BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

FERMENTACIÓN ANAEROBIA DE LA VINAZA MEZCALERA PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE VALOR INDUSTRIAL

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

ANGÉLICA RODRÍGUEZ CORTÉS

ASESOR:

DR. EFRAÍN RUBIO ROSAS

CO-ASESOR:

M.C. CARLA DE LA CERNA HERNÁNDEZ

Puebla, Puebla Enero 2016

DEDICATORIAS

A mis padres:

Sra. Juana Cortés Morales

Sr. Sergio M. Rodríguez Zamacona

A mis hermanas: Liliana, Genoveva y Karla

A mis sobrinas: María Fernanda, Ana Cristina, Ambar Ximena y Carlos Adán

A mis amigos: Anhel, Alfredo, Nelly, Jorge, Alejandra, Paulina y Laura

Ustedes son la alegría de mi vida. Los adoro.

A Sergio: Gracias por creer en mí. Siempre estarás en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Dr. Efraín Rubio Rosas y co-asesora M.C. Carla de la Cerna Hernández por haber sido mi guía durante la tesis y brindarme su apoyo, comprensión y paciencia.

A mis revisoras la Dra. María del Consuelo Mendoza Herrera, Dra. Gabriela Pérez Osorio por el tiempo que dedicaron en la revisión y por sus sugerencias para mejorar este trabajo.

A la Dra. Margarita Teutli León por su apoyo incondicional, sin el cual nunca lo hubiera logrado.

Al Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyTT) y al Ing. Ángel Leal Rodríguez por la ayuda y orientación proporcionadas para la realización de la parte experimental de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca que me permitió continuar con mis estudios.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de para realizar los estudios de Maestría.

A mi compañera de maestría Ana María León por los días de trabajo y esfuerzo compartidos.

Contenido

INTRODUCCIÓN 1

JUSTIFICACIÓN 3

HIPÓTESIS 3

IMPACTO SOCIOECONÓMICO 3

OBJETIVOS 4

Objetivo general 4

Objetivos particulares 4

CAPÍTULO 1. Antecedentes 5

1.1 Industria de mezcal en México 5

1.2 Regiones productoras y proceso de producción del mezcal en Zacatecas 6

1.3 Vinazas generadas en la industria mezcalera 8

1.3.1 Características 9

1.3.2 Impacto ambiental 9

1.3.3 Tendencias en el tratamiento y aplicaciones de la vinaza 11

1.4 Procesos de biodigestión 13

1.5 Fermentación oscura 15

1.5.1 Rutas metabólicas en la fermentación anaerobia 19

1.5.2. Fermentación ácido-mixta 20

1.5.3. La ruta Wood-Ljungdahl 22

1.5.4. Escherichia Coli 23

1.5.5. Clostridium sp 25

1.6 Inhibición del proceso anaerobio 27

1.7 Factores que afectan la producción de hidrógeno y metano por fermentación anaerobia 31

CAPÍTULO 2. Metodología 34

2.1 Obtención de la muestra 34

2.2 Caracterización de la vinaza 34

2.2.1 Determinación DQO 35

2.2.2 Determinación de DBO_5 36
2.2.3 Determinación de sólidos y sales disueltas 37
2.2.4 Determinación de metales 39
2.3 Aislamiento bacteriano 40
2.3.1 Caracterización de las bacterias aisladas 40
2.4 Fermentación obscura de la vinaza 41
2.4.1 Etapa de aclimatación del inoculo 42
2.4.2 Fermentación anaerobia con el inoculo adaptado de *Clostridium* 43
2.4.3 Sistemas de producción de biogás 44
2.4.4 Efecto del tiempo de inoculación y el pH en la producción de biogás 45
CAPÍTULO 3. Resultados y análisis 46
3.1 Caracterización de la vinaza mezcalera 46
3.2 Aislamiento y caracterización de bacterias 47
3.3 Crecimiento bacteriano (adaptación al medio) 48
3.4 Primeras pruebas de fermentación con *Clostridium* 49
3.5 Sistemas de generación de biogás en microcosmo 51
3.6 Efecto del tiempo de inoculación y el pH en la producción de biogás 51
CONCLUSIONES 56
PERSPECTIVAS 56
REFERENCIAS 57

INTRODUCCIÓN

La Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994 define mezcal como la bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no. De acuerdo con el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM) hay siete estados que pueden producirlo: Oaxaca, Zacatecas, Guerrero, San Luis Potosí, Durango, Tamaulipas y Guanajuato. La producción mexicana de mezcal en el 2009 fue de un millón y medio de litros, casi la mitad es fabricado en Zacatecas.

El proceso del mezcal consta generalmente de cuatro etapas: cocimiento del corazón del agave, molienda del corazón cocido, fermentación del mosto o el jugo, y destilación. En esta última etapa se generan entre 8 y 15 L de agua residual, también llamadas vinazas de mezcal (VM), por cada litro de mezcal (Robles *et al*., 2012; Jiménez *et al*., 2005; Preeti y Aniruddha, 2006). La vinaza es un líquido muy denso de coloración café oscura, con un elevado contenido de materia orgánica (100,000–150,000 mg O_2/L como DQO) y sales inorgánicas, además de una temperatura elevada (aproximadamente 90 °C) y un pH ácido (entre 3.5 y 4.5). Con estas características las vinazas son efluentes muy agresivos y recalcitrantes, por lo cual su descarga en los cuerpos de agua y suelos puede causar un severo impacto ambiental (Robles *et al*., 2012). Su vertimiento a cuerpos de agua natural puede causar su eutrofización (un aumento gradual en la concentración de fósforo, nitrógeno y otros nutrientes en ecosistemas acuáticos), lo cual induce al incremento de algas y microorganismos en la superficie, evitando que la luz solar y el oxígeno necesario entren para la subsistencia de la vida subacuática (Potentini y Rodríguez, 2006). También ha sido reportado que cuando las vinazas concentradas son irrigadas en campos agricultores, usualmente modifican la alcalinidad y la concentración de manganeso, causando la destrucción de los cultivos (Cirilo *et al*., 2007).

El tratamiento para combatir la contaminación en lo referente a la vinaza no debe ser una carga económica para la destilería sino por el contrario la vía de obtener un producto con valor comercial, cuya venta le permita un ingreso extra de los que tradicionalmente obtiene,

así como una reducción de las pérdidas que por concepto de vertimiento de aguas residuales o multas se deben hacer. La práctica actual de vertimiento de las vinazas es, además de contraria a la protección del medio ambiente, antieconómica; y un adecuado enfoque de este problema pasa por la búsqueda de nuevas vías de utilización de este residuo.

La construcción de sociedades sustentables requerirá reducir la dependencia a los combustibles fósiles y bajar la cantidad de contaminación que es generada. El tratamiento de las aguas residuales es un área en la cual estos dos objetivos pueden ser atendidos de manera simultánea. Como consecuencia, se ha dado un cambio de paradigma recientemente, de desechar los residuos a utilizarlos. Existen diversas estrategias de procesamiento biológico que pueden producir energía o químicos al mismo tiempo que se tratan las aguas residuales provenientes de la industria y la agricultura, entre estas estrategias se incluyen la digestión anaerobia metanogénica, la producción biológica de hidrógeno, las celdas de combustible microbiana y la fermentación orientada a la obtención de productos de valor. Estos productos de valor pueden ser definidos como bioproductos. Los bioproductos son el resultado de la aplicación de la biotecnología dentro del ámbito industrial, dónde, mediante procesos biológicos, principalmente, se transforma la biomasa por medio de la incorporación de bacterias, enzimas, microorganismos, etc., en bioproductos como: los bioplásticos, las biopinturas, los biolubricantes, los biomateriales de la construcción, la bioenergía, los biocombustibles, etc. Las aguas residuales provenientes de la industria de procesamiento de alimentos y bebidas, y las aguas de la agricultura son candidatos ideales para estos bioprocesos, ya que contienen altos niveles de materia orgánica fácilmente degradable, lo que resulta en energía neta positiva o balance económico (Angenent *et al*, 2004). Enfocados en este punto Espinoza y colaboradores (2009) concluyeron que la producción biológica de hidrógeno con vinazas es técnicamente viable y se prevé un potencial de ingresos para las destilerías de Tequila de 67, 000 dólares anuales por el uso de este biohidrógeno.

Es por esto que en este trabajo se pretende determinar el potencial de la vinaza mezcalera para la obtención de productos de valor por medio de la fermentación oscura o anaerobia, así como los efectos que tiene sobre el rendimiento de producción las variaciones del pH y la temperatura.

JUSTIFICACIÓN

Las destilerías mexicanas producen cerca de 2 millones de litros de mezcal por año, y generan aproximadamente 30 millones de litros de vinazas de mezcal, siendo el estado de Zacatecas uno de los productores más importante en el país. Este desperdicio ácido es muy agresivo con el ambiente por su alto contenido de toxinas y de materia orgánica. Junto con la degradación ambiental, otro problema de vital importancia global es la crisis energética. La recuperación de energía y materiales de valor puede reducir el costo de los tratamientos de estas aguas de residuo y, de alguna manera, aminorar nuestra dependencia hacia los combustibles fósiles. Por esto es importante examinar a la vinaza como una opción para la producción de energía o productos de manera limpia y económica y con esto también conseguir que el contenido tóxico de este efluente sea reducido antes de su descarga a mantos acuíferos o suelos.

HIPÓTESIS

Se podrían obtener satisfactoriamente bioproductos mediante la fermentación anaerobia de las vinazas mezcaleras probando diferentes valores de pH y temperatura.

IMPACTO SOCIOECONÓMICO

Las reservas limitadas de combustibles, la degradación del ambiente y la preocupación del cambio climático han impulsado la búsqueda de medios efectivos y estables de obtener biocombustibles y bioproductos a partir de los efluentes de desecho. Esto se puede lograr mediante la degradación anaerobia de diferentes sustratos, como las vinazas. Estas opciones podrían ofrecer beneficios desde el punto de vista ambiental debido a la reducción en la emisión de gases invernadero y la preservación de recursos naturales como el carbón y los combustibles fósiles y desde un punto de vista social, ya que se lograría evitar el establecimiento de cultivos no alimenticios dedicados a la producción de biocombustibles y bioplásticos. La aplicación de las vinazas mezcaleras para la obtención de energía y productos de valor para la industria podría representar una potencial fuente de ingresos para las fábricas de mezcal instaladas en el estado de Zacatecas, reduciendo la carga económica que conlleva la disposición y tratamiento de las mismas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la fermentación oscura o anaerobia de la vinaza mezcalera proveniente del estado de Zacatecas, determinando el efecto que tienen el pH y la temperatura del inóculo sobre en el rendimiento de la obtención de bioproductos o biomateriales de interés para la industria.

Objetivos particulares

- Determinar los compuestos y los parámetros fisicoquímicos presentes en las vinazas.
- Analizar el efecto que tiene la variación del pH, de la temperatura y la concentración de glucosa en la obtención de bioproductos.
- Evaluar los diferentes inóculos que son típicamente usados para este proceso.

CAPÍTULO 1. Antecedentes

1.1. Industria de mezcal en México

El mezcal es una bebida que cuenta con la denominación de origen, la cual comprende territorios protegidos en los estados de Durango, Guanajuato, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas.

De acuerdo con el Plan Rector del sistema-producto (SAGARPA, 2006) agave-mezcal, en México existen tres grupos de productores de mezcal: el grupo I de los del altiplano potosino y zacatecano, el grupo II de los pequeños productores y el grupo III de los tecnificados modernos.

Según cifras del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM, 2010), México tiene alrededor de 330,000 hectáreas de agave en explotación, propiedad de 9,000 productores. En el Plan Rector Maguey-Mezcal, actualizado en 2006, se señala la existencia de 625 fábricas, 80 plantas envasadoras y 130 marcas de mezcal.

Estimaciones realizadas por la Cámara de la Industria del Mezcal en Zacatecas, señalan que para el año 2000 se produjeron 14.9 millones de litros de mezcal en México, de los cuales Oaxaca contribuyó con 8 millones (53.7%). (Financiera Rural, 2011)

En 2010, Oaxaca fue el principal productor de mezcal certificado a granel en el país al generar 52.83% del total nacional. El segundo lugar lo ocupó Zacatecas con 46.43 % de la producción, mientras que Durango, San Luis Potosí y Guerrero produjeron el 0.74% restante.

En la Tabla 1.1 se muestra la distribución de la producción de mezcal certificado por estado en litros.

Tabla 1.1. Distribución de la producción de mezcal certificado por estado en México.

Estados	Año 2006	Año 2007	Año 2008	Año 2009	Año 2010
Oaxaca	425,000.00	69,856.69	1,267,918.80	975,625.32	809,519.98
Zacatecas	9,120.00	146,733.79	527,236.12	813,398.90	711,317.32
Guerrero	9,832.50	30,263.00	15,473.40	2,412.10	2,606.26
San Luis Potosí	8,876.10	18,346.20	00.00	00.00	484.61
Durango	194.40	336.5	13,764.90	3,004.60	8,244.62
Tamaulipas	16,927.17	149.00	00.00	00..00	00.00
Guanajuato	00.00	00.00	00.00	00.00	00.00
	469,950.77	805,685.18	1,824,393.22	1,794,440.94	1,532,172.79

COMERCAM (2010)

1.2. Regiones productoras y proceso de producción del mezcal en Zacatecas

En Zacatecas desde tiempos de la colonia se desarrollaron dos regiones productoras de mezcal, en el sur la región conocida como los Cañones, donde se cultiva el agave Azul Tequilana, y en el sureste donde se usa el agave Salmiana.

Región de Pinos

Ubicada en sureste zacatecano donde existe un ecosistema típico de las zonas áridas donde de manera silvestre se desarrolla el agave salmiana. Las fábricas de mezcal en esta región son tradicionales, consisten en 5 ó 6 hornos de piedra con capacidad cada uno para cocer unas 40 toneladas de agave. Para la molienda se utiliza una piedra rodante que hace las veces de molino y los jugos escurren a lo largo de un caño para llegar a las tinas de fermentación, las cuales son de madera y se encuentran plantadas en la tierra. En esta misma área se mantienen los cultivos de bacterias a añadir. La destilación se hace en alambiques de cobre, los cuales son calentados con vapor generado por calderas. Las marcas de mezcal más conocidas de esta región son “La Pendencia”, “Saldaña” y “El Chino”.

Región de los Cañones

Al sur de Zacatecas se cultiva el agave Azul Tequilana. En esta región las mezcaleras evolucionaron a fábricas con equipos de acero inoxidable, debido a la influencia de la industria tequilera en Jalisco.

En la actualidad estas fábricas tienen autoclaves para cocimiento, calderas de vapor, varias tinas de fermentación de acero inoxidable, destiladores, tinas de acero para almacenar producto terminado y envasadoras semiautomáticas (COMERCAM, 2010).

Se llevan a cabo cinco procesos para la producción del mezcal (SAGARPA, 2006):

Cocimiento. El cocimiento del maguey permite que se genere un proceso de hidrólisis de los almidones y que se conviertan en glucosa y fructuosa. A las piñas ya cocidas se les llama mezcal.

Molienda. Existen diferentes formas de realizar la molienda del corazón ya cocido del maguey: macerado a mano, machacado en una tahona (molino que funciona por la fuerza de caballos o mulas), o en una desgarradora apoyándose además con una prensa. Al terminar la molienda se obtiene el jugo llamado mosto y el bagazo; el mosto es depositado o bombeado a las tinas de fermentación.

Fermentación. Mediante este proceso, que tiene una duración de 1 a 3 días, se logra la conversión de los azúcares contenidos en el mosto en alcohol. Ésta etapa se puede llevar a cabo en tinas de madera, pilas forradas de madera o en tanques de acero inoxidable. Al jugo fermentado se le conoce como "mosto muerto" y tiene una graduación alcohólica entre 6 y 7%.

Destilación. Los destiladores pueden ser de acero inoxidable o cobre. En esta operación se efectúa la separación del alcohol de los sólidos o líquidos indeseables. Al producto obtenido se le conoce como mezcal de primera destilación.

Como ya se había mencionado con anterioridad, es durante las etapas de destilación y rectificación que se generan las vinazas (Figura 1.1).

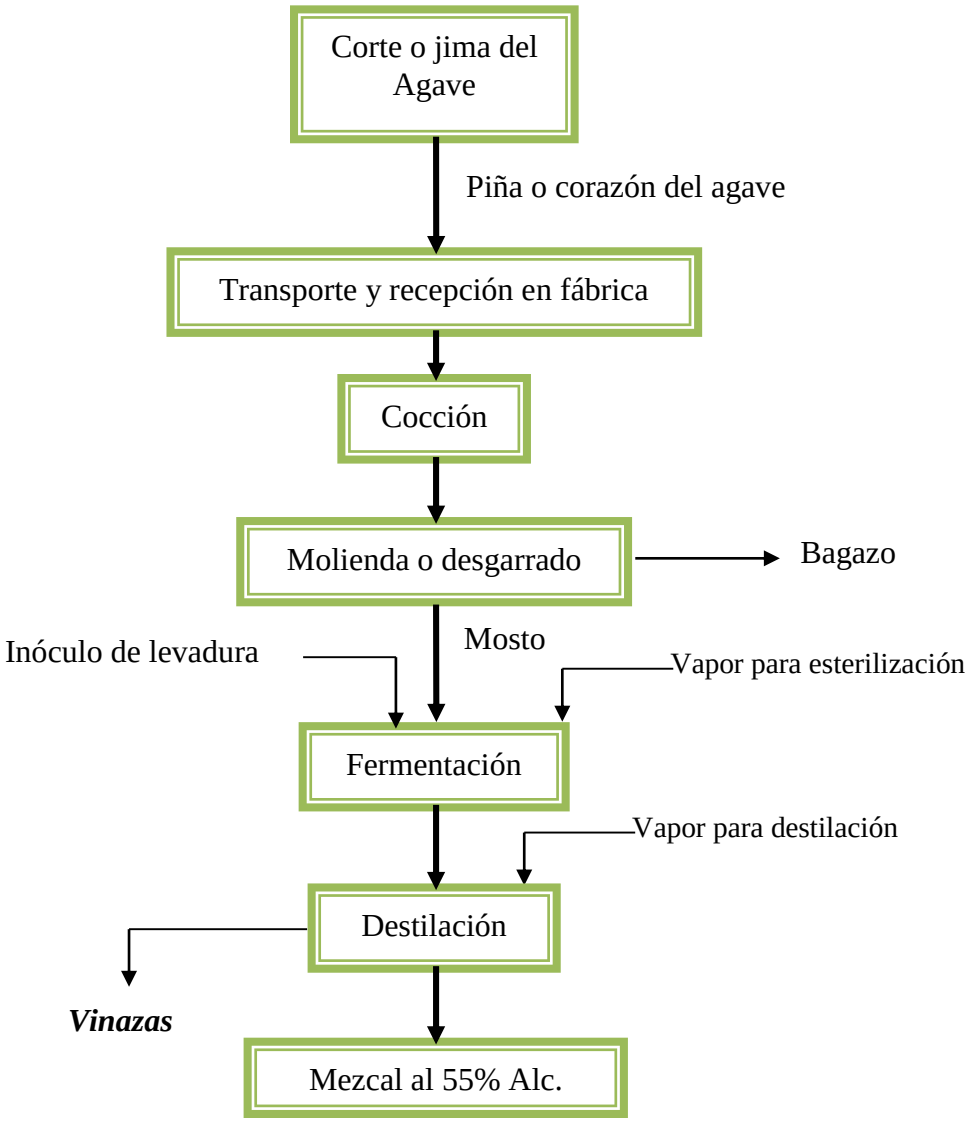


Figura 1.1. Proceso de producción del mezcal

1.3. Vinazas generadas en la industria mezcalera

Las Vinazas Mezcaleras (VM) son el producto residual de la destilación del mosto fermentado una vez que los componentes ricos en alcohol son separados por medio de temperatura y presión, parte de su volumen y variabilidad de carga orgánica proviene de otros efluentes menores como son el agua de limpieza de las tinas de fermentación (que contribuye significativamente en la carga teniendo valores de alrededor de 500 mg de DQO/L) y el agua

de enfriamiento de los condensadores que presenta un gran caudal, aumentando el volumen de las vinazas. Se puede estimar que en años anteriores en México se generaron de 14 a 27 millones de litros de VM, sin tratamiento esto podría ser equivalente a la contaminación anual de una población de 73,967 habitantes (López *et al.*, 2010).

