanol de diferentes fuentes especialmente de caña de azúcar, lo cual a su vez lleva a un significativo incremento en el consumo de agua (Chavez-rodriguez et al. 2013).

Como regla general, en una planta de etanol que produce 50 millones de galones año se necesitan 263 millones de galones de agua. Sin embargo, las plantas de etanol modernas tienen sofisticadas técnicas de tratamiento de agua para permitir el reciclaje de agua para calderas. Estas técnicas de tratamiento también deberían ser consideradas y permitir ser utilizadas a las plantas en agua de menor calidad tales como los efluentes de plantas de tratamiento de aguas y, posiblemente, incluso el agua reciclada de corrales de engorde de animales (Keeney 2006).

De esta investigación se concluye que al ser utilizado el efluente como agua de reúso el ahorro de agua es de aproximadamente un 12,5%, esto significa un ahorro de aprox. 166000 L/día para una planta como la de la Fábrica de Licores de Antioquia que produce aprox. 100000 L de alcohol/día. Esto a su vez equivaldría al consumo promedio de 1265 personas/día en la ciudad de Medellín.

Tabla 7. Relación de ahorro de consumo de agua utilizando el efluente como agua de reúso en el proceso de fermentación.

		DQO vinaza (mg/L)	DQO alimento reactor (mg/L)	Ahorro en consumo de agua (%)
Experimental*		160000	16267	12,5
	Escenarios futuros	1	160000	25000
2		160000	30000	23,0
3		120000	30000	30,7
4		100000	30000	36,8
5		80000	30000	46,0

* Tiempo de retención: 6,9 días. Generación de biogás: 39 L/día. Composición porcentual promedio de metano: 71%.

Las evaluaciones tecnológicas en una bio-refinería de caña de azúcar con diferentes escenarios, tiene como objetivo en un corto plazo tener presente aspectos tales como el medio ambiente, energéticos, económicos y sociales. Estos escenarios podrían cubrir diferentes consideraciones, por ejemplo, diferentes configuraciones de un reactor, condiciones operativas, aplicaciones de biogás, así como un sistema integrado de transformación de desechos en sub-productos. Así, la digestión anaerobia de vinazas y el reúso del efluente como agua son alternativas que podrían llegar a solucionar problemas de manejo de residuos y a su vez ser aprovechados como parte de la producción de la cadena de producción de etanol, la cual funcionaría como una herramienta para los estudios preliminares de nuevos procesos y la optimización de las condiciones de operación, dirigida hacia futuras aplicaciones industriales.

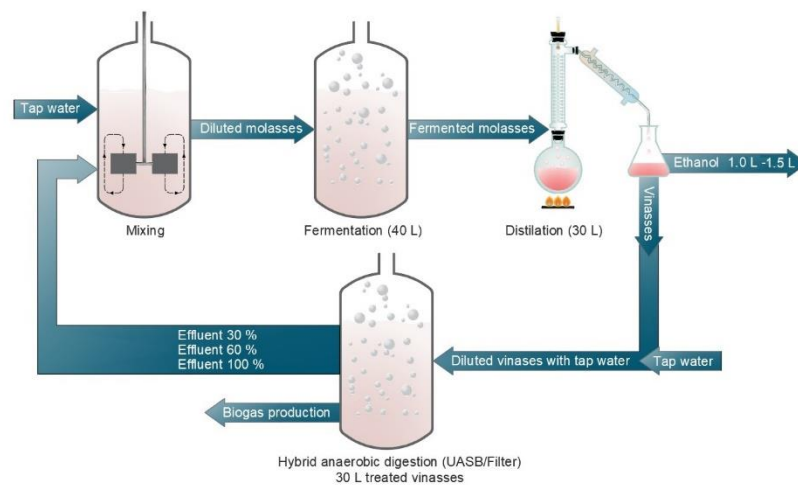


Figura 11. Esquema de experimentación de operaciones utilizando efluente de digestión anaeróbica de las vinazas.

