



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química

*“Reciclaje de residuos y subproductos derivados de la
industria vitivinícola”*

*“Recycling of waste and by-products derived from the
wine industry”*

Tesis Doctoral presentada por

Javier Hungría Estévez

07 de agosto de 2019

TITULO: *RECICLAJE DE RESIDUOS Y SUBPRODUCTOS DERIVADOS DE LA
INDUSTRIA VITIVINICOLA*

AUTOR: *Javier Luis Hungría Estévez*

© Edita: UCOPress. 2019
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)

**Reciclaje de residuos y subproductos derivados de la
industria vitivinícola**

LOS DIRECTORES.

**MARTIN SANTOS
MARIA ANGELES
- 30797589Z**

Firmado digitalmente por
MARTIN SANTOS MARIA
ANGELES - 30797589Z
Fecha: 2019.07.25 20:40:10
+02'00'

Fdo.: Dra. María de los Ángeles Martín Santos

Catedrática de Universidad.
Departamento de Química Inorgánica e
Ingeniería Química. Área de Ingeniería
Química, de la Universidad de Córdoba

**SILES LOPEZ
JOSE ANGEL -
30964419W**

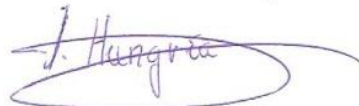
Firmado digitalmente por SILES LOPEZ
JOSE ANGEL - 30964419W
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, serialNumber=30964419W,
sn=SILES LOPEZ, givenName=JOSE
ANGEL, cn=SILES LOPEZ JOSE ANGEL -
30964419W
Fecha: 2019.07.25 23:25:37 +02'00'

Fdo.: Dr. José Ángel Siles López

Profesor Titular de Universidad.
Departamento de Química Inorgánica e
Ingeniería Química. Área de Ingeniería
Química, de la Universidad de Córdoba

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor

EL DOCTORANDO,



Fdo.: Javier Hungría Estévez

Licenciado en Ciencias Ambientales
por la Universidad de Córdoba



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química

Los Doctores: María de los Ángeles Martín Santos, Catedrática de Ingeniería Química, José Ángel Siles López, Profesor Titular de Universidad,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral: ***“Reciclaje de residuos y subproductos derivados de la industria vitivinícola”*** se ha realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios de este departamento por el Licenciado en Ciencias Ambientales D. Javier Hungría Estévez y reúne los requisitos vigentes, por lo que autorizamos su presentación y posterior defensa pública.

Córdoba, 25 de julio de 2019

Fdo.: Dra. María de los Ángeles Martín Santos

Fdo.: Dr. José Ángel Siles López



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química

Isidoro García García, Director del Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química, de la Universidad de Córdoba,


INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada *“Reciclaje de residuos y subproductos derivados de la industria vitivinícola”* se ha realizado en el Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba, por el Licenciado en Ciencias Ambientales D. Javier Hungría Estévez y reúne los requisitos vigentes, por lo que autorizo su presentación y posterior defensa pública.

Córdoba, 25 de julio de 2019

Fdo.: Dr. Isidoro García García

Código Seguro de Verificación	VFBAAX5P3EVC13GKIBXNJ4IENQ	Fecha y Hora	25/07/2019 14:16:19
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmado por	ISIDORO GARCIA GARCIA		
Url de verificación	https://sede.uco.es/verifirma/	Página	1/1



Mediante la defensa de esta Memoria, se pretende optar a la **obtención del Doctorado Internacional**, habida cuenta que el Doctorando reúne los requisitos exigidos para tal mención:

1. Se cuenta con los informes favorables de dos doctores pertenecientes a Instituciones de reconocido prestigio de países diferentes al país en el que se ha realizado la estancia.
2. En el Tribunal que ha de evaluar la Tesis Doctoral, existe un miembro de un Centro de Enseñanza Superior o de Investigación de otro país.
3. Parte de la defensa de la Tesis Doctoral se realizará en la lengua oficial de otro país.
4. El doctorando ha realizado una estancia de investigación de tres meses de duración en el Department of Industrial Biological Sciences of Ghent University (Bélgica), gracias a la concesión de una ayuda para estancias en el extranjero asociada a una beca movilidad para la internacionalización de la Tesis por parte de la Universidad de Córdoba.
5. La Tesis consta de seis artículos, dos de ellos aceptados definitivamente en revistas con índice de impacto del JCR.

La realización de una tesis doctoral conlleva el aprendizaje de trabajo en equipo, sin el cual el camino sería mucho más tedioso. Durante este proyecto, el cual ha supuesto varios años de mi vida, han sido muchas las personas que de manera directa e indirecta han colaborado en conseguir este fin. Con ello, quiero expresar a todas ellas mi más sincero agradecimiento.

Deseo agradecer a mis directores, María de los Ángeles Martín Santos y José Ángel Siles López, el haberme dado la oportunidad de haber podido llevar a cabo mi tesis. En igual medida, agradecer a Bodegas Robles S.A., y concretamente a Francis y Rocío por vuestro apoyo material y personal en la consecución de esta tesis, aunando innovación y tradición en un mismo objetivo.

Así mismo, agradecer a mi compañera y amiga de Departamento, mi locuela Isa has sido un apoyo, compañía y desahogo, que ayudaron a seguir hacia delante cuando llegaba la apatía o a sacarme una sonrisa en un día nublado. No puedo pasar por alto a “la loca de los gatos”, mi compañero Peter en la aventura argentina, a mi tocayo Javi Reyes, y al resto de los papeleros que siguen al frente y a los que tuvieron que abandonar el barco. Agradecer especialmente a Inmaculada Bellido, la cual no solo se ha mostrado como una compañera, sino como una amiga alentándome cuando más lo necesitaba.

Por otro lado, dar las gracias a todo el profesorado del Área de Ingeniería Química, y expresamente a Sixto por alegrarnos cada mañana con sus chistes. Deseo mostrar mi agradecimiento a quien me hizo descubrir el precioso mundo de la investigación, Lourdes Moyano Cañete, llevándome de la mano en mi primer año de tesis y durante el Máster que me dio acceso a llevar a cabo esta etapa.

Thank you so much to Diederik Rousseau and everyone who works in the Department of Industrial Biological Sciences of Ghent University (Bélgica), and also all friends and partners from Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Argentina), for having welcomed me and taught me so much during my stays, specially to Dra. Estela Santana, Dra. Verónica Córdoba and my dear friend Mica (te echo mucho de menos, boluda).

Muchas gracias a los que conforman mi otra familia, Blanca, Álvaro, Jaime, Betsy “la mujer de la eterna sonrisa”, Rafa “Shinnosuke”, Azahara, Camacho, y todos aquellos que me habéis impulsado a seguir con nuestras terapias de deporte o acompañándolo con una cañita. Sois mi motor!!

Finalmente, agradecer a mis padres por enseñarme unos valores que me hacen ser la persona que soy (con mis defectos y virtudes, pero orgulloso de todos ellos). Nunca podré agradeceros todo lo que habéis dado por mí, vuestro esfuerzo se refleja en esta tesis, y espero que estéis orgullosos de ello. Aunque estéis en el cielo, siempre os llevo conmigo papá y “mi abu”. Gracias Anabel, por formar parte de mi vida, a quien quiero como nunca había querido y a quien ha llevado el peso de la misma en los momentos de flaqueza. Gracias por haberme hecho recordar el significado de la palabra familia, y que junto con mi madre sois las dos mujeres de mi vida, y que de una manera u otra habéis sido partícipes de esta tesis.

A todos, muchas gracias por el cariño y apoyo prestado

ÍNDICE/INDEX

	Página/Page
1- Resumen y objetivos /Abstract and Aims	8
2- Introducción	19
2.1 Problemática actual de la generación de residuos.	21
2.2 Gestión y tratamiento de residuos.	21
2.3 Clasificación de los residuos.	22
2.4 Residuos agrícolas.	24
2.5 Residuos vitivinícolas.	25
2.5.1 Clasificación de residuos vitivinícolas.	26
2.5.2 Problemática ambiental de los residuos vitivinícolas.	30
2.5.2.1 Problemas asociados a las emisiones de olor.	31
2.5.3 Aprovechamiento actual de los residuos vitivinícolas.	33
2.5.4 Usos alternativos a los residuos vitivinícolas.	38
2.5.4.1 Compostaje.	38
2.5.4.1.1 Etapas	41
2.5.4.1.2 Variables en un sistema de co-compostaje.	43
2.5.4.1.3 Variables ambientales y de control.	50
2.5.4.2 Digestión anaerobia	56
2.5.4.2.1 Etapas de la digestión anaerobia.	58
Referencias.	65
3- Materiales y métodos	72
3.1 Equipo de digestión anaerobia	74

3.1.1 Digestores anaerobios	74
3.1.2 Sistema de agitación	76
3.1.3 Sistema de absorción de dióxido de carbono	76
3.1.4 Sistema de medida de metano	76
3.2 Respirómetro dinámico en fase líquida.	78
3.3 Respirómetro dinámico en fase sólida.	81
3.4 Olfatometría dinámica.	84
3.5 Métodos analíticos.	89
3.5.1 pH	91
3.5.2 Conductividad.	91
3.5.3 Alcalinidad.	91
3.5.4 Acidez volátil.	92
3.5.5 Ácidos orgánicos volátiles (determinación cromatográfica).	93
3.5.6 Sólidos totales (ST).	94
3.5.7 Sólidos minerales (SM).	94
3.5.8 Sólidos volátiles (SV).	95
3.5.9 Demanda química de oxígeno total (DQO _{total}).	95
3.5.10 Carbono total, carbono inorgánico y carbono orgánico total.	97
3.5.11 Nitrógeno total Kjeldahl.	97
3.5.12 Nitrógeno amoniacal.	98
3.5.13 Fósforo total (P ₂ O ₅).	99
3.5.14 Fósforo soluble.	100
3.5.15 Azúcares reductores.	102
3.5.16 Grado alcohólico.	104

3.5.17 Metales pesados.	105
Referencias.	107
4. Resultados y discusión.	109
Resumen bloque I: Digestión aerobia de subproductos y residuos vitivinícolas.	111
Descripción del artículo: “Aerobic biodegradability test of organic grape marc waste: A promising tool to evaluate polluting winery waste biovalorisation”.	114
<i>Aerobic biodegradability test of organic grape marc waste: A promising tool to evaluate polluting winery waste biovalorisation.</i>	116
Descripción del artículo: “Advantages and drawbacks of OFMSW and winery waste co-composting at pilot scale”.	135
<i>Advantages and drawbacks of OFMSW and winery waste co-composting at pilot scale.</i>	137
Resumen bloque II: Digestión anaerobia de subproductos y residuos vitivinícolas.	163
Descripción del artículo: “Revalorization of grape marc waste from liqueur wine: Biomethanization”.	166
<i>Revalorization of grape marc waste from liqueur wine: Biomethanization</i>	168
Descripción del artículo: “Technical evaluation and potential energy recovery from anaerobic digestion of grape lees: Inoculum importance”.	202
<i>Technical evaluation and potential energy recovery from anaerobic digestion of grape lees: Inoculum importance”.</i>	204

Descripción del artículo: “Evaluation of anaerobic digestion of Verdejo lees from an ecological crop” **235**

Evaluation of anaerobic digestion of Verdejo lees from an ecological crop. **237**

Descripción del artículo: “Anaerobic co-digestion of winery waste: Comparative assessment of grape marc waste and lees derived from organic crops” **262**

Anaerobic co-digestion of winery waste: Comparative assessment of grape marc waste and lees derived from organic crops **264**

5. Conclusiones. **287**

RESUMEN Y OBJETIVOS/ABSTRACT AND AIMS

RESUMEN Y OBJETIVOS

El desarrollo de una legislación cada vez más restrictiva en materias medioambientales, auspiciada a su vez por una creciente concienciación ciudadana, está favoreciendo la implantación de nuevas prácticas más sostenibles en la industria agroalimentaria. Concretamente, es frecuente en el sector vitivinícola que la mayoría de las bodegas lleven a cabo procesos de producción tradicionales, cuya praxis ambiental puede resultar cuestionable. El almacenamiento de residuos al aire libre, el ineficaz aislamiento en los tanques de fermentación, la pérdida de recursos naturales en la zona de cultivo (nutrientes en el suelo), que son transportados a gran distancia para su gestión parcial y la disposición en vertedero, suponen un impacto ambiental grave que podría reducirse mediante la implantación de técnicas alternativas en la valorización y gestión de los residuos del sector agrícola.

La Denominación de Origen Protegida Montilla-Moriles, situada en Córdoba (España), es un claro ejemplo de ello, donde las prácticas vitivinícolas tradicionales han ido sucediéndose de generación en generación, con plantación de cepas en vaso, aunque en los últimos años se han ido sustituyendo por plantación en espaldera. El cultivo predominante corresponde a la variedad Pedro Ximenez (95% de la producción total), además de Airén, Baladí, Verdejo, Moscatel, entre otros. La reducción de su impacto medioambiental es prioritaria, lo que a su vez puede repercutir positivamente en la economía de la zona, mediante la aplicación de prácticas alternativas en la gestión y tratamiento de los residuos principales generados durante la vinificación (orujo y lías, fundamentalmente) que permitan recuperar recursos.

Ante esta necesidad, se proponen dos técnicas o tratamientos biológicos para la gestión de dichos residuos: co-compostaje y digestión anaerobia. De forma más concreta, los

objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral es el aprovechamiento de los residuos y subproductos generados en la industria vitivinícola, encuadrados en los siguientes apartados:

- **Test de biodegradabilidad de orujo de uva**, utilizando ensayos respirométricos aerobios como herramienta de predicción y cuantificación de la influencia de las variables físico-químicas del proceso sobre la actividad aerobia de los microorganismos. (Hungría, J., Siles, J.A., Martín, M.A.. *Aerobic biodegradability test of organic grape marc waste: A promising tool to evaluate polluting winery waste biovalorisation. Under review*)

- Evaluación de las **ventajas e inconvenientes del proceso de co-compostaje** de orujo y la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos, realizando el seguimiento del índice respirométrico dinámico (consumo de oxígeno en la degradación de la materia orgánica y tiempo en hacerlo) en el proceso, así como de la temperatura, oxígeno consumido y otras variables operacionales que permitan controlar su evolución para obtener un compost de calidad. Así mismo, se ha llevado incluido el estudio de la emisiones odoríferas a lo largo del proceso, incluyendo de forma comparativa los resultados de las emisiones del compostaje de otros residuos. (Hungría, J., Gutiérrez, M.C., Siles, J.A., Martín, M.A. 2017. *Advantages and drawbacks of OFMSW and winery waste co-composting at pilot scale. Journal of Cleaner Production. 164, 1050-1057*).

- Estudio de **viabilidad de la digestión anaerobia de orujo de la variedad Pedro Ximenez** en condiciones mesófilas, y su posible implantación en una bodega como técnica alternativa de tratamiento sostenible. (Hungría J., Siles J.A., Gil A., Gutiérrez, M.C., Martín M.A. *Revalorization of grape marc waste from liqueur wine: Biomethanization. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 94, 1499-1508*).

- **Evaluación de la digestión anaerobia de lías procedentes de cultivo ecológico** de dos variedades distintas, procedentes de la decantación del mosto y fermentación alcohólica, respectivamente (*Evaluation of Anaerobic Digestion of Verdejo Lees from an Ecological*

Crop. Javier Hungría J., Siles J.A., Gutiérrez M.C., Chica A.F., Martín M.A. Renewable Energy (Under review) y Technical evaluation and potential energy recovery from anaerobic digestion of grape lees: inoculum importance. (Hungría J., Siles J.A., Gutiérrez M.C., Chica A.F., Martín M.A. Bioresource Technology (Under review)).

- **Evaluación tecnológica de la digestión anaerobia de lías Pedro Ximenez**, estudiando la posible influencia del empleo de inóculos de diversa procedencia en la recuperación energética del metano contenido en el biogás. Estudio preliminar de implantación de un digestor anaerobio en la DOP Montilla-Moriles, Córdoba (España), considerando la potencia energética generada por dichos residuos y su repercusión en el medio ambiente en forma de ahorro en emisiones de CO₂. (*Hungría J., Siles J.A., Gutiérrez M.C., Chica A.F., Martín M.A. Technical evaluation and potential energy recovery from anaerobic digestion of grape lees: inoculum importance. Bioresource Technology (Under review).*)

- **Estudio de viabilidad del tratamiento integral de residuos de orujo de uva y lías derivadas de cultivos orgánicos**, mediante la digestión anaeróbica para producir energía en forma de metano, valorizando el digestato estabilizado como una enmienda orgánica. Se ha estudiado el tratamiento secuencial de las lías de PX, las lías de Verdejo y los residuos de orujo de uva en el mismo reactor para completar el ciclo anual y promover la economía circular en la DOP Montilla-Moriles. (*Hungría J., Siles J.A., Chica A.F., Martín M.A. Anaerobic co-digestion of winery waste: Comparative assessment of grape marc waste and lees derived from organic crops. Journal of Environmental Management (Under review).*)

En cuanto al co-compostaje, el elevado contenido en humedad de las lías condiciona que su mezcla con otro residuo dé como resultado una mezcla residual con contenido de

humedad adecuado. Por ello, se ha restringido el estudio de compostaje a los orujos. Tras la evaluación de su biodegradabilidad en condiciones aerobias, se ha estudiado la viabilidad tecnológica de su co-compostaje, a escala de planta piloto, con la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) a 50:50%, en peso. La FORSU es un residuo generado en todos los municipios y para cuyo correcto compostaje solo requiere una previa clasificación de los residuos sólidos urbanos para seleccionar la fracción más rica en materia orgánica. En muchos municipios ya se dispone de recogida selectiva de residuos urbanos, e incluso suelen someterse a compostaje de forma directa.

Adicionalmente, la digestión anaerobia es ampliamente conocida como tecnología de valorización y/o tratamiento de residuos orgánicos biodegradables. Por ello, con el objetivo de evaluar la viabilidad de la aplicación de la digestión anaerobia a distintos residuos del sector vitivinícola (orujo y lías de dos variedades distintas de uva) se han realizado tres estudios (uno por residuo) a escala de laboratorio y en condiciones mesófilas. En el caso de las lías PX se obtuvieron los mayores rendimientos en metano 539 ± 46 NmL CH₄/g SV, seguido de las lías Verdejo (332 ± 37 NmL CH₄/g SV) y orujo Pedro Ximenez (252 ± 31 NmL CH₄/g SV). Dado que la generación de residuos se produce de forma escalonada a lo largo del tiempo, se ha llevado a cabo otro estudio para evaluar la viabilidad del tratamiento secuencial en un mismo reactor de todos los residuos, y de esta forma completar el ciclo anual de producción y promover la economía circular en la D.O.P. Montilla-Moriles.

ABSTRACT AND AIMS

The development of an increasingly restrictive legislation on environmental matters, sponsored in turn by a growing public awareness, is favoring the implementation of new more sustainable practices in the agri-food industry. Specifically, it is common in the wine sector that most wineries carry out traditional production processes, whose environmental praxis can be questionable. The storage of waste in the open air, the inefficient isolation in the fermentation tanks, the loss of natural resources in the cultivation area (nutrients in the soil), which are transported at a great distance for partial management and disposal in landfill, they suppose a serious environmental impact that could be reduced by means of the implantation of alternative techniques in the valuation and management of the residues of the agricultural sector.

The Montilla-Moriles Protected Designation of Origin, located in Córdoba (Spain), is a clear example of this, where traditional winemaking practices have been happening from generation to generation, with plantation of strains in a glass, although in recent years they have It has been replaced by trellis plantation. The predominant crop corresponds to the Pedro Ximenez variety (95% of total production), in addition to Airén, Baladí, Verdejo, Moscatel, among others. The reduction of its environmental impact is a priority, which in turn can have a positive impact on the economy of the area, through the application of alternative practices in the management and treatment of the main waste generated during winemaking (pomace and lees, mainly) that allow to recover resources.

Given this need, two techniques or biological treatments are proposed for the management of such waste: co-composting and anaerobic digestion. More specifically, the specific objectives of this Doctoral Thesis is the use of waste and by-products generated in the wine industry, framed in the following sections:

- **Biodegradability test of grape marc**, using aerobic respirometric tests as a tool for prediction and quantification of the influence of the physical-chemical variables of the process on the aerobic activity of microorganisms. (Hungría, J., Siles, J.A., Martín, M.A. *Aerobic biodegradability test of organic grape marc waste: A promising tool to evaluate polluting winery waste biovalorisation.. Under review*)

- Evaluation of the **advantages and disadvantages of the process of co-composting** pomace and the organic fraction of urban solid waste, monitoring the dynamic respirometric index (oxygen consumption in the degradation of organic matter and time in doing so) in the process, as well as the temperature, oxygen consumed and other operational variables that allow controlling its evolution to obtain a quality compost. Likewise, the study of odoriferous emissions throughout the process has been included, including comparatively the results of composting emissions from other wastes. (Hungría, J., Gutiérrez, M.C., Siles, J.A., Martín, M.A. 2017. *Advantages and drawbacks of OFMSW and winery waste co-composting at pilot scale. Journal of Cleaner Production. 164, 1050-1057*).

- **Feasibility study of the anaerobic digestion of pomace of the Pedro Ximenez variety** under mesophilic conditions, and its possible implantation in a winery as an alternative sustainable treatment technique. (Hungría, J., Siles J.A., Gil A., Gutiérrez, M.C., Martín M.A. *Revaluation of grape marc waste from liqueur wine: Biomethanization. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 94, 1499-1508*).

- **Evaluation of anaerobic digestion of lees from organic farming of two different varieties**, from the decantation of must and alcoholic fermentation, respectively (Evaluation of Anaerobic Digestion of Verdejo Lees from an Ecological Crop. Hungría, J., Siles JA, Gutiérrez MC, Chica AF, Martín MA *Renewable Energy (Under review)* and *Technical evaluation and potential energy recovery from anaerobic digestion of grape*

lees: inoculum importance. (Hungría J., Siles JA, Gutiérrez MC, Chica AF, Martín MA Bioresource Technology (Under review)).

- **Technological evaluation of the anaerobic digestion of lees Pedro Ximenez**, studying the possible influence of the use of inocula of diverse origin in the energy recovery of methane contained in biogas. Preliminary study of implantation of an anaerobic digester in the PDO Montilla-Moriles, Córdoba (Spain), considering the energy generated by said waste and its impact on the environment in the form of savings in CO₂ emissions. *(Hungría J., Siles J.A., Gutiérrez M.C., Chica A.F., Martín M.A. Technical evaluation and potential energy recovery from anaerobic digestion of grape lees: inoculum importance. Bioresource Technology (Under review)).*

- **Feasibility study of the integral treatment of grape pomace residues and lees derived from organic crops**, through anaerobic digestion to produce energy in the form of methane, valuing the stabilized digestate as an organic amendment. The sequential treatment of PX lees, Verdejo lees and grape pomace residues in the same reactor has been studied to complete the annual cycle and promote circular economy in the Montilla-Moriles PDO. *(Hungría J., Siles J.A., Chica A.F., Martín M.A. Anaerobic co-digestion of winery waste: Comparative assessment of grape marc waste and lees derived from organic crops. Journal of Environmental Management (Under review)).*

As for co-composting, the high moisture content of the lees determines that their mixing with another residue results in a residual mixture with adequate moisture content. Therefore, the study of composting has been restricted to pomace. After the evaluation of its biodegradability in aerobic conditions, the technological viability of its co-composting

has been studied, at the pilot plant scale, with the organic fraction of urban solid waste (OFUSW) at 50:50%, by weight. OFUSW is a waste generated in all municipalities and for whose correct composting it only requires a previous classification of urban solid waste to select the richest fraction in organic matter. In many municipalities, selective collection of urban waste is already available, and they even tend to be directly composted.

Additionally, anaerobic digestion is widely known as biodegradable organic waste recovery and / or treatment technology. Therefore, in order to evaluate the viability of the application of anaerobic digestion to different residues in the wine sector (pomace and lees of two different grape varieties), three studies (one per residue) have been carried out on a laboratory scale and in mesophilic conditions. In the case of the Pedro Ximenez lees, the highest yields in methane 539 ± 46 NmL CH₄/g VS were obtained, followed by the Verdejo lees (332 ± 37 NmL CH₄/g VS) and grape marc waste of Pedro Ximenez (252 ± 31 NmL CH₄/g VS). Since the generation of waste occurs in a phased manner over time, another study has been carried out to assess the feasibility of sequential treatment in the same reactor of all waste, and thus complete the annual production cycle and promote the circular economy in the PDO Montilla-Moriles.

INTRODUCCIÓN/INTRODUCTION

2.1 Problemática actual de la generación de residuos

El rápido crecimiento demográfico experimentado en la población mundial, acompañado del hacinamiento en muchas áreas del planeta, ha motivado uno de los problemas sociales de mayor trascendencia en la actualidad: la generación de residuos. Así mismo, el empleo de bienes materiales con un ciclo de funcionalidad cada vez más corto y el uso de envases sin retorno, fabricados con materiales no biodegradables han agravado esta situación, que supone un riesgo de salud pública y medioambiental, por lo que ha sido necesaria una regulación normativa en la gestión y tratamiento de residuos. En concreto, la incorrecta gestión de los residuos genera, entre otros, un deterioro del paisaje, olores indeseados, riesgo de incendios originando un problema secundario como es la contaminación atmosférica como consecuencia de los gases emitidos, riesgo de contaminación de acuíferos por lixiviación, etc.

2.2 Gestión y tratamiento de residuos

La Directiva Marco de Residuos 2008/98/CE de 19 de noviembre de 2008, tiene como objetivo principal cumplir con el principio de jerarquía en la gestión de residuos, reduciendo el uso de recursos. Dicho instrumento normativo, considera la prevención como la mejor opción de gestión, seguida del acondicionamiento para la reutilización, reciclado, valorización de dichos residuos (incluida la energética) y por último la eliminación (como la disposición en vertedero).

El objetivo es que la sociedad europea sea eficiente en el uso de los recursos, produzca menos residuos y utilice como recurso, siempre que sea posible, los que no pueden ser evitados. En definitiva, se trata de transformar una sociedad con una economía lineal basada en producir, consumir y tirar, en una economía circular en la que el reciclaje

o la valorización material de los residuos jueguen un papel primordial, reincorporándose estos en la línea de producción.

Los Estados miembros tienen la obligación de establecer planes de gestión de residuos con cobertura en toda la geografía de cada uno de ellos, según la Directiva 2008/98/CE Marco de Residuos.

Así mismo, la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, que incorpora a su ordenamiento interno una Directiva emanada de la Directiva 2008/98/CE Marco de Residuos, obliga a la elaboración de planes de gestión al Estado y a las comunidades autónomas, permitiendo que las Entidades Locales desarrollen programas de gestión de residuos en el ámbito de sus competencias. El artículo 14 de dicha Ley establece que el Ministerio competente en materia de medio ambiente es el responsable de la elaboración del Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos, previa consulta a las Comunidades Autónomas, a las Entidades Locales, a otros Ministerios afectados y cuando proceda en colaboración con otros Estados miembros. Dicho Plan debe contener la estrategia general de la política de residuos, las orientaciones y la estructura a la que ajustarse los planes autonómicos, así como los objetivos mínimos a cumplir de prevención, preparación para la reutilización, reciclado, valorización y eliminación. La definición de dichos objetivos debe ser consecuente con las medidas en reducción de gases de efecto invernadero y los compromisos internacionales acordados en materia de cambio climático. Así mismo, de acuerdo con lo establecido en el apartado 2 de la citada Ley, las Comunidades Autónomas elaborarán los planes autonómicos de gestión de residuos, previa consulta a las Entidades Locales.