1.3.1. Características

La composición y las características de las vinazas pueden variar, dependiendo del tipo de agave y las técnicas de destilación utilizadas para su producción. A pesar de esto, las VM comparten ciertas características: bajo pH en el rango de 3-5, y altos contenidos de materia orgánica (35,000-50,000 mg de O_2/L como demanda bioquímica de oxígeno o 100,000-150,000 mg de O_2/L como demanda química de oxígeno) la cual es usualmente tóxica y recalcitrante (Robles *et al.*, 2012). Las vinazas presentan una alta concentración de sólidos disueltos; cerca del 50% de este parámetro puede ser azúcar reducida, compuestos no volátiles provenientes de la etapa de destilación, compuestos fenólicos y polifenólicos, concentraciones relativamente altas de sales minerales que se reflejan en una conductividad eléctrica alta (250-300 dS m^{-1}) y cenizas. Su coloración café oscura es atribuida a la presencia de ácidos tánicos y húmicos, pero principalmente porque contienen melanoidinas que son estructuras poliméricas heterogéneas de elevado peso molecular. En la Tabla 1.2. se muestran algunos parámetros fisicoquímicos medidos a VM provenientes de tres fábricas de mezcal diferentes.

1.3.2. Impacto ambiental

Aproximadamente el 80% de las vinazas son descargadas directamente en los cuerpos de agua (ríos, lagos y reservas), al sistema de alcantarillado municipal o al suelo sin recibir el tratamiento adecuado para su disposición. Su alto contenido en sales puede conducir a la sodicidad y salinidad en el suelo causando el deterioro severo de su estructura, fertilidad y porosidad (Tejada *et al.*, 2009). Además la presencia de substancias como el ácido acético, ácido láctico, glicerina y nitrógeno amoniacal puede envenenar las cosechas (fitotoxicidad) (Yavuz, 2007). Los compuestos fenólicos y polifenólicos en ellas pueden inhibir la

germinación de semillas y dañar severamente las cosechas, así como afectar negativamente la actividad microbiana del suelo (Díaz *et al.*, 2002).

Tabla 1.2. Características de vinazas mezcaleras de diferentes destilerías.

Parámetro	FIM-1	FIM-2	FAM
pH	3.7	3.6	3.8
Conductividad(mS/cm)	2.6 ± 0.02	3.9 ± 0.03	4.2 ± 0.05
Color (475 nm)	4.6 ± 0.3	6.0 ± 0.2	10.6 ± 0.5
DQO (mg O_2/L)	56,230 ± 162	60,560 ± 1004	122,860 ± 2270
DBO_5 (mg O_2/L)	26,500 ± 710	22,000 ± 2830	33,600 ± 2260
Fenol (mg de ácido gálico/L)	478 ± 24	521 ± 16	542 ± 48
Fructuosa (mg/L)	14.8 ± 2.3	25.4 ± 4.2	50.0 ± 6.4
Nitrógeno Kjeldahl (mg de NH_3-N/L)	660 ± 37	843 ± 97	5,650 ± 503
Sólido totales (mg/L)	26,830 ± 1120	43,450 ± 1490	94,7130 ± 4055
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	3130 ± 168	3905 ± 156	8400 ± 504
Sólidos volátiles suspendidos (mg/L)	1130 ± 88	2500 ± 100	6850 ± 411
Sólidos suspendidos fijos (mg/L)	2000 ± 80	1405 ± 56	1550 ± 93
Fosfato (mg/L)	290 ± 5	850 ± 14	1705 ± 30
Sulfato (mg/L)	308 ± 14	947±12	842 ± 14

Robles *et al.* (2012)

FIM-1: Fábrica industrial de mezcal 1

FIM-2: Fábrica industrial de mezcal 2

FAM: Fábrica artesanal de mezcal.

Si las vinazas no son enfriadas antes de su descarga, ya que dejan la fábrica a temperaturas alrededor de los 50 a 80 °C, pueden incrementar la temperatura del agua y disminuir el oxígeno a niveles críticos para la supervivencia de los peces (Mane *et al*., 2006; Jiménez *et al*., 2005). Por otra parte, la turbiedad y el color asociados a los sólidos suspendidos y melanoidinas respectivamente, pueden impedir la penetración de la luz necesaria para la fotosíntesis e impactar severamente la vida acuática. Las concentraciones relativamente altas de nutrientes como el potasio y nitrógeno pueden causar eutrofización en cuerpos de agua, reservas y canales (Vlyssides *et al.*, 1997).

A pesar de los esfuerzos por adaptar y desarrollar procesos fisicoquímicos y biológicos para el tratamiento de este tipo de efluentes, estos han sido insuficientes para proveer una solución técnica viable y rentable que cumpla con la regulación de la Norma Oficial Mexicana NOM-064-ECOL-1994, dónde se establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de la destilería (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Límites máximos permisibles de contaminantes de los efluentes de la industria de la destilería

Parámetros	Límites máximos permisibles	
	Diarios[(a)]	**Instantáneos**[(b)]
pH (unidades de pH)	6.9	6.9
DBO (mg/L)	200	240
DQO (mg/L)	260	360
Grasas y aceites (mg/L)	10	20
Sólidos sedimentables (mg/L)	1.0	2.0
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	200	240
Fósforo Total (mg/L)	5	6
Nitrógeno Total (mg/L)	10	12

[(a)]Límite máximo permisible promedio diario. Son los valores, rangos y concentraciones de los parámetros que debe cumplir el responsable de la descarga, en función del análisis de una muestra compuesta de las aguas residuales provenientes de esta industria.
[(b)]Límite máximo permisible instantáneo. Son los valores, rangos y concentraciones de los parámetros que debe cumplir el responsable de la descarga, en función del análisis de muestras instantáneas de las aguas residuales provenientes de esta industria.

1.3.3. Tendencias en el tratamiento y aplicaciones de la vinaza

Es interesante notar que hay un gran vacío en la investigación de los tratamientos de las vinazas mezcaleras. Sin embargo, existe mucha información en el terreno del tratamiento y aplicación de otros efluentes recalcitrantes tóxicos con características similares a las de las vinazas mezcaleras, por ejemplo, vinazas de vino (Díaz *et al*., 2011; Sheli y Moletta, 2007; Perez *et al*., 2005), vinazas de la industria azucarera (Fernández *et al*., 2007; Pontetini y

Rodríguez, 2006) y de las aguas residuales provenientes de la industria del papel (Ortega *et al.*, 2006). Al revisar la literatura se encuentran las siguientes tendencias de tratamiento de estos efluentes:

1) Digestión anaerobia, combinado con oxidación química como pretratamientos (por ejemplo la ozonación) (Siles *et al*., 2011; Martín *et al*., 2002).
2) Tratamiento aerobio solo o con ozono dirigido a remover los compuestos fenólicos y el color, estos se han aplicado exitosamente (Rehman et al., 2006; Jiménez et al., 2005).
3) Tratamientos fisicoquímicos como el Fenton, electro-oxidación, oxidantes y otros, los cuales solo se han desarrollado a nivel laboratorio, han demostrado una remoción significativa de compuestos orgánicos recalcitrantes (Hadavifar *et al*., 2010; Beltrán *et al*., 2005)
4) Pretratamiento por hongos seguido de oxidación (O_3) o digestión anaerobia, esta combinación parece dar resultados atractivos (Siles *et al*., 2011; Martín *et al*., 2002; Kumar *et al*., 1998).

Dentro de las aplicaciones o posibles productos que se pueden obtener de las vinazas están:

1) Las vinazas se pueden co-compostar con residuos orgánicos sólidos (Rashad *et al*., 2010; Tejada *et al*., 2009; Díaz *et al*., 2002), principalmente aquellos provenientes de la actividades agrícolas y agro-industrias. Además de ser reparadores para el suelo con propiedades fertilizantes para mejorar la calidad del mismo en áreas típicamente áridas, aparenta ser una tecnología de bajo costo la cual encaja muy bien en las regiones rurales de países subdesarrollados donde tecnologías más sofisticadas son difíciles de adoptar, debido a sus altos costos y personal especializado
2) Los bioproductos como las enzimas lacasas utilizadas como blanqueador en la industria de la mezclilla y el papel (Singh et al., 2010; Kahraman y Yesilada, 2001) o la obtención de biomasa microbiana que es una fuente de alto

contenido de proteínas que se comercializaría como suplemento alimenticio de animales (Barrocal *et al*., 2010)

3) Generación de bioenergía a partir de metano (Moletta, 2005; Poggi *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2003) y biohidrógeno (Lay *et al*., 2010; Muñoz *et al*., 2010; Espinoza *et al*., 2009; Valdez *et al*., 2006).

1.4. Procesos de biodigestión

A través de diferentes tratamientos se puede lograr la transformación de residuos orgánicos a productos con valor agregado. El reciclaje de materia orgánica ha tomado relevancia debido al alto costo de los fertilizantes químicos, a la búsqueda de alternativas no tradicionales de energía, así como también, a la necesidad de vías de descontaminación y eliminación de residuos. A diferencia de la degradación aerobia, donde solo se obtienen como producto final CO_2 y agua, el proceso de biodigestión anaerobia u oscura destaca por su importancia para la producción de biogás rico en metano el cual puede utilizarse directamente en quemadores para hornos, estufas, alimentación de motores de combustión interna o indirectamente para la producción de electricidad, esta fermentación ha sido reconocida también como una ruta prometedora para la producción biológica de H_2 debido a su adaptabilidad a diferentes sustratos . En años recientes, se ha proyectado al hidrógeno y al metano como el futuro en combustibles por sus características no contaminantes y su uso altamente eficiente en celdas para generar electricidad (Levin *et al.*, 2004). Se consumen y producen cerca de 450 mil millones de m^3 de hidrógeno en el mundo y es comercializado principalmente como reactivo químico en la producción de fertilizante, para la refinación de diésel y para la síntesis industrial de amoníaco. Actualmente el 88% del hidrógeno comercial proviene de combustibles fósiles (gas natural, aceites pesados y carbón) a través de procesos termoquímicos tales como el reformado de hidrocarburos, gasificación de carbón y la oxidación parcial de hidrocarburos pesados (Ferreira *et al.*, 2012).

La diversidad en la fisionomía y en el metabolismo microbiano significa que existen diferentes maneras en las cuales un microorganismo puede producir gas, cada una con aparentes beneficios, así como problemáticas. Hay diferentes vías para la producción de biohidrógeno que pueden ser categorizadas, de manera general, en dos grupos: procesos

dependientes de la luz y los procesos de fermentación oscura. Los primeros incluyen la fotólisis directa o indirecta del agua usando algas/cianobacterias y la foto-descomposición (foto-fermentación) de compuestos orgánicos mediante bacterias fotosintéticas, mientras que un proceso que se lleva a cabo en ausencia de luz o independientemente de ella, es la producción de hidrógeno por fermentación oscura con bacterias anaerobias o anaerobias facultativas (Show *et al*., 2011; Hallenbeck *et al.*, 2009).

Aunque el proceso de fotólisis es altamente atractivo ya que involucra la transformación de la energía solar en hidrógeno con solo agua como substrato, en la práctica existen muchos retos que vencer. Actualmente problemas como la necesidad de grandes áreas superficiales para la acumulación de luz (debido a la baja eficiencia en la utilización de la misma) y la dificultad para lograr una producción continua de hidrógeno bajo condiciones anaerobias son temas a tratar (Show *et al.*, 2011).

Una desventaja del método de foto-fermentación, donde microbios fotosintéticos purpuras son capaces de generar hidrógeno a partir de diferentes sustratos, es que podría ser necesario el tratamiento previo a la producción fotosintética de biohidrógeno debido a la toxicidad o al color opaco del efluente. Por ejemplo, no es deseable que la concentración de la biomasa sea alta ya que se reduce la difusión de la luz a través del reactor.

Los sistemas anaeróbicos tienen ventajas sobre los métodos fotosintéticos ya que son más simples, menos costosos y producen hidrógeno en una proporción mayor además la producción de biohidrógeno es más estable ya que se lleva a cabo en ausencia de oxígeno. Por otro lado, se ha investigado también la posibilidad del acoplamiento de una etapa metanogénica al proceso de producción de H_2, ya que con este último proceso solo el 33% de los electrones de hexosa son utilizados, esto implica que el 66% de los electrones del sustrato permanecen como Ácidos Grasos Volátiles (AGV). Una etapa metanogénica posterior a la producción de H_2 permitiría la conversión de AGVs a metano, incrementando la cantidad de sustrato convertido a energía renovable (Escamilla *et al*., 2011).

1.5. Fermentación oscura

En la fermentación anaerobia, el proceso de producción del biogás se desarrolla en ausencia de oxígeno mediante la degradación y estabilización de materia orgánica por microorganismos. La fermentación oscura bajo condiciones anaerobias parece ser el más favorable entre los bioprocesos para la obtención de hidrógeno ya que puede ser llevada a cabo a velocidades mayores y menores costos usando diferentes tipos de sustratos orgánicos y aguas residuales; además tiene una baja producción de lodos, bajos requerimientos de energía y posible recuperación de la misma (Guo *et al*., 2010; Angenent *et al*., 2004). En los procesos anaerobios, los microorganismos generan mucho menos energía que en los aerobios y, para suplir sus necesidades de energía, metabolizan una mayor cantidad de azúcares; por consiguiente se obtienen más metabolitos.

El hidrógeno es un componente esencial en el metabolismo de muchos microorganismos anaerobios, así como de algunos aerobios. En ausencia de aceptores de electrones externos algunos organismos disponen el exceso de electrones reduciendo los protones a hidrógeno. En otras palabras, cuando los organismos crecen en sustratos orgánicos, estos sustratos son degradados por oxidación con el fin de proveer los bloques de construcción y la energía necesarios para lograr este crecimiento. Esta oxidación genera electrones, los cuales necesitan ser eliminados para mantener la neutralidad eléctrica; en condiciones aerobias el oxígeno es reducido y se produce agua, en ambientes anaerobios otros compuestos necesitan actuar como aceptores de electrones (por ejemplo: los protones) que son reducidos a hidrógeno molecular (H_2). La capacidad de reducir otros aceptores de electrones diferentes al oxígeno requiere la presencia de enzimas específicas en el microorganismo, estas enzimas claves son las hidrogenasas. Hay dos tipos principales: las Ni-Fe hidrogenasa y las Fe-hidrogenasa. En general, la Ni-Fe hidrogenasa es propensa a catalizar la oxidación del hidrógeno y la Fe hidrogenasa es altamente activa en la reducción de los protones.

El proceso de fermentación anaerobia de la materia orgánica se produce en fases secuenciales desde las primeras descomposiciones microbianas de la materia orgánica hasta la estabilización del producto con la producción del denominado biogás. A pesar de ser

agrupadas en tan sólo 3 etapas, la digestión anaerobia es una serie de procedimientos y reacciones específicas en las que intervienen o interactúan por lo menos 11 grupos microbianos (Almeida *et al.*, 2011). En la Figura 1.2 se muestra de manera esquemática las interacciones microbianas que se dan durante el proceso de degradación anaerobia.