6. Conclusiones

- El sistema de metanización de vinazas en el biodigestor (del reactor híbrido de lecho de lodos con filtro anaerobio) tuvo una carga máxima de 16267 mg/L, carga que a nivel industrial representa una cantidad importante. Se obtuvo una cantidad promedio de metano en el biogás del 71% que es considerable en este tipo de sistemas. La utilización de cargas mayores puede superarse mediante la estabilización del sistema, ya que a medida que el reactor alcanzaba una estabilización permitía mayor concentración de vinaza en el sistema, obteniendo remociones de hasta el 65,8% de materia orgánica, si el reactor es cargado con altas cantidades de DQO sin estar estabilizado, el sistema se satura y pierde eficiencia. El uso de vinaza para la producción de energía es técnicamente factible.
- En el sistema de reúso del efluente del 100 % en la fermentación a pesar de no tener un impacto negativo en la viabilidad y vitalidad de *Saccharomyces cerevisiae*, se evidencia una menor producción de etanol respecto al control donde es utilizada agua, esto quizás se deba a la presencia o acumulación de compuestos inhibitorios o condiciones de estrés haciendo menos eficiente el proceso de fermentación.
- El sistema melaza – efluente mostro tener propiedades buffer que influyen en la actividad y eficiencia de la fermentación de azúcares. El efecto de esta capacidad amortiguadora del pH que tiene tanto la melaza como el efluente es disminuir la eficiencia en el consumo de azúcares no fermentables por parte de la levadura.
- Teniendo en cuenta que la cantidad de agua requerida para la preparación del medio de fermentación en una planta de producción de alcohol es aproximadamente 77% del consumo total de agua, el re-uso de 100% efluente reduce a 0% la cantidad de agua requerida. Sin embargo, para el proceso global de fermentación alcohólica y metanización solo llega a un 12,5 %.
- El sistema integrado de uso de vinazas para metanización y producción de energía, además del reúso del efluente en un 100% como agua en la fermentación que se propone en este trabajo, es un proceso de importancia económica para aplicaciones industriales, con la ventaja añadida de la eliminación no contaminante de los residuos potencialmente contaminantes y el ahorro de agua.

7. Bibliografía

- Andersone, Una, and Gederts Ievinsh. 2008. "Medium PH Aff Ects Regeneration Capacity and Oxidative Enzyme Activity of Pinus Sylvestris in Tissue Culture." 745: 25–35.
- Baez-smith, Carmen, and Smith Baez Consulting. 2006. "Anaerobic Digestion of Vinasse for the Production Of Methane in the Sugar Cane Distillery." : 268–87.
- Cajigas, C. A; Pérez, V. A; Torres, L. 2005. Importancia del pH y la alcalinidad en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. (27): 243–48.
- Castro, G A, and L A Caicedo. 2015. "Solvent Extraction of Organic Acids from Stillage for Its Re-Use in Ethanol Production Process." (19): 1–6.
- Chavez-rodriguez, Mauro F, Klever Joao Mosqueira-salazar, Adriano V Ensinas, and Silvia A Nebra. 2013. "Energy for Sustainable Development Water Reuse and Recycling According to Stream Qualities in Sugar – Ethanol Plants." *Energy for Sustainable Development* 17(5): 546–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.esd.2013.08.003>.
- Christofolletti, Cintya Aparecida et al. 2013. "Sugarcane Vinasse : Environmental Implications of Its Use." *Waste Management* 33(12): 2752–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>.
- Conil, Philippe. 2006. "Manejo de Vinazas : Metanización y Compostaje , Aplicaciones Industriales." *Nota Técnica*. BIOTEC, www.bio-tec.net.
- Demeke, Mekonnen M et al. 2013. "Combining Inhibitor Tolerance and D-Xylose Fermentation in Industrial Saccharomyces Cerevisiae for Efficient Lignocellulose-Based Bioethanol Production." : 1–17.
- Dijken, Ruud A. WeusthuisJack T. PronkJack T Pronk Peter J.A. Van den BroekJohannes P. Van. 1994. "Chemostat Cultivation as a Tool for Studies on Sugar Transport in Yeasts." *Microbiological reviews* 58(4): 616–30. <https://mibr.asm.org/>.
- Eliet Veliz Lorenzo ; José Guadalupe Llanes Ocaña ; Lidia Asela Fernández ; Mayra Bataller Venta ; 2009. "Reúso de Aguas Residuales Domésticas Para Riego Agrícola . Valoración Crítica." *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 40. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181221574007>.
- España-Gamboa E, Mijangos-Cortés JO, Hernández-Zárate G, Maldonado JA, Alzate-Gaviria LM. 2012. "Methane Production by Treating Vinasses from Hydrous Ethanol Using a Modified UASB