2.3 Clasificación de los residuos

La Directiva 2006/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2006, define residuo como *“cualquier sustancia u objeto del cual su poseedor se desprenda o tenga la intención o la obligación de desprenderse”*. Los residuos pueden clasificarse por su peligrosidad como residuos peligrosos y no peligrosos de conformidad con la Decisión 2000/532/CE de la Comisión, de 3 de mayo de 2000. De esta manera, serán clasificados como residuos peligrosos *“aquellos que figuren en la lista de residuos peligrosos, aprobada en el Real Decreto 952/1997, así como los recipientes y envases que los hayan contenido. Los que hayan sido calificados como peligrosos por la normativa comunitaria y los que pueda aprobar el Gobierno de conformidad con lo establecido en la normativa europea o en convenios internacionales de los que España sea parte”*.

Otra posible clasificación es atendiendo a la procedencia de dichos residuos (Avanzini, 2003):

- Residuos generados por el sector primario: Agrícolas, ganaderos y forestales.
- Residuos generados por el sector secundario: Industriales y radiactivos.
- Residuos generados por el sector terciario: Residuos sólidos urbanos y residuos sanitarios.

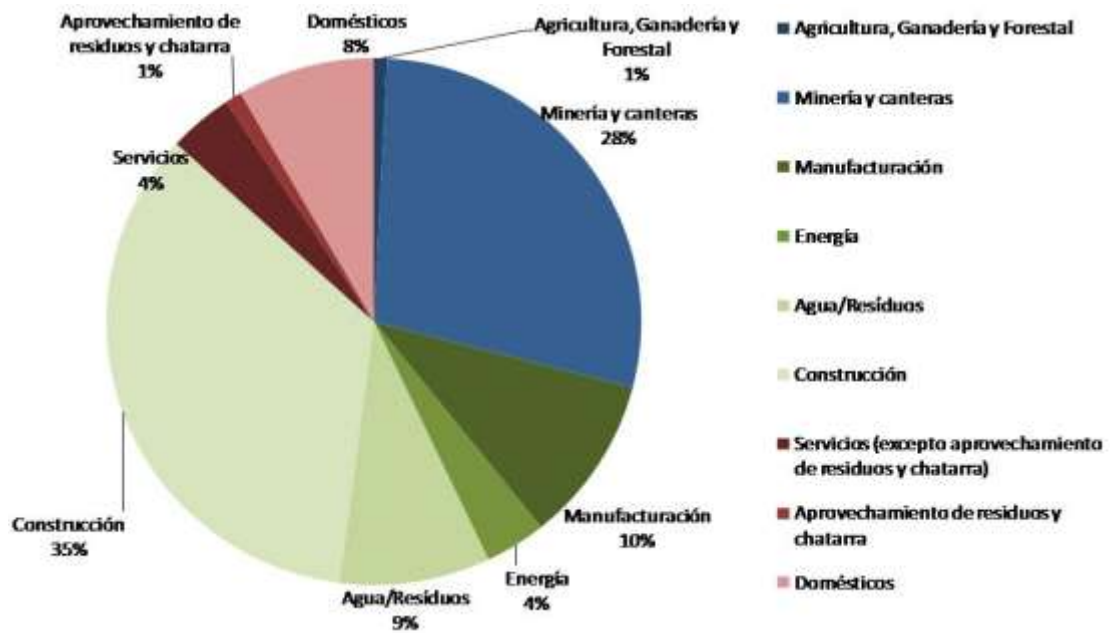


Figura 2.3 Generación relativa de residuos según su procedencia en Europa, durante el año 2014. Fuente EUROSTAT (2014).

Como puede observarse en la Figura 2.3, la minería y la construcción son los sectores industriales que mayor porcentaje de residuos generan en Europa (2014). No obstante, hay industrias extendidas por todo el mundo, como las derivadas del sector agrícola, en las que la gestión y tratamiento de residuos es de importancia capital, debido a su volumen de generación y carga contaminante.

2.4 Residuos agrícolas

Se estima que anualmente se producen 998 millones de toneladas residuos agrícolas en el mundo (Agamuthu, 2009), por lo que su tratamiento es crucial para reducir su impacto ambiental, abaratar costes de producción y generar nuevos sistemas económicos mediante su tratamiento alternativo. Atendiendo a la clasificación en función de su procedencia, la gestión de los residuos agrícolas está reglada en la Ley 10/98, así como en otras normativas de aplicación sustitutoria de la citada Ley de residuos producidos en explotaciones agrícolas y ganaderas consistentes en materiales fecales y

otras sustancias naturales y no peligrosas, utilizadas en explotaciones agrarias, reguladas en el Real Decreto 261/1996, de 16 de febrero, sobre protección de las aguas.

Esta disposición establece que la utilización como fertilizante agrícola de los residuos agrícolas estará sometida a la normativa que aprueben las Comunidades Autónomas a propuesta conjunta de los Departamentos de Medio Ambiente y de Agricultura, Pesca y Alimentación, como complemento a lo establecido en el Real Decreto 261/1996. En esta normativa se fijarán los tipos y cantidades de residuos que puedan ser utilizados como fertilizante sin poner en peligro la salud humana y sin perjudicar al medio ambiente. En el apartado 2 del artículo 4 de la Ley 7/94, de 18 de mayo de Protección Ambiental (BOJA 31/05/94) se establece que quedan excluidos del ámbito de aplicación de esta Ley los residuos orgánicos procedentes de actividades agrícolas o ganaderas o producidos en fase de explotación y que se depositen en suelo calificado como no urbanizable. Fuera de esta referencia los residuos vegetales pasan a ser considerados residuos y su gestión debe realizarse de acuerdo a los criterios establecidos en Ley 10/98 de Residuos, cuyo artículo 11 establece que los poseedores de residuos estarán obligados a su adecuada gestión, evitando su eliminación en todos los casos posibles y estando obligado a sufragar sus correspondientes costes de gestión, manteniéndolos en condiciones adecuadas de higiene y seguridad.

2.5 Residuos vitivinícolas

Dentro del sector primario, concretamente en el sector agrícola, destaca la enología, debido al gran volumen de vino que se produce a nivel mundial. De hecho, en el año 2013, la cifra mundial alcanzó los 281 millones de hectolitros de vino, lo que equivale a más de 29 millones de toneladas, volumen muy superior al alcanzado por otros cultivos importantes como son los derivados del procesado de la aceituna para obtención de aceite oliva virgen extra, que fue de 3.5 millones de toneladas a nivel mundial (FAO,

2013), generando aproximadamente 2.8 millones de toneladas de residuos. El 46% del volumen de vino producido corresponde a Italia, Francia y España (OIV (2013)). No obstante, España es el país con mayor superficie vitivinícola del mundo, con 1,2 millones de hectáreas aproximadamente, siendo el tercer país del mundo en cuanto a producción de vino (aproximadamente 45 millones de hectolitros en 2015) (MAGRAMA, 2015).

A nivel mundial, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la producción media de uva desde 2012 a 2016 fue de 74,4 millones de toneladas (FAO, 2017). Según esta misma fuente, el 60% de dicha producción es destinada a la elaboración de vino y mosto, generando anualmente millones de toneladas de orujo y lías (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2012). Estos subproductos representan un desafío para la mayor parte de los productores y zonas de Denominación de Origen (DO) dado que determinadas organizaciones gubernamentales y no gubernamentales han establecido ciertos requisitos estrictos de eliminación, como sucede por ejemplo en Australia, donde las bodegas deben registrar la cantidad de orujo generado y la metodología empleada para su eliminación (Environment Protection Authority South Australia, 2004).

Junto a las restricciones y modificaciones del marco legal en la gestión y tratamiento de residuos, un incremento en la concienciación ciudadana por el medio ambiente y la importancia de este cultivo a nivel mundial, requieren una especial atención la gestión de los residuos vitivinícolas. El volumen de residuos generados en la industria vitivinícola se mantiene relativamente estable debido a que las técnicas de elaboración del vino están determinadas por su Marco Regulador de la Denominación de Origen correspondiente, mientras que el volumen de residuos agrícolas en la Unión Europea ha ido disminuyendo desde 63.1 millones de toneladas en el año 2004 a 19.7 millones de toneladas en 2014 (EUROSTAT, 2017). Estos datos, junto con lo expuesto previamente,

aportan mayor grado de compromiso en la gestión de residuos y subproductos vitivinícolas, intentando orientarla hacia la obtención de un beneficio económico al viticultor sin detrimento en la política medioambiental.

2.5.1 Clasificación de residuos vitivinícolas

Los residuos generados durante el proceso de vinificación pueden clasificarse fundamentalmente en orujo y lías. El orujo es el residuo sólido generado durante el prensado de la uva, constituido por hollejos, raspones y semillas. Sus características varían notablemente en función del tipo de vino producido, ya sea blanco o tinto, de la variedad de uva utilizada y del tipo de proceso de separación empleado. Estos residuos se generan en diferentes etapas de vinificación. Durante la extracción del mosto, la uva es sometida a presiones moderadas durante distintos intervalos de tiempo, determinados en función del rendimiento de la uva de la temporada. En el caso de los vinos blancos, se debe minimizar, en la medida de lo posible, el contacto entre las partes sólidas (hollejos, raspones y semillas) y el mosto, a fin de evitar conferirle un sabor astringente y aromas no deseados, mientras que en el caso de la elaboración de vinos tintos, se produce una maceración dejando en contacto los hollejos, y en algunos casos semillas, de uvas tintas con el mosto, a fin de conferirle las propiedades organolépticas deseadas (OIV, 2016). En definitiva, el proceso para la obtención del mosto es el siguiente: Recepción en tolva, despallado (separación de la uva del raspón, a fin de que no transmita olores y sabores herbáceos desagradables), estrujado (prensado neumático que no altera al hollejo ni las semillas), bombeo de vendimia, escurrido y prensado. A continuación,

se procede a una separación física del residuo sólido (orujo) y líquido (mosto) en el caso del vino blanco, mientras que en el caso del vino tinto el proceso de separación se llevará a cabo tras la maceración (Figura 2.5.1).

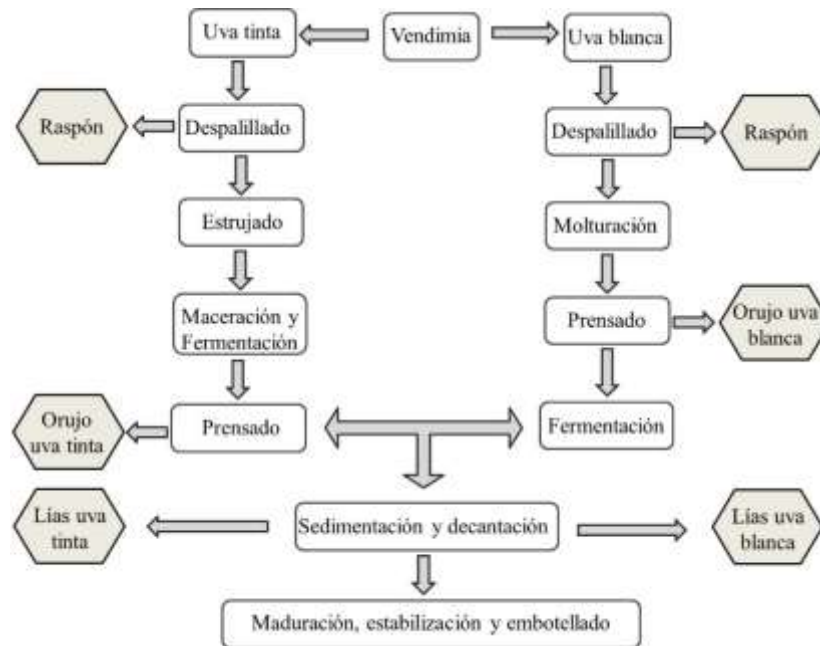


Figura 2.5.1.1 Diagrama de flujo proceso de elaboración de vino y generación de residuos y subproductos. Javier Hungría Estévez (2019)

Tras la separación, los mostos se almacenan en unos depósitos donde se depositan fangos constituidos por residuos terrosos, fragmentos de raspones y hollejos, sustancias pépticas y mucilaginosas. Dichos fangos se denominan lías. La cantidad y naturaleza de los fangos generados dependerá de la variedad de uva utilizada, de su estado de maduración y de la técnica empleada en la obtención del mosto (Zoecklein et al., 1999). Existen tres técnicas de separación de dichos fangos:

- Sedimentación y trasiego (separación del vino de aquellas materias sólidas depositadas en el fondo de los recipientes por acción de la gravedad). Es la técnica más empleada.
- Centrifugación por medio de un clarificador. Se trata de la técnica más rápida.
- Flotación. Se trata de una técnica parecida a una clarificación estática, en la que las partículas a decantar suben a la superficie con la ayuda de

aire o nitrógeno. Esta unión de partícula en suspensión con la burbuja de gas favorece la formación de un complejo solido-gas de menor densidad que el mosto, por lo que gran parte de los fangos tienden a subir a la superficie.

Además de los fangos o lías obtenidos tras esta etapa, existe otra fracción sólida, también denominada lías, que se genera tras la fermentación alcohólica y maloláctica. La fermentación maloláctica se lleva a cabo para conseguir la transformación del ácido málico en láctico, permitiendo que se suavice la acidez original del vino al término de la fermentación alcohólica (OIV, 2016).

Además de los desechos anteriormente mencionados, es destacable que la viticultura también genera aguas residuales. De hecho, España genera un volumen de aguas residuales derivadas de la producción de vino ($18 \cdot 10^6$ m³/año aproximadamente), seis veces mayor que el primer y segundo país productor de vino, Italia y Francia respectivamente (Rivas B. et al., 2006). En cada una de las fases del proceso de vinificación, se generan diferentes cantidades de agua, con composición variable, que en conjunto forman aguas residuales complejas que se tratan principalmente mediante digestión aeróbica (Mira de Orduña, 2010, Traversac et al., 2011). La digestión aeróbica de las aguas residuales de la industria vitivinícola produce una degradación parcial de la materia orgánica, que requiere de una gran superficie, generando a su vez grandes cantidades de lodo (Chiusano et al., 2015). El efluente resultante puede tener una elevada Demanda Química de Oxígeno (DQO) que varía de un mínimo de 320 a 50.000 mg/L. (Robinson y Hellou, 2009), lo que la constituye como un agua residual con una carga orgánica muy elevada. Esta elevada carga orgánica, junto con la presencia de algunos compuestos tóxicos de los procesos de fertilización, fabricación y esterilización del vino se han convertido en un gran desafío para la descontaminación de los efluentes de la

industria del vino (Lombardi et al., 2016). Como técnica de tratamiento, existen estudios de digestión anaerobia, como el llevado a cabo por Da Ros et al., (2016), quien trató bajo condiciones mesófilas (37 °C) y termófilas (55 °C) una proporción de 80 y 20% de lías de vino y aguas residuales de bodega, respectivamente. Los datos obtenidos fueron estables bajo condiciones mesófilas, mientras que bajo condiciones termófilas se produjo una acumulación de ácidos grasos volátiles que conllevaron una inhibición del sistema, situación que mejoró tras la adición de elementos traza, tales como hierro, cobalto y níquel.



Figura 2.5.1.2 Residuos vitivinícolas. Javier Hungría Estévez (2019).

2.5.2 Problemática ambiental de los residuos vitivinícolas

El problema asociado a la producción del vino es muy importante en los países donde existe una tradición consolidada en la fabricación de dicho producto tan demandado, como Francia, Italia o España. En particular, en España hay 89 áreas de producción de vinos de calidad con 67 Denominación de Origen Protegido (DOP) en 2014, según Pérez-Bibbins et al. al., (2015). Algunos de ellos están empezando a producir sus vinos en condiciones ecológicas, por lo que es muy importante la investigación de otros tratamientos alternativos de sus residuos más sostenibles con el medio ambiente.

Estos residuos son fundamentalmente restos de plantas (sarmiento, hollejos, semillas, raspones), pero no sólo esto, sino que incluyen los frutos que por su apariencia o calidad no se pueden comercializarse, son residuos con un alto contenido en humedad. Los principales problemas que plantea una inadecuada gestión de los residuos son:

- Al amontonarse, debido a la humedad y a las altas temperaturas se transforman en un foco de plagas e insectos que pueden propagarse por los cultivos de alrededor o por las poblaciones cercanas. A esto contribuye el alto contenido en azúcares de algunos de los productos.

- La incineración incontrolada constituye un foco de contaminación y molestias para las zonas cercanas.

- Cuando estos residuos se encuentran contaminados por restos de tratamientos fitosanitarios, su incineración puede emitir a la atmósfera compuestos peligrosos. También es frecuente que se utilicen estos residuos para alimentar al ganado con el consiguiente peligro para el ganado y los consumidores (Palmieri et al., (2017)).

Aunque las ventajas potenciales del tratamiento in situ de los residuos de la industria vinícola podrían incluir factores ambientales, agronómicos y económicos (Ruggieri et al., 2009), si dicho proceso se lleva a cabo lejos del lugar de producción, las ventajas podrían transformarse en desventajas, implicando un aumento del coste de gestión. Además, es importante mencionar que el compostaje y digestión anaerobia realizado en condiciones poco controladas puede conllevar impactos sociales y medioambientales relacionados con la emisión de olor y la generación de lixiviados altamente contaminantes.

2.5.2.1 Problemas asociados a las emisiones de olor

El olor es la propiedad organoléptica de una sustancia perceptible por el órgano olfativo cuando inspira determinadas sustancias volátiles. Los olores son un indicador de la contaminación ambiental causada por determinadas sustancias, las cuales inciden a su vez sobre la calidad de vida de la población. La manera en que es evaluada la respuesta humana a un olor depende de la propiedad sensorial particular que se está midiendo, incluyendo la concentración y la intensidad. La relación entre olor y molestia percibida es compleja de definir (Wojcik and Sirotin (2014)). En ella confluyen factores físicos y químicos fáciles de determinar, pero también otros de carácter subjetivo más difícil de evaluar. Sin embargo, es la intensidad de olor la que permite determinar la fuerza con la que se percibe la sensación de olor.

La relación entre la intensidad de olor (I) y la concentración (C) viene dada por la ley de Stevens:

$$I_{percibida} = k \cdot C^n$$

Donde:

I es la intensidad del olor expresada en ppm de n-butanol.

C es la concentración de olor expresada en número de diluciones.

k y *n* son constantes que varían para un olor específico o mezcla de olores. *n* varía aproximadamente entre 0,2 y 0,8, dependiendo de la sustancia olorosa; es una variable crítica como indicador de la efectividad relativa de la dilución para el control de un determinado olor.

Debido al relativamente bajo número de infraestructuras ambientales en España, así como una baja concienciación y presión social acerca de las emisiones de olores, ocasionaba una escasa jurisprudencia en casos de conflictos de origen ambiental

por emisiones u olores. Sin embargo, en la última década se ha incrementado el número de instalaciones de tratamiento de residuos, un inadecuado plan de ordenación del territorio y urbanístico que origina un acercamiento de las instalaciones existentes a los núcleos urbanos, así como un incremento en la calidad y nivel de vida, provoca el inicio de sucesivas reclamaciones ciudadanas y en la toma de medidas por parte del organismo correspondiente (Sironi et al., 2007).

En la actualidad, los métodos empleados en la determinación de emisiones de olor pueden ser clasificados en métodos químico-físicos y métodos sensoriales. Dentro de los métodos químico-físicos se incluyen cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-SM), sensores piezoeléctricos (narices electrónicas), tubos colorimétricos, etc. Como métodos sensoriales cabe mencionar la olfatometría dinámica, Nasal Ranger (olfatómetro de campo), psicometría, etc. Los métodos químico-físicos son adecuados cuando se conoce el compuesto causante de los olores o para hacer un seguimiento de las emisiones de unas determinadas instalaciones en continuo, con el fin de controlar la presencia de emisiones no controladas de gases asociados a los compuestos olorosos. Sin embargo, este tipo de métodos son, en la actualidad, poco específicos o poco sensitivos. A estos factores, debe añadirse la subjetividad del olor y, por lo tanto, la dificultad de su determinación y control junto con la ausencia de una técnica contrastada para analizar este problema.

La Ley 34/2007 sobre Calidad del Aire y Protección de la Atmósfera regula los niveles de calidad del aire en España, a pesar de que esta ley no impone restricciones referentes a emisiones de olor. Los problemas derivados a la población de las actividades generadoras de los olores son difíciles de abordar por cuestiones de vacío legal o técnicas ya que por el momento no existe en España legislación estatal que regule o limite las emisiones de olor. Ante esta problemática, en la Unión Europea el Comité TE-264 sobre

“Calidad del aire”, elabora la norma EN-13725 publicada en 2003, cuya versión española es publicada en 2004, que establece la Olfatometría Dinámica como la técnica para determinar la concentración de olor, en términos de unidades de olor Europeas por metro cubico (ou_E/m^3). Aunque es una técnica relativamente novedosa, la olfatometría se presenta como el estándar futuro en la medición de los olores mientras que no se perfeccionen otros dispositivos de medición de olores.

- **Técnicas de determinación del impacto oloroso.**

El olor tiene distintos orígenes en función de la fuente que lo genere, por lo que se debe tener en cuenta a la hora de abordar el grado de afectación en el entorno, así como sus características. Se pueden producir desde situaciones en las que existan áreas extensas afectadas hasta fenómenos puntuales, tanto en el ámbito espacial como temporal. Por todo ello, es necesario tener en cuenta que puede haber muchos tipos de episodios de olor: baja intensidad, pero larga duración, alta intensidad y corta duración, puntuales a lo largo de un periodo de tiempo, o de una alta frecuencia temporal. Este hecho obliga a objetivar la molestia ofreciendo unas garantías tanto al ciudadano como a las instalaciones generadoras de olor.

Actualmente existe una norma técnica, la UNE-EN 13725, comentada anteriormente, la cual sirve de apoyo para la determinación de la concentración del olor. La concentración de una muestra se expresa en unidades de concentración de olor uo_E . La medición consiste en la determinación de la concentración de olor de una muestra para presentarla a un conjunto de panelistas utilizando un olfatómetro. Este aparato permite efectuar diluciones de la muestra, diluyéndola con gas neutro, con el objetivo de determinar el factor de dilución en el umbral de detección del 50% de las personas que integran el panel.

Existen otras metodologías que permiten evaluar el impacto odorífero en el entorno, como, por ejemplo:

- Nariz electrónica: Se trata de una serie de sensores de distintos materiales metálicos que reaccionan de forma distinta a un mismo componente químico. Esta muestra olorosa no se evalúa de forma individual, sino conjuntamente para la totalidad de los sensores. Antes de obtener un resultado, hay que “enseñar” al equipo a asociar la respuesta con la intensidad/concentración de olor, a partir de los valores obtenidos por panelistas humanos, los cuales se registran en una base de datos.

- Mediciones de campo: Su principio consiste en la observación y detección en campo del olor mediante observadores que se sitúan en los puntos de muestreo.

- Tablas FIDO: Esta herramienta sirve para determinar la molestia o no de un olor, mediante el estudio de cuatro parámetros: la frecuencia, la duración de la detección, la intensidad y el carácter agradable o desagradable del olor.

- Nomogramas: Son un instrumento gráfico de cálculo, un diagrama bidimensional que permite el cálculo gráfico y aproximado de una función. En uno de los ejes se introduce el valor de emisión de la carga odorífera (calculado a partir de datos reales o estimados) y el otro eje indica la distancia a la que se estima que existe una determinada concentración odorífera o a la que se espera que se produzcan molestias por olores.

- Quejas: El número de quejas por parte de la ciudadanía puede ser un indicador de la existencia de contaminación por olores.

• Modelización: Es el método más empleado para valorar la contaminación por olores generada por una fuente. Para su cálculo se utilizan modelos matemáticos de dispersión de contaminantes, permitiendo evaluar el impacto odorífero que una

instalación, existente o futura, tiene o tendrá sobre su entorno próximo. A partir de los datos meteorológicos de la zona, se puede efectuar la modelización, obteniendo la concentración de olor en inmisión, la cual puede representarse mediante líneas con un mismo valor de concentración de olor: las isodoras.

En definitiva, en el contexto del desarrollo sostenible es fundamental la adecuada gestión de residuos agroindustriales con el objetivo de minimizar los riesgos asociados a un inadecuado tratamiento, siendo esencial minimizar la emisión de olores desagradables en las plantas de gestión.

2.5.3 Aprovechamiento actual de los residuos vitivinícolas

El orujo representa una fuente rica en diversos productos de alto valor añadido como tartratos de etanol y malatos, ácido cítrico, aceite de semilla de uva, hidrocoloides y fibra dietética. Así mismo, los hollejos pueden servir como sustrato para la producción de pululano, un polisacárido importante industrialmente (Arvanitoyannis et al., 2006). Además, puede emplearse como sorbente de metales pesados (cromo, níquel y cobre) (Villaescusa et al., 2004; Chand et al., 2009) y frecuentemente para la elaboración de piensos para ganado, si bien el contenido en taninos puede limitar su uso para este fin. Aunque algunos autores como Alipour y Rouzbehan (2007) han evaluado los efectos del ensilado y adición de polietilenglicol (PEG) sobre la desactivación de los taninos en el orujo por cambios en la composición química, consiguiendo una reducción del tanino libre, aunque no en el caso de los taninos enlazados después de la ensilada, que causan una disminución de la digestibilidad y directamente podrían afectar a la productividad del ganado. Este inconveniente hace que la utilización de los residuos de vinificación como alimento para ganado sea reducida y conlleva la necesidad de encontrar soluciones para su tratamiento, como alternativa a la disposición en vertedero o en zonas próximas a los

centros de procesado del fruto principal. De hecho, el potencial de este residuo para la extracción y producción de compuestos de elevado valor añadido ha desencadenado la necesidad de desarrollar procesos tecnológicamente viables para su aprovechamiento y valorización. Así, dado que las bodegas y las regiones productoras de vino generan importantes cantidades de desechos sólidos, en particular de orujo, está creciendo la presión dentro del sector para implementar planes alternativos que permitan una gestión sostenible de residuos y subproductos, fundamental en el contexto de la economía circular.

En cuanto a la otra fracción residual derivada de la vinificación, es destacable que las lías presentan una gran concentración de compuestos orgánicos altamente biodegradables, tales como ácidos orgánicos, levadura, proteínas, etc. (Zhihui et al., 2008), si bien su composición concreta dependerá del proceso de elaboración, variedad de uva y condiciones de temperatura en la bodega.