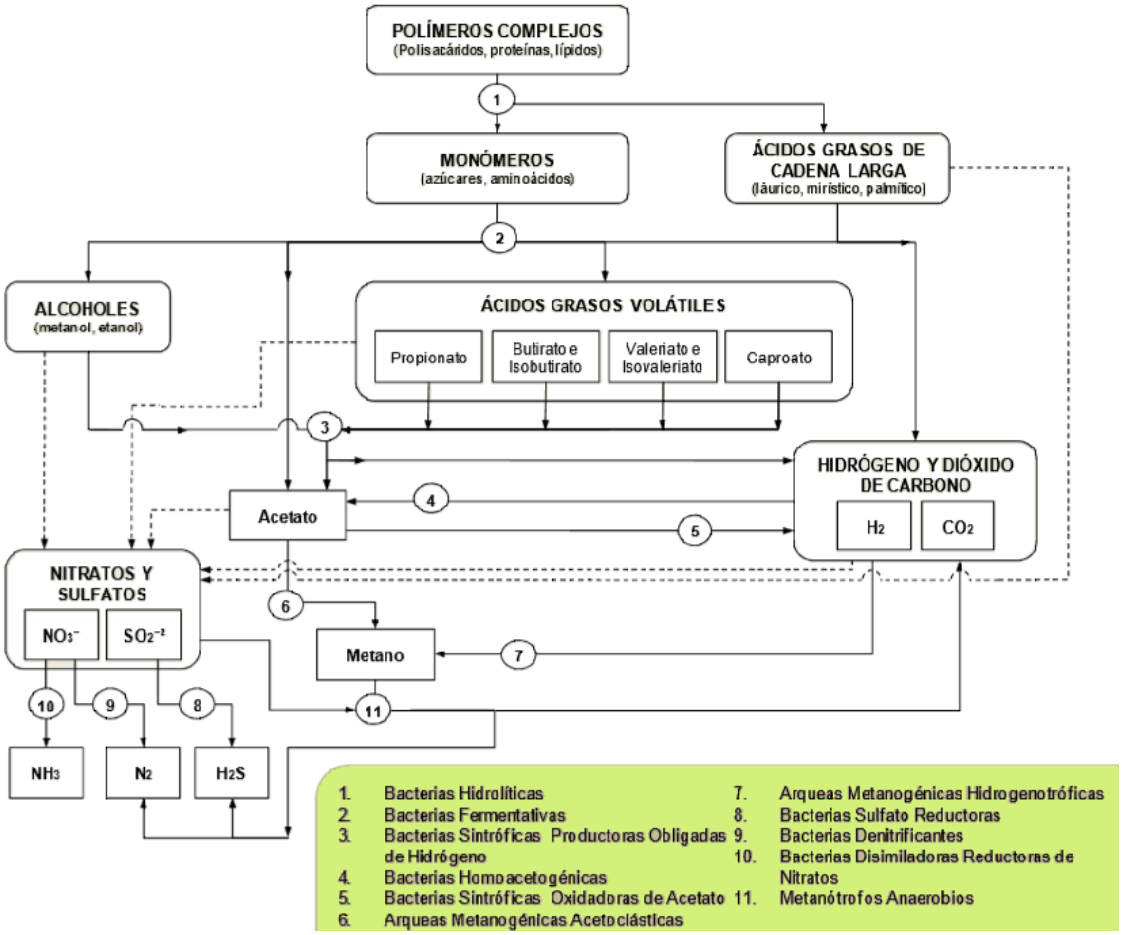


Figura 1.2. Interacciones microbianas en el proceso de degradación anaerobia (Almeida *et al.*, 2011)

Fase de hidrólisis. La hidrólisis es el primer paso necesario para la degradación de sustratos orgánicos complejos. En esta etapa se realiza la transformación enzimática de compuestos con alto peso molecular como los carbohidratos, proteínas y lípidos en otros compuestos aptos para ser utilizados por los microorganismos como fuente de energía y como transformación a carbono celular. La hidrólisis de estos materiales orgánicos complejos es efectuada por medio de las enzimas extracelulares, como son la celulosa, amilasa o proteasa. Los productos principales de la degradación de la celulosa son la celobiosa y glucosa,

mientras que la hemicelulosa produce pentonas, hexonas y ácidos urónicos. Las proteínas son hidrolizadas en proteosa, peptonas, péptidos y aminoácidos. La degradación de los lípidos en ambientes anaerobios consiste en una ruptura inicial de las grasa en los correspondientes ácidos grasos de cadena larga y moléculas de glicerol. La etapa hidrolítica puede ser el paso limitante de la velocidad del proceso global.

Fase de acidogénesis. Durante la acidogénesis de los carbohidratos, las especies principales responsables de la producción de hidrógeno biológico son *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*. La ruta metabólica de la fermentación que produce acetato y butirato son las principales responsables de la producción de H_2, mientras que las rutas metabólicas que producen etanol, lactato y propionato no producen hidrógeno porque consumen los intermediarios bioquímicos hidrogenados, como el dinucleótido nicotinamida adenina (NADH).

Dependiendo de la ruta metabólica usada por los microorganismos y los productos finales de la fermentación, el rendimiento de H_2 puede ser variable. Cuando la conversión anaerobia se lleva a cabo en fase líquida la etapa de acidogénesis suele ser la más rápida. La flora acidogénica está constituida en mayor proporción por bacterias anaerobias estrictas, como la *Ruminicola clostridium* y *Bifido bacterium*, y bacterias anaerobias facultativas (entero-bacterias, *Streptococos*, *Bacillus*, etc.). Los azúcares degradados siguen la ruta clásica de la glucólisis. El producto final de la glucólisis es el piruvato (por cada molécula de glucosa se forman dos de piruvato). Esta molécula se considera clave para muchos tipos de fermentación, ya que, a partir de ella, se produce una gran cantidad de compuestos dependiendo del microorganismo usado y las condiciones ambientales en las que se lleve a cabo el proceso. Algunos de estos productos pueden ser: ácido láctico, acético, cítrico, butírico o propiónico, así como etanol, butanol, acetona, H_2O y CO_2.

Para la estimación de los rendimientos teóricos del hidrógeno obtenido por fermentación es ampliamente aceptada como referencia la reacción de la biotransformación de la glucosa a acetato. De acuerdo a esta ecuación (1.1) el rendimiento teórico máximo del biohidrógeno producido por la fermentación de la glucosa es 4 moles de H_2 por mol de glucosa consumida (Ntaikou *et al.*, 2010).

$$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 4H^+ + 4H_2 \qquad (1.1)$$

Este rendimiento teórico máximo también se puede alcanzar a través de dos etapas, la fermentación de glucosa a acetato y formiato, como lo muestran las ecuaciones 1.2 y 1.3 (Ntaikou *et al*., 2010).

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCOO^- + 4H^+ + 2H_2 \qquad (1.2)$$

$$2HCOOH \rightarrow 2CO_2 + 2H_2 \qquad (1.3)$$

Fase acetogénica. En la etapa de acetogénesis productos como el ácido láctico, el propiónico, butírico, etanol y otros Ácidos Grasos Volátiles (AGV) son degradados por las bacterias productoras de hidrógeno, ya que estás pueden o no ser utilizados directamente por los microorganismos metanogénicos. La conversión de estos compuestos intermedios es crucial para la exitosa producción de metano. Dentro de las poblaciones microbianas que intervienen en esta fase se distinguen tres tipos: a) Bacterias fermentativas. En cultivo puro, estas bacterias producen alcohol, acetato e hidrógeno; tienden a orientar su metabolismo hacia la producción de acetato cuando la presión parcial de hidrógeno es baja, b) Bacterias productoras de hidrógeno. Los principales géneros son *Syntrophomonas y Syntrophobacter*, los cuales degradan primeramente el butirato y valerato, posteriormente degradan el propianato. Estas bacterias son de desarrollo lento y cuando la presión parcial de hidrógeno es baja degradan los AGV y los alcoholes a acetato, c) Bacterias homoacetogénica. Producen acetato como único metabolito, esto puede ser a partir de la mezcla de H_2/CO_2 o azúcares.

Las siguientes ecuaciones describen en forma general el proceso de acetogénesis, a partir de ácido propiónico (1.4), butírico (1.5) y etanol (1.6).

$$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3H_2 \qquad (1.4)$$

$$CH_3(CH_2)_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3OOH + 2H_2 \qquad (1.5)$$

$$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H_2 \qquad (1.6)$$

Fase metanogénica. La metanogénisis es la etapa terminal de la digestión anaerobia donde los compuestos intermediarios de etapas anteriores se convierten en metano y dióxido

de carbono. Alrededor del 70% de metano obtenido es por la reacción de acético y el restante es a partir de la combinación H_2/CO_2. Estos microorganismos son consumidores de hidrógeno. Se conoce que la fermentación metánica se basa en el transporte de equivalente de reducción desde un sustrato, donador de hidrógeno o electrones, al dióxido de carbono o grupos metilo, quedando reducidos a metano. Como donadores actúan: hidrógeno, dióxido de carbono, metanol, acetato, formiato, entre otras especies.

Inevitablemente, el rendimiento de los sistemas de biorreactores que generan hidrógeno y su operación está determinado por numerosos factores. Estos factores están asociados con las condiciones ambientales, condiciones de operación del proceso y condiciones químicas.

1.5.1. Rutas metabólicas en la fermentación anaerobia

Durante la acidogénesis de los carbohidratos, las especies principales responsables de la producción de hidrógeno biológico (*Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*), presentan en general el metabolismo representado por la ruta metabólica bioquímica de la Figura 1.3.

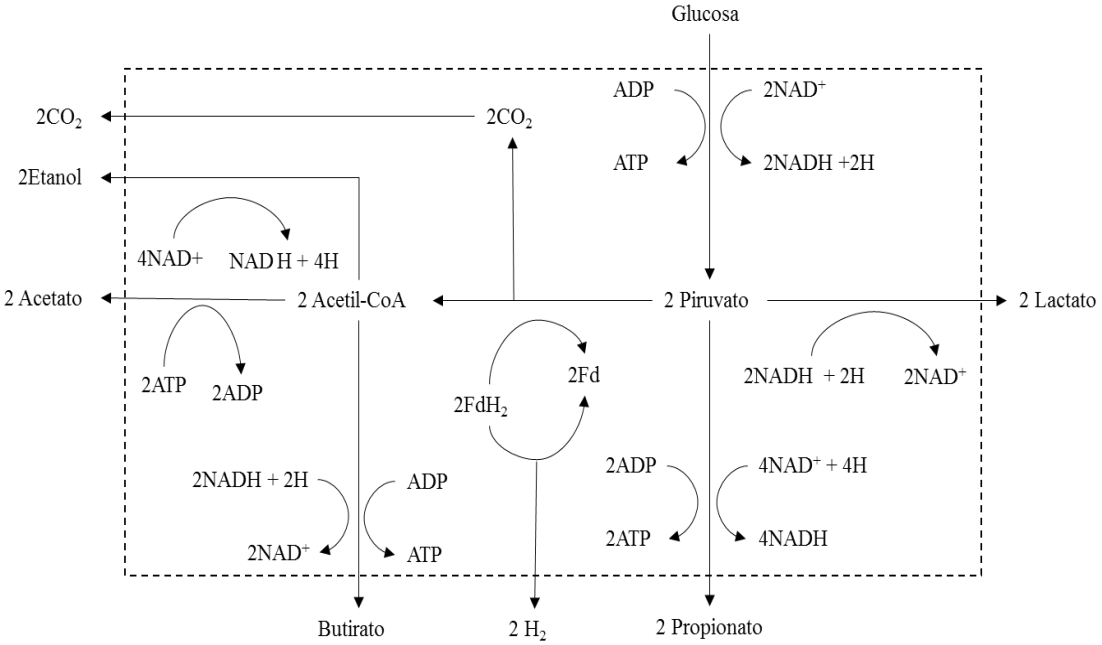


Figura 1.3. Ruta metabólica bioquímica de la acidogénesis de carbohidratos (Aceves-Lara 2007)

Las rutas de fermentación de producción de H_2 principales son la butanol-butírica y la ácida mixta. El primer paso en ambas fermentaciones es la glucólisis en la cual la glucosa es convertida a piruvato y el NADH es formado. El piruvato puede después convertirse a Acetil-Coenzima A (Acetil-CoA), dióxido de carbono e hidrógeno por la piruvato-ferredoxin óxido reductasa y por la hidrogenasa. El piruvato puede también ser convertido a Acetil-CoA y formato, el cual puede ser fácilmente transformado a hidrógeno y CO_2. El Acetil-CoA es finalmente alterado a algunos metabolitos solubles como acetato, butirato y etanol.

1.5.2. Fermentación ácido-mixta

En condiciones anaerobias, y en ausencia de aceptores finales de electrones, miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia, Enterobacter, Salmonella, Klebsiella, and Shigella*) fermentan la glucosa a través de la ruta ácida mixta. Esta fermentación produce ácido acético, etanol, H_2, CO_2 y proporciones diferentes de ácido láctico y propiónico (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Productos de la fermentación ácida mixta

Productos (mmol/100 mmol de glucosa)	*Escherichia Coli*	*Enterobacter Aerogenes*
Lactato	108.8	53.4
Etanol	41.3	59.4
Acetato	32.0	10.1
Formato	1.6	5.5
CO_2	54.0	126.9
H_2	45.2	44.2
2,3-Butanodiol	0	34.6

Moat (2002)

En esta fermentación la enzima Liasa Piruvato-Formiato (LPF) convierte el piruvato a acetil-CoA y ácido fórmico. El ácido fórmico puede ser degradado en hidrógeno y dióxido de carbono por otra enzima llamada Liasa Hidrógeno-Formato (LHF). De hecho la producción de hidrógeno por la bacteria no es llevada a cabo a menos que el metabolismo activo cause la baja del pH y con esto la LHF sea inducida, la conversión de ácido fórmico a

hidrógeno mitiga la condición ácida. Esta condición ácida también favorece la conversión de piruvato a ácido láctico, una molécula de éste es producida en vez de dos, una de ácido fórmico y una de acético. Obviamente, esta reacción desvía la ruta productora de hidrógeno. La producción de succinato es también posible, pero normalmente representa sólo una fracción menor en el total de los productos de la fermentación. El NADH formado debe ser oxidado con la producción de un compuesto orgánico reducido, generalmente el etanol. Debido a que máximo 2 moléculas de formato son producidas a partir de 2 moléculas de piruvato, los anaerobios facultativos tienen un rendimiento teórico máximo de 2 mol de H_2 por mol de glucosa. En la Figura 1.4 se muestra la ruta metabólica de este tipo de fermentación (Hallenberck 2009).

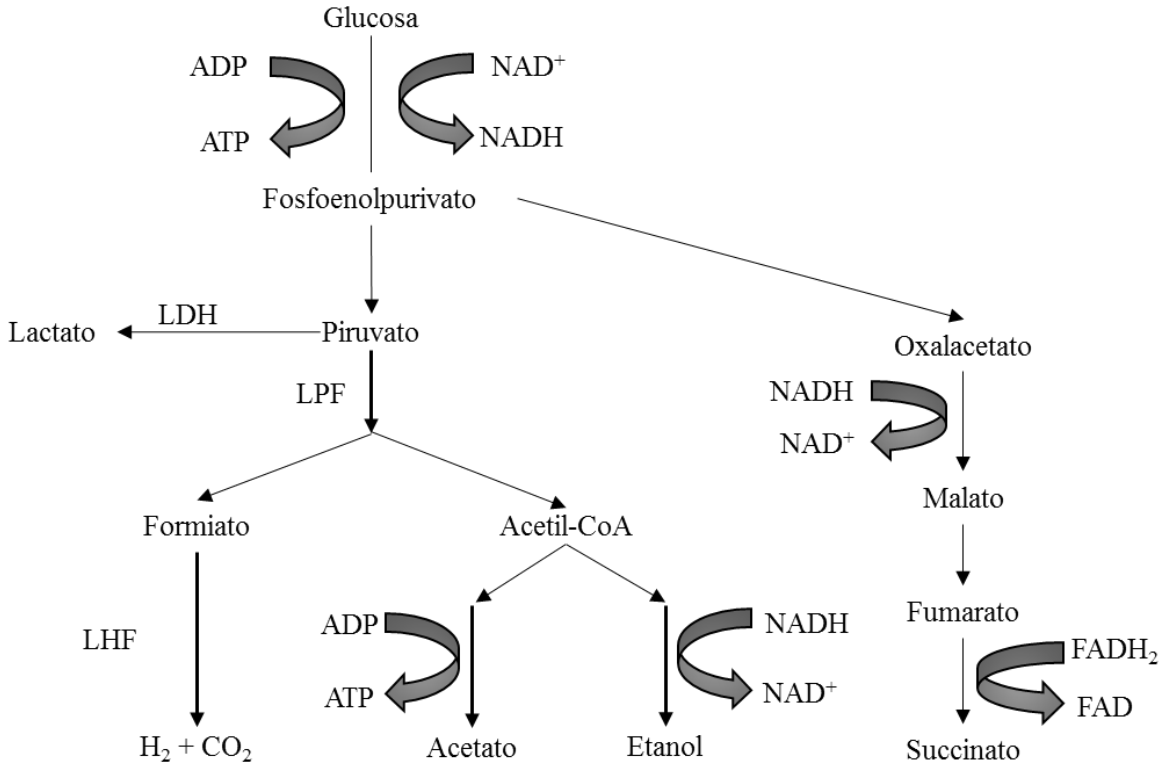


Figura 1.4. Fermentación ácido-mixta (Hallenberck 2009)

Hay dos tipos de fermentaciones ácido-mixtas. En el primer tipo son producidos el etanol y una compleja mezcla de ácidos, particularmente acético, láctico, succínico y fórmico. Este patrón puede ser visto en *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus* y otros géneros. El

segundo tipo es característico de *Enterobacter*, *Serratia*, *Erwinia* y algunas especies de *Bacillus*. En ésta son formados la acetoína, el 2,3 butanodiol y pequeñas cantidades de ácido; esta última aparece representada en la Figura 1.5.

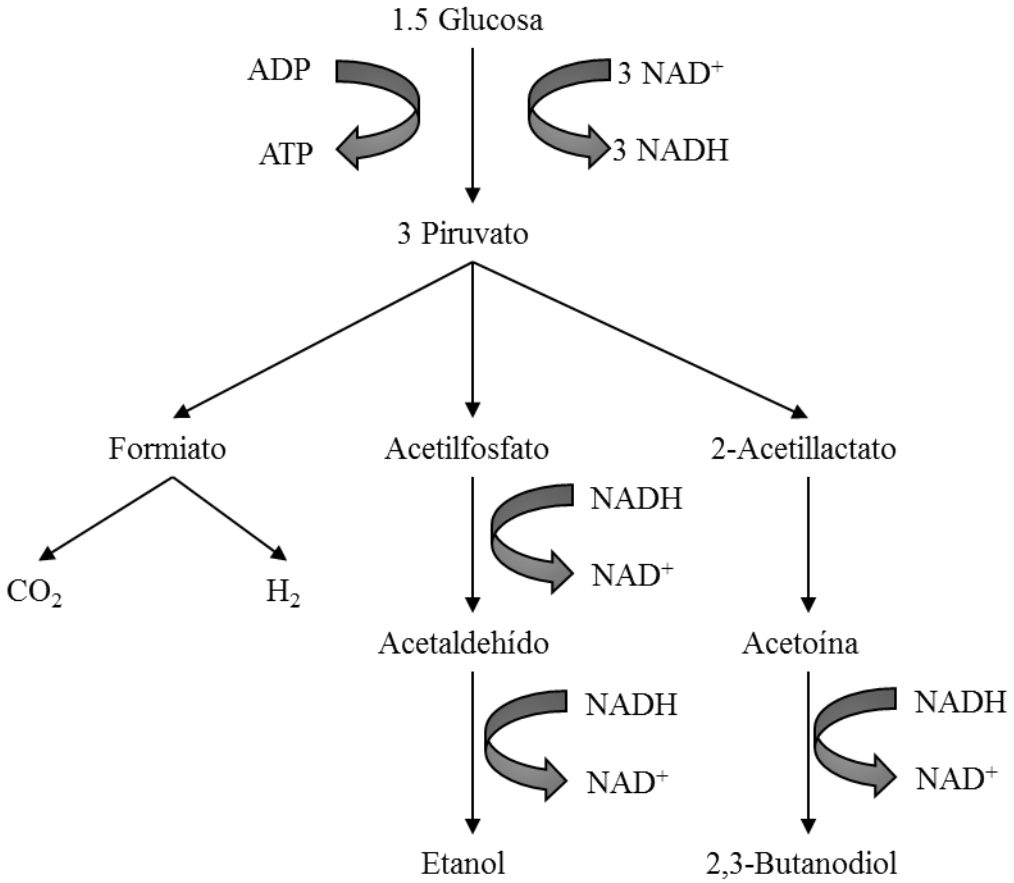


Figura 1.5. Fermentación butanodiólica (Hallenberck 2009)

1.5.3. La ruta Wood-Ljungdahl

Algunas bacterias anaerobias, incluyendo los metanogénicos arquea y los acetogénicos, convierten el CO_2 en carbono celular por la ruta Wood-Ljungdahl, también llamada "ruta del acetil CoA" o la "ruta del monóxido de carbono deshidrogenasa". Las bacterias acetogénicas usan esta ruta como su principal medio para generar la energía necesaria para su crecimiento. Las bacterias homoacetogénicas son microorganismos

estrictamente anaerobios, los cuales catalizan la formación de acetato a partir de hidrógeno y dióxido de carbono.