- Reactor.” *Biotechnol Biofuels* 5(1): 82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167984>.
- Evandro Galvão Tavares Menezes, José Guilherme Lembi Ferreira Alves*, Carolina, and Valeriano and Isabela Costa Guimarães. 2013. “Physico-Chemical and Sensorial Evaluation of Sugarcane Spirits Produced Using Distillation Residue.” 56(February): 121–26.
- Fajardo y Sarmiento, 2007. 2007. "Evaluación de Melaza de Caña Como Sustrato Para La Producción De. Universida". Bogotá. Tomado de: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8279>
- Fitzgibbon, F. J., Nigam, P., Singh, D., & Marchant, R. 1995. “Biological Treatment of Distillery Waste for Pollution-Remediation.” *Journal of Basic Microbiology* 35(5): 293–301.
- G.J. Sheehan, P.F. Greenfield. 1980. “Utilisation, Treatment and Disposal of Distillery Wastewater.” *Water Research* 14(3): 257–77.
- Gabriel, P. et al. 2008. “Optimised Acidification Power Test of Yeast Vitality and Its Use in Brewing Practice.” *Journal of the Institute of Brewing* 114(3): 270–76. <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00338.x>.
- Hohmann, M. 1997. “Soil Freezing - The Concept of Soil Water Potential. State of the Art.” *Cold Regions Science and Technology* 25(2): 101–10.
- Jenkins, D M et al. 2011. “Rehydration of Active Dry Brewing Yeast and Its Effect on Cell Viability.” 117(3): 377–82.
- Jiménez, Elena. 2010. "Análisis de la respuesta de las levaduras a las condiciones de estrés osmótico y ausencia de nitrógeno durante la vinificación". UNIVERSITA. eds. Universitat de València and Servei de Publicacions. Spain, Valencia.
- Kalia VC, Chauhan A, Bhattacharyya G, Rashmi. 2003. “Genomic Databases Yield Novel Bioplastic Producers.” *Nat Biotechnol* 21: :800-845.
- Kara, By B V, W J Simpson, and J R M Hammond. 1988. “Population of Yeast Cells to Maintain Different Intracellular and Extracellular Hydrogen Ion the Acidification Power Test a ‘stand Alone’ Test, No Secondary Analyses (Such as Dry Weight.” 94: 153–58.
- Keeney, D. 2006. “Water Use by Ethanol Plants Potential Challenges.” https://www.iatp.org/sites/default/files/258_2_89449.pdf.
- Larrahondo Aguilar, J. E. 2009. “La Vinaza, Caracterización de Las Vinazas Usos y Aprovechamientos

Potenciales.” In Cali, Valle del Cauca, Colombia: Sena-Asocaña: Momorias Seminario Internacional de Fertilización y Nutrición de la Caña de Azúcar.

Lasso, J. Ramírez, J. 2011. “Reúso de Aguas Residuales En Riego de Cultivos de Producción de Agrocombustibles.Pdf.” *El Hombre y la Máquina* 36: 95–105. <https://www.redalyc.org/pdf/478/47821598009.pdf>.

Lina Hernández Saavedra. 2009. “Patente Método Para El Tratamiento Electroquímico de La Vinaza.” In , 1.

Lino, Felipe Senne de Oliveira, Thiago Olitta Basso, and Morten Otto Alexander Sommer. 2018. “A Synthetic Medium to Simulate Sugarcane Molasses.” *Biotechnology for Biofuels* 11(1): 221. <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-018-1221-x>.

Maciel, Eduardo, Oliveira Laime, Pedro Dantas Fernandes, and Dayane Cristine De Souza. 2011. “Possibilidades Tecnológicas Para a Destinação Da Vinhaça : Uma Revisão Technological Possibilities for the Disposal of Vinasse : A Review.” : 16–29.

Maiorella, Brian, Harvey W Blanch, and R Charles. 1983. “Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae*.” XXV: 103–21. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.260250109>

Marques, Wesley Leoricy, Vijayendran Raghavendran, Boris Ugarte Stambuk, and Andreas Karoly Gombert. 2016. “Sucrose and *Saccharomyces Cerevisiae* : A Relationship Most Sweet” ed. Jens Nielsen. *FEMS Yeast Research* 16(1): fov107. <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1093/femsyr/fov107>.

Moraes, B S et al. 2015. “Bioresource Technology Biogas Production within the Bioethanol Production Chain : Use of Co-Substrates for Anaerobic Digestion of Sugar Beet Vinasse.” *BIORESOURTECHNOLOGY* 190: 227–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.089>.