Por lo general, las aplicaciones de lías de vino se centran, en primer lugar, en la recuperación del etanol por destilación para producir licores. En la mayoría de los casos, la bodega comercializa las lías con una destilería, convirtiéndose en subproducto. Seguidamente, tras la destilación, a las lías agotadas (vinazas) se las centrifuga para separar la fracción sólida de la líquida. Esta fracción sólida se disuelve con agua y se mezcla con HCl, para centrifugar nuevamente. A continuación, se obtiene una fase líquida que se evapora, se precipita con etanol y cristaliza. Finalmente se vuelve a centrifugar y se obtienen cristales de ácido tartárico. Este ácido es muy común en este residuo y tiene propiedades muy interesantes para la industria alimentaria, como ácido natural en las bebidas, dulces, confites, etc. Tras la extracción del ácido tartárico, el residuo resultante puede evaporar y mediante la adición de CaCO_3 y CaCl_2 , se obtiene un precipitado, tartrato cálcico, el cual se utiliza como conservante de los alimentos. Las aguas residuales

generadas tras la extracción del ácido tartárico y tartrato cálcico requieren ser tratadas en una planta de depuración de aguas residuales. Así mismo, se ha demostrado la viabilidad de las lías para eliminar las sustancias indeseables del vino, actuando como un adsorbente natural. Se ha comprobado en varios estudios el papel que desempeñan las lías durante el proceso de vinificación en cuanto a la evolución de compuestos tóxicos se refiere, tales como la ocratoxina A (OTA) ($C_{20}H_{18}O_6NCl$), *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* y *P. viricatum*, se consideran los principales productores de ocratoxina A en los alimentos debido a su gran dispersabilidad y crecimiento. La eliminación de la OTA es importante debido a que es nefrotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinogénica, teratogénica y neurotóxica. Con respecto a la actividad carcinogénica, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado esta micotoxina como posible carcinógeno humano (IARC 1993). El papel de las células de levadura para absorber micotoxinas ha sido corroborado por Fernandes et al. (2007) y García-Moruno et al., (2005), quienes demostraron la utilidad de las lías para la eliminación natural de OTA de los vinos, evitando el uso de agentes clarificantes. Después del contacto con lías durante 7 días, la reducción de OTA fue superior al 70% con lías procedentes de vinos blancos y alrededor del 50% con lías tintas. Otros tiempos de contacto no mejoraron los resultados. Los mejores resultados obtenidos con lías blancas se debieron a la competencia entre los polifenoles y OTA para los mismos sitios de unión en la superficie de las células de levadura. Además, De Melo Abreu et al. (2006) observaron cómo durante la producción del vino con maceración, los residuos de famoxadona, que se utiliza como fungicida aplicado a los vinos, se eliminaban con la torta y las lías al final del proceso de fermentación, mientras que en ausencia de maceración este fungicida era sólo parcialmente eliminado.

Así mismo, Caputi, Ribeiro y Byrne (2000), quienes estudiaron la eliminación de mono y diglicéridos del ácido oleico utilizados comúnmente como antiespumantes durante la fermentación del vino, propusieron el uso de lías como adsorbente de agentes antiespumantes del vino. Por lo tanto, las lías pueden ser aconsejables para el tratamiento de otras corrientes de fluidos, si bien, tras su utilización como adsorbente es necesario llevar a cabo una adecuada gestión de dicho residuo con el fin de minimizar su impacto ambiental y cumplir con los objetivos establecidos en la legislación vigente.

Es destacable que la aplicación de lías de uva como enmienda orgánica en terrenos de cultivo ha sido anteriormente estudiada, pero su contenido en compuestos fenólicos tiene efectos negativos sobre el medio ambiente, tales como el pH que podría inhibir la transición de la etapa mesófila a termófila durante el compostaje (Paradelo et al., (2013). Los compuestos fenólicos controlan muchos aspectos de la interacción planta-suelo y desempeñan un papel como intermediarios en las interacciones de la formación del humus (Muscolo et al., 2001).

2.5.4 Usos alternativos a los residuos vitivinícolas:

2.5.4.1 Compostaje

El problema con los residuos generados en la DOP de Montilla-Moriles es muy significativo, debido a que el rendimiento de producción en esta DOP es inferior al rendimiento mundial medio, especialmente con los vinos dulces Pedro Ximenez, cuyo rendimiento de producción es de 2,68 kg de uva / L de dulce Pedro Ximenez vino aproximadamente.

El uso y desarrollo de las energías renovables se está convirtiendo en un foco frecuente de diferentes propuestas políticas y una prioridad para muchos países, debido a la creciente preocupación por el problema del calentamiento global. No obstante, si bien

hay una variedad de estudios acerca del uso de residuos vitivinícolas, las opciones de procesamiento no térmico como el compostaje podrían resultar ser más atractivas económicamente para implementar a nivel de productor individual a pequeña o mediana escala industrial, las cuales representan a la mayor parte de la industria vitivinícola.

En este contexto, el vermicompostaje ha sido investigado por varios autores, como Paradelo et al. (2013), para la estabilización de orujos derivados del procesado de la uva, evaluando su influencia en el acondicionamiento del suelo. Estos autores observaron una rápida reducción de la fitotoxicidad inicial de estos residuos, mientras que el pH durante el proceso aumentó hasta valores cercanos a la neutralidad. Sin embargo, no hubo cambios en la materia orgánica total, mientras que la relación C/N apenas disminuyó (de 31 a 28), y la temperatura no alcanzó el rango termófilo. Adicionalmente, varios estudios utilizaron *Eisenia andrei* (lombriz de tierra) para tratar el orujo de uva blanca crudo a escala de laboratorio (Nogales et al., 2005) y escala piloto (Domínguez et al., 2014; Gómez-Brandón et al., 2011) durante un período de hasta 16 semanas. Los resultados de los estudios a escala piloto permitieron conseguir la estabilización del orujo de la uva después de aproximadamente dos semanas, como lo demuestran las disminuciones en la actividad microbiana y el contenido de celulosa (Domínguez et al., 2014; Gómez-Brandón et al., 2011). Ensayos más prolongados permitieron una disminución significativa en las relaciones C:N, contenido fenólico y fitotoxicidad, mientras que el pH y el contenido de nutrientes se incrementaron (Domínguez et al., 2014; Nogales et al., 2005). De forma más específica, el estudio de Domínguez et al. (2014) el pH aumentó de 4.36 a 7.10 y la materia orgánica disminuyó de 91% a 75%. El contenido de polifenoles del orujo de uva disminuyó un 80%, mientras que el ácido gálico se redujo en 12.5 mg de ácido gálico/g de peso seco. La presencia de polifenoles en el compost

resulta en efectos fitotóxicos en el suelo, por lo que la disminución de polifenoles durante el vermicompostaje aumenta la aplicabilidad del orujo de uva como fertilizante.

El compostaje es un proceso biológico aerobio, el cual mediante condiciones controladas de temperatura y humedad transforma los residuos orgánicos biodegradables en un material estable, higienizado y homogéneo llamado compost, que se puede utilizar como enmienda orgánica. Este tratamiento favorece el retorno de la materia orgánica al suelo y su reincorporación en los ciclos naturales. La posibilidad de reciclar residuos orgánicos de la industria del vino mediante compostaje puede ser una estrategia sostenible para la gestión de residuos. Varios autores como Ferrer et al., (2001), han evaluado la viabilidad del compostaje de residuos de uva, con resultados satisfactorios. Así mismo, existe otra técnica denominada co-compostaje, el cual es una degradación aeróbica controlada de los materiales orgánicos usando más de un residuo, resulta una técnica interesante para tratar residuos que se generan en una misma área y época.

2.5.4.1.1 Etapas

El proceso de compostaje consta de las siguientes etapas (Moreno y Moral, 2008):

- **Mesófila**

Es la etapa más dinámica del proceso de compostaje, en la cual se produce un acusado incremento de la temperatura (hasta alcanzar aproximadamente 40°C), así como la degradación de los compuestos orgánicos más simples y de fácil degradación (azúcares y aminoácidos), como consecuencia de la actuación de bacterias y hongos mesófilos y termotolerantes. A su vez, se produce una disminución del pH, debido a la descomposición de lípidos y glúcidos en ácidos orgánicos y las proteínas en aminoácidos. En esta etapa la relación carbono/nitrógeno (C/N) es de especial importancia, ya que el carbono es el aporte energético de los microorganismos y el nitrógeno es esencial para la

síntesis de nuevas moléculas. Como resultado del elevado incremento de la actividad microbiana, la descomposición de compuestos orgánicos y la disminución del pH, también se produce un fuerte incremento de las emisiones de olor generadas durante el proceso.

- **Termófila**

Se caracteriza por desarrollarse bajo elevadas temperaturas (45-60 °C) que permiten únicamente la proliferación de bacterias termófilas, inhibiendo la actividad de bacterias mesófilas, hongos y levaduras. El decrecimiento de la actividad microbiana hace que el incremento de la temperatura no sea tan pronunciado como en la etapa anterior. La degradación de los ácidos obtenidos en la etapa anterior provoca el incremento del pH pasando desde 5,5 hasta 7,5 aproximadamente, con la consiguiente alcalinización. En esta etapa se alcanzan las mayores emisiones de olor generadas durante el proceso de compostaje.

- **Enfriamiento y maduración**

Se produce una disminución de la temperatura hasta temperatura ambiente. Es la etapa en la que el material se encuentra más estable y humidificado, por lo que proliferan de nuevo la comunidad mesófila de la fase inicial, hongos y actinomicetos capaces de degradar compuestos complejos. Estas bacterias realizan actividades importantes en la maduración del compost como la oxidación de la materia orgánica, hidrógeno, amonio, nitrito y sulfuros, fijación del nitrógeno, reducción de sulfatos y producción de nitritos a partir de amonio, bajo condiciones heterotróficas. Como consecuencia de esta actividad microbiológica, en esta etapa decrecen de manera acusada las emisiones de olor y el compost va adquiriendo un aspecto similar al de un suelo, no debiendo reconocerse los residuos iniciales.

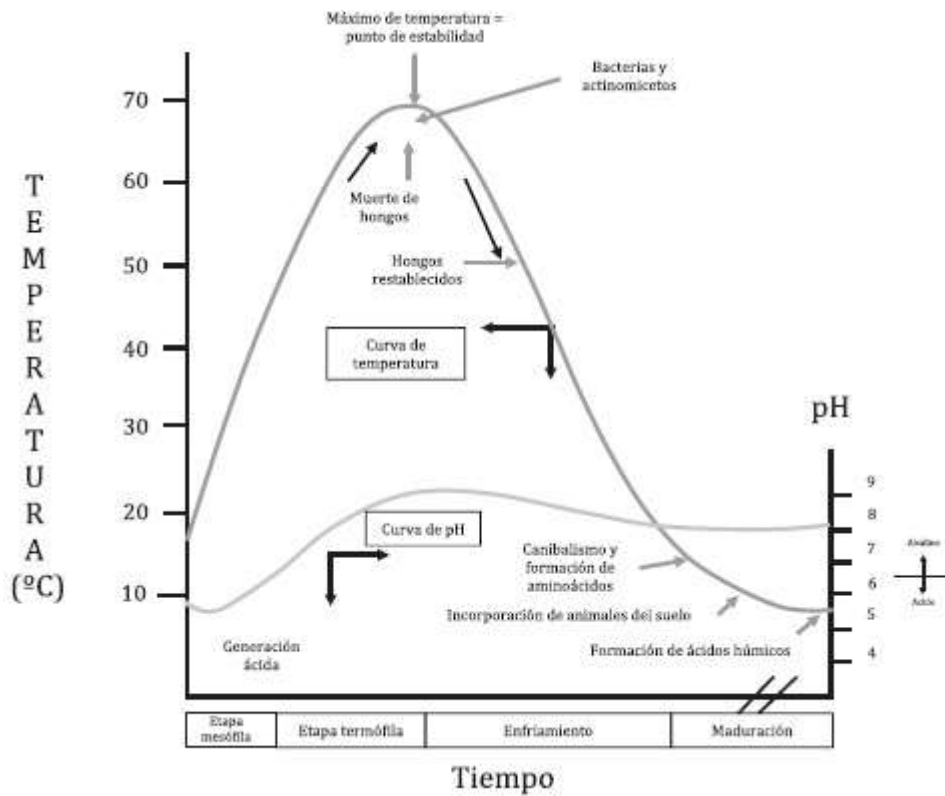


Figura 2.5.4.1.1 Etapas del proceso de compostaje. Fuente Campiteli, Velasco, Rubenacker & Andrea (2010).

2.5.4.1.2 Variables en un sistema de co-compostaje.

Un sistema de co-compostaje puede verse afectado por diferentes variables clasificadas en dos tipos de parámetros: parámetros de seguimiento (aquéllos que han de ser evaluados durante todo el proceso y adecuarlos, en caso de ser necesario, para que se encuentren en los intervalos óptimos) (Jeris et. al., 1973) y parámetros relativos a la naturaleza del sustrato (aquéllos que han de ser medidos fundamentalmente al inicio del proceso y adecuarlos a sus valores correctos (Madejón et. al, 2001).

- **Parámetros de seguimiento**

- **Temperatura:** Durante el crecimiento microbiano se genera calor aumentando la temperatura de la masa que está compostando, por lo que la temperatura

ha sido considerada tradicionalmente como una variable fundamental en el control del compostaje (Liang et. al., 2003; Miyatake et al., 2006). A través de la evolución de la temperatura se puede evaluar la eficiencia y el grado de estabilización del proceso, al existir una relación directa entre la temperatura y la degradación de la materia orgánica. Se observan tres fases en el proceso de descomposición aeróbica: fase mesófila inicial (T^a 45°C); y fase mesófila final, considerándose finalizado el proceso cuando se alcanza de nuevo la temperatura inicial. Cada especie de microorganismo tiene un intervalo de temperatura óptima en el que su actividad es mayor y más efectiva: 15-40 °C para los microorganismos mesófilos y 40-70 °C para los termófilos (Suler y col, 1977). La descomposición de la materia orgánica llevada a cabo por los diferentes microorganismos, producen un desprendimiento de calor el cual provoca una variación de la temperatura de la pila que dependerá de la adecuación de los demás factores a los intervalos óptimos, del tamaño de la pila (el calor generado es proporcional al volumen o masa de la pila, pero la pérdida es proporcional a la superficie), de las condiciones ambientales y del tipo de aireación de la pila, ya sea con volteos o con aire a presión (Ekinci y col, 2004).

- **Humedad:** La presencia de agua es imprescindible para las necesidades fisiológicas de los microorganismos implicados en el proceso de compostaje, ya que es el medio de transporte de las sustancias solubles que sirven de alimento a las células y de los productos de desecho de las reacciones que tienen lugar durante dicho proceso. Shulze (1962) estudió la variación de la cantidad de oxígeno consumido por una masa inicial durante el compostaje, en un reactor cerrado a una temperatura constante, en función de la humedad, demostrando que pequeñas variaciones de humedad provocaban grandes cambios en la temperatura. La humedad óptima para el crecimiento microbiano está entre el 50-70%, para que permita la circulación tanto del oxígeno como la de otros gases

producidos en la reacción (Miyatake et al., 2006). La actividad biológica decrece mucho cuando la humedad está por debajo del 30%, mientras que por encima del 70% el agua desplaza al aire en los espacios libres existentes entre las partículas, reduciendo la transferencia de oxígeno y produciéndose anaerobiosis. Cuando las condiciones se hacen anaerobias se originan malos olores de forma intensa y disminuye la velocidad del proceso.

- **pH:** A pesar de que el pH tiene una influencia directa en el compostaje debido a su acción sobre la dinámica de los procesos microbianos, su medida, que se realiza en el laboratorio sobre el extracto acuoso de las muestras tomadas en las pilas, es sólo una aproximación del pH “in situ” (Sundberg et al., 2004). Durante la fase mesófila se observa una disminución del pH debido a la acción de los microorganismos sobre la materia orgánica más fácilmente biodegradable, produciéndose ácidos orgánicos. En la etapa termófila se produce una progresiva alcalinización del medio, debido a la pérdida de los ácidos orgánicos y la generación de amoníaco procedente de la descomposición de las proteínas (Sánchez-Monedero, 2001). Y en la fase de maduración el pH tiende a la neutralidad debido a la formación de compuestos húmicos que tienen propiedades tampón. Suler et al., (1977) establecieron una relación entre la evolución del pH y la aireación de la mezcla, afirmando que un compostaje con una aireación adecuada genera productos finales con un pH comprendido entre 7 y 8; valores más bajos del pH son indicativos de fenómenos anaeróbicos y de que el material aún no está maduro. Así mismo, dedujeron que la degradación orgánica se inhibe a pH bajos.

- **Aireación:** Los microorganismos que intervienen en el proceso de compostaje son aerobios, por lo que es necesario la presencia de oxígeno para el correcto desarrollo del proceso. Las pilas de compostaje presentan porcentajes variables de oxígeno en el aire de sus espacios libres: la parte más externa contiene aproximadamente

18-20% de oxígeno, mientras que el contenido de oxígeno va disminuyendo a medida que nos introducimos en la pila, a la vez que va aumentando el de dióxido de carbono, hasta el punto de que a una profundidad mayor de 60 cm el contenido de oxígeno puede estar entre 0,5 y 2% (Ekinici et al., 2004). Una aireación insuficiente provoca una sustitución de los microorganismos aerobios por anaerobios, con el consiguiente retardo en la descomposición, la aparición de sulfuro de hidrógeno y la producción de malos olores (Bidlingmaier, 1996). El exceso de ventilación podría provocar el enfriamiento de la masa y una alta desecación con la consiguiente reducción de la actividad metabólica de los microorganismos (Zhu, 2006). La aireación es una variable de operación muy importante, al ser la que más incide en los costes de operación, ya que suponen el 32-46% de los costes totales. Durante el proceso de maduración no deben hacerse aportaciones adicionales de oxígeno, ya que una excesiva aireación podría dar lugar a un consumo de los compuestos húmicos formados y a una rápida mineralización de los mismos (Tomati et al., 2000).

- **Espacio de aire libre:** Shulze (1962) utiliza por primera vez el concepto de Espacio de Aire Libre (Free Air Space, FAS), que relaciona los contenidos de humedad (H), la densidad aparente (D_a), la densidad real (D_r) y la porosidad (P) de los residuos. El FAS, calculado por la Ecuación 2.5.4.4, da idea de las cantidades relativas de agua y aire existentes en la masa en compostaje.

$$FAS = P \left(1 - \frac{H}{100} \right) \quad \text{Ecuación 2.5.4.4}$$

$$\text{donde: } P = 100 \left(1 - \frac{D_a}{D_r} \right) \quad \text{Ecuación 2.5.4.5}$$

$$FAS = 100 \left(1 - \frac{D_a}{D_r} \right) \left(1 - \frac{H}{100} \right) \quad \text{Ecuación 2.5.4.6}$$

En ambas expresiones FAS, P y H se expresan en % y D_r y D_a en g cm^{-3} . Por lo tanto, conocidos los valores de D_a y D_r puede ser encontrada la humedad óptima para el

residuo estudiado. La densidad real es una constante para cada producto. Por otro lado, en una pila de compostaje, la Da puede aumentar o disminuir dependiendo del grado de humedad de la mezcla. Cuando la humedad es alta disminuye el FAS y el producto se compacta, mientras que a valores bajos de humedad los espacios intersticiales están ocupados por aire, y la densidad aparente aumenta.

- **Parámetros relativos a la naturaleza del sustrato**

- **Tamaño de la partícula.** El tamaño de las partículas que conforman el sustrato es una variable importante para la optimación del proceso, ya que cuanto mayor sea la superficie expuesta al ataque microbiano por unidad de masa, más rápida y completa será la reacción. Sin embargo, aunque un pequeño tamaño de partícula provoca una gran superficie de contacto para el ataque microbiano, también se reduce el espacio entre partículas y aumentan las fuerzas de fricción (Haug, 1993); esto limita la propagación de oxígeno hacia el interior y de dióxido de carbono hacia el exterior, lo cual restringe el crecimiento microbiano y puede dar lugar a un colapso microbiano al ser imposible la aireación por convección natural. Las dimensiones consideradas óptimas varían según el autor, oscilando entre 1 y 5 cm (Haug, 1993), entre 2 y 5 cm (Kiehl, 1985) o entre 2,5 y 2,7 cm (Tchobanogolus et al., 1994).

- **Nutrientes.** Los microorganismos sólo pueden aprovechar compuestos simples, por lo que las moléculas más complejas se rompen en otras más sencillas para poder ser asimiladas (Castaldi et al., 2005). Entre los elementos que componen el sustrato destacan el C, N, y P, que son macronutrientes fundamentales para el desarrollo microbiano. El carbono es necesario en la síntesis celular para la formación del protoplasma, así como la de los lípidos, grasas y carbohidratos; durante el metabolismo se oxida para producir energía y anhídrido carbónico. El nitrógeno es un elemento esencial para la reproducción celular debido a la naturaleza proteica del protoplasma. El

fósforo desempeña un papel fundamental en la formación de compuestos celulares ricos en energía, siendo necesario para el metabolismo microbiano. Además de los macronutrientes, existen otros nutrientes presentes en menor cantidad (micronutrientes). Estos tienen un importante papel en la síntesis de las enzimas, en el metabolismo de los microorganismos y en los mecanismos de transporte intra y extracelular (Miyatake et al., 2006).

- **Relaciones C/N y C/P.** Los microorganismos utilizan generalmente 30 partes de C por cada una de N; por esta razón se considera que el intervalo de C/N óptimo para el compostaje es de 25-35 (Jhorar et al., 1991). La relación C/N es un factor importante que influye en la velocidad del proceso y en la pérdida de amonio durante el compostaje. Si la relación C/N es mayor que 40 la actividad biológica disminuye y los microorganismos deben oxidar el exceso de carbono con la consiguiente ralentización del proceso, debido a la deficiente disponibilidad de N para la síntesis proteica de los microorganismos. Al morir estos microorganismos el nitrógeno contenido en su biomasa se recicla y la relación C/N tiende a disminuir. Si el residuo tiene una alta relación C/N, pero la materia orgánica es poco biodegradable, la relación C/N disponible realmente para los microorganismos es menor y el proceso evolucionará rápidamente, pero afectará sólo a una proporción de la masa total. Si la relación C/N es muy baja el compostaje es más rápido pero el exceso de nitrógeno se desprende en forma amoniacal, produciéndose una autorregulación de la relación C/N del proceso (Jhorar et al., 1991). La relación C/N ideal para un compost totalmente maduro es cercana a 10, similar a la del humus, mientras que, en la práctica, se suele considerar que un compost es suficientemente estable o maduro cuando $C/N < 20$. Al tener la relación C/N una gran dependencia de la riqueza inicial de N, un valor concreto de C/N no refleja el estado de madurez de un compost, por lo que es más indicado seguir la evolución de C/N del proceso o calcular la diferencia entre los

valores iniciales y finales. Por otra parte, el fósforo es el nutriente más importante, tras el C y el N, por lo que también debe estar presente en unas cantidades óptimas para que el proceso se lleve a cabo correctamente y permita una adecuada proliferación microbiana, al tener todos los nutrientes principales en unas cantidades óptimas y en la forma más disponible para la síntesis microbiana. La relación C/P para el compostaje es óptima entre 75 y 150, mientras que la relación N/P debe estar entre 5 y 20.

- **Materia orgánica.** Como consecuencia de la mineralización, el contenido en materia orgánica tiende a descender durante el compostaje debido a su mineralización y a la consiguiente pérdida de carbono en forma de dióxido de carbono (Zucconi et al., 1987). La disminución de la materia orgánica transcurre en dos etapas fundamentalmente. En la primera se produce una rápida disminución de los carbohidratos, transformándose las cadenas carbonadas largas en otras más cortas con la producción de compuestos simples; algunos de los cuales se reagrupan para formar moléculas complejas dando lugar a los compuestos húmicos. En la segunda etapa, otros compuestos menos biodegradables, como las ligninas se van degradando lentamente y/o transformando en compuestos húmicos (Tomati et al., 2000; Castaldi et al., 2005). Algunos compuestos procedentes de la materia orgánica son utilizados por los microorganismos para formar sus tejidos y otros son transformados en dióxido de carbono y agua. La velocidad de transformación de materia orgánica depende de su naturaleza física y química, de los microorganismos que intervienen y de las condiciones físico-químicas del proceso (humedad, aireación, temperatura y pH) (Michel et al., 2004).

- **Conductividad Eléctrica.** La conductividad eléctrica de un compost está determinada fundamentalmente por su concentración de sales y en menor grado por la presencia de iones amonio o nitrato formados durante el proceso (Sánchez-Monedero, 2001). La conductividad eléctrica tiende generalmente a aumentar durante el proceso de

compostaje debido a la mineralización de la materia orgánica, hecho que produce un aumento de la concentración de nutrientes. Puede ocurrir un descenso de la conductividad eléctrica como consecuencia de fenómenos de lixiviación en la masa, provocados por una humectación excesiva de la misma. La conductividad eléctrica es importante a la hora de aplicar un compost, ya que un exceso de salinidad en la solución del suelo dificulta la absorción de agua por las raíces de las plantas, de modo que en algunos casos, en esas condiciones, sólo prosperan las especies resistentes.

2.5.4.1.3 Variables ambientales y de control

- **Temperatura**

La temperatura está considerada como una de las principales variables operacionales de diseño, al influenciar de manera directa a la velocidad de crecimiento de los microorganismos involucrados y por consiguiente a la velocidad de reacción de los procesos biológicos. A medida que aumenta la temperatura (dentro del rango de operación), aumenta la velocidad de crecimiento de los microorganismos y se acelera el proceso de digestión, dando lugar a una mayor producción de biogás. Además, el proceso puede desestabilizarse por variaciones bruscas de temperatura en el digestor. Por ello, para garantizar la ausencia de gradientes térmicos en el digestor, es imprescindible un sistema adecuado de agitación y un controlador de temperatura.

Existen tres rangos de temperatura en los que pueden desarrollarse los microorganismos anaerobios: psicrófilo (por debajo de 25°C), mesófilo (entre 25°C y 45°C) y termófilo (entre 45°C y 65°C). Está ampliamente reconocido que las temperaturas óptimas para cada rango son aproximadamente 20°C, 35°C y 55°C para las condiciones psicrófilas, mesófilas y termófilas, respectivamente.

El rango mesófilo de operación es el más utilizado, a pesar de que en la actualidad se está utilizando cada vez más el rango termófilo para conseguir una mayor velocidad de tratamiento (lo que en algunos casos implica un aumento en la eliminación de materia orgánica y en la producción de biogás) y una mejor eliminación de microorganismos patógenos. Sin embargo, el régimen termófilo suele ser más inestable a cualquier cambio de las condiciones de operación y presenta además mayores problemas de inhibición por la mayor toxicidad de determinados compuestos a elevadas temperaturas, como el nitrógeno amoniacal o los ácidos orgánicos de cadena larga (Chen et al., 2008).

- **pH y alcalinidad**

El pH es una de las variables utilizadas en el diagnóstico de los sistemas anaerobios ya que muchos fenómenos tienen influencia sobre el mismo. Un ejemplo de ello, son las situaciones de acidificación de un reactor anaerobio provocadas por desequilibrios en la producción y consumo de ácidos orgánicos volátiles. La acumulación de éstos provoca un descenso en el pH, que será más o menos acusado en función de la alcalinidad del medio. Una de las consecuencias derivadas de un descenso del pH a valores inferiores a 6 es que el biogás generado es muy pobre en metano y, por tanto, presenta peores cualidades energéticas.

Por otra parte, el pH afecta a los diferentes equilibrios químicos existentes en el medio, pudiendo desplazarlos hacia la formación de un determinado componente que tenga influencia en el proceso. Éste es el caso de los equilibrios ácido-base del ácido acético y del amoniacal: al aumentar el pH se favorece la formación de amoniacal libre que, a elevadas concentraciones, es inhibidor del crecimiento microbiano y a pH bajos se

genera mayoritariamente la forma no ionizada del ácido acético, que inhibe el mecanismo de degradación del propionato.

Los diferentes grupos bacterianos presentes en el proceso de digestión anaerobia presentan unos niveles de actividad óptimos para valores de pH próximos a la neutralidad:

- Fermentativos: entre 7,2 y 7,4.
- Acetogénicos: entre 7,0 y 7,2.
- Metanogénicos: entre 6,5 y 7,5.