El total de la síntesis se encuentra esquematizada en la Figura 1.6. Donde FH_4 es tetrahidrofolato y CH_3-Co-E se refiere a la proteína corrinoide metilada/Fe-S.

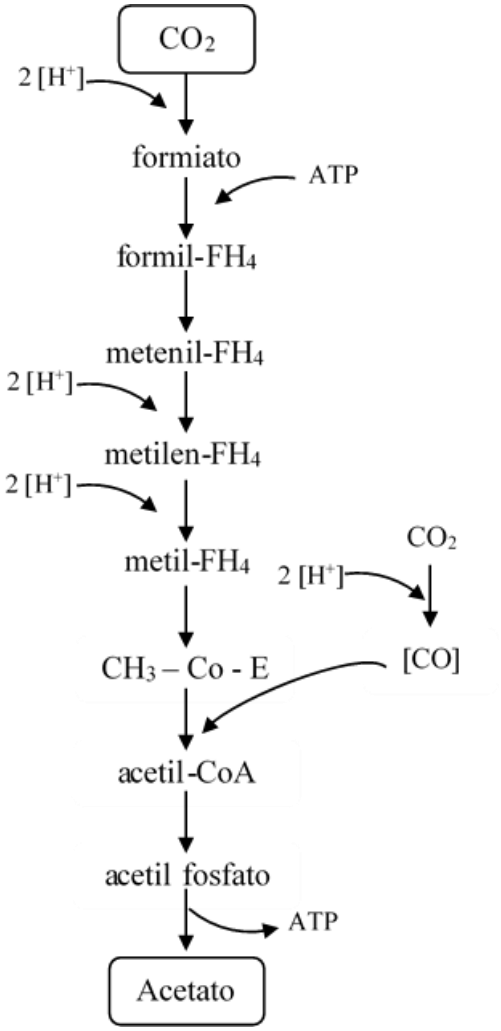


Figura 1.6. Síntesis del acetato a partir del CO_2 (Almeida *et al.*, 2011)

1.5.4. Escherichia Coli

Escherichia Coli es un microorganismo anaerobio facultativo que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por consiguiente en las aguas negras. Sus rutas metabólicas han sido ampliamente estudiadas y ya son conocidas.

Una parte de piruvato puede ser transformado a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), pero la mayoría de éste es hidrolizado por la liasa piruvato-formato (PFL) en acetil-CoA y formato. La PFL divide el piruvato sólo cuando las células crecen de manera fermentativa, mientras que la PDH (piruvato deshidrogenasa) descarboxila al piruvato bajo condiciones aerobias. Ambas enzimas son activadas bajo condiciones limitadas de oxígeno. El acetil-CoA es parcialmente convertido en etanol y acetato. El formato es el donador de electrones en el metabolismo anaerobio para la reducción de nitrato o puede ser transformado en hidrógeno por el complejo liasa formato-hidrógeno (FHL) (Dávila-Vázquez *et al.* 2007). El FHL es un complejo multienzimático responsable de la producción molecular de H_2 a partir de formato bajo condiciones anaerobias y en ausencia de aceptores de electrones como el oxígeno y el nitrato. En la *E. Coli* hay tres tipos de formato deshidrogenasa (FDH) denominados O, N y H. La FDH-H forma parte del complejo FHL. Las hidrogenasas O y N también consumen formato pero no producen hidrógeno.

La Figura 1.7 muestra la ruta metabólica general que sigue *E. Coli* hasta H_2 a partir de la glucosa (Dávila-Vázquez *et al.* 2007).

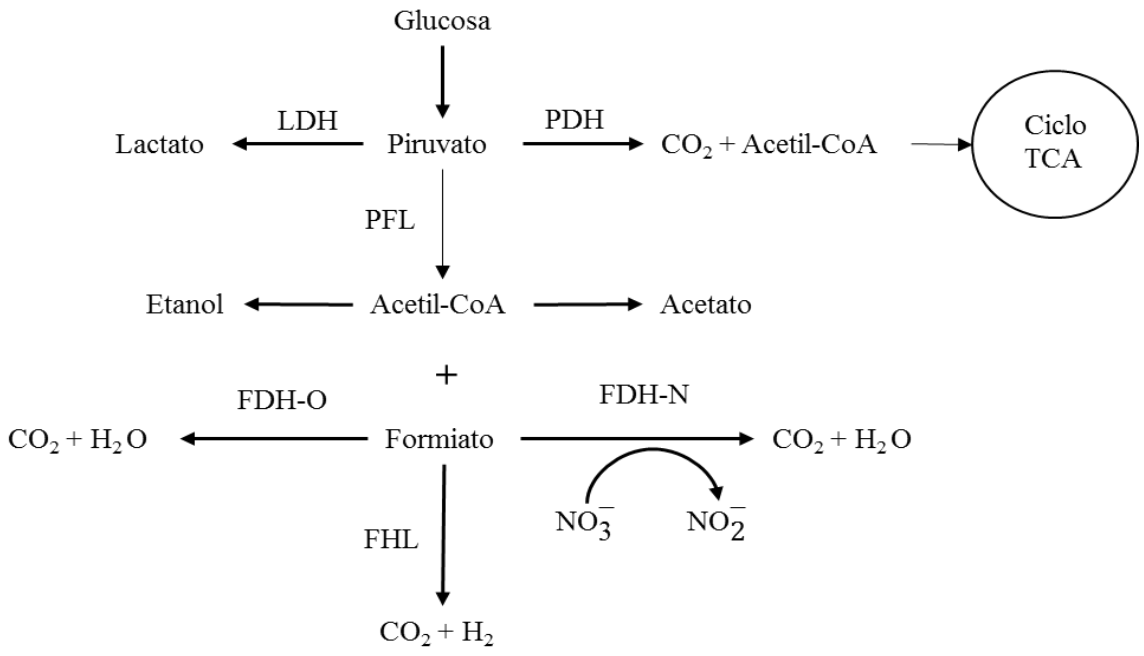


Figura 1.7. Ruta metabólica de producción de hidrógeno por *E. coli*. (Dávila-Vázquez *et al.*, 2007*)*

1.5.5. Clostridium sp

En anaerobios estrictos, como *Clostridium*, el piruvato es convertido a acetil-CoA y CO_2 a través del piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR) y está oxidación requiere la reducción de la ferredoxina. La ferredoxina es una proteína que contiene hierro e interviene en el proceso del transporte de electrones. La ferredoxina reducida transfiere electrones a la hidrogenasa, impulsando la producción de hidrógeno. Esto asegura la producción de dos moles de hidrógeno por mol de glucosa consumido (Hallenbeck 2009). El acetil-CoA es convertido a acetil fosfato lo que resulta en la formación de ATP y la excreción de acetato. Las ecuaciones 1.7, 1.8 y 1.9 son relevantes:

$$\text{PFOR: } 2\text{piruvato} + 2\text{CoA} + 2\text{Fd(oxidado)} \rightarrow 2\text{AcetilCoA} + 2CO_2 + 2\text{Fd(oxidado)} \quad (1.7)$$

$$\text{NFOR: } 2\text{NADH} + 2\text{FD(oxidado)} \rightarrow 2NAD^+ + 2\text{Fd(reducido)} \quad (1.8)$$

$$4\text{Fd(reducido)} \rightarrow 4\text{Fd(oxidado)} + 4H_2\text{(vía hidrogenasa)} \quad (1.9)$$

A diferencia de los organismos que llevan a cabo las fermentaciones ácido-mixtas, los anaerobios fermentativos como *Clostridium* poseen una ruta metabólica que les permite, bajo condiciones apropiadas, empatar la oxidación del NADH con la reducción del protón a hidrógeno. Estos organismos son potencialmente capaces de producir hidrógeno adicional mediante la re-oxidación del NADH generado durante la glucólisis, hasta dos moléculas adicionales de H_2 pueden generarse por esta ruta. Por lo tanto estos organismos son capaces en teoría de producir un máximo de $4H_2$/glucosa. Esta formación de hidrógeno a partir de electrones derivados del NADH es posible solamente a presiones parciales de hidrógeno muy reducidas. La inhabilidad para re-oxidar el NADH por esta ruta lleva a su oxidación por otras que producen compuestos orgánicos reducidos; comúnmente ácido butírico, pero también butanol y acetona (Hallenbeck 2009).

Cuando el producto final de la fermentación es acetato o acetona se puede obtener el mayor rendimiento de 4 moles de H_2 por mol de glucosa como lo muestra las ecuaciones 1.10 y 1.11.

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 \quad (1.10)$$

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3COCH_3 + 3CO_2 + 4H_2 \quad (1.11)$$

Como se puede observar en la ecuación 1.12 la producción máxima teórica del hidrógeno es de 2 moles de H_2 por mol de glucosa cuando el producto final de la fermentación es el butirato.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 \quad (1.12)$$

Los productos formados a partir del acetil-CoA como el acetato, butirato, lactato o etanol en anaerobios estrictos determinan el rendimiento teórico de hidrógeno (Vardar-Schara y Wood 2007). Cuando los alcoholes son los productos finales, se presentan rendimientos más bajos ya que éstos contienen átomos de hidrógeno adicionales que no han sido convertidos a gas hidrógeno. Cuando se produce lactato existe consumo de hidrógeno lo que disminuye los rendimientos (Dávila-Vázquez *et al.* 2007).

La Figura 1.8 muestra la ruta metabólica de *Clostridium* a partir de glucosa (Hallenbeck 2009).

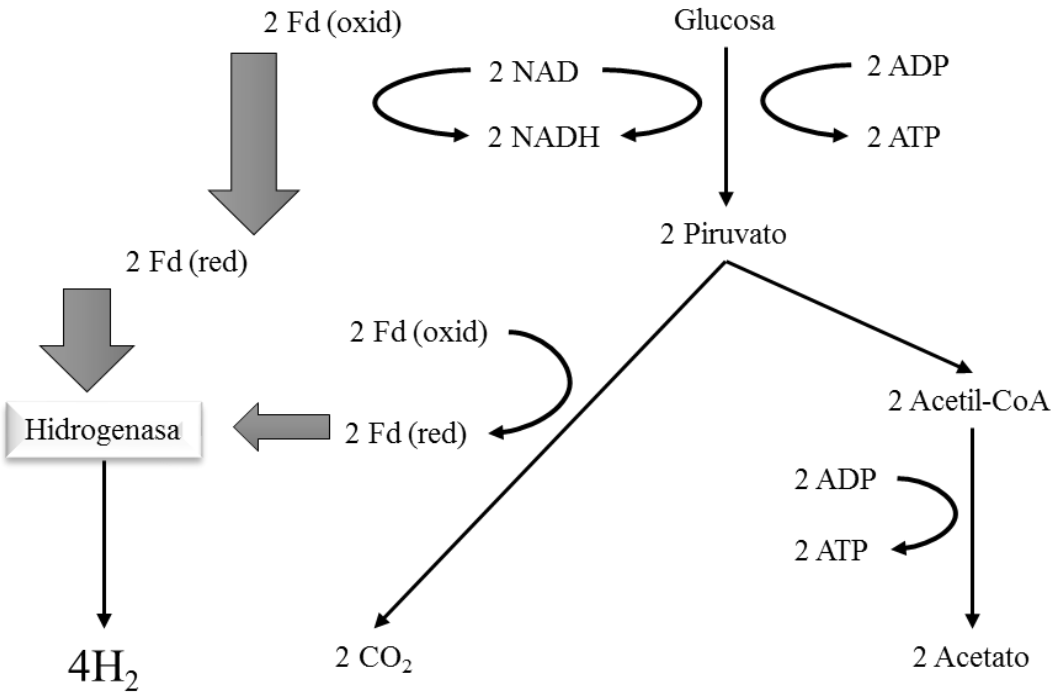


Figura 1.8. Ruta metabólica de Clostridium (Hallenbeck 2009)

En muchos microorganismos los rendimientos de hidrógeno se reducen porque éste se utiliza para la producción de otros metabolitos o por la presencia de hidrogenasas consumidoras de hidrógeno lo cual consume parte del hidrógeno producido (Hallenbeck 2009). Para lograr la maximización en los rendimientos, el metabolismo celular debe direccionarse hacia rutas que eviten la producción de alcoholes (etanol) y de ácidos reducidos (lactato) y que produzcan ácidos grasos volátiles (acetato y butirato).

1.6. Inhibición del proceso anaerobio

La principal causa de la falla o el mal funcionamiento en los digestores anaerobios es la concentración de diversas sustancias inhibidoras. Estas sustancias pueden formar parte de las materias primas que entran al digestor o pueden ser subproductos de la actividad metabólica de los microorganismos anaeróbicos. Entre las más comunes se encuentra el amoníaco, los sulfuros, los iones de metales ligeros y los metales pesados, y ciertos compuestos orgánicos. La literatura acerca de la digestión anaerobia muestra una variación considerable en cuanto a los niveles de inhibición/toxicidad para la mayoría de las sustancias (Almeida *et al.*, 2011). La razón principal de estas variaciones es la complejidad del proceso de digestión anaerobia donde mecanismos tales como antagonismo, sinergismo y aclimatación puede afectar significativamente al fenómeno de inhibición. Una sustancia puede juzgarse inhibitoria cuando la tasa de crecimiento de alguno o algunos de los grupos microbianos involucrados es disminuido o se detiene totalmente, produciéndose un cambio adverso en la población en general (Chen *et al*., 2008). A continuación se revisarán los inhibidores más comunes del proceso.

Amoníaco

El amoníaco es producido por la degradación biológica de materia nitrogenada, mayormente en forma de proteínas y urea. El ion amonio $\left(NH_4^+\right)$ y el amoniaco libre (NH_3) son las dos formas principales de nitrógeno amoniacal inorgánico presentes en las soluciones acuosas, se ha sugerido que el NH_3 posee un poder inhibidor mayor al de NH_4^+, ya que es permeable a través de la membrana celular. Entre todos los tipos de microorganismos que participan en el proceso de digestión anaerobia, los metanogénicos son los menos tolerantes

y los que probablemente cesen su crecimiento debido a la inhibición por amoníaco. Se ha postulado que los efectos que el amoníaco tiene sobre la metalogénesis son dos: a) inhibe directamente la síntesis de las enzimas necesarias para la producción de metano y b) la molécula hidrofóbica del amoniaco se difunde de manera pasiva dentro de la célula, causando un desequilibrio protónico o una deficiencia de potasio. Se ha reportado que concentraciones entre 80 y 100 mg/L de amoniaco inhiben totalmente cultivos metanogénicos no adaptados creciendo a pH 7.5 y condiciones mesofílicas (Aspé *et al.*, 2001). Generalmente es aceptado que concentraciones por debajo de 200 mg/L son beneficiosos para el proceso anaerobio ya que el nitrógeno es un nutriente esencial los microorganismos envueltos en éste.

Durante el tratamiento de las aguas residuales tanto el pH como la temperatura afectan el crecimiento de los microorganismos y la concentración total de nitrógeno amoniacal. Un incremento en el pH podría resultar en un aumento en la toxicidad debido a un nivel más alto en el potencial de ionización del nitrógeno amoniacal $\left(NH_4^+\right)$. Un control de la temperatura dentro del rango óptimo de crecimiento del microorganismo puede reducir la toxicidad por amoníaco. Un incremento en la temperatura, en general, tiene un efecto positivo en el ritmo metabólico de los microorganismos pero también resulta en una mayor concentración de amoníaco. En el rango termófilo de temperaturas el proceso de fermentación con grandes concentraciones de amoníaco se vuelve más inestable y más fácil de inhibir. Un deceso en la temperatura de operación de 60 ºC a 37 ºC en digestores anaerobios con una alta concentración de amoníaco provee una baja en la inhibición causada por amoníaco libre permitiendo rendimientos mayores de biogás (Chen *et al.*, 2008).

Sulfuro

Un constituyente común en las aguas de desecho es el sulfuro. En las reacciones de degradación anaerobia el sulfato produce sulfito y H_2S gracias a la acción de las Bacterias Sulfato-Reductoras (BSR). Como consecuencia se dan dos estados de inhibición por la reducción del sulfato: el primero es debido a la competencia de las BSR por sustancias orgánicas e inorgánicas comunes, lo cual suprime la producción de metano; el segundo es la inhibición causada por la toxicidad que ejerce el sulfuro a diversos grupos de bacterias. Las BSR son muy diversas en cuanto a sus rutas metabólicas se refiere y los compuestos que

pueden ser degradados completa o parcialmente por las BSR incluyen ácidos grasos de cadena larga o cadena ramificada, etanol y otros alcoholes, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos. Durante el tratamiento de aguas con altos niveles de sulfato compiten con las bacterias fermentativas o acidogénicas por los productos de la hidrólisis, con las bacterias acetogénicas por sustratos intermediarios como los ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes, y con las bacterias metanogénicas por los sustratos menos complejos como hidrógeno y acetato (Chen *et al.*, 2008). El resultado de esta competencia determinará la proporción de ácido sulfhídrico y metano en el biogás producido.