Moraes, Bruna S et al. 2014. “Anaerobic Digestion of Vinasse from Sugarcane Biorefineries in Brazil from Energy , Environmental , and Economic Perspectives : Profit or Expense ?” *Applied Energy* 113: 825–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.018>.

Moraes, Bruna S, Marcelo Zaiat, and Antonio Bonomi. 2015. “Anaerobic Digestion of Vinasse from Sugarcane Ethanol Production in Brazil: Challenges and Perspectives.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 44: 888–903. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>.

Navarro, a. R., M. Del C. Sepúlveda, and M. C. Rubio. 2000. “Bio-Concentration of Vinasse from the

Alcoholic Fermentation of Sugar Cane Molasses.” *Waste Management* 20(7): 581–85.

Nielsen, Jens, and Gunnar Liden Villadsen, John. 2003. “Principles Bioreaction Engineering Principles.” In *The First Edition of Bioreaction Engineering Principles*, ed. LLC Springer Science+Business Media. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.

Olbrich, Hubert. 1963. “The Molasses.” *Biotechnologie-Kempe GmbH* 2006. http://kempetrade.de/Molasses_OLBRICH.pdf.

Oliva-neto, Pedro De et al. 2013. “The Brazilian Technology of Fuel Ethanol Fermentation – Yeast Inhibition Factors and New Perspectives to Improve the Technology.” : 371–79.

de Oliveira, B.G., Carvalho, J.L.N., Cerri, C.E.P., Cerri, C.C., Feigl, B.J.: Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. *Geoderma*. 200–201, 77–84 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.02.005>

Páez, Gloria et al. 2016. “Science of the Total Environment Vinasse Application to Sugar Cane Fi Elds . Effect on the Unsaturated Zone and Groundwater at Valle Del Cauca (Colombia).” *Science of the Total Environment* 539: 410–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.153>.

Pereira, Sueli Yoshinaga, and Paulo Pereira. 2008. “Environmental Aspects in Ethanol Production Related to Vinasse Disposal and Groundwater.” In Oslo: International Year of Planet Earth (IYPE), and the International Polar Year (IPY), 1. <http://www.cprm.gov.br/33IGC/1339047.html>.

Perera, J. G. 2009. “Concentración y Combustión de Vinazas. Ministerio de Gobierno y Justicia de La Provincia de Tucumán Secretaria de Estado de Gobierno y Justicia - Subsecretaria de Asuntos Técnicos,.” In San Miguel de Tucumán - República de Argentina.

Robles-González, Vania, Juvencio Galíndez-Mayer, Noemí Rinderknecht-Seijas, and Héctor M. Poggi-Varaldo. 2012. “Treatment of Mezcal Vinasses: A Review.” *Journal of Biotechnology* 157(4): 524–46. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165611005426>.

Roger, Paulo et al. 2015. “Science of the Total Environment Ecotoxicological Characterization of Sugarcane Vinasses When Applied to Tropical Soils ☆.” *Science of the Total Environment, The* 526: 222–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.150>.

Sainz-Polo, M. Angela et al. 2013. “Three-Dimensional Structure of Saccharomyces Invertase.” *Journal*

of Biological Chemistry 288(14): 9755–66.
<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.446435>.

SIADDEB. 2013. “Sociedad Iberoamericana Para El Desarrollo de Las Biorrefinerias.”
<http://www.siaddeb.org/>.

Tejada M, Garcia C, Gonzalez JL, Hernandez MT. 2006. “Organic Amendment Based on Fresh and Composted Beet Vinasse.” *Soil Science Society of America Journal* 70: :900–908.

Wang, Ke et al. 2014. “Reusing a Mixture of Anaerobic Digestion Effluent and Thin Stillage for Cassava Ethanol Production.” *Journal of Cleaner Production* 75: 57–63.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095965261400345X>.

Wang, Zheng-xiang, Jian Zhuge, Huiying Fang, and Bernard A Prior. 2001. “Glycerol Production by Microbial Fermentation : A Review.” 19: 201–23.

Wuytswinkel, O Van et al. 2000. “Response of *Saccharomyces Cerevisiae* to Severe Osmotic Stress : Evidence for a Novel Activation Mechanism of the HOG MAP Kinase Pathway.” 37: 382–97.

Yan, Zhongsen et al. 2019. “Treatment of Anaerobic Digestion Effluent Using Membrane Distillation: Effects of Feed Acidification on Pollutant Removal, Nutrient Concentration and Membrane Fouling.” *Desalination* 449: 6–15.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011916418313985>.