De forma general, para que el proceso se desarrolle satisfactoriamente, el pH no debería exceder los límites de 7 y 8 (Wheatley, 1990). El valor del pH en el digestor no sólo determina la producción de biogás sino también su composición.

En este sentido la alcalinidad, que es una medida de la capacidad tampón del medio, es otra variable fundamental a tener en cuenta para el correcto desarrollo del proceso de digestión anaerobia. En el rango de pH de la biometanización, el principal equilibrio que controla la alcalinidad es el del dióxido de carbono/bicarbonato. Se considera que valores de alcalinidad superiores a 2.500 mg CaCO₃/L, aseguran un buen control del pH y una adecuada estabilidad del sistema, si bien no son recomendables valores excesivos.

No obstante, algunos autores sostienen que existe una relación definida entre el pH, alcalinidad y presión parcial de dióxido de carbono en el digestor, ya que los valores de las dos primeras variables condicionan la tercera, tal y como se muestra en la Figura 2.5.4.1.3, por lo que el pH en el licor de mezcla del digestor es un factor que no puede considerarse aisladamente.

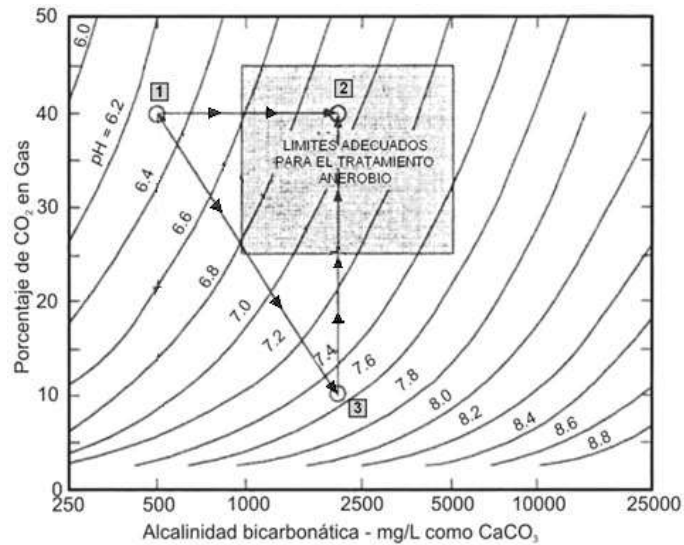


Figura 2.5.4.1.3 Influencia del pH, alcalinidad y concentración de CO₂ en la digestión anaerobia.

▪ Nutrientes

Como consecuencia de los bajos índices de producción de biomasa que presentan los microorganismos anaerobios, este proceso, a diferencia de los procesos aerobios, tiene un requerimiento más bajo de nutrientes. Los principales nutrientes necesarios para el crecimiento de dichos microorganismos son carbono, nitrógeno y fósforo, además de una serie de elementos minerales como S, K, Na, Ca, Mg y Fe, que deben estar presentes a nivel de trazas. Según Amatya (1996) y Aiyuk et al. (2004), la proporción recomendable entre Demanda Química de Oxígeno (DQO), nitrógeno y fósforo es de 300:5:1, respectivamente, para el adecuado arranque de los reactores anaerobios si bien el ratio óptimo, descrito en bibliografía, para el correcto funcionamiento del reactor durante el tratamiento de residuos puede variar entre 50:4:1 y 350:5:1 (Thavesri, 1995; Brunetti et al., 1983). En el caso de que el residuo a tratar presente un balance de nutrientes alejado de estas proporciones, se puede proponer su co-digestión con otro sustrato biodegradable que permita compensar el desequilibrio y aproximarlo a los requerimientos óptimos de los microorganismos anaerobios (Chen et al., 2008).

- **Potencial redox**

Con el fin de asegurar el ambiente fuertemente reductor que las bacterias metanogénicas necesitan para su actividad óptima, conviene mantener el valor del potencial redox por debajo de -300 mV o -330 mV (Martí, 2006).

- **Velocidad de carga orgánica y tiempo de retención**

El tiempo de retención, junto con la velocidad de carga orgánica, condicionado por el tipo de sustrato, son los principales parámetros de diseño ya que determinan el volumen del digestor.

El tiempo de retención hidráulico (TRH) indica el tiempo de permanencia de una fase acuosa en un digestor para que toda la materia orgánica biodegradable se transforme en biogás. Depende del tipo de residuo y sus características, así como de las condiciones de operación. En los sistemas de mezcla completa, el TRH coincide con el tiempo de retención celular, por lo que el tiempo de retención deberá ser suficiente para asegurar el crecimiento de la población bacteriana. Al aumentar el TRH, aumenta el grado de degradación de la materia orgánica y la producción de biogás, aunque este valor depende en gran medida del tipo de reactor utilizado y del residuo a tratar.

La velocidad de carga orgánica (VCO) es la cantidad de materia orgánica añadida al reactor en un determinado tiempo y por unidad de volumen, siendo directamente dependiente de la concentración de sustrato y del tiempo de retención fijado. En ausencia de inhibidores, altas cargas orgánicas proporcionan altas producciones volumétricas de biogás, aunque también aumenta el riesgo de sobrecargas puntuales que conllevan a la acidificación del reactor.

- **Agitación**

La experiencia ha demostrado que una adecuada mezcla del contenido del digestor es esencial, ya que permite (Martí, 2006):

- Poner en contacto el sustrato fresco con la población bacteriana y eliminar los metabolitos producidos por los microorganismos metanogénicos al favorecer la salida de los gases.
- Proporcionar una concentración uniforme de la población bacteriana.
- Prevenir la formación de espumas y la sedimentación en el reactor.
- Prevenir la formación de espacios muertos, que reducirían el volumen efectivo del reactor, y la formación de vías preferenciales.
- Mantener una temperatura homogénea en el medio de reacción, reduciendo la estratificación térmica.

El sistema de agitación puede ser mecánico, hidráulico o neumático. Sin embargo, la velocidad de agitación debe ser suficiente para asegurar la correcta homogeneización del licor de mezcla, sin romper los agregados bacterianos.

2.5.4.2 Digestión Anaerobia

Otra alternativa interesante de gestión en el contexto de la biorrefinería y economía circular es la digestión anaerobia. Este tratamiento se considera actualmente como una de las tecnologías de conversión más importantes y sostenibles para explotar los residuos orgánicos y biodegradables. El biogás es el resultado de este proceso bioquímico y es un combustible renovable constituido principalmente por metano y dióxido de carbono, lo que permite su aplicación para la producción de energía térmica y electricidad (Castellucci et al., 2013). Debido a este interés, autores como Da Ros et al. (2016) estudiaron la producción de metano a partir de lías de uva en condiciones

mesofílicas ($36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), con un rendimiento de producción de metano de 488 NmL CH_4 / g SV en condiciones estándar. En un estudio de Dinuccio et al. (2010), se utilizó orujo fresco y raspones de uva blanca como materia prima para la producción de biogás a través de digestión anaeróbica en modo discontinuo, obteniéndose 98 y 116 NmL CH_4 /g de sólidos volátiles (SV), respectivamente. Por otro lado, Martínez et al., (2016) utilizó orujo de uva tinta utilizado para la producción biogás, mediante digestión anaerobia, tras extraerle los polifenoles, dio como resultado 113 NmL CH_4 /g SV. Al tratarse de unos residuos que dependerán de la variedad de uva, estado de madurez de la uva, condiciones meteorológicas que afecten a la composición de la misma, técnicas de vinificación, levadura empleada, etc. el rendimiento en metano variará de un ensayo a otro, siendo una variable a tener en cuenta a la hora de evaluar un proceso anaerobio.

En este contexto, el tratamiento conjunto de los residuos vitivinícolas en los digestores anaerobios utilizados en las plantas de tratamiento de aguas residuales para la gestión de lodos de depuradora representa una interesante opción de eliminación para al menos una parte de estos materiales a nivel local (Da Ros et al., 2014).

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el que la materia orgánica, en ausencia de oxígeno, y mediante la acción de un grupo de bacterias específicas, se transforma en productos gaseosos o “biogás” y en un digestato, que es una mezcla de productos minerales y compuestos de difícil biodegradación (IDAE, 2007).

El biogás es una mezcla de gases formada principalmente por metano y dióxido de carbono y pequeñas porciones de otros gases como H_2S , H_2 , NH_3 , etc. La composición o riqueza del biogás depende del material digerido y del funcionamiento del proceso. En la Tabla 2.5.4.2. se muestran los valores medios de composición del biogás en función del sustrato utilizado (Sasson, 1985; Chang, 1983).

Tabla 2.5.4.2 Componentes del biogás en función del sustrato utilizado (Sasson, 1985; Chang, 1983).

Componente	Residuos Agrícolas	Lodos de Depuradora	Residuos industriales	Gas de vertedero
CH₄	50-80 %	50-80 %	50-70 %	45-65 %
CO₂	30-50 %	20-50 %	30-50 %	34-55 %
H₂O	Saturado	Saturado	Saturado	Saturado
H₂	0-2 %	0-5 %	0-2 %	0-1 %
H₂S	100-700 ppm	0-1 %	0-8 %	0,5-100 ppm
NH₃	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas
CO	0-1 %	0-1 %	0-1 %	Trazas
N₂	0-1 %	0-3 %	0-1 %	0-20 %
O₂	0-1 %	0-1 %	0-1 %	0-5 %
Compuestos orgánicos	Trazas	Trazas	Trazas	5 ppm

El efluente líquido, conocido como digestato, es el producto resultante de la degradación anaerobia, consistente en la mezcla del influente estabilizado y la biomasa microbiana producida. Para un mismo residuo, el tipo de reactor y los parámetros de operación empleados determinan la calidad del efluente en cuanto al nivel de contaminación y de organismos patógenos. Durante el proceso anaerobio parte de la materia orgánica se transforma en metano y dióxido de carbono, por lo que el contenido en materia orgánica es menor que en el influente.

En cuanto a las ventajas que presenta la digestión anaerobia frente a procesos aerobios, destacan:

- Generación de biogás que puede ser utilizado a modo de cogeneración por la misma industria generadora de dicho residuo

- Reducción de costes al no requerir aireación y generar menores excedentes de lodos, lo que se refleja en un abaratamiento en el tratamiento y deposición de los mismos.
- Tratamiento simultáneo de varios residuos, proceso conocido como co-digestión, con importantes ventajas.

Así mismo, también conlleva desventajas respecto a procesos aerobios:

- Se trata de un proceso completo que requiere personal cualificado para el control de su funcionamiento.
- Elevados costes de implementación del sistema que limitan el desarrollo de pequeñas instalaciones, al no ser rentables.

La riqueza del biogás dependerá de diversos factores, cuya composición determinarán el manejo y aprovechamiento de este.

2.5.4.2.1 Etapas de la digestión anaerobia

Atendiendo a los procesos bioquímicos y microbiológicos, las etapas en las que puede dividirse la digestión anaerobia son cuatro, principalmente:

- Hidrolítica.
- Acidogénica.
- Acetogénica.
- Metanogénica.

La hidrólisis de partículas y moléculas completas, tales como proteínas, hidratos de carbono o lípidos, se lleva a cabo en la primera fase de la digestión anaerobia. Las enzimas extracelulares producidas por los microorganismos hidrolíticos, convierten estos

compuestos en otros solubles más sencillos (aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga). A continuación, las bacterias acidogénicas fermentan estos compuestos más sencillos dando lugar, principalmente, a ácidos orgánicos de cadena corta, alcoholes, hidrógeno, dióxido de carbono y otros productos intermedios. Posteriormente, estos ácidos orgánicos son transformados a su vez en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, mediante la acción de microorganismos acetogénicos. Por último, los microorganismos metanogénicos producen metano a partir de ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono (Figura 2.5.4.2.1).

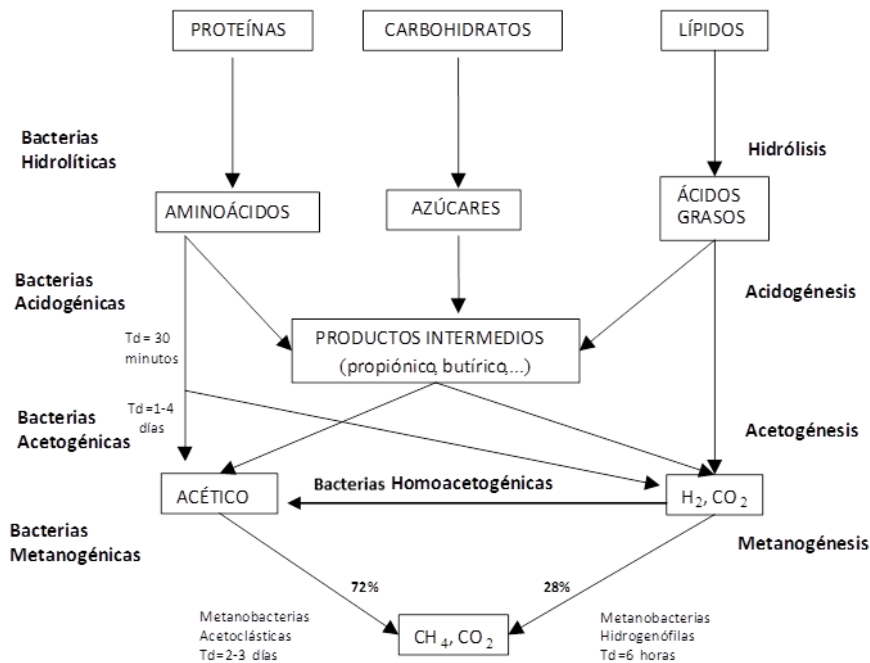


Figura 2.5.4.2.1 Etapas metabólicas para la formación de metano (Td, tiempo de duplicación) (Gujer y Zehnder, 1983).

- **Hidrolítica**

La etapa inicial en la degradación anaerobia de sustratos orgánicos complejos es la fase hidrolítica. En esta etapa, se produce la hidrólisis de la materia orgánica polimérica a compuestos solubles o monómeros, para que estos puedan atravesar la membrana

celular de los microorganismos involucrados en la biometanización. Únicamente pueden utilizar materia orgánica soluble que pueda atravesar su membrana celular. La etapa hidrolítica, puede ser el proceso limitante de la velocidad global del proceso, al depender, así mismo, de la temperatura, tiempo de retención hidráulico, composición del sustrato (porcentaje de lignina, carbohidratos, proteínas y grasas), tamaño de partículas, pH, concentración de amonio y concentración de los productos de la hidrólisis (Martí, 2006). Así mismo, los distintos tipos de macromoléculas que conforman el sustrato determinarán el proceso de degradación. Las proteínas constituyen un sustrato muy importante en el proceso de digestión anaerobia, ya que además de ser fuente de carbono y energía, los aminoácidos derivados de su hidrólisis tienen un elevado valor nutricional. Las proteínas son hidrolizadas en péptidos y aminoácidos por la acción de enzimas proteolíticas llamadas proteasas. Parte de estos aminoácidos son utilizados directamente en la síntesis de nuevo material celular y el resto son degradados a ácidos orgánicos volátiles, dióxido de carbono, hidrógeno, amonio y sulfuro en etapas posteriores del proceso (Martí, 2006).

La degradación de los lípidos en ambientes anaerobios comienza con la ruptura de las grasas por la acción de enzimas hidrolíticas denominadas lipasas, produciendo ácidos grasos de cadena larga y glicerol.

La velocidad de degradación de los materiales lignocelulósicos, compuestos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, al ser compuestos difícilmente asimilables por los microorganismos, suele ser la etapa limitante del proceso de hidrólisis de dichos materiales y por tanto, de la degradación anaerobia de determinados sustratos. Además de ello, los compuestos lignocelulósicos bajo condiciones anaerobias se transforman en compuestos fenólicos, agentes antimicrobianos, afectando también a la biodegradabilidad de la celulosa, de la hemicelulosa y de otros hidratos de carbono. Los

principales productos de la hidrólisis de la celulosa son celobiosa y glucosa, mientras que la hemicelulosa produce pentosas, hexosas y ácidos urónicos.

- **Acidogenética**

Durante esta etapa tiene lugar la transformación de las moléculas orgánicas solubles en compuestos que pueden ser utilizados directamente por las bacterias metanogénicas (ácido acético, ácido fórmico o H_2), y compuestos orgánicos más reducidos (ácido propiónico, butírico, valérico, láctico y etanol principalmente) que deben ser oxidados por bacterias acetogénicas en la siguiente etapa del proceso para de digestión anaerobia.

Fermentación de carbohidratos solubles

La fermentación de azúcares se realiza por diversos tipos de microorganismos y, en función de cada organismo, la ruta metabólica y los productos finales son diferentes. Los principales microorganismos asociados a la degradación de la glucosa pertenecen al género *Clostridium sp.* y convierten la glucosa en ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno. La glucosa se convierte en piruvato mediante la ruta Embden-Meyerhof y el piruvato, posteriormente, se desdobla a Acetil-CoA y dióxido de carbono. El Acetil-CoA se reduce en los productos de fermentación empleando como transportador de electrones el NADH derivado de las reacciones glucolíticas en la ruta Embden-Meyerhof.

Fermentación de aminoácidos

La fermentación de aminoácidos y de otras moléculas hidrogenadas genera ácidos orgánicos volátiles de cadena corta, ácido succínico, aminovalérico e hidrógeno. La fermentación de aminoácidos se considera un proceso rápido y que, en general, no limita la velocidad de degradación de compuestos proteicos. Las bacterias proteolíticas

que mayoritariamente se han identificado, pertenecen al género *Clostridium sp.* (Garrity et al., 2007). Los compuestos generados mediante esta oxidación son amoníaco, dióxido de carbono y un ácido carboxílico con un átomo de carbono menos que el aminoácido oxidado.

Oxidación anaerobia de ácidos orgánicos de cadena larga

Los ácidos orgánicos de cadena larga son oxidados a ácidos orgánicos volátiles de cadena corta por el mecanismo de β -oxidación. Los ácidos orgánicos volátiles libres son introducidos en la célula a través de la pared celular y una vez en su interior, son transformados en el correspondiente tio-éster-CoA. La β -oxidación es un ciclo en espiral que va liberando un acetyl-CoA en cada bucle, produciendo principalmente ácido acético. En condiciones anaerobias, este mecanismo es termodinámicamente desfavorable y muy dependiente de la presión parcial del hidrógeno, por lo que es de gran importancia la acción simbiótica de los microorganismos consumidores de hidrógeno para que ésta se pueda producir.

- **Acetogénica.**

Mientras que algunos productos de la fermentación pueden ser metabolizados directamente por los organismos metanogénicos (hidrógeno y ácido acético), otros, como el etanol, ácidos orgánicos volátiles de cadena más larga y algunos compuestos aromáticos, deben ser transformados en productos más sencillos, tales como acetato e hidrógeno, mediante la acción de las bacterias acetogénicas. En esta etapa intervienen bacterias de los géneros *Syntrophobacter sp.*, *Syntrophomonas sp.* y *Desulfovibrio sp.* (Garrity et al., 2007). Desde el punto de vista termodinámico, estas reacciones no son posibles porque en condiciones ambientales (pH=7, 25°C y 1 atm), presentan energías libres de reacción positivas. Sin embargo, a presiones parciales de hidrógeno bajas (del

orden de 10^{-4} - 10^{-5} atm), estas reacciones pasan a ser termodinámicamente favorables y la variación de energía libre es suficiente para permitir la síntesis de ATP y el crecimiento bacteriano. Por tanto, el principal inhibidor de la acetogénesis es el hidrógeno molecular, cuya concentración provoca la rápida acumulación de sustratos.

Un tipo especial de microorganismos acetogénicos son los llamados homoacetogénicos, que son capaces de crecer heterotróficamente en presencia de azúcares o compuestos monocarbonados (como la mezcla H_2/CO_2), produciendo como único producto acetato. Al contrario que las bacterias acetogénicas, éstos no producen hidrógeno como resultado de su metabolismo, sino que lo consumen como sustrato. El resultado neto del metabolismo homoacetogénico permite mantener bajas presiones parciales de hidrógeno y, por tanto, permite la actividad de las bacterias acidogénicas y acetogénicas. Los principales microorganismos homoacetogénicos involucrados en el proceso de digestión anaerobia son *Acetobacterium wodii*, *Clostridium aceticum* (Garrity et al., 2007) y *Butybacterium methylotrophium* (Nähle, 1987).

- **Metanogénica.**

Los microorganismos metanogénicos completan el proceso de digestión anaerobia mediante la formación de metano a partir de sustratos monocarbonados o con dos átomos de carbono unidos por un enlace covalente: acetato, hidrógeno/dióxido de carbono, formiato, metanol y algunas metilaminas. La obtención de metano puede realizarse principalmente mediante dos rutas metabólicas. En primer lugar, las bacterias metanogénicas acetoclásticas utilizan el ácido acético como sustrato. El segundo tipo de bacterias son las metanobacterias hidrogenófilas, que utilizan hidrógeno y dióxido de carbono para obtener metano. Los organismos metanogénicos se clasifican dentro del dominio Archaea y presentan unas características comunes que los diferencian del resto

de los microorganismos procariotas, tanto en su bioquímica como en su historia evolutiva (Martí, 2006). Dentro de esta etapa, encontramos bacterias de los géneros *Methanobacterium sp.*, *Methanosarcina sp.* y *Methanococcus sp.* (Siles, 2010).

Una alternativa a la valorización de los residuos de la industria vitivinícola podría ser la bio-refinería integrada a escala regional para la producción/obtención de múltiples productos (obtención de etanol, extracción de ácido tartárico, co-compostaje, obtención de energía eléctrica y térmica mediante digestión anaerobia, aprovechamiento de las aguas residuales una vez tratadas, como agua de reposición de calderas o para riego de viñedos, etc). Se trataría de un enfoque integrado para incorporar procesamiento físico-químico, bioquímico y térmico, que convierta a los residuos vitivinícolas en una materia prima de bajo coste para la producción de diversos productos de valor añadido. Puede ser la clave para obtener el verdadero valor de este residuo agrícola. La elección y combinación de tecnologías para su futura adopción dependerán en última instancia del rendimiento energético global y del riesgo asociado (tanto técnico como económico), que será específico para cada instalación, siendo fundamental la investigación y desarrollo adicionales.

El potencial de los residuos vitivinícolas para producir productos de valor añadido, como alcoholes de bebidas, combustibles y bioenergía, desencadena la necesidad de desarrollar procesos tecnológicamente viables utilizando este residuo como materia prima.

Dado que las bodegas y las regiones productoras de vino generan grandes cantidades de residuos, así como la creciente concienciación ciudadana por el medio ambiente y las restricciones legales en cuanto a la gestión y tratamiento de residuos se refiere, se está incentivando la implementación de nuevas técnicas sostenibles en el tratamiento de estos residuos. Como consecuencia de estos problemas emergentes, se ha

desarrollado esta investigación con el fin de poder implementar nuevos planes de gestión de estos residuos en uno de los cultivos con mayor volumen de producción y cultivo en el mundo.

Con este fin, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar la valorización de residuos derivados de la producción de vino blanco de las variedades de cultivo (*cv*) Pedro Ximenez, específicamente pieles, semillas y tallos producidos después de prensar las uvas, y lías Pedro Ximenez y Verdejo *cv*. Las técnicas alternativas propuestas son la digestión anaerobia para la producción de energía en forma de metano y el co-compostaje de orujo con residuos sólidos urbanos, con el fin de poder utilizarlo como enmienda orgánica en terrenos de cultivo.

La investigación de diferentes técnicas alternativas en la gestión de residuos, para convertirlas en subproductos y producir un aporte económico en el sector vitivinícola como biogás, demostrará si el co-compostaje y la digestión anaerobia de estos residuos vitivinícolas son posibles y si podrían ser implementados en la DOP Montilla-Moriles (Córdoba) para la gestión de residuos y reducir así el gran volumen de residuos generados por esta DOP.

Referencias:

- OIV, 2013, State of condition report, October 2013.
- Agamuthu, P., 2009. Challenges and opportunities in Agrowaste management: An Asian perspective. Inaugural meeting of First Regional 3R Forum in Asia 11 -12 Nov., Tokyo, Japan.
- Aiyuk, S., Amoako J., Raskin, L., van Haandel, A., Verstraete, W., 2004. Removal of carbon and nutrients from domestic wastewater using a low investment, integrated treatment concept. *Water Res.*, 38, 13, 3031-3042.

- D. Alipour, D., Y. Rouzbehan, Y.. 2007. Effects of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial biomass yield. *Animal Feed Science and Technology*. 137, 138–149

- Amatya, P.L., 1996. Anaerobic treatment of tapioca starch industry wastewater by bench scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. M. Eng. Thesis. Bangkok. Thailand.

- Arvanitoyannis, I.S., Ladas, D., Mavromatis, A. 2016. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 41,475-487.

- Avanzini, J.M. 2003. Concepto y clasificación de los RU y asimilables. En los Residuos Urbanos y Asimilables. Conserjería de MA. Junta de Andalucía.

- Beatriz Rivas, Ana Torrado, Ana Beleän Moldes and Joseä Manuel Domiänguez. Tartaric Acid Recovery from Distilled Lees and Use of the Residual Solid as an Economic Nutrient for *Lactobacillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2006), 54, 7904-7911.

- Brunetti, A., Boari, G., Passino, R., Rozzi, A., 1983. Physico-chemical factors affecting start-up in UASB digestors, in: Proc. of European Symposium on Anaerobic Wastewater Treatment, Noordwijkerhout, The Netherlands, pp. 317.

- Chen, Y., Chen, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technol.*, 99, 4044-4064.

- Chiusano, L., Cerutti, A.K., Cravero, M.C., Bruun, S., Gerbi, V. 2015. An Industrial Ecology approach to solve wine surpluses problem: the case study of an Italian winery. *J. Clean. Prod.*, 91, 56-63.

- Da Ros, C., Cavinato, C., Bolzonella, D., Pavan, P. 2016. Renewable energy from thermophilic anaerobic digestion of winery residue: Preliminary evidence from batch and continuous lab-scale trials. *Biomass and Bioenergy*. 91, 150-159.
- Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P., Bolzonella, D. 2016. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of winery wastewater sludge and wine lees: An integrated approach for sustainable wine production. *Journal of Environmental Management*. 203, 745-752.
- Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P., Bolzonella, D., 2014. Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Waste Management* 34, 2028-2035.
- Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., Menardo, S., 2010. Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresour. Technol.* 101, 3780–3783.
- Directiva 2006/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de abril de 2006 relativa a los residuos.
- Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, relativa a los residuos.
- Domínguez, J., Martínez-Cordeiro, H., Álvarez-Casas, M., Lores, M., 2014. Vermicomposting grape marc yields high quality organic biofertiliser and bioactive polyphenols. *Waste Manage. Res.* 32, 1235–1240.
- Eurostat, 2017. Waste generation by economic activities and households. http://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/index.php/File:Waste_generation_excluding_major_mineral_wastes_EU28_2004-2014_YB17.png (Last accessed 30/12/2017).

- Eurostat, Mayo 2017. Waste generation by economic activities and households, EU-28, 2014.

- Ferrer, J., Páez, G., Mármol, Z., Ramones, E., Chandler, C., Marín, M., Ferrer A., 2001. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresource Technol.* 76, 39–44.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT Data: Crops., 2013. <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> (Last accessed 27/03/2019).

- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT Data: Crops., 2017. <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> (Last accessed 26/12/2017).

- Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, R.C., Harrison, S.H., Euzéby, J., Tindall, B.J., 2007. Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea, Release 7.7. Michigan State University.

- Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Lores, M., Domínguez, J., 2011. Short-term stabilization of grape marc through earthworms. *J. Hazard. Mater.* 187, 291–295

- Juan M. Avanzini de Rojas. Los Residuos Urbanos y Asimilables. Consejería de Medio Ambiente Junta de Andalucía. I.S.B.N.: 84-95785-83-8

- Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados.

- Martí, N., 2006. Phosphorus precipitation in anaerobic digestion process. Dissertation.com. Boca Raton, Florida.

- Martinez, G.A., Rebecchi, S., Decorti, D., Domingos, J.M., Natolino, A., Del Rio, D., Bertin, L., Da Porto, C., Fava, F., 2016. Towards multi-purpose biorefinery platforms for the valorisation of red grape pomace: production of polyphenols, volatile fatty acids, polyhydroxyalkanoates and biogas. *Green Chem.* 18, 261–270.

- Mira de Orduña, R. 2010. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.*, 43, 1844-1855
- Moreno J. y Moral R., 2008. *Compostaje*. Mundi- presa libros, S.A (Ed.) ISBN: 9788484763468.
- Nähle, C., 1987. La fermentación metánica de aguas residuales y su aplicación a la industria azucarera. *Tecnología del agua*. 33, 69-85.
- Nogales, R., Cifuentes, C., Benitez, E., 2005. Vermicomposting of winery wastes: a laboratory study. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 40, 659–673.
- OIV. Código Internacional de Prácticas Enológicas. Edición 06/2016.
- Palmieri N., Forleo, M.B., Giannoccaro, G., Suardi, A. 2017. Environmental impact of cereal straw management: An on-farm assessment. *Journal of Cleaner Production* 142, 2950-2964.
- Paradelo, R., Moldes, A.B., Barral, M.T., 2013. Evolution of organic matter during the mesophilic composting of lignocellulosic winery wastes. *J. Environ. Manage.* 116, 18–26.
- Real Decreto 952/1997, de 20 de junio. BOE núm. 160, de 5 de julio de 1997, páginas 20871 a 20880.
- Robinson, B.J., Hellou, J. 2009. Biodegradation of endocrine disrupting compounds in harbour seawater and sediments. *Sci. Total Environ.* 407, 5713-5718.
- Rumi, C., Kenji, N., Hidetaka, K., Ohto, K., Takanori, W., Katsutoshi, I., 2009. Grape waste as a biosorbent for removing Cr (VI) from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials.* 163, 245-250.

- Siles, J.A., 2010. Reciclado de residuos orgánicos derivados de la industria de fabricación de zumo de naranja y de obtención de biodiesel. Ph.D. Thesis. Universidad de Córdoba, Spain.
- Thaveesri, J., 1995. Granulation and stability in upflow anaerobic sludge bed reactors in relation to substrates and liquid surface tension. Ph.D. Thesis. Ghent University, Belgium.
- Traversac, J.B., Rousset, S., Perrier-Cornet, P. 2011. Farm resources, transaction costs and forward integration in agriculture: evidence from French wine producers. *Food Policy* 36, 839-847.
- Villaescusa, I., Fiol, N., Martínez, M., Miralles, N., Poch, J., Serarols, J., 2004. Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions by grape stalks wastes. *Water research*. 38, 992-1002.
- Wheatley, A., 1990. *Anaerobic Digestion: a Waste Treatment Technology*. Elsevier, London, UK.
- Wojcik, P.T., Sirotin, Y.D. 2014. Single Scale for Odor Intensity in Rat Olfaction. *CellPress*. 24, 568-573.

**MATERIALES Y MÉTODOS/MATERIALS AND
METHODS**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Equipo de Digestión Anaerobia

El sistema utilizado para los ensayos de biodegradación anaerobia se compone de los siguientes elementos (Figura 3.1):

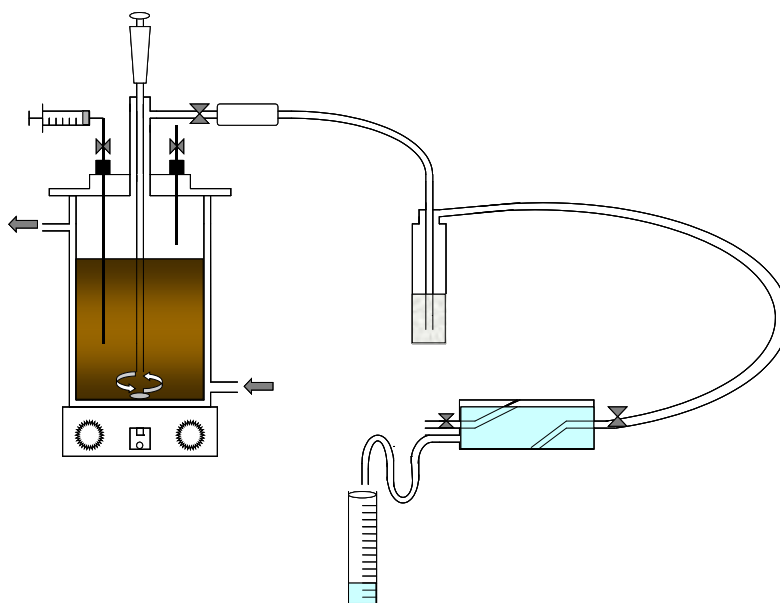


Figura 3.1 Esquema del equipo de digestión anaerobia.

- Digestor anaerobio.
- Sistema de agitación.
- Sistema de absorción de dióxido de carbono.
- Sistema de medida del metano.

3.1.1 Digestores anaerobios

Entre los distintos tipos de digestores existentes (Nebot, 1992) se ha optado por reactores discontinuos de mezcla completa con crecimiento bacteriano en suspensión sin sistema de retención de biomasa. Los reactores de vidrio utilizados han sido de 1,0 L de volumen útil, forma cilíndrica y provistos de una tapa con un sistema de cierre hermético (Figura 3.1.1). La tapa consta de cuatro

orificios: el primero y central de mayor diámetro y otros tres laterales. Por el mayor de ellos se acopla el sistema de alimentación del reactor. Consta de un tubo, que se introduce hasta el centro del volumen de reacción, y de un frasco de alimentación con un tapón, con cierre hidráulico, para poder llevar a cabo la alimentación de forma discontinua. La toma de muestra se puede realizar en agitación o en decantación de modo que la diferente longitud de los tubos de muestreo permite minimizar el arrastre de biomasa en caso de que fuese necesario (decantación). En la toma de muestra es necesario compensar la presión con un gas inerte (N_2); además el sistema de inyección de éste permite inertizar el espacio de cabeza del reactor en el arranque de los experimentos y cuando fuese necesario.

Adicionalmente, los reactores disponen de una camisa por la que circula agua a $37,8^{\circ}C$ procedente de un baño termostático modelo LAUDA RTM 20, que permite mantener la temperatura del medio de reacción en el rango mesófilo.



Figura 3.1.1. Equipo de digestión anaerobia.

3.1.2 Sistema de agitación

El agitador empleado ha sido del modelo MAGNA AN-2. Está provisto de un selector de velocidad que permite suspender la biomasa en el medio de reacción. La velocidad de agitación ha estado comprendida entre 150-200 rpm para no provocar la ruptura de los agregados bacterianos (Ramalho, 1996) y permitir el contacto entre el sustrato y los microorganismos.

3.1.3 Sistema de absorción de dióxido de carbono

Se utiliza un borboteador con un volumen de 50 mL, lleno parcialmente de NaOH 6N, en el que burbujea el biogás procedente de cada digestor con objeto de retener el dióxido de carbono que contiene.

3.1.4 Sistema de medida de metano

El metano se mide por desplazamiento de agua, utilizando un gasómetro cilíndrico de 1,0 L de capacidad y una probeta del mismo volumen. El metano desplaza un volumen equivalente de agua que es recogido y medido en la probeta.

Los resultados obtenidos de volumen de metano acumulado se normalizan teniendo en cuenta el efecto de la presión atmosférica, la temperatura y la presión de vapor del agua a la temperatura ambiente en el momento de la medida, expresándolos finalmente en condiciones normales (0°C y 760 mm Hg). La temperatura y la presión son determinadas en una estación meteorológica provista de termómetro y barómetro. Partiendo de la *Ley de los gases ideales*, tanto

para el volumen en las condiciones experimentales como del volumen a condiciones normales se tiene:

$$P_{\text{real}} \times V = n \times R \times T \quad (\text{ec. 3.1.4.1})$$

$$NP \times NV = n \times R \times NT \quad (\text{ec. 3.1.4.2})$$

Donde:

- P_{real} es la presión atmosférica expresada en atm.
- V es el gas generado en las condiciones experimentales (NL).
- R es la constante de los gases ideales (atm·L/K·mol).
- T es la temperatura ambiente expresada en K.
- NP es la presión de vapor en condiciones normales (atm).
- NV es el volumen de gas generado expresado en condiciones normales (0 °C, 1 atm) (NL).
- NT es la temperatura en condiciones normales (K).

Combinando ambas expresiones y sustituyendo los parámetros se llega a la expresión deseada:

$$NV = V \times \left(\frac{P_{\text{real}}}{NP} \right) \times \left(\frac{NT}{T} \right) \quad (\text{ec. 3.1.4.3})$$

$$NV = V \times \left(\frac{P_{\text{real}}}{1 \text{ atm}} \right) \times \left(\frac{273 \text{ K}}{T} \right) \quad (\text{ec. 3.1.4.4})$$

Adicionalmente, P_{real} es dependiente de dos factores, la presión atmosférica medida y la presión de vapor, debido al sistema experimental utilizado para la medida del volumen de metano generado (por desplazamiento de agua), calculando esta última a partir de los valores de presión de vapor del agua de 0 a 370 °C (Handbook of Chemistry and Physics, 2004-2005).

Finalmente se obtiene la expresión a aplicar:

$$NV = V \times \left(\frac{P_{real} - P_v}{1 \text{ atm}} \right) \times \left(\frac{273 \text{ K}}{T} \right) \quad (\text{ec. 3.1.4.5})$$

Donde:

-P_v es la presión de vapor a la temperatura ambiente (atm).

3.2 Respirómetro dinámico en fase líquida

La actividad microbológica de las muestras orgánicas se ha determinado con la utilización de un respirómetro en fase líquida (Figura 3.2.1) diseñado y construido por el departamento de Ingeniería Química, patentado durante el periodo 2003/2004 (Publication No. ES2283171 A1 of 16 October 2007) (figura 3.1.10.1). Permite determinar la Velocidad Específica de Consumo de Oxígeno (VECO, mgO₂·gSV⁻¹·h⁻¹) y el Consumo Acumulado de Oxígeno (CAO, mgO₂·gSV⁻¹). De acuerdo a la clasificación de la IWA (International Water Association), se trata de un respirómetro LSS donde la concentración de oxígeno se mide con un sensor de oxígeno disuelto en fase líquida (L) y no se produce alimentación de gas (S) ni de líquido (S) durante la medida. El sistema consiste en un baño termostático donde se introducen dos matraces Erlenmeyer o reactores biológicos (1 L de capacidad cada uno), en los cuales se lleva a cabo el proceso. En dichos matraces, se introduce una cantidad de muestra determinada, de 1 a 4 gramos dependiendo de la actividad de la misma, junto con una serie de micronutrientes que favorezcan la actividad microbológica (10 mL de sulfato de magnesio (MgSO₄) [11g/L], 10 mL de cloruro de hierro (FeCl₃) [0.15 g/L] y 10 mL cloruro de calcio (CaCl₂) [27.50 g/L]) y 30 mL de tampón fosfato (K₂HPO₄ [8.50 g/L], Na₂HPO₄·7H₂O [18.23 g/L], NH₄Cl [1.70 g/L]) que permite tamponar el medio a pH 7,2. Se añade 1 g de tiourea con la finalidad de inhibir el proceso de nitrificación, bloqueando el consumo de

oxígeno por parte de las bacterias nitrificantes y, de esta manera, atribuir todo el consumo de oxígeno a la oxidación del carbono. Finalmente, se enrasa con agua destilada hasta 1 L. Durante el tiempo de medida, las muestras se mantuvieron agitadas de manera constante a 300 rpm.



Figura 3.2.1. Respirómetro en fase líquida.

En cada reactor son introducidos un electrodo Mettler, modelo IMPRO-6000, que permite medir la concentración de oxígeno disuelto, y unos difusores de aire que permiten mantener la concentración de oxígeno disuelto ($\text{mg O}_2/\text{L}$) entre dos valores prefijados de conformidad con el rango posible dependiendo de la mayor o menor rapidez de biodegradación de la materia orgánica puesta en juego, quedando cada matraz cerrado herméticamente. La fuente de aire es una red de aire comprimido del laboratorio controlada por el accionamiento de dos electroválvulas. Cuando se produce la inyección de aire en el matraz (entre 100 y 300 L/h), el líquido que ocupa todo el volumen del recipiente y el gas sobrante rebosan por el orificio superior y son conducidos a través de un tubo a un depósito auxiliar situado en la parte superior del matraz. Cuando se detiene la aireación, caen de nuevo al matraz por acción de la gravedad hasta su llenado. Aun así, el recipiente puede considerarse hermético ya que la difusión del oxígeno que pueda producirse en el depósito de rebose, a través de los tubos es prácticamente nula.

Por otro lado, el respirómetro dispone de un módulo de acondicionamiento de señal (Mettler, modelo 4200) que permite transformar la señal en forma de corriente, que nos

proporcionan los electrodos de oxígeno, en señal de tensión que es la que admite la tarjeta de adquisición de datos.

Como se mencionó anteriormente, el funcionamiento discontinuo del respirómetro gira en torno a dos consignas, la concentración máxima y mínima de oxígeno establecidas, considerando un ciclo el tiempo que transcurre desde el valor máximo al mínimo. Durante este periodo, el software recoge los datos de concentración de oxígeno disuelto frente al tiempo, que suelen venir representados por la recta de pendiente negativa. El valor absoluto de dicha pendiente se corresponde con un valor de VECO ($\text{mg O}_2 \cdot \text{g SV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

La serie de ciclos transcurre durante unas 20 horas, resultando una curva típica como la que se muestra en la Figura 3.2.2. Mediante el cálculo de la integral del área bajo la curva se obtiene otro dato de interés, el Consumo Acumulado de Oxígeno a las 20 horas (CAO_{20} , $\text{mg O}_2 \cdot \text{g SV}^{-1}$) si bien, el consumo acumulado podría ser calculado a cualquier tiempo durante el transcurso del experimento.

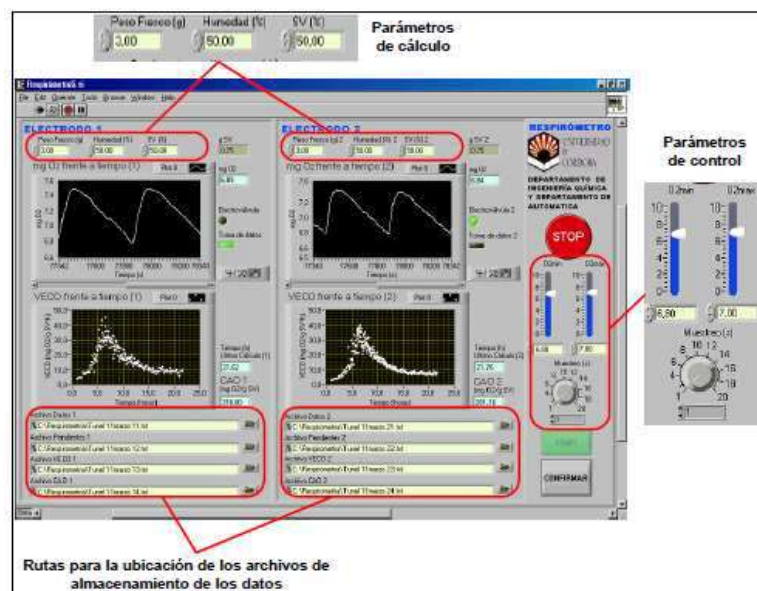


Figura 3.2.2. Pantalla donde se programan las condiciones del ensayo y se recogen los resultados durante el transcurso del mismo

Como puede observarse en la Figura 3.2.2, la pantalla recoge la información procedente de cada uno de los reactores en dos columnas similares. Al inicio del experimento es necesario introducir datos sobre la muestra introducida en cada reactor (masa (g), humedad (%) y sólidos volátiles (%)). Las gráficas superiores de cada columna recogen la evolución del contenido en oxígeno disuelto (mg O_2), que, como se comentó anteriormente, da lugar a rectas decrecientes de pendiente negativa, cuyo valor absoluto se corresponde con una VECO ($\text{mg O}_2/\text{gSV}\cdot\text{h}$). El valor de cada una de las VECO ($\text{mg O}_2/\text{gSV}\cdot\text{h}$) calculadas se recoge en la gráfica inferior. Dichas gráficas, muestran la evolución típica de esta variable durante un proceso de degradación de la materia orgánica.

En la parte inferior de cada columna, se muestran las cuatro rutas en las que son recogidos los datos que se generan durante el ensayo:

1. Concentración de oxígeno frente al tiempo, durante la fase de consumo de oxígeno de cada ciclo.
2. Pendiente de la curva concentración de oxígeno frente al tiempo, calculada al final de la fase de consumo de oxígeno de cada ciclo.
3. VECO frente al tiempo, calculada al final de la fase de consumo de oxígeno de cada ciclo.
4. CAO frente al tiempo, calculada al final de la fase de consumo de oxígeno de cada ciclo.

3.3 Respirómetro dinámico en fase sólida

El respirómetro dinámico adiabático (aeróbico con el flujo de aire continuo) es un instrumento dedicado a la evaluación de la estabilidad biológica de la biomasa mediante la determinación del Índice Respirométrico Dinámico (IRD) determinado por el método Di.Pro.Ve. (Departamento de Producción Vegetal - Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Milán) - UNI / TS11184 - prEN 15590. Figura 3.3.1. Respirómetro dinámico en fase sólida.



Figura 3.3.1. Respirómetro dinámico en fase sólida. (Respirómetro 3022)

La determinación del IRD se basa en la medición de la tasa de consumo de oxígeno necesario para la oxidación bioquímica de compuestos fácilmente biodegradables contenidos en una matriz orgánica. La medición del consumo de O_2 se lleva a cabo en la ventilación continua para garantizar el mantenimiento de condiciones aerobias para el desarrollo óptimo de los microorganismos y para eliminar el CO_2 producido.

El respirómetro permite el análisis de la muestra, comparable a los ensayos a escala real. El objetivo es comprobar la estabilidad de la biomasa y controlar los principales parámetros del proceso, para evaluar su progreso y las posibilidades de intervención en ellos durante el proceso de compostaje (NC Technologies).

En el respirómetro dinámico la concentración de oxígeno permanece prácticamente invariable (entre el 16 y 20%) debido a un sistema de control del caudal mediante feedback que consigue mantener estas condiciones aerobias a lo largo de todo el ensayo. El caudal aportado en todo momento es uno de los temas más importantes para la correcta realización del índice de respiración dinámico para que garantice las condiciones de aerobiosis. El respirómetro puede actuar con caudal fijo o con caudal variable en función del objetivo perseguido.

El equipo consta básicamente de un reactor adiabático, encamisado con 57 mm de poliuretano para su aislamiento. Tiene una capacidad de 148 litros, (altura 800 mm y diámetros externos e internos de 600 y 486 mm). La tapa se fija al reactor mediante 8 cierres herméticos juntas de goma. Tiene tres orificios, para añadir el aire (\varnothing 26 mm), introducir la sonda de temperatura tipo Pt100 (\varnothing 20 mm, Tersid Came, Italia) y otro para la salida de aire (\varnothing 20 mm). La capacidad útil es de 124 litros que es la capacidad de la cesta de fácil manejo para las operaciones de llenado y vaciado. El fondo de dicha cesta está provisto de una rejilla desmontable que permite percolar el lixiviado del residuo (\varnothing 2 mm). La diferencia entre la altura desde donde se produce la aireación y el fondo de dicha rejilla de acero (100 mm) permite una mejor difusividad del aire.

El sistema de control consiste en un ordenador, un módulo de acondicionamiento de señales en el que se encuentra el regulador de flujo y una cámara donde se produce la determinación del oxígeno. La determinación del oxígeno, realizada con una sonda tipo Clark con compensación de la temperatura, se realiza en un sistema colector, una vez pasado por una cámara de expansión para eliminar la humedad. La calibración ordinaria fue realizada por medidas de la concentración de oxígeno en la atmósfera (210 mL/L) durante 1 hora antes de cada ensayo. Los resultados indicaron que la sonda tenía una precisión de ± 0.47 % después de cada calibración. El electrodo de oxígeno era chequeado diariamente durante la realización de los ensayos.

Todos los datos medidos por los electrodos son transferidos a un PC mediante una tarjeta electrónica (PC-LPM-16, National Instruments, USA) con una frecuencia de adquisición de datos

de 5 minutos, el resultado a cada hora de las distintas variables viene dado como media de las 12 medidas que se suceden en cada hora. La tarjeta contiene integrada el caudalímetro necesario para el aire entrante, además de la sonda de temperatura, registrando en línea, la conducción de aire que entra y sale a dicha unidad. El software fue un desarrollo exclusivo para este método por Di.Pro.Ve y Costech Internacional. El software permite monitorizar la temperatura de la biomasa y la del aire entrante y saliente, así como la concentración de O₂, CO₂, caudal e índice de respiración.

El IRD viene calculado como la media de los 24 valores horarios consecutivos en los cuales la respiración de la biomasa ha sido más elevada. En la práctica puede ser calculado como el valor máximo de la media móvil de 24 valores.

El llenado se completa con la tapadera y la sonda de temperatura que debe ser introducida, siempre recta y despacio, llegando la punta al núcleo del reactor, o lo que es lo mismo sumergida unos 25 cm en la masa de los residuos (Dios, 2008).

Para el seguimiento del experimento realizado se ha llevado a cabo la toma de distintas muestras de la fase sólida abriendo y cerrando el sistema cada vez que ha sido necesario.

3.4 Olfatometría dinámica

La Norma EN-13725:2003 establece la olfatometría dinámica como el método estándar para determinar la concentración de olor de una muestra, expresada en unidades de olor Europeas por metro cúbico (ouE/m³). El olfatómetro utilizado fue un olfatómetro T08 de TO-Series, desarrollado a principios del año 2000 por la compañía Ecoma, actualmente denominada Odournet GmbH (Figura 3.4.1).

El olfatómetro se encuentra totalmente automatizado y dispone de un software especializado que permite exponer a un grupo de panelistas a una serie de diluciones de la muestra ($22 \leq x \leq 216$), cuya concentración de olor se pretende determinar. Este olfatómetro permite la medida de olor de cuatro panelistas, simultáneamente en puertos separados.



Figura 3.4.1. Olfatómetro dinámico. (Olfatómetro T08 de TO-Series)

Esta técnica se basa en el método Si/No que consiste en que los panelistas pulsen el botón que indica “Si” cuando han percibido el olor de la muestra. El momento en el cual el panelista pulsa el botón de manera acertada en dos series consecutivas es conocido como ITE (Individual Threshold Estimate), es decir, el límite de detección individual. La media geométrica de los ITE’s de un grupo de panelistas es tomada como la concentración de olor (ouE/m^3) de la muestra. Esta concentración de olor es calculada de forma automática por el software que, a su vez, permite calcular la concentración detectada por cada uno de los panelistas y crear una base de datos con los resultados obtenidos en cada medida.

Conservación de muestras: Las muestras deben ser analizadas en un periodo inferior a 30 horas desde que fueron tomadas. Durante este tiempo, las muestras deben ser almacenadas en un

lugar donde las fluctuaciones de luz y temperatura no sean muy acentuadas, no debiéndose superar los 25°C.

Panelistas: Para que una persona sea apta para la realización de medidas de olor debe someterse a un proceso de evaluación. Dicha evaluación consiste en tres secciones de olfatometría realizadas en días alternos, en las que se ha utilizado como material de referencia n-butanol disuelto en nitrógeno con una concentración de 65 ppm y una incertidumbre de $\pm 3,3$. Se requiere de al menos 8 ITE's por sección realizada, dichos ITE's expresados en ouE/m³ deben expresarse en $\mu\text{mol/mol}$ o ppb y aplicarle logaritmos (\log_{10}). A los resultados obtenidos se les calcula la media y la desviación típica. Un panelista cualificado es aquel para el cual los resultados muestran una media comprendida entre 20 y 80 ppb y una desviación típica inferior a 2,3.

Análisis de muestras: Para que el análisis olfatométrico pueda llevarse a cabo, se requiere de una habitación de ventilación adecuada y cuya entrada de aire disponga de un filtro de carbón activo que permita mantener la habitación libre de olor. La temperatura debe mantenerse por debajo de 25°C y el nivel de dióxido de carbono (CO₂) por debajo de una concentración de 1500 ppm.

El olfatómetro dispone de un compresor que le suministra el aire necesario para la dilución de las muestras de olor, que debe operar entre 4 y 5 bares de presión. El compresor debe encenderse siempre antes de encender el olfatómetro. El aire procedente del compresor se hace pasar por un filtro que permite eliminar humedad, compuestos orgánicos y partículas del aire antes de llegar al olfatómetro.

Posteriormente, se conectan el olfatómetro y el ordenador y se establece conexión entre ambos, de manera que aparece el menú principal. Entre las diferentes opciones que se muestran en el menú principal podemos destacar:

Olfactometric Test: Permite comprobar que todos los puertos de olor funcionan adecuadamente ante la respuesta de cada uno de los panelistas, si todos los puertos funcionan adecuadamente el icono "none" se cambia por "yes". También permite realizar diluciones concretas

de la muestra de manera manual, realizando combinaciones de los números del 0 al 7 en las unidades de dilución 1 y 2.

Panel management: Permite introducir nuevos miembros como panelistas los cuales van siendo almacenados en una base de datos. La creación de nuevos miembros se puede hacer pulsando “Edit panel member” de manera que aparece la ventana “Panel member” en la que se recogen los datos del panelista y se le asigna un código identificativo (ID) compuesto por las dos primeras letras del apellido y la primera letra del nombre.

Start measurement: Es la opción del menú principal que permite comenzar a realizar una medida olfatométrica. Contiene una serie de pestañas en las cuales se va introduciendo toda la información referente a la medida que se va a realizar. La primera pestaña “Project data” permite seleccionar el proyecto en el cual los datos van a ser almacenados y requiere introducir el lugar en el cual se va a realizar la medida y la temperatura a la que se encuentra.

La pestaña “*Panel members*” te permite seleccionar al grupo de panelistas que participan en la medida y la posición en la que se encuentra cada uno de ellos. Los miembros del panel se pueden seleccionar uno a uno pulsando sobre “not assigned” o bien, se puede seleccionar un panel previamente formado pulsando el desplegable que aparece junto a “previous panel teams”. La pestaña “*Data of sample*” permite introducir todos los datos informativos sobre la muestra: el nombre de la muestra, el lugar donde fue tomada la muestra e indicar si se ha realizado algún tipo de pre-dilución durante el muestreo o en el laboratorio.

Finalmente, la pestaña “Dilution series” permite elegir las series de diluciones a las que los panelistas van a ser expuestos durante la medida siempre y cuando se encuentren ordenadas desde mayor a menor dilución, pudiendo intercalar el número de blancos (muestra sin olor) que se estime oportuno.

En cualquiera de las pestañas anteriores, se encuentra una pestaña denominada “*Manual flushing*” que te permite limpiar los conductos del olfatómetro por los que circula el aire, siempre

que se considere necesario. Dicha función se realiza de manera automática después del análisis de cada muestra.