Iones de metales ligeros y presencia de metales pesados

Metales ligeros como el sodio, calcio, potasio y magnesio se encuentran presentes en los afluentes de los digestores anaerobios. Éstos pueden ser liberados por la descomposición de la materia orgánica o pueden ser agregados en los químicos que se utilizan en el ajuste de pH. Los iones de metales ligeros son necesarios para el crecimiento microbiano, y por lo tanto, afectan el ritmo de crecimiento específico como cualquier otro nutriente. Reportes previos señalan diferentes valores de inhibición para algunos cationes, mayormente se reportan Ca^{2+}, K^{+} y Na^{+}. Los valores inhibitorios reportados son 4600 mg/L, 4800 mg/L y 7400 mg/L, respectivamente (Almedia *et al*., 2011). Cantidades excesivas de calcio conduce a la precipitación de carbonatos y fosfatos lo cual podría resultar en un incremento de la biomasa y una reducción en la actividad metanogénica, además de perder capacidad amortiguadora y algunos nutrientes esenciales en la degradación anaerobia (van Langerak *et al.*, 1998). Vallero y colaboradores establecieron en el 2003 que el contenido de sodio necesario para una inhibición del 50% de la actividad metanogénica debe ser de 5600 a 8000 mg/L. En cuanto al magnesio se ha reportado que el crecimiento de las bacterias metanogénicas se detiene en una concentración menor a 400 mg/L y la cantidad óptima es de 720 mg/L de Mg^{2+} (Chen *et al.*, 2008).

La toxicidad de los metales pesados es atribuida mayormente a la interrupción de la función enzimática y a la alteración de la estructura mediante la unión de éstos a los tioles y otros grupos en moléculas proteínicas o al reemplazar los metales unidos naturalmente a grupos de enzimas prostéticas (Ulmanu *et al*., 2003). Los metales pesados que se identifican

por ser de mayor preocupación son el cobre, el zinc, el hierro, el cadmio y el níquel. Una característica distintiva de los metales pesados es que, a diferencia de otras sustancias tóxicas, no son biodegradables y pueden acumularse hasta alcanzar niveles de potencial toxicidad.

Compuestos orgánicos

Un amplio rango de compuestos orgánicos puede inhibir la digestión anaerobia. Entre los compuestos orgánicos que se han reportado tóxicos para este proceso se incluyen alquilbencenos, nitrobencenos, bencenos halogenados, alcoholes y fenoles, alcanos, éteres, aminas, amidas y también los ácidos grasos de cadena larga han reportado efectos adversos en la degradación anaerobia (Chen *et al.*, 2008). Los grados de concentración que pueden causar la inhibición varían ampliamente dependiendo del tipo de tóxico en cuestión. Los parámetros que determinan la toxicidad de estas sustancias incluyen, concentración del contaminante, concentración de la biomasa, tiempo de exposición a la sustancia tóxica, edad de la célula, patrón de alimentación, aclimatación y temperatura. A concentraciones bajas la degradación de estos tóxicos pueden prever la inhibición consecuentemente, concentraciones mayores de tóxicos pueden llevar a la inhibición de los procesos de degradación anaerobia. Cuando la concentración de la biomasa es mayor los digestores muestran mayor estabilidad en la presencia de choques tóxicos. A concentraciones iguales de sólidos, las colonias más jóvenes resultaron más robustas y resistentes a los contaminantes, a diferencia de las colonias más longevas.

Como sucede con otras sustancias inhibidoras, la aclimatación de los microorganismos anaerobios es un parámetro importante para evaluar los efectos de la inhibición de los compuestos orgánicos. La aclimatación incrementa la tolerancia de las bacterias a los choques tóxicos y favorece al proceso de degradación de las sustancias contaminantes.

1.7. Factores que afectan la producción de hidrógeno y metano por fermentación anaerobia

El rendimiento en la producción de hidrógeno y metano fermentativo es un proceso muy complejo e influenciado por varios factores como son: el inóculo, el sustrato, el tipo de reactor, nitrógeno, fosfato, temperatura y pH. Este trabajo solo se enfocará en tres de ellos.

Inóculo

La fermentación oscura se puede llevar a cabo por una gran variedad de microorganismos, con requerimientos muy distintos en términos de las condiciones del sustrato, pH y temperatura. Estos parámetros no solo determinan el crecimiento de los microorganismos, sino también tienen un papel crucial en el camino metabólico que van a seguir, afectando así el rendimiento final observado del proceso en general. Se puede alcanzar por medio de cultivos puros, con gran variedad de cepas de microorganismos, como cultivos mixtos que por lo general provienen de productos de desecho. Ambos tipos de cultivos sirven de inóculos para el proceso de fermentación. Tales microorganismos pueden ser mesófilos (25-45 ºC), termófilos (40-65 ºC), termófilos extremos (65-80 ºC) o incluso hipertermófilos (>80 ºC). En cualquier caso, la elección final del tipo de cultivo a usar así como el microorganismo específico, está basada en los requerimientos particulares que cada uno posee.

Cultivos puros. Dentro de los microorganismos anaerobios estrictos, los cuales son muy sensibles al oxígeno, se encuentra el género *Clostridium*, además de las bacterias del rumen, termófilos y metanógenos. Los principales argumentos en el uso ventajoso de los cultivos puros son la selectividad del sustrato son la manipulación sencilla del metabolismo al alterar las condiciones en las que crecen y un mayor rendimiento observado como efecto de la disminución de subproductos indeseados. Por otro lado, los cultivos puros pueden ser bastantes sensibles a los contaminantes, por esto su uso exige, en la mayoría de los casos, condiciones asépticas lo cual incrementa considerablemente el costo total del proceso. Además que pueden requerir sustratos selectos y la adición de agentes reductores (como L-cisteína) lo que incrementa los costos y reduce la facilidad de su aplicación práctica (Li *et*

al., 2008). La producción de metano es llevada a cabo por arqueas metanogénicas, entre los que se incluyen los géneros *Methanosarcina*, *Methanococcus*, *Methanosaeta*, *Methanobacterium* (Escamilla *et al.*, 2011). Las bacterias fermentativas como las especies de *Clostridium y Enterobacter* son los principales géneros con la habilidad de producir hidrógeno, de las cuales *Clostridium* ha sido reconocida como un productor de hidrógeno muy efectivo (Chen *et al.* 2005).

Cultivos mixtos. Se ha podido aislar microflora de cultivos mixtos de varias fuentes de desecho como composta, lodos y suelos. En general para aplicaciones industriales o a gran escala la selección de cultivos mixtos puede ser favorable, al menos desde el punto de vista ingenieril. Esto se debe al hecho que el control y operación del proceso es más sencillo cuando no se requiere la esterilización del medio, reduciendo así el costo global. Estos consorcios mixtos pueden ser obtenidos de diversas fuentes naturales, así como de lodos del alcantarillado, lodos activados anaeróbicamente, composta, estiércol y suelos. La presencia del estiércol puede ayudar a activar la digestión anaerobia de materiales con altas relaciones de carbono/nitrógeno (C/N) y baja capacidad de amortiguación de pH. El estiércol contribuye con nitrógeno, trazas de elementos amortiguadores, y esto crea condiciones más apropiadas para el crecimiento microbiano, incluyendo a los metanógenos. Posiblemente, estos efectos del estiércol pueden ser debido a la inoculación microbiana causada por esté. Los metanogénicos activos en el rumen también contribuyen a la producción de biogás en la etapa de metanogénesis.

A pesar de los avances en cuanto la viabilidad económica del proceso en el uso de los cultivos mixtos siempre existe la posibilidad de que predominen especies que no producen hidrógeno como las metanogénicas, homoacetogénicas y bacterias de ácido láctico, los cuales consumen el hidrógeno producido y lo convierten a metano acetato y propianato. Generalmente se usan pretratamientos con calor y/o pH extremos para enriquecer la microflora, los cuales inhiben la actividad de los consumidores de hidrógeno, mientras las bacterias esporuladas, que por lo general del genero *Clostridium*, sobreviven (Bedoya *et al*., 2008). Estos tratamientos alteran la comunidad microbiana presente en la población inicial mixta.

pH y temperatura

Se ha demostrado que la obtención de hidrógeno es más eficiente si se controla el pH inicial de 6, de lo contrario puede ocasionar cambios en la comunidad bacteriana. De esta manera, la producción de hidrógeno y ácidos acético y butírico como principales subproductos es más conveniente a pHs menores o iguales a 6 que a pHs más neutros, en los cuales se encuentran subproductos no asociados al metabolismo del hidrógeno (Bedoya *et al.*, 2008). En cuanto al metano, el rango de pH para mantener una producción óptima se ubica entre 7-8. En los extremos de estos valores la producción severamente afectada. El pH óptimo para cultivos mixtos se encuentra en el rango entre 6.8 y 7.4, siendo el pH neutro el ideal.

Los procesos anaeróbicos, al igual que muchos otros sistemas biológicos, son fuertemente dependientes de la temperatura. La velocidad de reacción de los procesos biológicos depende de la velocidad de crecimiento de los microorganismos involucrados que a su vez, dependen de la temperatura. A medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de crecimiento de los microorganismos y se acelera el proceso de digestión, dando lugar a mayores producciones de biogás. Aunque no se ha reportado un valor fijo de la temperatura óptima para un mayor rendimiento de H_2. Se ha encontrado que los mejores rendimientos de hidrógeno se obtienen en un rango mesófilo (Espinoza *et al.*, 2009). La mayoría de los metanogénicos tienen como temperatura óptima de 35ºC.

CAPÍTULO 2. Metodología

2.1. Obtención de la muestra

La vinaza empleada en este trabajo fue obtenida en el estado de Zacatecas, fue proporcionada por la hacienda mezcalera de Saldaña ubicada sobre la carretera a San Luis Potosí, aproximadamente a 30 km de la cabecera municipal Pinos. La hacienda mezcalera de Saldaña es una de las más antiguas del estado. La elaboración del producto en Saldaña es artesanal pero se distribuye fuera de la región. En la Figura 2.1 se muestra acotada la región de los Pinos donde se producen las vinazas estudiadas.

Figura 2.1. Región denominada Los Pinos en el estado de Zacatecas.

2.2. Caracterización de la vinaza

Se determinó la demanda química de oxígeno, la demanda biológica de oxígeno, los metales presentes y la cantidad de sólidos y sales disueltas en las vinazas. Esto se realizó para determinar la presencia y degradabilidad del material orgánico, y así determinar con qué rapidez este material va a ser metabolizado por las bacterias que normalmente se encuentran

presentes y los posibles contaminantes e inhibidores del proceso anaerobio. Un ejemplo claro es la cantidad de sólidos totales contenidos en la mezcla con que se carga el digestor es un factor importante a considerar para asegurar que el proceso se efectúe satisfactoriamente. La movilidad de las bacterias metanogénicas dentro del sustrato se ve crecientemente limitada a medida que se aumenta el contenido de sólidos y por lo tanto puede verse afectada la eficiencia y producción de gas.

2.2.1. Determinación DQO

Se determinó la demanda química de oxígeno de acuerdo a la norma mexicana NMX-AA-030-SCFI-2001 siguiendo el método de reflujo abierto. A continuación se describen los pasos básicos que se siguieron.

1. Se transfirió a los matraces Erlenmeyer una muestra de 20 mL de vinaza al 20%, 5 perlas de ebullición y 10 mL de disolución estándar de dicromato de potasio 0.0417 M y mezclar mediante un movimiento circular. Se llevó simultáneamente un testigo preparado con agua y todos los reactivos que se utilizan en el procedimiento.
2. Se conectó el matraz Erlenmeyer al condensador tipo Friedrich y se hizo circular el agua de enfriamiento.
3. Por el extremo superior del condensador se agregó lentamente 30 mL de la disolución de ácido sulfúrico-sulfato de plata y se agitó con un movimiento circular para homogeneizar.
4. Se calentó el matraz que contiene la mezcla y se mantiene a reflujo durante 2 h a partir del momento en que empieza la ebullición.
5. Se añadió 100 mL agua por el extremo superior del condensador, se retiró el matraz del condensador y se enfrió a temperatura ambiente.
6. Se agregaron 3 gotas de 1,10-fenantrolina como indicador y se tituló con la disolución de sulfato ferroso amoniacal 0,25 M. Se tomó como punto final el primer cambio de color de azul verdoso a café rojizo.

Para expresar la DQO en mg O_2/L se calcula con la Ecuación 2.1

$$DQO = \frac{(V_1 - V_2) \cdot M \cdot 8000}{V_3} \quad (2.1)$$

donde

V_1 es el volumen en mL de la disolución de sulfato ferroso amoniacal requerido para valorar el testigo;

V_2 es el volumen en mL de la disolución de sulfato ferroso amoniacal requerido para la muestra;

V_3 es el volumen en mL de la muestra, y

M es la molaridad de la disolución de sulfato ferroso amoniacal utilizada en la determinación.

2.2.2. Determinación de DBO_5

El análisis de la demanda biológica de oxígeno se realizó con lo establecido en la NMX-AA-028-SCFI-2001:

1. Se colocó el volumen requerido de agua en un frasco y se añadió por cada litro de agua 1 mL de cada una de las siguientes disoluciones: disolución de sulfato de magnesio, disolución de cloruro de calcio, disolución de cloruro férrico y disolución amortiguadora de fosfatos. Antes de usar el agua de dilución se ajustó a una temperatura aproximada de 20 ºC. Se saturó con oxígeno aireando con aire filtrado (libre de materia orgánica) durante 4 horas.
2. Utilizando una pipeta volumétrica, se añadió el volumen de muestra para obtener diluciones en un rango de 0.25% a 1% en los frascos Winkler individuales de 300 mL. Se llenaron los frascos con suficiente agua de dilución de forma que la inserción del tapón desplazará todo el aire, sin dejar burbujas. Se determinó el oxígeno disuelto inicial (ODi) en uno de

los frascos de cada una de las diferentes diluciones. Se ajustó herméticamente el tapón y se puso a incubar durante 5 días a 20 ºC.

3. Después de 5 días de incubación se determinó el oxígeno disuelto final (OD_5) en las diluciones de la muestra y en los blancos. Las mediciones del OD se realizó con un oximetro de marca HANNA® modelo HI 8043.

En este caso se utilizaron diluciones y el resultado de la resta de la ODi menos la OD_5, reportado en mg/L, se dividió entre el % de dilución expresado en decimales.

2.2.3. Determinación de sólidos y sales disueltas

La medición de los sólidos y sales disueltas se hizo de acuerdo a la norma mexicana de análisis de agua NMX-AA-034-SCFI-2001. A continuación se hace una descripción del protocolo seguido para obtener estos parámetros.

Medición de ST y SVT

1. Preparación de las cápsulas de porcelana. Las cápsulas se introdujeron limpias a la mufla a una temperatura de 550 ºC, durante 20 minutos. Después de este tiempo se transfirieron a la estufa a 105 ºC por aproximadamente 20 minutos. Se sacaron y se dejaron enfriar dentro de un desecador, los datos del peso fueron anotados. El ciclo se repitió hasta obtener un peso constante (<0.0005).
2. Determinación de sólidos totales. Se tomaron 50 mL de muestra y se transfirió a la cápsula que se ha puesto a peso constante. Se llevó a sequedad la muestra en la estufa a 105ºC. Por último se enfrió en el desecador a temperatura ambiente y se registró el peso.
3. Determinación de sólidos volátiles totales. Se introdujo la cápsula que contiene el residuo a la mufla a 550 ºC durante 20 minutos. Se transfirió a la estufa a 105 ºC, se enfrió a temperatura ambiente en un desecador. Se repitió el ciclo hasta alcanzar un peso constante.

Medición de ST y SVT

1. Preparación de Crisoles Gooch. Se introdujo un filtro de fibra de vidrio en el crisol y se mojó para asegurarlo al fondo del mismo, a continuación se llevó a cabo el procedimiento para ponerlos a peso constante.
2. Determinación de sólidos suspendidos totales. Se tomaron 35 mL de muestra y se filtraron lentamente a través del crisol preparado aplicando vacío, posteriormente se lavó el filtro tres veces con agua destilada. Se secó el crisol con el filtro en la estufa a 105 ºC, por último se dejó enfriar y se registró el peso.
3. Determinación de sólidos suspendidos volátiles totales. Se metió el crisol que tiene el residuo y el filtro a la mufla, a una temperatura de 550 ºC durante 20 minutos, se sacó y llevó a la estufa a 105 ºC por 20 minutos. Se repitió el ciclo hasta que se obtuvo un peso constante y se anotó.

Para el cálculo de los sólidos y sales disueltas se siguieron las ecuaciones 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5.

$$ST=\frac{(G_1-G)}{V}\cdot 10^6 \qquad (2.2)$$

Donde:

ST	son los sólidos totales, en mg/L;
G_1	es el peso constante de la cápsula con el residuo, después de la evaporación, en g;
G	es el peso de la cápsula vacía, en g en peso constante, y
V	es el volumen de muestra, en mL
10^6	Factor de conversión de unidades

$$SVT=\frac{(G_1-G_2)}{V}\cdot 10^6 \qquad (2.3)$$

Donde:

SVT	es la materia orgánica total, en mg/L;
G_2	es el peso constante de la cápsula con el residuo, después de la calcinación, en g;

$$SST=\frac{(G_4-G_3)}{V}\cdot 10^6 \quad (2.4)$$

Donde:

SST	son los sólidos suspendidos totales, en mg/L;
G_3	es el peso constante del crisol con el filtro, en g;
G_4	es el peso del crisol con el filtro y el residuo seco, en g en peso constante, y
V	es el volumen de muestra, en mL
10^6	Factor de conversión de unidades

$$SSVT=\frac{(G_4-G_5)}{V}\cdot 10^6 \quad (2.5)$$

Donde:

SSVT	son los sólidos suspendidos totales, en mg/L;
G_5	es el peso constante del crisol con el filtro, después de la calcinación, en g;

2.2.4. Determinación de metales

Las concentraciones de metales se determinaron en un espectrofotómetro de medición real simultánea de plasma y emisión por inducción acoplada (ICP).

1. Preparación de la muestra. En una cápsula de porcelana se vertieron 100 mL de muestra y se calentó, a temperatura baja, hasta sequedad.
2. Se metió a la mufla a 550 ºC por 20 minutos.
3. La ceniza obtenida se solubilizó con 10 mL de HNO_3 y se llevó al aforo de 50 mL.
4. La ceniza diluida se analizó en un espectrofotómetro de medición real simultánea de plasma y emisión por inducción acoplada Varian IC-730.

Los resultados se reportaron de forma directa de la lectura del equipo ICP Varian IC-730 en mg/L.

2.3. Aislamiento bacteriano

La obtención de *Clostridium* se realizó a partir de la vinaza, para asegurar la separación de esta bacteria del resto de los microorganismos que la acompañan se sometió la muestra a un pretratamiento térmico a 100 ºC por espacio de 40 minutos. Después de pasado este tiempo se utilizó el método de aislamiento bacteriano por dilución, realizando por lo menos 5 diluciones, para esto se utilizó 1 mL de solución madre (que contiene la muestra) y se pasó a un tubo que contenía 9 mL de agua destilada esterilizada y así sucesivamente hasta obtener el número de diluciones deseadas. Utilizando el asa bacteriológica se sembró por estría cruzada en cajas Petri que contenían diferentes medios de cultivo. En la Tabla 2.1 se pueden ver las composiciones de cada uno de los medios utilizados. Las cajas Petri se colocaron en incubación en condiciones anaeróbicas utilizando un sistema BD Gaspak ^{TM}, a una temperatura de 28ºC, presión atmosférica y un pH de 5.5 durante 7 días. En la Figura 2.2 se observa el sistema de incubación usado para el aislamiento.

Tabla 2.1. Medios de cultivo para *Clostridium*

Medios	**Composición (g/L)**	
Muller Hinton	**Peptona**	**17.5**
	Dextrosa	**40**
	Extracto de carne	**1.5**
	Agar	**16**
Vinaza	**Vinaza**	**25%**
	Medio Muller	**74%**
	Agar	**16**
Mineral	**$(NH_4)_2PO_4$**	**3**
	$KHPO_4$	**0.6**
	K_2HPO_4	**2.4**
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	**1.5**
	$CaSO_4$	**0.15**
	Agar	**16**

2.3.1. Caracterización de las bacterias aisladas

A los diferentes aislados bacterianos se les determinó la morfología colonial, tinción de Gram y para obtener información morfológica de las bacterias presentes en los consorcios,

a través la caracterización superficial a nivel micrométrico, se realizaron observaciones por microscopía óptica.

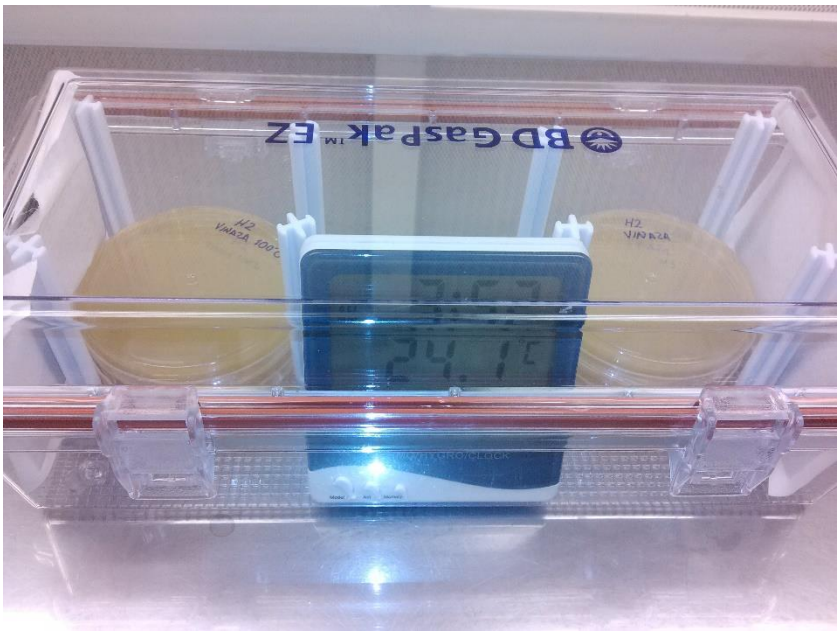


Figura 2.2. Sistema de inoculación

2.4. Fermentación obscura de la vinaza

Las pruebas de fermentación se hicieron por etapas en las cuales se probaron diversas variantes que afectan la digestión oscura de las sustancias orgánicas presentes en la vinaza. En la primera fase se hicieron fermentaciones con cultivos aislados de *Clostridium*, las inoculaciones se hicieron sobre vinaza fabricada en el laboratorio y se logró observar el crecimiento bacteriano, en la segunda fase se utilizó la vinaza proveniente de la mezcalería y las fermentaciones se hicieron en microcosmos, en esta etapa se probó con la cantidad de glucosa y se agregó al estudio un cultivo puro de *E. Cloacae*. Durante la tercera fase se cambió el sistema experimental para lograr una contención mayor del biogás, aquí se probaron los efectos que tienen en el proceso de degradación anaerobia el pH, la temperatura y del tiempo de inoculación.

2.4.1. Etapa de aclimatación del inoculo

En esta etapa se obtuvo una vinaza libre de contaminación en el laboratorio, la cual se utilizó como fuente de nutrientes para realizar la siembra de la cepa bacteriana de *Clostridium*, observando el desarrollo de la población bacteriana. Las primeras fermentaciones se llevaron a cabo con vinaza mezcalera y se realizaron análisis por espectrometría de infrarrojo para examinar la ruta metabólica seguida por los microorganismos en las primeras horas de inoculación.

Fabricación de la vinaza sin contaminantes

1. Se colocó el jugo de caña en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL.
2. El pH del jugo de caña se ajustó a aproximadamente 5.5 para evitar la pérdida de azucares
3. Fueron agregados al jugo de caña 11 g de levadura de pan y 0.5 g de urea.
4. Se le adicionó una pieza de piloncillo previamente disuelta en agua destilada.
5. Se colocó en baño María a una temperatura de 35 °C, se monitorio que la mezcla mantuviera una temperatura constante.
6. Cuando la reacción de fermentación terminó, el mosto muerto se destiló para obtener la vinaza.

Adaptación del inoculo de cultivo a la vinaza

1. Se colocó 240 mL de medio Mueller Hinton en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se agregaron 0.75 mL de solución de glucosa, la temperatura de 28 ºC y la agitación de 200 rpm se mantuvieron constantes, se mantuvo durante 24 horas en estas condiciones (Cultivo A).
2. Se tomó 24 mL del cultivo A y a este se le agrego 175 mL de medio de cultivo Mueller Hinton, 40 mL de vinaza y 0.75 mL de solución de glucosa se mantuvieron las mismas condiciones por 24 horas más (cultivo B).

3. Por último, se tomaron 24 mL del cultivo B, se agregó a éste 107.5 mL de medio Mueller Hinton, 107.5 mL de vinaza, 0.75 mL de solución de glucosa, se mantuvo por las siguientes 24 horas en las condiciones anteriormente descritas. Este cultivo C será con el que se va a inocular el bioreactor.

2.4.2. Fermentación anaerobia con el inoculo adaptado de *Clostridium*

Estas primeras fermentaciones fueran llevadas a cabo en un matraz de bola de 500 mL, el volumen de operación fue de 300 mL de vinaza, 30 mL de inoculo y 2 mL de solución de glucosa para ajustar el contenido de azucares en la vinaza (Figura 2.3). Para asegurar el ambiente adecuado de la fermentación se evacuó el aire en el matraz a través de una corriente de CO_2.

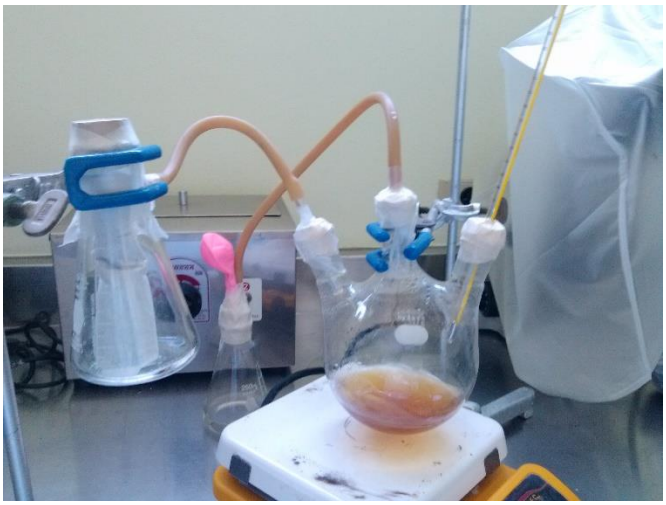


Figura 2.3. Sistema experimental de primeras fermentaciones.

El biogás producido se evaluó en un equipo de Infrarrojo por transformada de Furrier (FTIR) marca BRUKER VERTEX 70, tomando muestra del espacio gaseoso cada hora en la primera prueba y cada 20 minutos en la segunda.

2.4.3. Sistemas de producción de biogás

En esta etapa se realizó la fermentación oscura para la producción de biogás en sistemas de microcosmos (Figura 2.4). Se utilizó como sustrato la vinaza proveniente de la mezcalera y medio mineral (con la composición ya antes descrita en la Tabla 2.1). Los experimentos en microcosmos fueron llevados a cabo en viales con sello de 100 mL a los cuales se le agregaron 8 mL de inoculo, 52 mL de medio y 20 mL de vinaza mezcalera para un volumen total de 80 mL. En estas fermentaciones se evaluó la producción de biogás con diferentes concentraciones de glucosa 15 g/L y 10 g/L, se probó un cultivo de *Clostridium* y uno de *E. Cloacae,* y dos valores de pH de 5.5 y 7. El espacio gaseoso de estos sistemas fue evacuado por una corriente de nitrógeno con el fin de eliminar el oxígeno presente y establecer las condiciones anaerobias. Los viales fueron colocados en una incubadora con agitación orbital y control de temperatura, las condiciones fueron fijadas a 35ºC y 150 rpm. La inyección de las muestras de biogás para análisis por cromatografía de gases se realizó cada 24 horas en un cromatógrafo de gases Gow-Mac 350 equipado con un detector de conductividad térmica y una columna empacada con mineral Erionita. Las temperaturas de análisis fueron: en la columna 80 ºF y en el detector 158 ºF y se utilizó Helio como gas de arrastre.

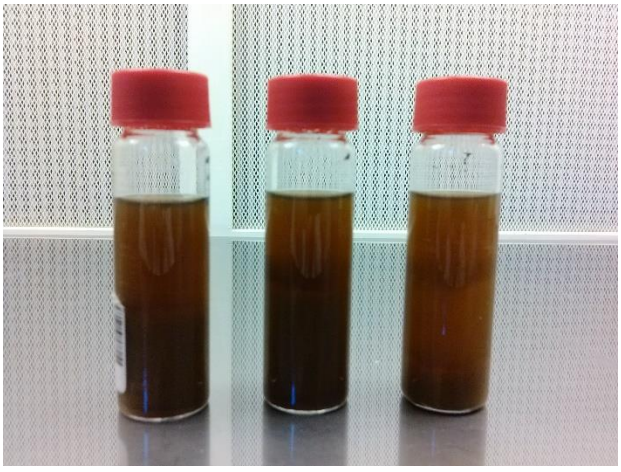


Figura 2.3. Sistema de fermentación anaerobia en microcosmo

2.4.4. Efecto del tiempo de inoculación y el pH en la producción de biogás

Las pruebas se trasladaron a reactores de bolsa para lograr un mayor volumen de producción de biogás y contenerlo de manera eficiente. Se vaciaron bolsas de glucosa inyectable al 5% de 250 mL (Figura 2.4). A las cuales se les agregó 15 mL de inóculo, 38 mL de vinaza y 97 mL de medio, resultando un volumen total de trabajo de 150 mL. El medio tenía la siguiente composición: dextrosa 15 g/L, peptona 5 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 25 mg. En esta etapa de la experimentación se probó con la variación del pH, tiempo y temperatura de incubación. Se leyeron las muestras de biogás cada 15, 24 y 48 horas, el pH probado fue 7.5 y 6.5, y las temperaturas de incubación se establecieron en 35 y 45 ºC. Estas muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases acoplado a masas (CG/MS) Varian 320, columna Zebron ZB-semivolátiles con una longitud de 30 m y un diámetro interior de 0.25 mm. Las temperaturas de operación de la columna y el detector son 180 y 80 ºC respectivamente, el gas de arrastre utilizado fue Helio.

Figura 2.4. Sistema experimental para evaluar el efecto de pH y el tiempo de inoculación

En estas fermentaciones el inóculo usado fue un cultivo obtenido del estiércol de vaca, el cual se activó durante 24 horas a una temperatura de 37 ºC.

CAPÍTULO 3. Resultados y análisis

3.1. Caracterización de la vinaza mezcalera

A continuación se presentan en la tabla 3.1 los resultados de los parámetros medidos en la vinaza que proviene de la industria del mezcal.

Tabla 3.1. Características de la vinaza

DQO (mgO_2/L)	**41,113**
DBO_5 (mgO_2/L)	**25,320**
pH	**3.5**
ST (mg/L)	**34,621**
SVT(mg/L)	**30,028**
SST (mg/L)	**8,395**
SSVT (mg/L)	**7190**
SDT (mg/L)	**26,226**
Cadmio (mg/L)	**<0.048**
Plomo (mg/L)	**<0.048**
Zinc (mg/L)	**<0.048**
Níquel (mg/L)	**<0.048**
Cobre (mg/L)	**<0.048**
Fierro(mg/L)	**<0.048**
Sodio (mg/L)	**44.71855**
Potasio (mg/L)	**53.7215**
Calcio (mg/L)	**491.92**
Magnesio (mg/L)	**202.927**
Fósforo (mg/L)	**132.751**

La vinaza analizada presentó alto contenido de materia orgánica medida como DQO y DBO los cuales dieron como resultado 41,113 y 25,300 mgO_2/L respectivamente, altas concentraciones de sólidos totales (34,621 mg/L) y sólidos suspendidos totales (8,395 mg/L), muy bajo pH con valor de 3.5, altos contenidos de fósforo, magnesio y calcio con

valores de 132.751, 202.927 y 491.92 mg/L respectivamente. Todos estos parámetros coinciden con otros ya reportados en estudios previos a efluentes de este tipo o similares (Robles et al., 2012; López et al., 2010; Méndez et al., 2010; Leal et al., 2003) los cuales se encuentran en un intervalo de 24 635 - 65 457 y 26 500 - 33 600 mgO_2/L, 26 800 - 94 700 mg/L, 3 000-9 000 mg/L, 3.6 - 3.8, para DQO, DBO, ST, SST y pH respectivamente. Los únicos parámetros que se encuentran bajos con respecto a la bibliografía son el sodio y el potasio (167 y 303 mg/L), pero esto se podría deber al efecto que tiene los diversos procesos de fabricación y los tipos de materia prima. También se puede notar que se encontraron solo trazas de otros compuestos como el Cd, Pb, Zn, Ni, Cu, Fe.

3.2. Aislamiento y caracterización de bacterias

Con la prueba Tinción de Gram se comprobó la presencia de bacterias grampositivas. Al microscopio se observan bacilos grandes de aproximadamente 2 a 5.82 x 1 a 2.06 µm, agrupados en cadenas esporuladas y extremos redondos (Fig. 3.1, Fig. 3.2).

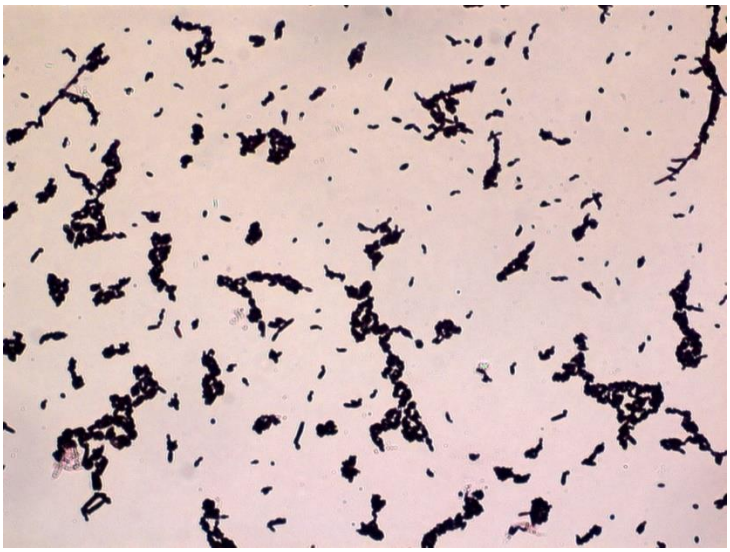


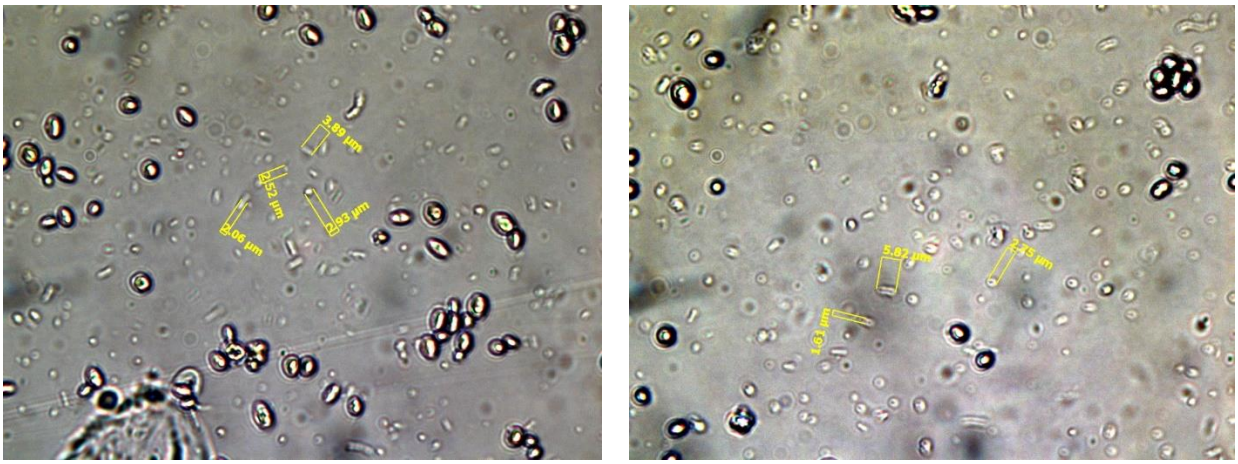
Fig.3.1. Prueba Tinción de Gram

De las colonias aisladas se puede observar colonias de aspecto puntiforme, bordes irregulares, superficie elevada, de color gris traslúcido.

Tanto la morfología colonial como las observaciones bajo el microscopio coinciden con las características de alguna de las especies de *Clostridium* ya reconocidas.

3.3. Crecimiento bacteriano (adaptación al medio)

En la primera fase de la experimentación se nota el desarrollo de *Clostridium* mientras se adapta a la vinaza (esta es una vinaza producida en el laboratorio enriquecida con glucosa líquida para que quedé al 1%, que son las condiciones óptimas de glucosa con la que sale de la fábrica).