Una vez introducidos los datos requeridos en cada una de las ventanas anteriores, comienza la medida olfatométrica pulsando “*Start measurement*”, donde puede observarse la serie de diluciones, previamente seleccionadas, a las que se expone el panel y se muestra subrayada la dilución que van a percibir los miembros del panel. Además, dicha pantalla muestra cuatro rectángulos uno para cada panelista, coloreados en función del tipo de muestra que estén percibiendo: el color rojo indica que el miembro del panel está siendo sometido a una dilución de la muestra olorosa, el verde indica que el panelista está percibiendo aire de referencia o un blanco (ambas muestras sin olor) y el gris muestra que no sale ningún tipo de aire por el puerto de muestreo. En el interior de cada rectángulo aparece otro de menor tamaño que indica cuándo el panelista ha pulsado el botón de “*Yes*”.

El olfatómetro selecciona de manera aleatoria el primer miembro que va a ser sometido a la dilución de olor o blanco correspondiente. Un dispositivo luminoso en cada puerto de olor indica al panelista su turno para evaluar el olor del aire.

Cada vez que finaliza una secuencia, la pantalla muestra una ventana con los resultados que se han obtenido para cada uno de los panelistas. Se puede observar como aparecen los resultados de concentración de olor, expresada en términos de dilución, en cada secuencia para cada uno de los panelistas. Junto al valor de concentración aparece el valor de ΔZ que es el cociente entre una estimación del umbral individual (Z_{EUI}) y la media geométrica (\bar{Z}_{EUI}) de todas las estimaciones del umbral individual en una medida. El parámetro ΔZ debe cumplir que $-5 \leq \Delta Z \leq 5$.

La Figura 3.4.2 muestra el documento que genera el olfatómetro con la concentración de olor (ouE/m^3) de la muestra analizada. En dicho documento aparece detallada toda la información sobre la muestra, el muestreo, el operador y los panelistas.

TO8 by ecoma GmbH		Measurement of odour threshold - yes/no		Software by SPS Productions Version: 1.5.4.0	
Measurement report according DIN EN 13725:2003 and AS 4323.2					
Laboratory		Universidad de Cordoba Area de Ingenieria Quimica, Campus Rabanales Edificio Marie Curie (C3) Planta Baja Ctra, N-IV, Km, 396 ES-14071 Cordoba			
Sample		limoneno 3 LAB			
Project	Name Operator	2018 AAP			
Sampling	Time Place Pre-Dilution	20/03/2018 11:51:03 none			
Measurement	Place Time of measurement Temperature of odour room Olfactometer Last Calibration Pre-Dilution	planta piloto 20/03/2018 11:55:48 - 20/03/2018 11:58:11 25 TO8 (Serial number: EO.8088) none			
	Presentation method Presentation time Request method Sequences / discarded	Limit 2,2s Yes / No 2 / 0			
Measurement result					
	$Z_{ite,pan}$	2048			
	c_{od}	2048 OU_e/m^3 (33,1 dB) (*)			
Panel members	Round 1	ΔZ	Round 2	ΔZ	
JAH	5793	2,8	5793	2,8	
LOM	724	-2,8	1448	-1,4	
BEI	1448	-1,4	724	-2,8	
AIG	2896	1,4	2896	1,4	
Panel members	Err. ref. air		Err. blanks		
JAH		0		0 / 2	
LOM		0		0 / 2	
BEI		0		0 / 2	
AIG		0		0 / 2	

(*) Unit in OU_e/m^3 only valid, if traceability to European Reference Odour Mass (EROM) is proved.

Figura 3.4.2 Resultados de un test olfatómico.

3.5 Métodos analíticos

Las determinaciones analíticas realizadas para la caracterización de las materias primas (sustancias residuales) y el seguimiento del proceso de digestión anaerobia son:

- pH
- Conductividad

- Alcalinidad
- Acidez volátil
- Ácidos orgánicos volátiles (determinación cromatográfica)
- Sólidos totales
- Sólidos minerales
- Sólidos volátiles
- Demanda química de oxígeno total y soluble
- Carbono total, carbono inorgánico y carbono orgánico total
- Nitrógeno total Kjeldahl
- Nitrógeno amoniacal
- Fósforo total
- Fósforo soluble
- Azúcares reductores
- Grado alcohólico
- Metales pesados

Las determinaciones de las muestras de los digestores se han llevado a cabo según los métodos estándar de la APHA (APHA, 1989). Por otro lado, la caracterización de los sustratos se ha realizado mediante los protocolos para el análisis de compost desarrollados por el US Department of Agriculture y el US Composting Council (Thompson et al., 2001).

En el estudio de co-compostaje, el pH, la conductividad, el CT, COT y CI se han determinado a partir de una dilución del material (seco y triturado) en agua destilada en una relación 1:25 (p/p). La mezcla se mantiene en agitación (170 r.p.m) en un agitador durante 30 minutos y, posteriormente, se deja reposar. Finalmente, la muestra se microfiltra con un filtro de microporo (47 micras) obteniendo la parte soluble del residuo orgánico, la cual es analizada. El resto de variables

(SV, NTK, N-NH₄⁺ y P-P₂O₅) son analizadas directamente de la muestra. Para la determinación de todas estas variables, a excepción de las variables respirométricas, se utiliza la materia prima seca y triturada.

3.5.1 pH

Se ha utilizado un pHmetro “Crison” modelo Digit 2001, provisto de un electrodo de vidrio que se sumerge en un volumen adecuado de muestra: la lectura digital da el valor de pH con dos decimales. Diariamente se ha procedido a la calibración del mismo con disoluciones tampón de pH 4,01; 7,00 y 9,21.

3.5.2. Conductividad

La conductividad ha sido determinada con la utilización de un conductímetro modelo micro CM 2200, que dispone de dos electrodos de vidrio los cuales se sumergen en la muestra que va a ser analizada. Uno de ellos determina la temperatura, ya que la conductividad de un líquido depende de la temperatura el mismo, y el otro realiza la medida de la conductividad. Dispone de una pantalla digital que muestra la conductividad expresada en mS/cm ó µS/cm. Requiere de una calibración previa a la realización de la medida para la cual se utiliza una muestra patrón de KCl 0,01 molar con una conductividad de 1413 µS/cm a 24°C.

3.5.3 Alcalinidad

La alcalinidad de un agua es una medida de su capacidad para amortiguar cambios de pH y, por lo tanto, es una medida de la estabilidad en los digestores anaerobios. El valor medio puede variar significativamente con el pH del punto final utilizado. Además es importante en muchos usos y tratamientos de aguas naturales y residuales porque es función fundamentalmente del contenido en carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, si bien los valores medios de alcalinidad incluyen

también la contribución de boratos, fosfatos, silicatos y otras bases presentes en la muestra analizada.

La determinación se realiza tomando un volumen conocido de muestra, normalmente 10 mL, en un vaso de precipitado y se le añade lentamente una solución de ácido sulfúrico desde una bureta, hasta alcanzar pH 4,5. Se mide el volumen gastado de ácido y el resultado se expresa en mg CaCO₃/L. La alcalinidad de la muestra viene dada por la expresión:

$$Alc = \frac{V \times N \times 50 \times 1000}{V_m} \quad (\text{ec. 3.2.1})$$

Donde:

- Alc = alcalinidad expresada en mg CaCO₃/L.
- V = volumen gastado de ácido sulfúrico, mL.
- N = normalidad del ácido sulfúrico.
- 50 = masa equivalente del CaCO₃, g.
- V_m = volumen tomado de muestra, mL.

3.5.4 Acidez volátil

Para su determinación se sigue un método indirecto, que consiste en una destilación por arrastre de vapor. Este método se basa en la propiedad que presentan los ácidos grasos de cadena corta, de arrastre con vapor de agua en medio ácido. Es una técnica de gran precisión y con ella se consiguen recuperaciones de hasta el 98% de los ácidos orgánicos volátiles presentes en la muestra.

El procedimiento para la determinación consiste en tomar un volumen de muestra, normalmente 10 mL, determinar la cantidad de ácido sulfúrico 0,5 N necesario para llevar el pH

hasta 3,5 y a continuación se toma otro volumen igual de muestra y se introduce en el destilador. Inmediatamente después se añade la cantidad de ácido sulfúrico determinada previamente, evitándose de esta forma la pérdida de ácidos volátiles.

Se destila a una velocidad tal que se recoja un volumen de 200 mL en aproximadamente 15 minutos; pasados éstos, se recogerá una fracción de 50 mL más para asegurarnos de haber recogido todas las fracciones de ácidos. El destilado se recoge en un matraz Erlenmeyer, tapado con papel de parafina, que se valora con NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

El contenido en ácidos volátiles de la muestra, expresado en mg ácido acético /L, viene dado por:

$$AV = \frac{V \times N \times 60 \times 1000}{V_m} \quad (\text{ec. 3.2.2})$$

Donde:

- AV = acidez volátil, mg ácido acético/L.
- V = volumen de NaOH, mL.
- N = normalidad de NaOH.
- 60 = masa molecular del ácido acético, g.
- V_m = volumen tomado de muestra, mL.

3.5.5 Ácidos orgánicos volátiles (determinación cromatográfica)

Los ácidos orgánicos volátiles de manera individual analizados son ácidos acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico y caproico. En el caso de residuos sólidos, la determinación se realiza después de llevar a cabo una extracción con agua destilada, de acuerdo al método descrito por Thompson et al. (2001). La determinación se lleva a cabo utilizando un

cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP-5890 equipado con una columna semicapilar Nukol-silica de 15 m x 0.53 mm (i.d.) y un detector de ionización de llama (FID). La temperatura de horno se incrementa gradualmente de 100 a 150 °C a una velocidad de 4°C/min. Se utiliza helio (28.6 kPa) como gas portador a una velocidad de flujo de 50 mL/min. Para la ignición de la llama del FID se emplean hidrógeno (14.3 kPa) y aire (28.6 kPa).

3.5.6 Sólidos totales (ST)

La determinación de los sólidos totales incluye tanto los sólidos orgánicos como los inorgánicos presentes en la muestra. Se pesa una cantidad de muestra bien homogeneizada en una balanza de precisión, conteniéndose la misma en un crisol de porcelana cuyo peso vacío se conoce previamente. La muestra se seca en estufa a 103-105°C hasta peso constante. El incremento de peso experimentado por el crisol representa el contenido en sólidos totales de la muestra. La siguiente fórmula permite expresar los resultados en mg/kg.

$$ST \left(\frac{mg}{kg} \right) = \frac{(A-B) \times 10^6}{m} \quad (\text{ec. 3.2.3})$$

Donde:

- ST= sólidos totales presentes en la muestra, mg/kg.
- A= masa de la muestra desecada más el peso del crisol, g.
- B= masa del crisol, g. m= masa inicial de muestra, g.

3.5.7 Sólidos minerales (SM)

El crisol con el residuo seco procedente de la determinación de los sólidos totales, de peso conocido, se lleva a un horno a 550°C donde se calcina hasta peso constante. Las cenizas que

quedan en el crisol coinciden con la fracción mineral de la muestra. La siguiente fórmula permite expresar los resultados en mg/kg.

$$SM \left(\frac{mg}{kg} \right) = \frac{(A-B) \times 10^6}{m} \quad (\text{ec. 3.2.4})$$

Donde:

- SM= sólidos minerales presentes en la muestra, mg/kg.
- A= peso de la muestra calcinada más el peso del crisol de porcelana, g.
- B= peso del crisol, g.
- m= masa inicial de muestra, g.

3.5.8 Sólidos volátiles (SV)

Los sólidos volátiles se calculan como la diferencia entre los sólidos totales y los sólidos minerales. La siguiente fórmula permite expresar los resultados en mg/kg.

$$SV = ST - SM \quad (\text{ec. 3.2.5})$$

Donde:

- SV = sólidos volátiles, mg/kg.
- ST = sólidos totales, mg/kg.
- SM = sólidos minerales, mg/kg.

3.5.9 Demanda química de oxígeno total (DQOtotal)

La demanda química de oxígeno es una medida de la materia orgánica contenida en una muestra determinada a través del oxígeno requerido para oxidar dicha materia orgánica.

El método utilizado para su determinación es el del dicromato ($K_2Cr_2O_7$): la muestra se somete a una oxidación química en caliente ($150^\circ C$), por adición de un exceso de oxidante ($K_2Cr_2O_7$) de concentración conocida, en medio H_2SO_4 . Tras el periodo de digestión (2 h), el exceso de dicromato que no ha reaccionado se valora frente a FAS (sulfato ferroso amónico, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 7H_2O$), conocido como sal de Mohr. Para cuantificar la cantidad de dicromato añadida y posibles interferencias de materia orgánica aportadas con el agua de dilución a las muestras, se incluye junto a la muestra un ensayo en blanco de agua destilada. Por diferencia con un blanco, se determina la cantidad de dicromato consumido en la oxidación de la muestra.

Las especies inorgánicas en estado reducido que puedan estar presentes en la muestra son también oxidadas en el transcurso de la digestión, por lo que si el nivel de las mismas es elevado, debe conocerse su concentración en la muestra para efectuar las correcciones necesarias. No obstante, con el objetivo de reducir dichas interferencias se añade $HgSO_4$ junto con el H_2SO_4 adicionado a la muestra, de manera que las especies inorgánicas precipitan al reaccionar con el mercurio y formar compuestos de baja solubilidad.

La siguiente fórmula permite expresar los resultados en $mg O_2/kg$, si bien adicionalmente se han expresado como $mg O_2/L$.

$$DQO \left(\frac{mg O_2}{kg} \right) = \frac{(B-M) \times 8 \times 1000 \times N_{FAS}}{m} \quad (\text{ec. 3.2.6})$$

Donde:

- DQO = demanda química de oxígeno, $mg O_2/kg$.
- B = volumen de FAS gastado en la valoración del blanco, mL.

- M = volumen de FAS gastado en la valoración de la muestra, mL.
- N_{FAS} = normalidad del FAS.
- m = masa de muestra, g.
- 8 = masa equivalente del oxígeno.

3.5.10 Carbono total, carbono inorgánico y carbono orgánico total

El carbono total es una medida del contenido en carbono, tanto inorgánico como orgánico, presente en la fracción soluble una muestra. Se ha determinado mediante una técnica instrumental, utilizando un analizador de carbono Dohrmann modelo DC-190. El método de determinación se basa en la oxidación catalítica de todo el carbono presente en la muestra a CO_2 , y la posterior detección de este producto final mediante espectrometría de infrarrojos. Dicha oxidación se realiza en un horno relleno con un catalizador de platino depositado sobre partículas de alúmina, junto con el gas portador que actúa como oxidante (Oxígeno N50). Por otro lado se determina en el mismo equipo instrumental el carbono inorgánico contenido la muestra. La muestra vaporizada se hace burbujear, junto con el gas portador, en una disolución de ácido fosfórico al 20%, de modo que al detector espectrofotométrico de infrarrojos sólo llega la fracción de CO_2 correspondiente al carbono inorgánico contenido en la muestra.

3.5.11 Nitrógeno total Kjeldahl

En un tubo Kjeldahl se adicionan de 0,2 a 2,0 gramos de muestra, a continuación se le añaden 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 5 gramos de catalizador Kjeldahl (CuSe). Posteriormente se somete a digestión durante 180 minutos a 350 °C. Una vez transcurrido ese tiempo se dejan enfriar las muestras y se someten a destilación en presencia de NaOH al 35% hasta $pH > 9,5$. El destilado se recoge sobre un volumen en exceso de ácido sulfúrico $\approx 0,1N$ (10 mL) al que se han añadido unas gotas de naranja de metilo. Finalizada la destilación (200 mL), el exceso de

ácido que no ha sido neutralizado en la destilación se valora frente a una solución de NaOH $\approx 0,1N$ hasta el viraje del indicador. La siguiente fórmula permite expresar los resultados en mg N-NH₄⁺/g:

$$N - NTK \left(\frac{mg \text{ NTK}}{g \text{ muestra}} \right) = \frac{[(V_{H_2SO_4} \times N_{H_2SO_4}) - (V_{NaOH} \times N_{NaOH})]}{m} \times 14 \quad (\text{ec. 3.2.7})$$

Donde:

- N-NTK = nitrógeno total, mg NTK/g muestra.
- V_{H₂SO₄} = volumen de ácido sulfúrico añadido al erlenmeyer en la destilación, mL.
- N_{H₂SO₄} = normalidad del ácido sulfúrico añadido al erlenmeyer en la destilación.
- V_{NaOH} = volumen de NaOH gastado en la valoración, mL.
- N_{NaOH} = normalidad del NaOH utilizado en la valoración.
- m = masa de muestra, g.

3.5.12 Nitrógeno amoniacal

Se toma un volumen conocido de muestra y se determina la cantidad de NaOH al 35% que se necesita para llevar el pH del volumen tomado a 9,5. Se toma otro volumen igual de muestra y se introduce en el destilador Kjeldahl. Inmediatamente se le añade un volumen de NaOH igual al determinado con anterioridad, evitándose así la pérdida de NH₃ que comienza a liberarse de la muestra.

Se destila mediante arrastre de vapor recogiendo el destilado sobre un volumen 0,1N (10 mL) al que se le han añadido unas gotas de naranja en exceso de ácido sulfúrico de metilo. Finalizada la destilación (200 mL), el exceso de ácido que no ha sido neutralizado por el amoníaco liberado, se valora frente a una solución de NaOH $\approx 0,1N$ hasta viraje del indicador. La siguiente fórmula permite expresar los resultados en mg N-NH₄⁺/g:

$$N - NH_4^+ \left(\frac{mg \text{ N-NH}_4^+}{g \text{ muestra}} \right) = \frac{[(V_{H_2SO_4} \times N_{H_2SO_4}) - (V_{NaOH} \times N_{NaOH})]}{m} \times 14 \quad (\text{ec. 3.2.8})$$

Donde:

- N-NH₄⁺ = nitrógeno amoniacal, mg N-NH₄⁺ /g muestra.
- V_{H₂SO₄} = volumen de ácido sulfúrico añadido al erlenmeyer en la destilación, mL.
- N_{H₂SO₄} = normalidad del ácido sulfúrico añadido al erlenmeyer en la destilación.
- V_{NaOH} = volumen de NaOH gastado en la valoración, mL.
- N_{NaOH} = normalidad del NaOH utilizado en la valoración.
- m = masa de muestra, g.

3.5.13 Fósforo total (P₂O₅)

La determinación del fósforo se ha llevado a cabo mediante el método gravimétrico. El procedimiento consiste en someter una determina cantidad de muestra (≈1 g) a digestión a 350 °C durante 3 horas, en presencia de ácidos fuertes (5 mL de ácido nítrico y 25 mL de ácido sulfúrico) que permitan solubilizar el fosfórico. Cuando el bloque de digestión ha alcanzado unos 150 °C, se añaden 3 g de nitrato potásico. Tras la digestión, las muestras se dejan enfriar y se añaden 150 mL de agua destilada, sometiendo la muestra de nuevo a digestión a 110 °C durante 10 minutos. Paralelamente, se realizan ensayos en blanco, es decir, en ausencia de muestra.

Acabada la digestión, las muestras se dejan enfriar y se transfieren a un matraz aforado de 250 mL filtrando con embudo y papel de filtro. Se pipetea una alícuota de 25 mL del filtrado y se lleva a un vaso de precipitado de 250 mL al cual se adicionan 100 mL de agua destilada y 50 mL de reactivo de quimiociaco, el cual permite la formación de un precipitado (fosfomolibdato de quinoleína) a altas temperaturas.

Las muestras se calientan en una placa calefactora a 100 °C, calentando durante 1 minuto a partir de que se produzca la ebullición. Las muestras deben de estar agitadas durante el calentamiento y el posterior enfriamiento.

A continuación, la mezcla se filtra con filtro microporo, previamente pesado, y un sistema de vacío. Los filtros se desecan en un horno a 250 °C durante 30 minutos (o en estufa a 150 °C durante toda la noche), se enfrían en desecador y se pesan los filtros con el precipitado de fosfomolibdato de quinoleína. Para el cálculo de P₂O₅ se aplica la siguiente ecuación:

$$\% P_2O_5 = \frac{(M-B) \cdot 3.207}{P/10} \quad (\text{ec. 3.3.13})$$

Donde:

- M = masa del precipitado de fosfomolibdato de quinoleína (masa del filtro con el residuo).
g.
- B = masa del precipitado del ensayo en blanco, g.
- P = masa de la muestra contenida en una alícuota de 25mL, g.

3.5.14 Fósforo soluble

La determinación del fósforo soluble se ha llevado a cabo por el método colorimétrico. Para ello se pesa aproximadamente 1 g de la muestra a analizar en un tubo Kjeldahl. A continuación se le añaden 10 mL de un reactivo de digestión compuesto por:

- 500 mL de ácido sulfúrico concentrado/L de reactivo.
- 500 mL de ácido nítrico concentrado/L de reactivo.
- 100 g de nitrato potásico/L de reactivo.

El tubo Kjeldahl se introduce en el bloque de digestión. La muestra es sometida a una temperatura máxima de 200 °C durante 75 minutos, siendo el aumento de temperatura gradual. La rampa de temperatura se ha expuesto en la Figura 3.5.14.1.

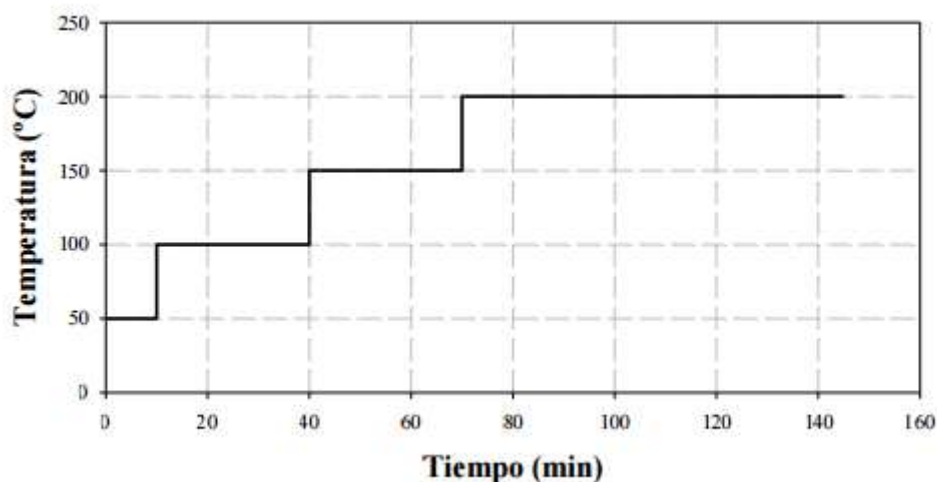


Figura 3.5.14.1. Rampa de temperatura empleada en la determinación de fósforo soluble.

Terminado el proceso de digestión, la muestra es transferida a un vaso de precipitado de 250 mL; al tubo que contiene la muestra se le añade un poco de agua destilada para arrastrar los restos de muestra al vaso de precipitado. El pH de la muestra se ajusta hasta un valor comprendido entre 6,8 y 7,2 mediante la adición de H₂SO₄ y NaOH. A continuación, se filtra y se transfiere a un matraz aforado de 100 mL. Seguidamente, se enrasa el matraz con agua destilada y se toman 50 mL de muestra del matraz que se transfieren a un erlenmeyer de 100 mL y se añaden 8 mL de un segundo reactivo combinado formado por:

- 50 mL de ácido sulfúrico diluido (140 mL de ácido sulfúrico concentrado/L) en 100 mL de reactivo.
- 5 mL de disolución de tartrato de antimonio y potasio (2,7 g/L) en 100 mL de reactivo.

- 15 mL de disolución de molibdato amónico (40,0 g/L) en 100 mL de reactivo.
- 30 mL de disolución de ácido ascórbico (17,6 g/L) en 100 mL de reactivo.

Posteriormente todas las muestras se analizan en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 880 nm. La concentración se obtiene conforme una recta de calibrado previamente realizada con patrones de concentración conocida. Para la corrección de la turbidez o color interferente se preparará un blanco con agua destilada.

$$U.A. = 0.075C + 0.0092 \quad (\text{ec. 3.3.13})$$

Donde:

- U.A. = unidades de absorbancia obtenidas en el espectrofotómetro a 880 nm.
- C = concentración de fósforo soluble, mg/L

3.5.15 Azúcares reductores

Las sustancias reductoras comprenden todos los azúcares que exhiben funciones cetónicas y aldehídicas y están determinadas por su acción reductora en una solución alcalina de una sal de cobre. El contenido de azúcar del líquido en el que se va a determinar el azúcar debe estar entre 0,5 y 5,0 g/L. Los vinos secos no deben diluirse durante la clarificación, mientras que los vinos dulces deben diluirse durante la clarificación para llevar el nivel de azúcar dentro de los límites prescritos en la Tabla 3.15.1.

Tabla 3.15.1 Dilución de los vinos, mostos y mistelas, para la determinación de azúcares reductores.

Descripción	Contenido en	Densidad	Dilución (%)
-------------	--------------	----------	--------------

	azúcar (g/L)		
Mostos y mistelas	>125	>1,038	1
Vinos dulces, ya sean fortificados o no	25-125	1,005-1,038	4
Vinos semi-secos	5-25	0,997-1,005	20
Vinos secos	<5	<0,997	Sin dilución

La determinación de los azúcares reductores se ha llevado a cabo a partir de Method OIV-MA-AS311-01^a (OIV, 2015). El procedimiento requiere mezclar 25 ml de la solución de sal de cobre alcalina, 15 ml de agua y 10 ml de la solución clarificada en un matraz cónico de 300 ml. Este volumen de solución de azúcar no debe contener más de 60 mg de azúcar invertido. A continuación, se añaden unos pequeños trozos de piedra pómez. Se coloca un condensador de reflujo en el matraz y se deja hervir la mezcla durante dos minutos. Una vez enfriado el matraz, se agregan 10 ml de solución de yoduro de potasio, 30% (m/v); 25 ml de ácido sulfúrico, 25% (m/v) y 2 ml de solución de almidón.

La valoración se lleva a cabo con solución de tiosulfato de sodio, 0,1 M. Así mismo, se debe llevar a cabo una titulación en blanco en la que los 25 ml de muestra a analizar se reemplazan por 25 ml de agua destilada. Siendo n el número de ml de tiosulfato de sodio utilizado para valorar la muestra y n' para el blanco. La cantidad de azúcar, expresada como azúcar reductor, contenida en la muestra de prueba es dado en la siguiente tabla, como una función del número ($n' - n$) de mL de Tiosulfato de sodio utilizado. El contenido de azúcar del vino se expresará en gramos de azúcar reductor por litro, teniendo en cuenta la dilución realizada durante la clarificación y el volumen de la muestra de prueba (Tabla 3.15.2).

Tabla 3.15.2. Cuantificación del contenido en azúcares reductores (OIV, 2015)

Table giving the relationship between the volume of sodium thiosulfate solution: (<i>n'-n</i>) mL, and the quantity of reducing sugar in mg.					
Na ₂ S ₂ O ₃ (ml 0.1 M)	Reducing sugars (mg)	Diff.	Na ₂ S ₂ O ₃ (ml 0.1 M)	Reducing sugars (mg)	Diff.
1	2.4	2.4	13	33.0	2.7
2	4.8	2.4	14	35.7	2.8
3	7.2	2.5	15	38.5	2.8
4	9.7	2.5	16	41.3	2.9
5	12.2	2.5	17	44.2	2.9
6	14.7	2.6	18	47.2	2.9
7	17.2	2.6	19	50.0	3.0
8	19.8	2.6	20	53.0	3.0
9	22.4	2.6	21	56.0	3.1
10	25.0	2.6	22	59.1	3.1
11	27.6	2.7	23	62.2	
12	30.3	2.7			

3.5.16 Grado alcohólico

El grado alcohólico de la muestra se determinó mediante el método OIV-MA-F1-03: R2011 (OIV, 2015). Una masa conocida de mosto o lías se alcaliniza mediante una suspensión de hidróxido de calcio y luego se destila. El grado alcohólico volumétrico del destilado se determina por densitometría electrónica o por densitometría utilizando un balance hidrostático. Para ello, se homogeneiza la muestra de ensayo invirtiendo el matraz varias veces. En un matraz volumétrico de 500 ml, se pesan unos 200 g de mosto o lías. Anotar la masa exacta y enrasar hasta la marca con agua destilada. Para la obtención del destilado, se transfieren 250 ml de la solución anterior al matraz de destilación. Se añaden aproximadamente 10 ml de hidróxido de calcio en suspensión, aproximadamente 5 ml de solución antiespumante y, cuando corresponda, un regulador de ebullición (por ejemplo, piezas de porcelana). Se pone suavemente a hervir, has recuperar el destilado en un matraz aforado de 100 ml (aproximadamente 90 ml). A continuación se deja que el destilado vuelva a la temperatura ambiente, y entonces se enrasa con agua destilada.

$$\text{Medición del grado alcohólico: } \frac{\% \text{alcohol densidad} \cdot 200 \cdot \text{densidad muestra } \left(\frac{g}{mL}\right)}{\text{masa muestra (g)}}$$

3.5.17 Metales pesados

El contenido en metales pesados se determina mediante espectrometría de absorción atómica, también conocida como espectrofotometría de llama. Se ha utilizado un espectrofotómetro modelo AAnalyst 100/300 (Perkin-Elmer). Está compuesto por un ordenador con un software específico, el espectrofotómetro y el suministro de gases para la combustión de la llama. Los gases empleados fueron Acetileno como combustible y aire sintético como comburente, variando la proporción de cada uno de ellos dependiendo del metal a analizar.

Para la realización del análisis, la muestra se somete a una etapa de digestión previa mediante el siguiente procedimiento:

Se coloca aproximadamente 1 gramo de muestra en un crisol de porcelana y se calcina en un horno a 550 °C durante 1 hora. Tras dejar enfriar, se añaden 10 mL de ácido clorhídrico (37% de riqueza). Las muestras se llevan a sequedad en una placa calefactora a 150 °C. Finalmente, se añaden 20 mL de ácido clorhídrico (2N). El contenido de los crisoles se lleva a un matraz aforado de 100 mL mediante filtrado, con la ayuda de un embudo y papel de filtro, y la disolución filtrada se lleva al volumen de 100 mL con agua ultra-pura obteniendo la disolución que será analizada.

Los metales analizados son Cobre (Cu), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Plomo (Pb), Niquel (Ni) y Zinc (Zn), cuya concentración se determina en ppm (mg/L).

Tras la digestión, comienza el análisis de la muestra comienza con su nebulización, de manera que las partículas más pequeñas pasan al mechero donde se atomizan totalmente a altas temperaturas, el resto es drenado a un depósito de almacenaje. Una vez la muestra está atomizada, se incide con un haz de luz procedente de una lámpara. Se utiliza una lámpara, con una longitud de onda específica, para cada uno de los metales que se analiza. Parte del haz de luz será absorbido por un determinado metal y el resto llega al detector. El software calcula la diferencia entre el haz de luz emitido y el que, posteriormente, ha llegado al detector siendo la absorción función de la concentración de metal presente en la muestra.

Para el análisis de cada uno de los metales, se elabora una recta patrón con diluciones del metal en diferente concentración. Dichas diluciones son preparadas a partir de patrones comerciales de 1000 ppm de concentración. En el análisis de la muestra, el software compara la señal de la muestra, con respecto a la recta patrón creada, de tal manera que a esa señal le corresponde una determinada concentración.

Referencias

- APHA, 1989. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 17th 6 Edition, American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Dios, M., 2008. Estudio y desarrollo de técnicas respirométricas para el control de la estabilidad de compost. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Handbook of Chemistry and Physics, CRC PRESS, D. R. LIDE, (2004-2005).
- Nebot, E., 1992. Caracterización de los principales parámetros de operación de sistemas de tipo filtro anaerobio: aplicación al diseño. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Ramalho, R.S., 1996. Tratamiento de aguas residuales. Ed. Reverte. London, UK.
- TAPPI T 222 OM-88. Acid Insoluble Lignin in Wood and Pulp. Ed. TAPPI, Norcross, USA.
- Thompson, W.H., Leege, P.B., Millner, P.D. & Watson, M.E., 2001. Test methods for the examination of composting and compost. Bethesda: US Composting Council.
- OIV, 2015. <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-wines-and-musts-2-vol> (accessed 09/05/18)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN/RESULTS AND DISCUSSION

Resumen bloque I: Digestión aerobia de subproductos y residuos vitivinícolas.

Tras la primera etapa de la vinificación, conocida como prensado, se generan los orujos constituidos por raspones, semillas y hollejos. Frecuentemente, la gestión de estos residuos consiste en el apilamiento en las zonas de producción, hasta su retirada para ser parcialmente aprovechados en destilerías (extracción de etanol y generación de un residuo biomásico). Además de afectar en la maniobrabilidad en la bodega, debido al gran volumen que ocupan dichos residuos, el almacenamiento también conlleva graves problemas medioambientales, como la generación de olores desagradables y lixiviados muy contaminantes, emisión de gases de efecto invernadero, riesgo de incendio debido a los procesos fermentativos se producen en el seno de las pilas y proliferación de microorganismos infecciosos, insectos y roedores.

De forma más detallada, el proceso de vinificación se inicia con la recepción en la tolva de la uva, seguida del despalillado (separación de la uva del raspón, a fin de que no transmita olores y sabores herbáceos desagradables) y estrujado de la misma para obtener el mosto. A continuación, se procede a una separación física del residuo sólido (orujo) y líquido (mosto) en el caso del vino blanco, con el fin de no conferirle propiedades organolépticas no deseables, mientras que en el caso del vino tinto el proceso de separación se llevará a cabo tras la maceración.

En este primer bloque de esta Tesis Doctoral, previa determinación de la biodegradabilidad aerobia de los orujos, como técnica alternativa para la valorización de estos residuos lignocelulósicos, se ha propuesto un tratamiento biológico aerobio, como es el co-compostaje con la Fracción Orgánica de Residuos Sólidos Urbanos (FORSU). La utilización de FORSU, también generada en la propia zona de generación de los residuos agroindustriales mencionados, evita el impacto ambiental asociado al transporte

hasta una destilería y los costes energéticos y de recursos naturales que lleva implícita esta valorización de los orujos.

Son conocidos los buenos resultados de compostaje obtenidos con FORSU, a pesar de que esta práctica, realizada en pilas abiertas o de modo artesanal por pequeños productores sin la utilización de la tecnología más novedosa, también lleva asociadas una serie de desventajas, como malos olores, requerimiento de una gran extensión de terreno y una inversión inicial. Mediante el co-compostaje con FORSU en una planta de tratamiento de residuos, se podría solucionar el problema asociado al apilamiento en bodega de los residuos vitivinícolas, sin que se vea incrementada su huella de CO₂ por prácticas habituales y desaconsejables, como es el compostaje en la propia bodega. Las bodegas son empresas alimentarias cada vez más avanzadas tecnológicamente y sostenibles, por ello, muchas de ellas, sobre todo las que realizan cultivo ecológico dentro de sus prácticas habituales, han adquirido ecoetiquetas o etiquetas verdes que muestren al consumidor su compromiso con el medio ambiente. A través de esta técnica de tratamiento alternativo, se podría fomentar la economía circular en la industria vitivinícola.

Con este objetivo, se ha llevado a cabo un estudio de co-compostaje, a escala piloto, de una mezcla de 50% de FORSU y 50% de orujo procedente de un cultivo ecológico de la empresa Robles S.A. (Montilla, Córdoba) y variedad Pedro Ximenez. La importancia y novedad de este trabajo radica en la evaluación de la viabilidad tecnológica y ambiental, en este caso centrada en la minimización de olores y recuperación de nutrientes de la zona. Dicho co-compostaje se llevó a cabo en condiciones controladas de aireación, temperatura y humedad, estudiando el índice respirométrico dinámico y las emisiones de olor mediante cuantificación olfatométrica.

Descripción del artículo: “Aerobic biodegradability test of organic grape marc waste: A promising tool to evaluate polluting winery waste biovalorisation.”

La industria vitivinícola es uno de los sectores agrícolas más importantes del mundo. Este sector produce una gran cantidad de residuos, entre los que se encuentran los residuos de orujo de uva. Actualmente los residuos de orujo de uva se utilizan para la obtención de etanol mediante destilación, consumiendo agua y energía. Teniendo en cuenta el coste del transporte a las orujeras, en combustibles y pérdidas de recursos en una zona concreta, y sumando el establecimiento de políticas ecológicas, es necesario encontrar alternativas más sostenibles para el tratamiento de estos residuos. Esta investigación ha permitido conocer la viabilidad de los residuos de orujos de uva para su utilización como sustrato en un proceso aerobio de transformación del mismo. Para ello se ha empleado un ensayo respirométrico y se ha obtenido que los residuos de orujo de uva son biodegradables aeróbicamente, al mismo tiempo que su cinética denota una adaptación de los microorganismos con el paso del tiempo. Así mismo, se ha podido determinar la influencia sobre la actividad aerobia de los microorganismos a través de las variables físico-químicas de la caracterización del sustrato y seguimiento de los experimentos. El análisis multivariante ha arrojado que el pH, ST y NTS son las variables con mayor importancia en la biodegradabilidad y cinética de degradación del orujo PX (85% y 69% de influencia para VECO y CAO, respectivamente).

Aerobic biodegradability test of organic grape marc waste: A promising tool to evaluate polluting winery waste biovalorisation.

Hungría Javier, Siles José Ángel, Martín María de los Ángeles *

Department of Chemical Engineering, University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Ctra. N-IV, km 396, building Marie Curie (C-3), CP/14071 Córdoba, Spain.

*Corresponding author: Email: iq2masam@uco.es; phone: +34 957212273

Abstract

Wine industry is one of the most important agricultural sectors around the world. This sector produces long amount of waste, among them is grape marc waste. Currently grape marc waste is used to obtain ethanol through distillation, consuming water and energy, leaving a residual solid stream. Considering the growing of social ecological awareness leading to restringing legal policies, it is necessary to find alternative treatment of these wastes. This research enables to evaluate the viability of treating grape marc waste under aerobic conditions, through a respirometric test. Grape marc waste was found to be partially biodegradable, being stable the aerobic microbial activity during the respirometric test. The research was carried out on a cyclical basis (semicontinuous mode) at retention time of 24 hours. The maximum SOUR was achieved at the second and third cycle (260 and 230 mg O₂/g VS·h, respectively) with a stabilization of the respirometric process as time goes by (143 ± 60 mg O₂/g VS·h), which indicates the viability of the aerobic treatment of this waste. In addition, the microbiological activity of the substrates was predicted reliably from the physico-chemical parameters of the aerobic test through multivariate analysis. The variables having more influence in the prediction of SOUR and OD₂₄ of grape marc waste were found to be pH, TS and TSN (85 and 69%, respectively). This mathematical tool might be used to monitor successfully the efficacy of the management process.

Keywords. Biological treatment; Principal components analysis, Aerobic biodegradability test, grape marc waste.

1. Introduction

Wine industry is one of the economic sectors most common and important in many countries, with a global production higher than 29 million of tonnes of wine during 2014 (FAOSTAT, 2014). The use of grape to produce wine generates different wastes such as skins, seeds, stalks, lees, etc. Currently, grape marc waste (skins, seeds and stalks) and lees have several applications in the industry such as by-product. It is very common the use of grape marc waste to extract chemical compounds such as phenolics, pigments and antioxidants. In spite of the profits of this compounds, especially in the pharmacology industry, the extraction of phenolics compound carries out energetic cost and environmental problems, like for example the use of high temperature (60 °C) and water (Spigno et al., 2007), and also the use of chemical compounds such as aqueous methanol and aqueous acetone (Dai and Mumper, 2010). Another use of winery waste is the recovery of tartaric acid with dilute hydrochloric acid or hot water, and sulfuric acid to convert the calcium tartrate into tartaric acid, after the precipitation of the first one (Versari et al., 2001). Grape stalks are also used to extract of celluloses and lignin through a pretreatment of autohydrolysis at 180 °C and organic solvents with ethanol to solubilise cellulose and lignocellulose (Amendola et al., 2012). However, these techniques supply a consumption of energy, water and several chemical compounds, which brings the need for new alternative ways of management.

Grape marc waste and lees are used to recover ethanol to be used as biofuel, however due to the high moisture concentration of the raw materials, is necessary a thermal processing such as torrefaction or hydrothermal carbonization (Guo et al., 2017). Torrefaction implies the use of high temperatures (200-300 °C) (Chen et al., 2015), while hydrothermal carbonization involves

low temperature (180-250 °C) but it is carried out in a water suspension at saturated pressures, increasing the cost of the process and the associated environmental problems (Pala et al., 2014).

In spite of the treatment of winery waste can also be carried out to extract ethanol for beverage spirit through the distillation (Buglas, 2011), there are environmental problems such as the energetic cost associated to the transport and to the increase of temperature, use of water, etc. According to Mendes et al. (2013), who investigated the use of white grape skins to produce bioethanol, they extracted with hexane-water, continued for an extraction with acid hydrolysis of the aqueous extract followed by fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The bioethanol yield achieved 310 L/ton of dry white grape skin, acceptable value in comparison with 400-500 L/t for feedstocks such as barley, rice and wheat (Corbin et al., 2015). On the other hand, anaerobic treatment in bioreactors is a promising process that can be used to obtain renewable biogas using grape marc waste. According to Hungría et al. (2019) a yield methane of 65.55 ± 2.76 L_{STP}/ ton grape marc waste, equivalent to 3.63 kW/ton of electrical power by burning the biogas, can be obtained.

In contrast, when pelleted grape marc waste is used as animal feed allows a reduction of methane emission derived from ruminant digestive system (till 195 g CH₄/cow·day, 20% of total) (Moate et al., 2014). However, these authors monitored a reduction of milk yields using this waste, which might be due to fats, lignin, tannins and tartaric acid. Moreover, metabolisable energy of grape marc waste is low in comparison with other livestock feed such as wheat and oat straw (Alipour and Rouzbehan, 2007), which might connect with the reduction of milk yields reported by Moate et al. (2014).

Taking into account the profits of winery waste in several industrial applications, it would be necessary to consider winery waste as a by-product instead of waste, due to its possibility to produce a large number of value-added products. However, in the context of biorefinery, in the

context of the biorefinery, stories such as composition or other aerobic biological treatments that entail a lower capacity.

The aim of this paper is to make an exhaustive physico-chemical characterization of grape marc waste derived from organic production of Pedro Ximenez *c.v.* and to evaluate its aerobic biological biodegradability. This study might allow evaluating the viability of applying new sustainable valorisation processes of such type of waste, which have never been reported before, through the study of the most influenced variables. Furthermore, an analysis of the main components was carried out with the objective of predicting the value of the respirometric variables principal from the chemical-chemical analysis of the residue. This research study might be of special interest within the frame of the winery circular economy, with the consequent environmental and social benefits.

2. Materials and methods

2.1 Substrates

Grape marc waste (skins, seeds and stalks) used for this experiment was generated after pressing the grapes derived from organic cultivation used for making Pedro Ximénez wine. This residue was provided by the Bodegas Robles Winery (Montilla, Cordoba, Spain), which belongs to the Montilla-Moriles Protected Denominated Origin (PDO) of Andalusia.

2.2 Experimental set-up: Respirometric test

The respirometric test was carried out at laboratory scale, using a respirometer patented by the Chemical Engineering Research Group (RNM-271) of the University of Cordoba (Publication No. ES2283171 A1 of 16 October 2007). The respirometric variables determined were maximum specific oxygen uptake rate (SOUR, mg O₂/g VS·h) and cumulative oxygen demand at 24 h (OD₂₄, mg O₂/g VS), both of which are the result of microbial respiration due to the degradation of organic matter. The respirometer consisted of a thermostatic bath and two 1-L Erlenmeyers, magnetically stirred at 300 rpm and two oximeters to monitor the oxygen content

in the liquid phase, which was maintained between two dissolved oxygen concentration (mg/L) through the injection of compressed air. Oxygen concentration was measured and registered continuously by a data acquisition system.

2.2.1 Experimental procedure

Several sets of experiments were carried out using grape marc waste (GMW) as raw material to evaluate its biodegradability aerobically. The respirometric test was carried out for 144 hours. The reactors were inoculated in semicontinuous mode each day with 0.18 g VS/L. The concentration of phosphate buffer inside the reactor was maintained at (K_2HPO_4 (8.50 g/L), $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (18.23 g/L), NH_4Cl (1.70 g/L)), while the concentration of $MgSO_4$, $CaCl_2$ and Cl_3Fe were (11 g/L, 27.50 g/L and 0.15 g/L, respectively). A total number of six cyclical loads were carried out during the experimental time. At the end of each cycle the process was monitored by means of a physico-chemical characterization collecting 50 mL-samples when specific oxygen uptake rate (SOUR, mg O_2 /g VS·h) was stable. In order to maintain the hydrolytic retention time constant, the volume of samples withdrawn was refilled into the reactors at the next load with distilled water containing new substrate and the above-mentioned nutrients.

2.3 Chemical analyses

To characterize the raw material were determined the following parameters: pH, alkalinity (Alk, mg $CaCO_3$ /L), volatile acidity (VA_{DIS} , mg C/L), conductivity ($\mu S/cm$), chemical oxygen demand (COD, mg O_2 /g dry weight), total solids (TS) (g TS/kg sample), fixed solids (FS) (g FS/kg sample), volatile solids (VS) (g VS/kg sample), total Kjeldahl nitrogen (TKN; mg N/g sample), total soluble phosphorus (TP mg P/g dry weight), total soluble organic carbon (TOC soluble; mg C/L), total soluble nitrogen (TSN; mg N/L), metals (Cu, Cr, Zn, Ni, Pb, Cd) (mg/g dry weight). All analyses were carried out in accordance with the Standard Methods of the APHA.

A Shimadzu model TOC-VCSH carbon analyzer was used to determine total soluble carbon (TC soluble), inorganic soluble carbon (IC soluble) and TOC, which is obtained as the difference between TC soluble (mg C/L) and IC soluble (mg C/L). The CO₂ generated by the catalytic oxidation of the carbon in the sample is detected by infrared spectrometry.

TSN was measured using a TOC-V CSH/CSN total organic carbon analyzer. The equipment used to analyze TSN is based on the combustion of the sample at 720 °C to decompose the total nitrogen into gaseous nitrogen monoxide. After the gas is cooled and dehumidified, it is detected using a chemiluminescence gas analyzer.

In addition, following the same Standar Methods these parameters were analysed in the sample withdrawn to monitor the process: pH, TC soluble, IC soluble, TOC soluble, TSN, TS and VS.

2.4 Multivariate regression

The physico-chemical and respirometric variables were statistically evaluated by multivariate regression. The dependent variables (SOUR_{mean} and OD₂₄) were predicted as a function of independent predictor variables on the biodegradation process, such as pH, TS, TSN, VS_{rem}, Time (d), TOC, Alk, etc.

In both cases, the linear correlations can be expressed by the following equations:

$$(1) \quad \text{SOUR}_{\text{est}} = \text{SOUR}_{\text{real}} \cdot b$$

where SOUR_{est} is the estimated specific oxygen uptake rate (mg O₂/g VS·h), SOUR_{real} is the real specific oxygen uptake rate (mg O₂/g VS·h) and b is the slope.

$$(2) \quad \text{OD}_{24\text{est}} = \text{OD}_{24\text{real}} \cdot c$$

where OD_{24est} is the estimated cumulative oxygen demand at 24 h (mg O₂/g VS), OD_{24real} is the real cumulative oxygen demand at 24 h (mg O₂/g VS) and c is the slope.

Two mathematical multivariate models were applied to determine the $SOUR_{est}$ and OD_{24real} from the physico-chemical parameters used in this multivariate regression according to Eqs. (3) and (4):

$$(3) \quad SOUR_{est} = \sum_{i=1}^5 a_i \cdot x_i$$

where $SOUR_{est}$ is the estimated specific oxygen uptake rate, a_i is the influence coefficient of each physico-chemical parameter and x_i is the physico-chemical parameter evaluated in the multivariate regression.

$$(4) \quad OD_{24} = \sum_{i=1}^5 a_i \cdot x_i$$

where OD_{24} is the estimated cumulative oxygen demand at 24 h, a_i is the influence coefficient of each physico-chemical parameter and x_i is the physico-chemical parameter evaluated in the multivariate regression.

In addition to the certainty in predicting each respirometric variable, the normalized a_i values provide information about the contribution of each independent variable (physico-chemical variables) on the respirometric dependent variable. The coefficients of each prediction equation were normalized in order to determine the most influential physico-chemical parameter for predicting the aerobic respirometric variables of each organic waste. Thus, the percentage of influence of each independent variable was evaluated according to the equation:

$$(5) \quad \%influence = \frac{|a_i| \cdot x_i}{\sum_{i=1}^n a_i \cdot x_i} \cdot 100$$

where $\%influence$ is the percentage of influence, n is the number of independent predictor variables, a_i is the influence coefficient in absolute value of each predictor variable and x_i is the predictor variable for the observation.

2.5 Software

Sigma-Plot software version 14.0 was used to perform the statistical analysis of the experimental data obtained in the study and create the graphs. The multivariate analysis was carried out using STATISTICA version 10 software.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of grape marc waste

Grape marc waste used in this research, belong to an ecological crop in Montilla-Moriles PDO, Córdoba (Spain). Montilla-Moriles PDO has a low production yield due to its regulations, which the pressure of grape cannot be high enough to produce more than 70 liters of wine per 100 kilograms of vintage (BOJA, 2011).

Table 1 shows the characterization of grape marc waste used in this research. Within the most remarkable variables, the pH was 3.59 ± 0.02 ; a low value which is in concordance with the results obtained by other authors such as Bustamante et al. (2008) who studied the agrochemical characterization of solid by-products and waste from the winery industry.

Table 1 Analytical characterization of Pedro Ximénez grape marc.

Pedro Ximénez grape marc	
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	$1,135 \pm 4$
pH	3.59 ± 0.02
% Moisture	73.67 ± 0.28
COD (mg O_2/g dry weight)	$1,293 \pm 20$
TKN (mg TKN/g dry weight)	16.1 ± 0.8
N-NH₄⁺ (mg N-NH₄⁺/g dry weight)	1.40 ± 0.02
Total soluble phosphorus (mg P/g dry weight)	0.120 ± 0.003
TC soluble (mg/kg dry weight)	$564,755 \pm 100$
IC soluble (mg/kg dry weight)	$1,000 \pm 50$
TOC soluble (mg/kg dry weight)	$563,755 \pm 100$
TSN (mg/kg dry weight)	$3,260 \pm 10$
FS (g/kg dry weight)	125 ± 5
VS (g/kg dry weight)	874 ± 10
Cu (mg/g dry weight)	1.30 ± 0.18
Cr (mg/g dry weight)	10.96 ± 2.23
Ni (mg/g dry weight)	5.57 ± 0.55
Cd (mg/g dry weight)	1.85 ± 0.37
Pb (mg/g dry weight)	1.48 ± 0.18
Zn (mg/g dry weight)	5.39 ± 0.37

The TKN and TP concentrations (16.1 ± 0.8 mg TKN/g and 0.120 ± 0.003 mg P/g, both dry weight) were lower than the value reported by Karaka (2004) which were found to be 20.3 ± 1.8 g TKN/kg dry weight and 1.15 ± 0.25 g P/kg dry weight. These results can be explained by the fact that the grape marc waste used in this research belong to an organic wine grape crops does not use chemical fertilizers, in favour of vegetation covers to prevent pest, water deficit, etc. Moreover, the heavy metal content was lower than the results obtained by Karaka (2004), especially in Ni (35 times higher than our research value), Zn, Cu and Cd. These results (Table 1) are, also, in concordance with the expected values of organic vineyards. Therefore, taking into account the characterization of the residue and taking into account its high concentration in organic matter (874 ± 10 g VS / kg dry weight) it could be affirmed that its biological treatment could be, a priori, viable.

3.2 Solids and soluble nutrients

With the aim to study the evolution of the process in order to know if could exist an inhibition by organic solids or nitrogen accumulation, primarily has been carried out the control of TS and VS. As can be seen in Figure 1, TS showed an increase during the first 2 days of the experiment (530 mg TS/L). Afterwards, the concentration of TS remained virtually stable throughout the experimentation. This fact might indicate the absence of inhibition caused by solids under the study conditions. However, in the case of VS existed an increase of them along the experiment. The total accumulation of VS was 962 mg VS/L, this value might be due an accumulation of the non-biodegradable fraction of grape marc waste, such as wax or lignocellulosic compounds, as well as due to cell growth.

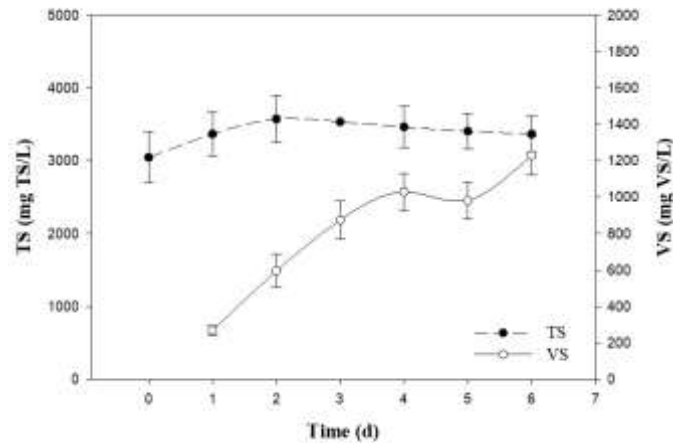


Figure 1 Evolution of TSN (mg TS/L) and VS (mg VS/L) along the time (d).

In parallel, the soluble fraction of the mixing liqueur was also monitored to evaluate the concentration of TOC, which is more readily assailable and biodegradable by microorganisms. As can be seen in Figure 2A, TOC showed a stable evolution (around 200 mg TOC/L) with higher values at the beginning of the experiment, which might be due to the start of the phase of acclimation during the hydrolytic phase. After 5 days, the concentration of TOC increased again probably due to an accumulation of non biodegraded organic matter inside the reactors. Furthermore, it is important to control the presence of other nutrients such as nitrogen, which might be inhibitory at certain concentrations. As can be seen in Figure 2A, TSN was stable along the days, showing a mean value of 176 ± 9 mg TSN/L. That might mean that there is no accumulation of TSN, which avoids the inhibition of nitrifying bacteria. This result is in concordance with the low concentration of nitrogen observed in the characterization of grape marc waste ($3,260 \pm 10$ mg/kg dry weight), due to this substrate belongs to an organic crop without fertilizers.