(A) (B)

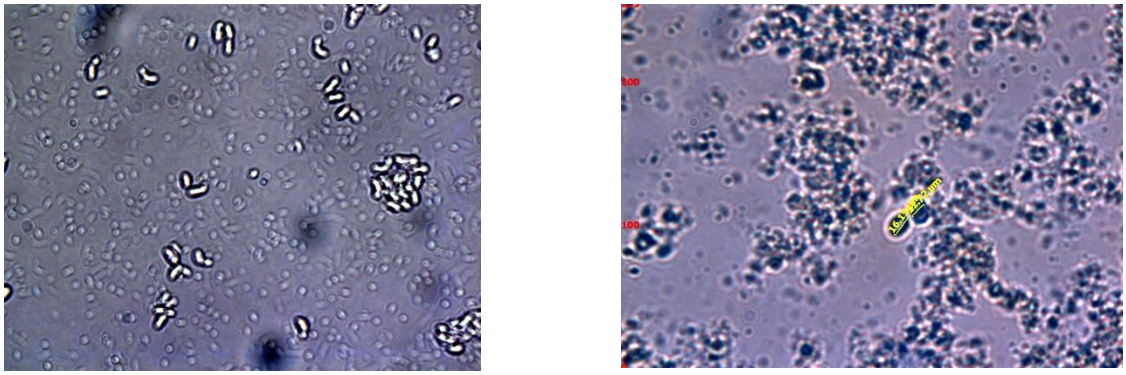
Fig.3.2. Microscopia óptica de Clostridium

En la Figura 3.3 se presenta la micrografía (A) Mueller Hinton + Glucosa + *Clostridium* y la micrografía (B) Mueller Hinton + Glucosa + *Clostridium* + vinaza. Se puede observar un mayor número de microroganismo en la figura (B), la cual fue tomada una hora después de la inoculación del medio.

Posteriormente se aumentó la concentración de vinaza (al 45%). Como resultado de esto en la Figura 3.4 (A) Vinaza + Glucosa + *Clostridium*, se observa un menor crecimiento de los microroganismos en la primera hora; sin embargo, en horas posteriores se recupera la población bacteriana (Figura 3.4. (B)). Con esto se puede concluir que el microroganismo ha pasado la etapa de aclimatación en el nuevo medio.

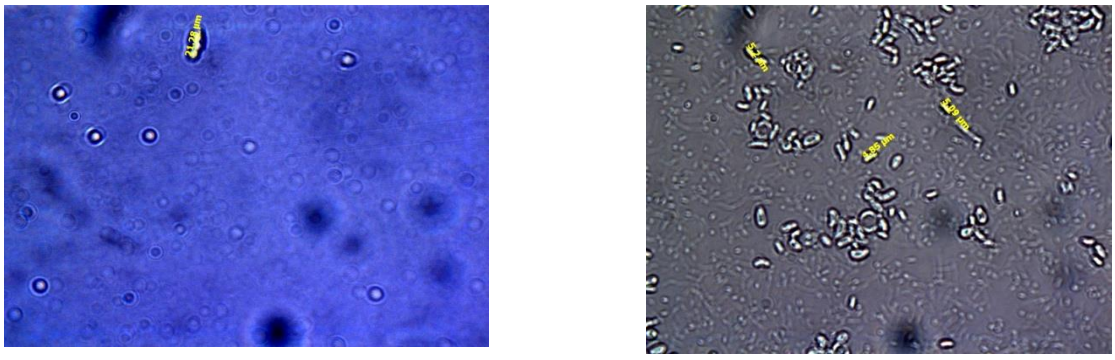
También se realizaron conteos celulares con cámara de Neubauer y se obtuvo que para la primera etapa de aclimatación (micrografía (B) de la Figura 3.3) se tienen 1, 960, 000 células/mL pasada una hora de inoculación. Cuando la concentración de vinaza es aumentada se observa una densidad de 1, 820, 000 células/mL después de 24 horas en etapa de

adaptación (micrografía (B) de la Figura 3.4). Los procesos de aclimatación de las bacterias es uno de los factores determinantes en la inhibición de altos niveles de tóxicos presentes en las aguas residuales, favoreciendo con esto la digestión anaerobia (Chen *et al*., 2008).



(A) (B)

Fig.3.3. A) Medio inoculado de Mueller Hinton + Glucosa + *Clostridium* en el tiempo 0 min. B) medio inoculado Mueller Hinton + Glucosa + *Clostridium* + vinaza en el tiempo 60 min.



(A) (B)

Fig.3.4. A) Medio inoculado con Vinaza+ Glucosa + *Clostridium* en 1 hr. B) medio inoculado con Vinaza+ Glucosa + *Clostridium* en 24 hrs.

3.4. Primeras pruebas de fermentación con *Clostridium*

En las Figuras 3.4 y 3.5 se presentan los espectros de infrarrojo tomados de las primeras pruebas de fermentación, donde el tiempo de inoculación fue de 1 y 6 horas, en éstas se pueden observar, en la zona de número de onda comprendida entre los 400 y 4000 cm^{-1}, las bandas características de H_2S, CO_2 y vapor de agua que se encuentran en los rangos de 1000-2000 cm^{-1}, 2350 cm^{-1} y 3900-3400 cm^{-1} respectivamente (Smith, 2011).

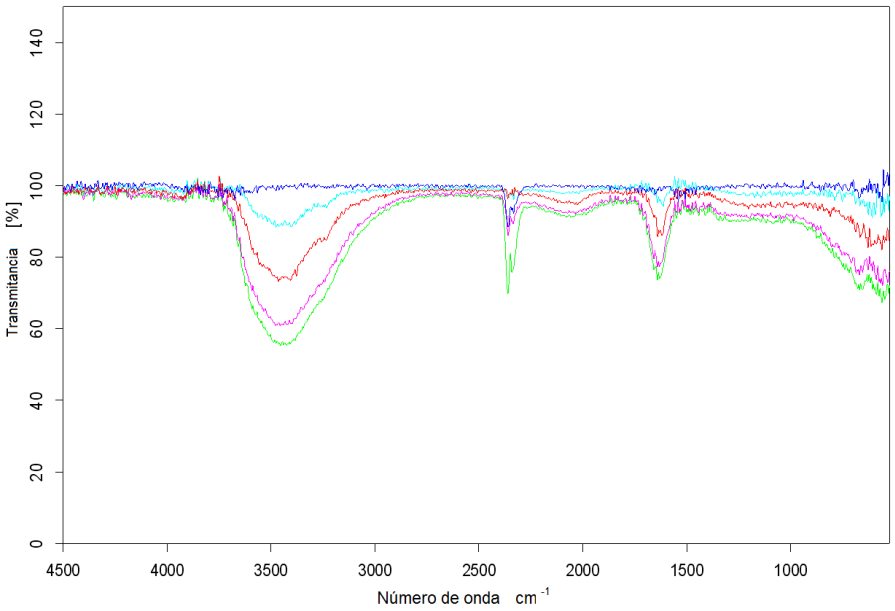


Figura 3.4. Espectro infrarrojo a una hora después de la inoculación

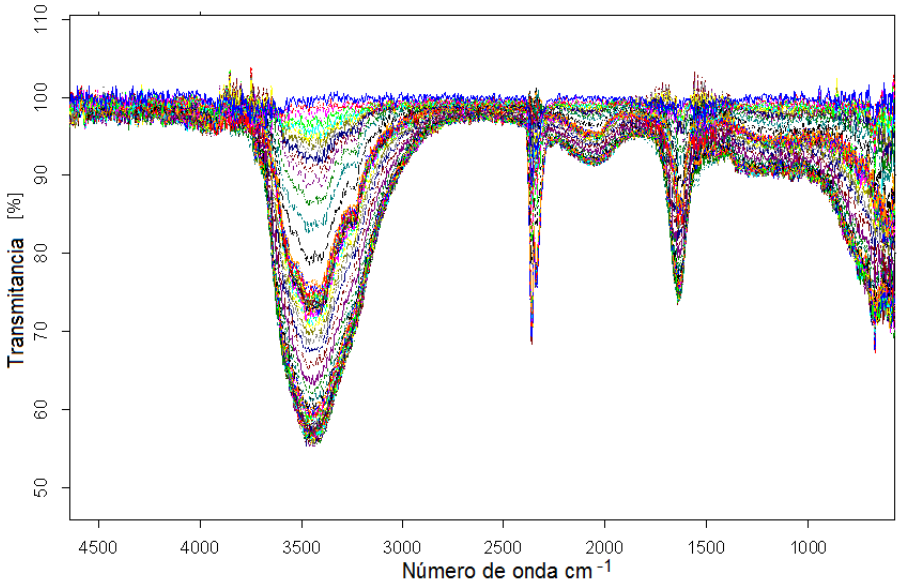


Figura 3.4. Espectro infrarrojo a 6 horas después de la inoculación

La determinación de sulfuro de hidrógeno en el biogás generado indica la acción de bacterias sulfuro-reductoras en el proceso de digestión anaerobia y que éstas, durante la etapa de acetogénesis podrían estar compitiendo con las bacterias de *Clostridium* por los productos

intermediarios de la fermentación (ácidos grasos volátiles y alcoholes), desviando la ruta hacia la producción de H_2S, reduciendo así el hidrógeno que se podría obtener durante esta etapa (Chen *et al.*, 2005). Uno de los factores que pueden afectar esta competencia es la relación DQO/SO_4^-, éste es un parámetro importante que define la existencia de la competencia entre los microorganismos. El grado de esta competencia aumenta con el decremento de la relación. Para efluentes con altas concentraciones de sulfato es preferible trabajar a bajas cargas orgánicas (Rodríguez *et al.*, 2005), las vinazas tequileras tienen un alto contenido de sulfuros y alta DQO, lo cual hace difícil su tratamiento en la primera fase por tecnología anaerobia.

3.5. Sistemas de generación de biogás en microcosmo

En estas fermentaciones se observa la generación de biogás en el vial pero los resultados arrogados por el análisis en el cromatógrafo muestran que éste tiene una concentración muy alta de CO_2 y no se logra determinar la presencia de hidrógeno o metano. Las muestras fueron tomadas cada 24 horas por tres días, ya que después de este tiempo no se observó la generación de más biogás. Esto podría indicar que la población bacteriana está viva y generando el ambiente propicio para seguir la fermentación oscura pero después son inhibidas por sustancias tóxicas y detienen su proceso de crecimiento. Como se pudo observar, en la etapa anterior de la experimentación, una de estos tóxicos es la concentración de sulfuros en el efluente y la generación de H_2S.

3.6. Efecto del tiempo de inoculación y el pH en la producción de biogás

En el Figura 3.4. se muestra el gráfico de la composición en porcentaje del biogás producido en las bolsas de glucosa a una temperatura de 35±2 ºC. Los resultados de la cromatografía muestran la producción de metilisourea y CO_2 en mayores cantidades y otros compuestos en menores cantidades: etanol, hidroxiurea, ácido oxálico, propanamida, hidroxipropanamida, L-alanina y aziridina. Cabe destacar que si bien la composición es similar, la cantidad producida de biogás no fue la misma para todos los experimentos. Se logró un mejor rendimiento para las bolsas con pH de 6 en todos los tiempos de inoculación

probados. Las bolsas con pH de 7.5 no lograron generar la cantidad necesaria de biogás para llenar el volumen restante de la bolsa. No se obtuvieron resultados de los sistemas en incubación a 45 ºC, esto podría ser consecuencia de que las bacterias pasaron su etapa de aclimatación a una temperatura de 27 ºC y no sobrevivieron al aumentar la misma.

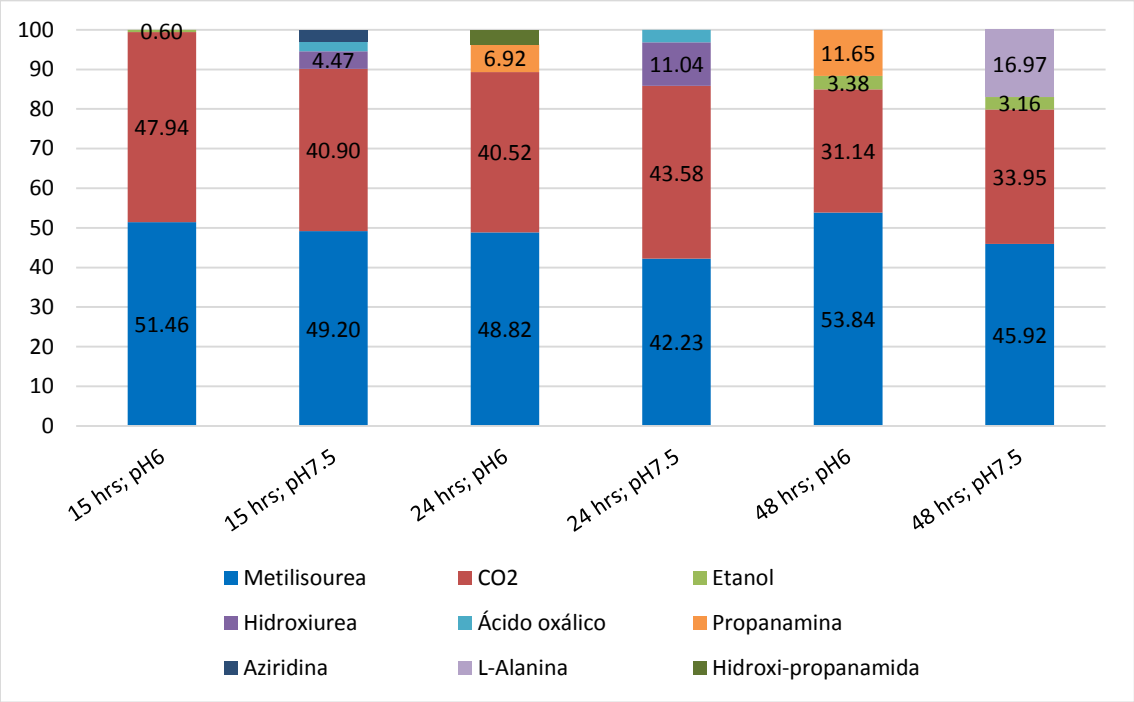


Figura 3.4. Producción de biogás en reactores de bolsa.

Se presenta una comparativa de los cromatogramas obtenidos en el análisis de la muestras después de las 24 horas de inoculación, como ya se había notado, las composiciones en el biogás son similares, la diferencia se puede notar en la producción de los compuestos que se presentan en el proceso, con un pH de 7.5 se obtiene hidroxiurea y ácido oxálico y con un pH de 6 propanamina e hidroxi-propanamida (Figura 3.5). Resultados similares se observan con un tiempo de 15 horas en donde con un pH de 7.5 se obtiene hidroxiurea, aziridina y ácido oxálico, mientras que con un pH de 6 se logra determinar trazas de etanol. Por último pasadas las 48 horas se produce L-alanina y propanamina con pH de 7.5 y 6 respectivamente. En comparativa de las pruebas llevadas a cabo a un pH de 6 se puede notar una mayor producción de biogás de manera consistente con el tiempo de inoculación (Figura 3.6).

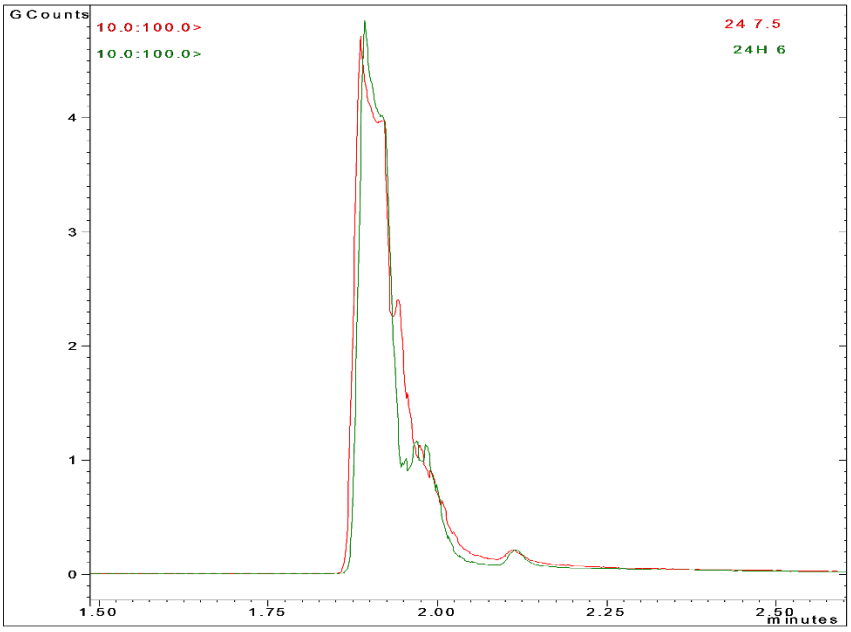


Figura 3.5. Comparativa de los cromatogramas a 24 horas de reacción

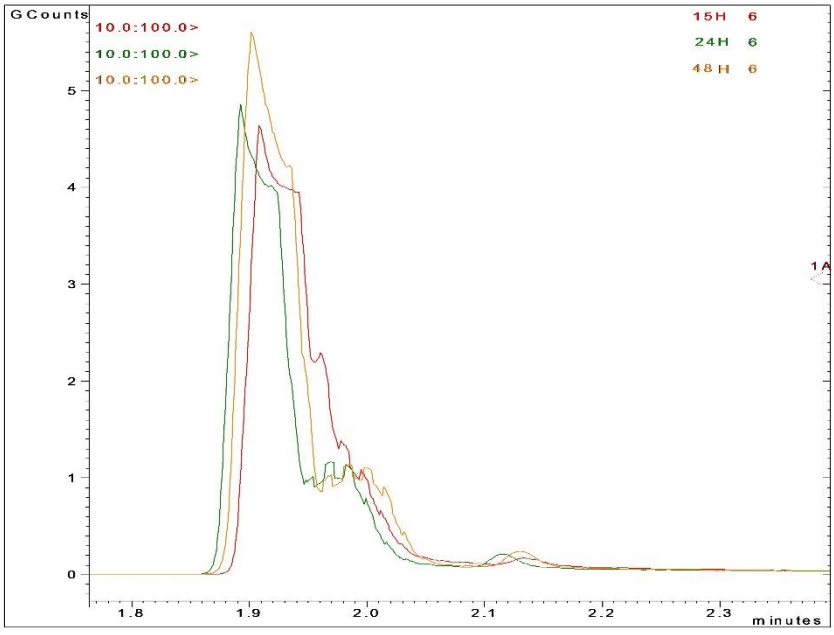


Figura 3.6. Comparativa de los cromatogramas a pH 6

Al comparar las intensidades de los picos generados en los cromatogramas a un pH 7.5 (Figura 3.7) podemos ver que existe una baja en la producción de biogás a las 24 horas, se podría inferir que existe una inhibición en este tiempo por la generación de algún tóxico

en este pH y pasado las 48 horas los microorganismos vuelven a adaptarse al medio y se recupera la producción del biogás.

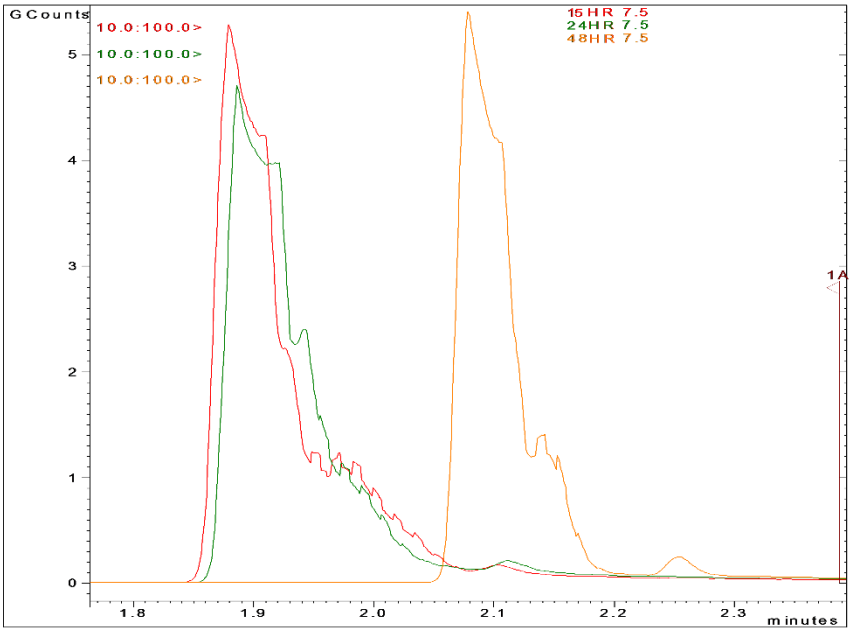


Figura 3.6. Comparativa de los cromatogramas a pH 7.5

El pico más alto en los cromatogramas es el que corresponde al compuesto O-Metilisourea que es un reactivo usado como un equivalente sintético suave a la guanina en muchas reacciones de condensación que llevan a la formación de piridinas, dihidropiridina, piridona y dihidropiridonas. También es aplicado para la síntesis de diazirina, dihidrotiazina, guaninas y triazoles. La piridina y sus compuestos relacionados son utilizados como solventes, en análisis químicos y en la síntesis de fármacos, insecticidas, herbicidas, colorantes, saborizantes, adhesivos, pinturas, explosivos, desinfectantes y químicos para el caucho (Smith, 2003).

Aunque no se obtuvieron en mayor proporción el ácido oxálico y el etanol podrían ser productos de interés en el proceso. El ácido oxálico es usado principalmente para el blanqueado de textiles, cuero y madera, y también como agente fijante para las tinturas, productos anti-sarro, monómero para la preparación de fibras y películas de plástico y poli (etileno-oxalato), que tienen una buena resistencia mecánica y un buen desempeño frente el

calor, entre otros. Es un producto industrial cuya producción anual se estima en 140,000 toneladas por año. El etanol mezclado con la gasolina produce un biocombustible de alto poder energético con características muy similares a la gasolina pero con una importante reducción de las emisiones contaminantes en los motores tradicionales de combustión. El etanol se usa en mezclas con la gasolina en concentraciones del 5 o el 10%, E5 y E10 respectivamente, que no requieren modificaciones en los motores actuales.

El tipo de compuestos que se generan en este estudio indica que la ruta metabólica de los microorganismos ha sido desviada hacía la formación de compuestos nitrogenados o sulfonados debido a la existencia de diversas fuentes contaminantes o tóxicas provenientes de la vinaza, como lo son los compuestos sulfurados, la alta carga orgánica y el contenido de nitrógeno amoniacal (Almeida et al., 2011). En el año 2010 Buitrón y Carvajal determinaron que es posible obtener hidrógeno y metano por medio de la fermentación anaerobia de vinazas de la industria del Tequila pero la carga orgánica óptima para esto debe ser 3 g de O_2/L en DQO, siendo necesario la dilución del efluente, concluyeron que la vinaza es un fuerte inhibidor de la biomasa. Los contenidos de calcio, potasio, sodio y magnesio en la vinaza en estudio no rebasan las concentraciones necesarias para la inhibición del proceso (Almeida et al., 2011; Chen et al., 2008; van Langerak et al., 1998).

CONCLUSIONES

Es posible la generación de productos de interés dentro de la industria química a partir de la digestión anaerobia de las vinazas que provienen de la fabricación del mezcal. Esto se logra de manera más satisfactoria con un valor de pH de 6 y a cortos periodos de inoculación. La temperatura que funcionó para esta fermentación fue de 35 ºC.

Los consorcios bacterianos propios de la vinaza compiten por los diferentes sustratos contenidos en la misma o producidos durante el proceso de digestión. Sin embargo, las bacterias de *Clostridium, E. Cloacae* y las contenidas en el estiércol de vaca logran adaptarse a la vinaza de manera exitosa y en tiempos cortos. El contenido de toxinas presentes en el efluente logra inhibir su crecimiento a partir del tercer o cuarto día de inoculación.

Aunque se logra obtener diversos compuestos de interés, el de mayor producción es la metilisourea con una composición en el gas de 53.84%.

PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos se observaron aspectos que son necesarios evaluar en trabajos futuros para tener un mayor conocimiento y entendimiento del proceso, entre ellos se encuentran:

Evaluar los efectos que tienen los diferentes pH, temperatura, carga orgánica y tiempos de incubación en la producción del metabolito de interés y su posterior purificación.

Determinar los intermediarios metabólicos que podrían explicar mejor la ruta metabólica que siguen los microorganismos durante la digestión anaerobia de las vinazas mezcaleras.

Conocer los tóxicos principales que contienen las vinazas y el efecto que estos tiene en la inhibición del crecimiento bacteriano, con el fin de poder eliminarlos o encontrar rutas para contrarrestarlos.

REFERENCIAS

Aceves-Lara, C. A., Buffiere, Pierre., Bernet, N., Steyer, J. (2007). Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. Chemical Engineering and Processing. 47, 1968-1975.

Almeida, A., Nafarrate-Rivera, E., Alvarado, A., Cervantes-Ovalle A., Luevanos, M.P.E., Oropeza R., Balagurusamy, N. Expresión genética en la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión de las interacciones tróficas de esta biotecnología. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 3, 14-34.

Angenent Largus, T., Karim Khursheed, Al-Dahhan Muthanna H., Wrenn Brian A., Dominguez-Espinosa R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. Trends in Biotechnology. 22, 477-485.

Aspé, E., Martí, M.C., Jara, A., Roeckel, M. (2001) Ammonia inhibition in the anaerobic treatment of fishery effluents. Water Environmental Research. 73, 154–64.

Barrocal, V.M., García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Coca, M. (2010). Production of biomass by Spirulina máxima using sugar beet vinasse in growth media. New Biotechnol. 27(6), 851–856.

Bedoya, A., Castrillón, J.C., Ramírez, J.E., Vásquez, J.E., Zabala, M.A. (2008). Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. Dyna. 75(154), 137-157.

Beltran-de-Heredia, J., Torregosa, J., Dominguez, J.R., Partido, E. (2005). Degradation of wine distillery wastewater by the combination of aerobic biological treatment with chemical oxidation by Fenton's reagent. Water Science and Technology. 51(1), 167–174.

Buitrón, G., Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. Bioresource Technology. 110, 9071-9077.

Chen Weng-Ming, Tseng Ze-Jing, Lee Kuo-Shing y Chang Jo-Shu. (2005). Fermentative hydrogen production with *clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. International Journal of Hydrogen Energy. 30, 1063-1070.

Chen Y, Cheng JJ y Creamer KS. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. Bioresource Technology. 99, 4044-4064.

Cirilo, R., Evangelista, S. R., Palma, S. J., Freitas, R., Piccoli, R. H., Ferreira, J. G. L. (2007). Study of the use of vinasse from the cachac, a production in alcoholic fermentation and in the production of single cell. Journal of Biotechnology 131, 133–187.

Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del mezcal (COMERCAM). Informe anual 2010. Consultado en el 2012 de http://www.comercam.org/.

Dávila-Vázquez, G., Arriaga S., Alatriste Mondragón, F., León-Rodríguez, A., Rosales, Colunga L. M., Razo-Flores, E. (2007). "Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives". Reviews in environmental science and biotechnology. 7, 27-45.

Díaz, B., Gomes, A., Freitas, M., Fernandes, E., Nogueira, D.R., González, J., Moure, A.,Levoso, A., Vinardell, M.P., Mitjans, M., Domínguez, H., Parajó, J.C. (2011). Valuable polyphenolic antioxidants from wine vinasses. Food and Bioprocess Technology (1), 133–144.

Díaz, M., Madejon, E., López, F., López, R., Cabrera, F., (2002). Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process. Process Biochemistry. 37, 1143–1150.

Escamilla-Alvarado, C., Poggi Varaldo, H., Ponce-Noyola, M.T. (2011) Producción de hidrógeno y metano como biocombustibles bajo el esquema de biorefinería. Ide@s CONCYTEG. 6(71), 526-539.

Espinoza-Escalante, F.M., Pelayo-Ortíz, C., Navarro-Corona, J., González-García, Y., Bories, A., Gutiérrez-Pulido, H., (2009). 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 and Bioenergy. 33,14–20.

Fernández, N., Montalvo, S., Fernández-Polanco, F., Guerrero, L., Cortés, I., Borja, R., Sánchez, E., Travieso, L. (2007). Real evidence about zeolite as microorganisms immobilizer in anerobic fluidized bed reactors. Process Biochemistry. 42 (4), 724–728.

Ferreira, A., Marques, A., Batista, A., Marques, P., Gouveia, L., Silva, C., 2012. Biological hydrogen production by *Anabaena sp*.- Yield, energy and CO_2 analysis including fermentative biomass recovery. International Journal of Hydrogen Energy. 37, 179-190.

Financiera Rural. Monografía del Mezcal, 2011. Consultado en el 2012 de www.financierarural.gob.mx/.

Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. International Journal of Hydrogen Energy. 35, 10660-10673.

Hadavifar, M., Zinatizadeh, A.A., Younesi, H., Galehdar, M. (2010). Fenton and photoFenton treatment of distillery effluent and optimization of treatment conditions

with response surface methodology. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering. 5 (3), 454–464.

Hallenbeck, P. C. (2009). Fermentative hydrogen production: principles, progress and prognosis. International Journal of Hydrogen Energy. 34, 7379-7389.

Jiménez, A.M., Borja, R., Martín, A. (2003). Aerobic-anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. Process Biochemistry. 38, 1275–1284.

Jiménez, A.M., Borja, R., Martín, A., Raposo, F. (2005). Mathematical modelling of aerobic degradation of vinasses with Penicillium decumbens. Process Biochemistry. 40, 2805–2811.

Kahraman, S., Yesilada, O. (2001). Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi. Folia Microbiologica. 46 (2), 133–136.

Kumar, V., Wati, L., Nigam, P., Banat, I.M., Yadav, B.S., Singh, D., Marchant, R. (1998). Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. Process Biochemistry. 33 (1), 83–88.

Lay, C., Wu, J., Hsiao, C., Chang, J., Chen, C., Lin, C. (2010). Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. International Journal of Hydrogen Energy. 35(24), 13445–13451.

Leal, I., Chirinos, E., Leal, M., Morán, H., Barrera, W. (2003). Caracterización fisicoquímica de la vinaza del Agave Cogui y su posible uso agroindustrial. Multiciencias. 3 (2).

Li D., Sun Y., Kong X. y Zhang Y. (2008). Hydrogen Production Characteristics of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes by Anaerobic Mixed Culture Fermentation. International Journal of Hydrogen Energy. 30, 1-9.

Levin D.B., Pitt L., Love M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical applications. International Journal of Hydrogen Energy. 29, 173-185.

López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., Gallardo-Valdez, J. (2010). Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 9, 109-116.

Mane, J.D., Modi, S., Nagawade, S., Phadnis, S.P., Bhandari, V.M. (2006). Treatment of spentwash using chemically modified bagasse and colour removal studies. Bioresource Technology. 97, 1752–1755.

Martín, M.A., Raposo, F., Borja, R., Martín, A. (2006). Kinetics study of anaerobic digestion of vinasse pretreated with ozono, ozone plus ultraviolet light and ozone plus ultraviolet light in presence of titanium dioxide. Process Biochem. 37, 699-709.

Méndez-Acosta, H.O., Snell-Castro, R., Alcaraz-González, V., González-Álvarez, V., Pelayo-Ortiz, C. (2010). Anaerobic treatment of Tequila vinasses in a CSTR-type digester. Biodegradation. 21, 357–363.

Moat, A.G., Foster, J. W., Spector, M.P. (2002). Microbial Physiology. 4a. ed. John Wiley & Sons. 412-431.

Moletta, R. (2005). Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion. Water Science and Technology. 51(1), 137–144.

Muñoz-Páez, K.M., Ríos-Leal, E., Valdez-Vázquez, I., Rinderknecht-Seijas, N., PoggiVaraldo, H.M., 2011. Re-fermentation of washed spent solids from batch hydrogenogenic fermentation for additional production of biohydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. Journal of Environmental Management. 95S, S355–S359.

NMX-AA-034-SCFI-2001. Determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.

NOM-070-SCFI-1994. Bebidas alcohólicas. Mezcal-Especificaciones. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.

NOM-064-ECOL-1994. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de la destilería. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.

Ntaikou, I., Antonopoulou, G., Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation. Waste Biomass Valoriz. 1 (1), 21–39.

Ortega-Clemente A., Ponce-Noyola M.T., Montes-Horcasitas M.C., Caffarel-Méndez S.,Vicent M.T., Barrera–Cortes J., Poggi-Varaldo H.M. (2007). Semi-continuous treatment of recalcitrant anaerobic effluent from pulp and paper industry using hybrid pellets of Trametes versicolor. Water Science and Technology. 55 (6), 125-133.

Pérez-García, M., Romero-García, Ll., Rodríguez-Cano, R., Sales-Márquez, D. (2005). High rate anaerobic thermophilic technologies for distillery wastewater treatment. Water Science and Technology. 51(1), 191–198.

Poggi-Varaldo, H.M., Alzate-Gaviria, L.M., Pérez-Hernández, A., Nevarez-Morillón, V.G., Rinderknecht-Seijas, N. (2005). A side-by-side comparison of two systems of sequencing coupled reactors for anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste. Waste Management & Research. 23 (3), 270–280.

Potentini, M.F., Rodriguez-Malaver, A.J., (2006). Vinasse biodegradation by Phanerochaete chrysosporium. Journal of Environmental Biology. 27 (4), 661–665.

Preeti, C.S., Aniruddha, B.P. (2006). Enhancement in biodegradability of distillery wastewater using enzymatic pretreatment. Journal of Environmental Management. 78 (1), 77–85.

Rashad, F.M., Saleh, W.D., Moselhy, M.A. (2010). Bioconversion of rice straw and certain agro-industrial wastes to amendments for organic farming systems: 1.composting, quality, stability and maturity indices. Bioresource Technology. 101 (15), 5952–5960.

Rehman, M.S., Ahmad, N., Sarwar, M., Hussain, W., 2006. Pretreatment of complex industrial wastewater by ozonation. Journal of Water and Environment Technology. 4 (1), 51–59.

Robles-González, V., Galindez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Treatment of mezcal vinasses: A review. Journal of Biotechnology. 157(4), 524–546.

Rodriguez-Maritnez, J., Aguilera-Carbó., A.F., Garza-García, Y. (2005). Influence of Nitrate and Sulfate on the Anaerobic Treatment of Pharmaceutical Wastewater. Engineering in Life Sciences. 5(6) ,568 - 573

Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA). Plan rector sistema nacional maguey mezcal. Consultado en el 2012 de http://www.sagarpa.gob.mx/.

Show, K.Y., Lee, D.J., Chang J.S. (2011). Bioreactor and process design for biohydrogen production. Bioresource Technology. 102, 8524–8533.

Siles, J.A., Garcia-Garcia, I., Martin, A., Martin, M.A. (2011). Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. Journal of Hazardous Materials. 188 (1–3), 247–253.

Smith, B.C. (2011). Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Boca Raton, EUA: CRC Press.

Smith, M. (2003). O-Methylisourea. e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis.

Singh, A., Bajar, S., Bishnoi, N.R., Singh, N. (2010). Laccase production by Aspergillus heteromorphus using distillery spent wash and lignocellulosic biomass. Journal of Hazardous Materials. 176 (1–3), 1079–1082.

Tejada, M., García-Martínez, A.M., Parrado. (2009). Effects of a vermicompost composted with beet vinasse on soil proporties, soil losses and soil restoration. CATENA. 77(3), 238–247.

Ulmanu, M., Maranon, E., Fernández, Y., Castrillón, L., Anger, I., Dumitriu, D., (2003). Removal of copper and cadmium ions from diluted aqueous solutions by low cost and waste material adsorbents. Water, Air and Soil Pollution. 142, 357–373.

Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Muñoz, K., Carmona, A., Poggi-Varaldo, H.M. (2006). Effect of inhibition treatment, type of inocula and incubation temperature o batch hydrogen production from organic solid wastes. Biotechnology and Bioengineering. 95(3), 342–349.

Vallero M.V.G, Lettinga G., Lens, P.N.L., (2003). Long-term adaptation of methanol-fed thermophilic (55° C) sulfate- reducing reactors to NaCl. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 30, 375–382.

van Langerak, E.P.A., Gonzales-Gil, G., van Aelst, A., van Lier, J.B., Hamelers, H.V.M., Lettinga, G., (1998). Effects of high calcium concentrations on the development of methanogenic sludge in upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactors. Water Res. 32 (4), 1255–1263.

Vardar-Schara Gonul y Wood Tomas K. (2007). Review: Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. Microbial Biotechnology.1-19

Vlyssides, A.G., Israilides, C.J., Loizidou, M., Karvouni, G., Mourafeti, V., (1997). Electrochemical treatment of vinasse from beet molasses. Water Science and Technology. 36 (2–3), 271–278.

Yavuz, Y. (2007). EC and EF processes for the treatment of alcohol distillery wastewater. Separation and Purification Technology. 53(1), 135–140.