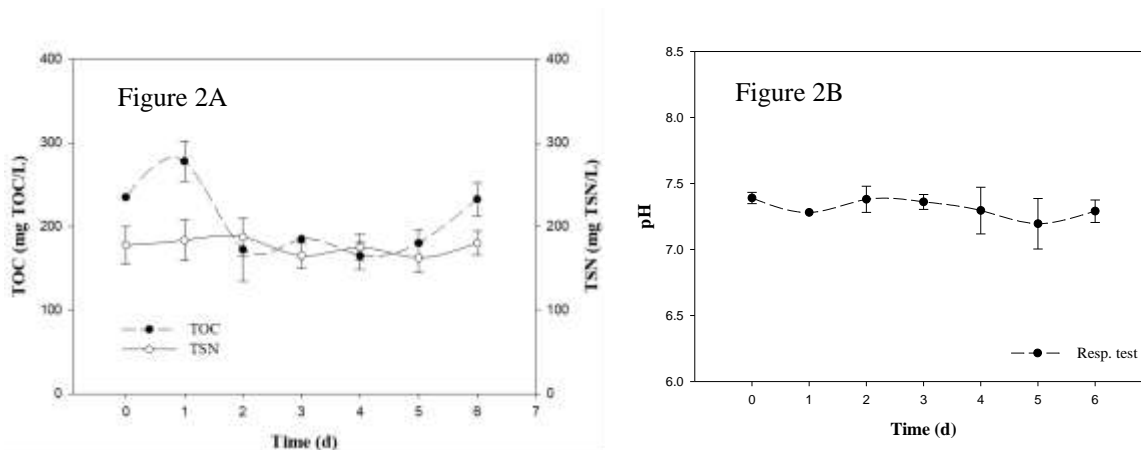


Figure 2 (A) Variation of TOC (mg C/L) and TSN (mg TSN/L) along the time (d). (B) pH.

3.3 Stability.

The respirometer test was monitored in order to control the stability of the process. As can be seen in Figure 2B, pH was stable along the process with a mean value of 7.31 ± 0.08 , indicating efficient self-control of the pH by biological treatment and buffer capacity of the mixing liqueur. This value is within the range, from 6.5 to 8.0, proposed as optimal pH for composting, which is frequent aerobic process implemented for organic waste management (Rink, 1992). Furthermore, the buffer effect showed in this experiment has been observed in other studies, such as Smars et al. (2002) who monitored a self-regulation of pH in composting process, and also the mean of pH was situated in the common pH range of co-composting of winery wastes (7.0-8.3) carried out by authors such as Rannalli et al. (2001) and Bertran et al. (2004).

3.4 Biodegradability of grape marc waste.

The aerobic biodegradability of grape marc waste was determined by static respirometry in liquid phase at laboratory scale, as mentioned in section 2.2 *Materials and Methods*. As can be seen, Figure 3 shows the specific oxygen uptake rate (SOUR, mg O₂/g VS_{added}·h) obtained for each substrate load carried out by duplicate along the experiment. SOUR showed an evolution

in form of peak during the first day of the experiment, achieving the maximum (146 mg O₂/g VS·h, as mean value of reactor A and B) at 15 hours, approximately.

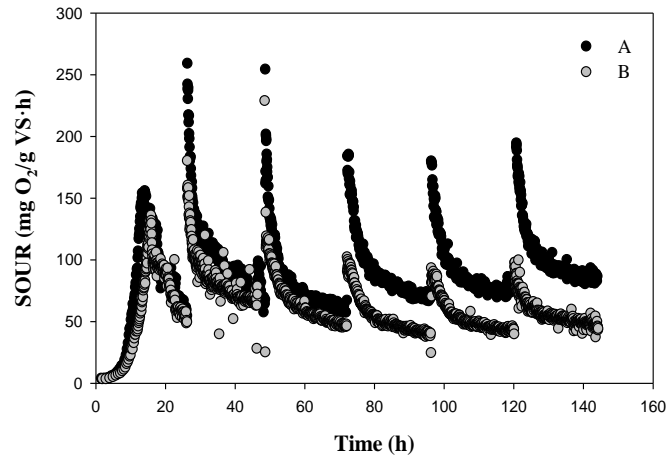


Figure 3 Evolution of the specific oxygen uptake rate (SOUR) expressed as mg O₂/g VS·h.

However, in the second and third cycle, higher oxygen consumption rates were reached (mean values and deviation), reaching the maximum values after 2 hours of loading the substrate. During the following loads, the process showed a stabilization and SOUR maximum reached a mean value of 185 ± 4 and 100 ± 5 mg O₂/g VS·h, for reactor A and B, respectively. This stabilization might be due to an adaptation of the microorganisms to the grape marc, however there is an accumulation of non biodegraded organic matter inside the reactors.

On the other hand, Figure 4A shows the variation of SOUR and OD₂₄ referring to the remaining SV in the reactors at the end of each cycle. As can be seen, maximum values of SOUR, per remained load, gradually decreasing from $79 + 15$ to $21 + 6$ mg O₂/g VS·h throughout the experiment, which might be due to the availability of soluble organic matter in the reactors.

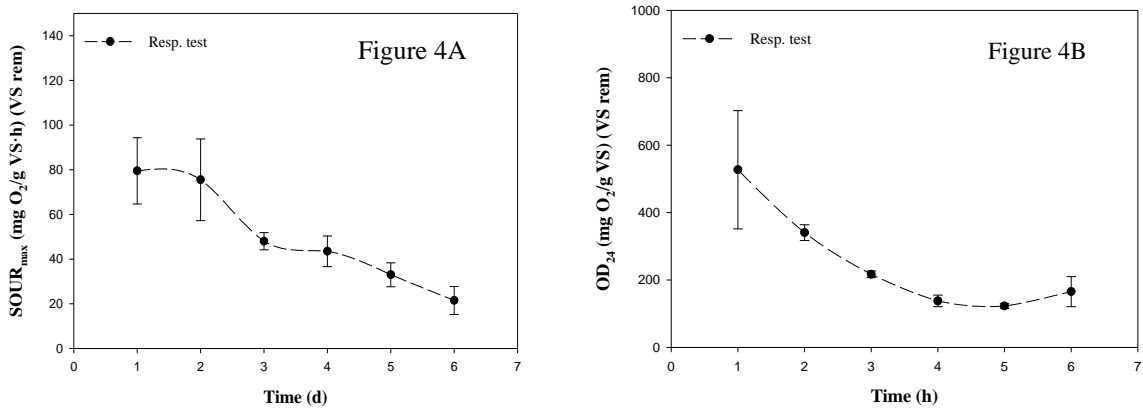


Figure 4 (A) Maximum values of specific oxygen uptake rate (SOUR) expressed as mg O₂/g VS·h., achieved along the days. (B) Evolution of the cumulative oxygen demand (OD₂₄) expressed as mg O₂/g VS, along the experiment (days).

The cumulative oxygen demand per gram of volatile solid added (OD₂₄) (mg O₂/g VS) on dry basis is quantified through the area under the curve for SOUR (mg O₂/g VS) vs. time (h), which is a respirometric variable proportional to the biodegradability of the sample analyzed. Figure 4B shows a decrease and stabilization of OD₂₄, which confirm a stabilization of the process of biodegradation of grape marc waste. As can be seen, during the 3 first days OD₂₄ values are higher, and those are decreasing gradually as time goes by. This evolution is in concordance with the results obtained on TOC, where there is no evidence of marked accumulation of soluble organic matter, explained previously.

3.5 Multivariate regression.

SOUR and OD₂₄ were predicted by multivariate regression according to equation 1 and 2 as previously mentioned. Afterwards the degree of influence of physico-chemical variables characterized in the solid substrate on SOUR and OD₂₄, was also evaluated.

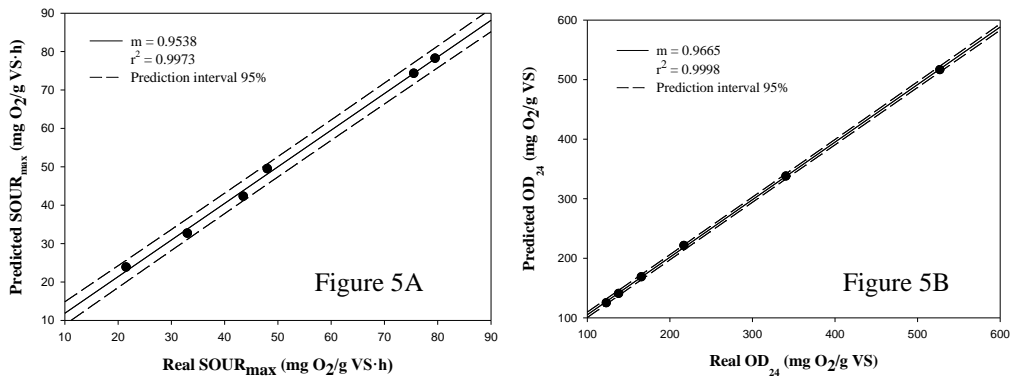


Figure 5 (A) Linear correlations between the $SOUR_{max_{real}}$ and $SOUR_{max_{est}}$. (B) Relationship between $OD_{24_{real}}$ and $OD_{24_{est}}$.

Figure 5A shows the linear correlations between the $SOUR_{max_{real}}$ and $SOUR_{max_{est}}$, while Figure 5B shows the relationship between $OD_{24_{real}}$ and $OD_{24_{est}}$. In both cases, the relationship was within a 95% prediction interval and the correlation fit adequately to a linear trend with a regression coefficient (r) of 0.9973 and 0.9998 for the prediction of SOUR and OD_{24} , respectively. This result indicates the viability of the mathematical model to estimate the values of said respirometric variables.

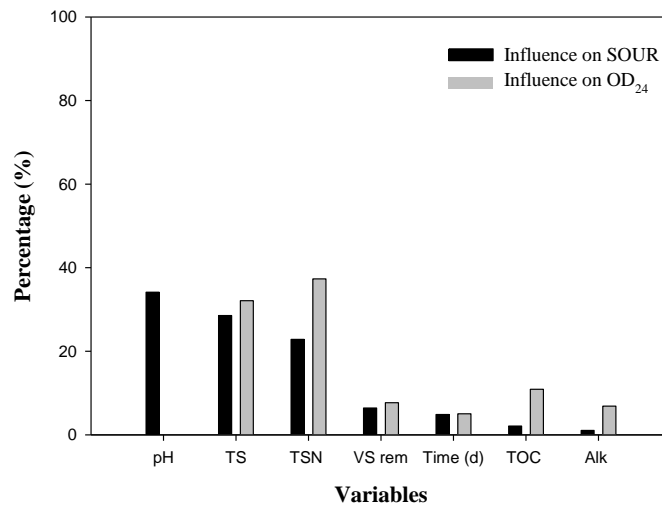


Figure 6 Degree of influence of physico-chemical variables in estimated $SOUR_{max}$ and OD_{24} .

In addition, as can be seen in Figure 6, pH, TS and TSN are the variables which more influence have in estimated SOURmax values (more than 85% of the total influence), while in the case of OD₂₄ TS and TSN accounted for more than 69%. In a similar way other authors, such as Gil et al. (2018) did not find influence of pH in OD₂₄.

Considering the results obtained, it is possible to confirm that the microbiological activity of the substrates can be predicted reliably from the physico-chemical parameters.

4. Conclusions.

The respirometer test of grape marc waste was stable according to the operational conditions, showing an accumulation of organic matter in form of volatile solids, along the replies. There was not any inhibition variables caused by TSN or pH, showing at the same time an optimal evolution of TOC. The biodegradability values were significantly elevated, showing a stabilization of the process. The multivariate analysis showed an optimal confidence interval for the prediction of SOUR and OD₂₄, at the same time that the influence of physico-chemical variables showed a higher influence in SOUR and OD₂₄, TS and TSN, and also pH in the case of SOUR (85 and 69%, respectively).

References:

- Alipour, D., Rouzbehan, Y. 2007. Effects of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial biomass yield. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 138–149.
- Amendola, D., De Faveri, D.M., Egiues, I., Serrano, L., Labidi, J., Spigno, G. 2012. Autohydrolysis and organosolv process for recovery of hemicelluloses, phenolic compounds and lignin from grape stalks. *Bioresour. Technol.* 107, 267–274.

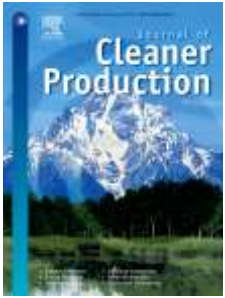
- APHA, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th 6 ed.). Washington, DC: American Public Health Association, 1989.
- Bertran, E., Sort, X., Soliva, M., Trillas, I. 2004. Composting winery waste: sludges and grape stalks. *Bioresour. Technol.*, 95, 203-208.
- BOJA (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía) 22 de diciembre de 2011, Núm. 249. Página núm. 155.
- Buglass, A.J. 2011. *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Bustamante, M., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M. 2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management* 28, 372–380.
- Chen, W.-H., Peng, J., Bi, X.T. 2015. A state-of-the-art review of biomass torrefaction, densification and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 44, 847–866.
- Corbin, K.R., Hsieh, Y.S., Betts, N.S., Byrt, C.S., Henderson, M., Stork, J., DeBolt, S., Fincher, G.B., Burton, R.A. 2015. Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresour. Technol.* 193, 76–83.
- Dai, J., Mumper, R.J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313–7352.
- FAOSTAT. 2014. <http://www.fao.org/faostat/es> (accesed 17/12/2018).
- Gil, A., Toledo, M., Siles, J.A., Martín, M.A. 2018. Multivariate analysis and biodegradability test to evaluate different organic wastes for biological treatments: Anaerobic co-digestion and co-composting. *Waste management* 78, 819-828.

- Guo, P., Saw, W.L., van Eyk, P.J., Stechel, E.B., de Nys, R., Ashman, P.J., Nathan, G.J. 2017. Gasification reactivity and physicochemical properties of the chars from raw and torrefied wood, grape marc, and macroalgae. *Energy Fuels* 31, 2246–2259.
- Hungría, J., Siles, J.A., Gil, A., Gutiérrez, M.C., Martín, M.A. 2019. Revalorization of grape marc waste from liqueur wine: Biomethanization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. DOI 10.1002/jctb.5909
- Karaka, A. 2004. Effect of organic wastes on the extractability of cadmium, copper, nickel, and zinc in soil. *Geoderma*. 122, 297-303.
- Mendes, J.A., Xavier, A.M., Evtuguin, D.V., Lopes, L.P. 2013. Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Ind. Crops Prod.* 49, 286–291.
- Pala, M., Kantarli, I.C., Buyukisik, H.B., Yanik, J. 2014. Hydrothermal carbonization and torrefaction of grape pomace: a comparative evaluation. *Bioresour. Technol.* 161, 255–262.
- Ranalli, G., Bottura, G., Taddei, P., Garavani, M., Marchetti, R., Sorlini C. 2001. Composting of solid and sludge residues from agricultural and food industries. Bioindicators of monitoring and compost maturity *J. Environ. Sci. Health*, 36, 415-436.
- Rink R. 1992. *On-Farm Composting Handbook*, Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Cooperative Extension, Ithaca, NY, pp. 24-42.
- Smars, S., Gustafsson, L., Beck-Friis, B., Jönsson, H. 2002. Improvement of the composting time for household waste during an initial low pH phase by mesophilic temperature control. *Bioresour. Technol.*, 84, 237-241.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M. 2007. Effects of extraction time, temperatura and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* 81, 200–208.

- Versari, A., Castellari, M., Spinabelli, U., Galassi, S. 2001. Recovery of tartaric acid from industrial enological wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 485–488.

Descripción del artículo: “Advantages and drawbacks of OFMSW and winery waste co-composting at pilot scale”

La industria vitivinícola produce grandes volúmenes de residuos que pueden y deben ser reciclados y valorizados. Este estudio evalúa las ventajas y desventajas de la valoración de los hollejos, semillas y raspones del prensado de uva (orujo) en la producción de vino Pedro Ximénez mediante co-compostaje con la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU). Tras la evaluación de la biodegradabilidad aeróbica de la FORSU y dichos residuos agroindustriales de forma independiente, se ha estudiado el co-compostaje de una mezcla de ambos residuos a una proporción 50:50%, en peso. Su co-compostaje presenta diversas ventajas, tales como, la mejora de las características físico-químicas del producto obtenido y una adecuada concentración de metales pesados, que permite clasificarlo como compost tipo A, con la excepción del contenido en Cromo. Adicionalmente, en este estudio se ha comprobado que el tratamiento conjunto permite reducir las emisiones de olor producidas durante el proceso de co-compostaje, respecto al compostaje de la FORSU realizado de forma individual. Sin embargo, la biodegradabilidad de FORSU-Orujo fue menor que la de la FORSU de forma individual (15%), para el mismo tiempo de tratamiento, ya que se ralentiza el proceso de estabilización de la materia orgánica mediante esta alternativa de gestión. Aun así, el co-compostaje podría ser una alternativa adecuada para reciclar y valorizar los desechos de las bodegas, con los consiguientes beneficios ambientales, económicos y sociales que ello conlleva.



Advantages and drawbacks of OFMSW and winery waste co-composting at pilot scale

Hungría J., Gutiérrez M.A., Siles J.A., Martín M.A*

Chemical Engineering Department, University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Ctra. N-IV, km 396, building Marie Curie (C-3), CP/14071 Córdoba, Spain. *Corresponding author: e-mail: iq2masam@uco.es; phone: 957 212273

Abbreviations

Cd	Cadmium (mg/kg)
Cr	Chromium (mg/kg)
Cu	Copper (mg/kg)
DRI	Dynamic respiration index (mg O ₂ /kgVS·h)
IC	Inorganic carbon in soluble form (%)
M_f	OFMSW-WW mass at the end of the experiments (kg)
M_i	OFMSW-WW mass at the beginning of the experiments (kg)
MSW	Municipal solid waste
Ni	Nickel (mg/kg)
N-kjeldahl	Total kjeldahl nitrogen (%)
N-NH₄⁺	Ammoniacal nitrogen (%)
OD₂₀	Cumulative oxygen demand at 20 hours (mg O ₂ /g VS)
OD_t	Cumulative oxygen demand at “t” hours (mg O ₂ /g VS; g O ₂ /kg VS; g O ₂ /kg dry sample)
OER	Odor emission rate (ouE/s)

OFMSW	Organic fraction of municipal solid waste
ouE	European odor concentration
Pb	Lead (mg/kg)
PDO	Protected designation of origin
P-P₂O₅	Phosphorus content expressed as P ₂ O ₅ (%)
SOUR	Specific oxygen uptake rate (mg O ₂ /g VS·h)
TC	Total carbon in soluble form (%)
TOC	Total organic carbon in soluble form (%)
VS	Volatile solids (%)
w/w	Ratio weight/weight
WW	Winery waste
Zn	Zinc (mg/kg)

Abstract

The winemaking industry produces large volumes of waste which can be recycled and valorized. This study evaluates the advantages and drawbacks of valorizing skins, seeds and stalks from the processing of grapes for the production of Pedro Ximenez wine through co-composting with the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). The ratio of a mixture of both wastes was evaluated. According to the evaluation of the aerobic biodegradability of OFMSW and winery waste (WW) independently, a mixture ratio of 50:50% w/w was determined to be the best option. A slight decrease in the biodegradability of the OFMSW-WW mixture (15%) with respect to the biodegradability of OFMSW was found. Although the biodegradability of OFMSW-WW was lower than that of OFMSW, the co-composting of WW with OFMSW presented numerous advantages: the physico-chemical variables of WW were improved, the heavy metal content of the mixture was adequate during the composting process and corresponded to a compost type A with the exception

of the Cr content. Furthermore, the odor emissions produced during the co-composting process were lower than those produced by OFMSW composting carried out under similar conditions. Consequently, co-composting might be a suitable alternative for recycling and valorizing winery waste, with the consequent environmental benefits.

Keywords: biodegradability, dynamic respirometry, odor emission, physico-chemical variables, winery waste, OFMSW.

1. Introduction

Municipal solid waste (MSW) can be defined as any solid waste generated from community activities, such as waste from households, commerce and businesses, fresh markets, institutions and construction and demolition waste, excluding hazardous and infectious wastes (Taeporamaysamai and Ratanatamskul, 2016). The European Union (EU) currently produces 76.5–102.0 million tons per year of biowaste composed of food and gardening waste and 37 million tons from the food and drinks industry (MAGRAMA, 2013). Due to the rapid growth in population, increasingly large amounts of MSW are being produced, particularly the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW), making it necessary to recycle and valorize these wastes.

From an environmental standpoint, the composting process is considered one of the most suitable alternatives to manage and treat OFMSW (Shen *et al.*, 2012; Scoton *et al.*, 2016). OFMSW is one of the most common types of waste produced worldwide and has the adequate physico-chemical characteristics to be composted and to obtain a quality product for use as a soil fertilizer. The composting of OFMSW has been widely studied at pilot/laboratory scale (Elango *et al.*, 2009; Komilis *et al.*, 2011) and at industrial scale (Colón *et al.*, 2013). Moreover, several authors have evaluated the co-composting of OFMSW with other kinds of waste such as poultry manure (Lhadi *et al.*, 2006; Petric *et al.*, 2015), fecal sludge (Cofie *et al.*, 2009) or waste orange peel (Siles *et al.*, 2016) in order to improve the efficiency of the process.

The wine industry, which is an important sector in the economy of some countries, also produces a large amount of wastewater and organic wastes. Therefore, innovative solutions must be proposed and tested to develop a truly viable industry (Sort *et al.*, 2004). In this regard, the possibility of recycling organic waste from the wine industry may be a sustainable strategy for waste management. The main organic wastes produced in modern wine industries include grape pomace (62%), lees (14%), stalk (12%) and dewatered sludge (12%) (Ruggieri *et al.*, 2009). Several authors have evaluated the viability of composting grape waste (Ferrer *et al.*, 2001), grape marc (Ingelmo *et al.* 1998; Madejon *et al.*, 2001) or pressed grape skin (Manios, 2004), while others have used some of these wastes to carry out preliminary studies on co-composting with other wastes. Zhang and Sun (2016) used exhausted grape marc and sugarcane bagasse to improve the composting process of green waste. Diaz *et al.* (2002) evaluated the optimum ratio of vinasse/grape marc for co-composting and reported that a moderate quantity of vinasse (10-20%) would be the best compromise to optimize the process and obtain a high quality compost.

Additionally, the composting of winery waste has been demonstrated to have environmental, agronomic and economic advantages. The environmental advantages include the minimization of waste, the closing of the organic matter cycle and the minimization of fertilizer requirement, while easy transport and application to soil and the general improvement of the soil are among the agronomic advantages. As for economic advantages, these include the total or partial reduction in the cost of organic fertilizers, the possibility of obtaining public financial help and the general improvement of the company image and perception from society (Ruggieri *et al.*, 2009).

Although composting can be performed using a variety of organic materials, a combination of some of these materials (co-composting) is usually recommended in order to properly support the process and obtain a good quality compost in terms of stability, maturity and good agronomic and environmental parameters (Proietti, et al., 2016). Considering the benefits of co-composting, as well as the need to recycle OFMSW and winery wastes (WW), the aim of this research study is to

evaluate the advantages and drawbacks of co-composting OFMSW and WW (skins, seeds and stalks) through a physico-chemical, respirometric and olfactometric study of the co-composting process. To the best of our knowledge, co-composting with OFMSW and WW has never been reported before and therefore constitutes a novel contribution to the field.

2. Materials and methods

2.1. Experimental procedure: Co-composting

Two consecutive experiments were carried out using an OFMSW-WW mixture at a ratio of 50:50% (w/w) to evaluate the advantages and disadvantages of the co-composting of winery waste mixed with the most widely composted substrate (OFMSW). Co-composting was carried out in a dynamic respirometer at pilot scale. Each experiment was performed over a 21-day period. The process was monitored by means of a physico-chemical, respirometric and olfactometric characterization. To that end, the reactor was opened at days 5, 11 and 15 of the process to collect solid samples. Odor samples were previously collected in order to monitor the odor emissions generated during the co-composting process.

2.1. Substrates

The WW used in this study derived from the production of wine, particularly wastes resulting from the processing of grapes for the production of Pedro Ximenez wine (Montilla, Cordoba, Spain). The residues (skins, seeds and stalks) were provided by Bodegas Robles, S.A., which belongs to the Montilla-Moriles Protected Designation of Origin (PDO) in Andalusia, Spain. The presence of lignocellulosic materials (stalks) in WW has several advantages during composting processes: it acts as a bulking agent that facilitates the aeration of the material, it does not produce odors unless the material is contaminated with waste during storage or transport, and it usually has good physical properties and low concentrations of potentially toxic elements and other pollutants (Mondini et al., 2006).

The WW was composted after mixing with OFMSW supplied by the urban solid waste treatment plant of Cordoba, Spain. This municipal treatment plant has a selective collection system where the organic matter is collected separately from other inorganic household wastes. The OFMSW used in this study had an approximate composition of 64% organic matter, 12% glass, 5% plastic, 16% paper-cardboard and 3% of other materials. The inorganic matter contained in the OFMSW is due to the inadequate waste separation at origin by the population. In the municipal treatment plant, fresh OFMSW is fed into a trommel tube to remove particles larger than 80 mm in diameter. An electromagnet is then used to remove most of the ferrous materials, after which a Foucault current is used to remove aluminum.

2.2. Physico-chemical and respirometric characterization

The initial substrates, the mixture of both substrates and the solid samples taken during the co-composting experiments were subjected to physico-chemical analyses. Moisture (%), volatile solid (%), N-kjeldahl (%), ammoniacal nitrogen (N-NH₄⁺, %) and phosphorus content (P-P₂O₅ %) were analyzed in the solid fraction, while conductivity (μS/cm), pH, total carbon (TC, %), total organic carbon (TOC, %) and inorganic carbon (IC, %) were measured in the aqueous extract (1:25 ratio). The analyses were carried out according to the test methods of the US Department of Agriculture and the US Composting Council (2002). The variables were analyzed in triplicate. Additionally, the microbiological activity of the raw materials was analyzed by means of a respirometric test carried out with a static-respirometer in liquid phase at laboratory scale. The test was performed to compare the biodegradability of each substrate independently with the biodegradability of the mixture of both substrates at a ratio of 50:50% (w/w). The respirometer was patented by the Chemical Engineering Research Group (RNM-271) of the University of Cordoba (Publication No. ES2283171 A1 of 16 October 2007). The respirometric variables determined were maximum specific oxygen uptake rate (SOUR, mg O₂/g VS·h) and cumulative oxygen demand at 20 h (OD₂₀, mg O₂/g VS), both of which are the result of microbial respiration due to the degradation of organic

matter. To prevent oxygen uptake due to the activity of nitrifying bacteria, thiourea was added as a nitrification inhibitor in all the experiments. Each sample was analyzed in duplicate.

The heavy metal content (copper, chromium, zinc, nickel, lead and cadmium) of both the OFMSW and WW substrates and the combination of the two (OFMSW-WW) was determined. A Perkin-Elmer AAnalyst 100/300 flame atomic absorption spectrometer was used. An air–acetylene mixture, whose proportion depends on the metal to be analyzed, was used as a combustion fuel.

2.3. Experimental set-up: Dynamic respirometry

The co-composting process was carried out at pilot scale in a commercial respirometer manufactured by Costech International (Respirometer 3022), which is frequently used to determine the dynamic respiration index (DRI) (Scaglia *et al.*, 2011). The respirometer consists of an adiabatic reactor (24-L capacity) isolated by means of a jacket. The reactor has three orifices: an air inlet (\varnothing 26 mm), an air outlet (\varnothing 20 mm) and a third orifice that is used to insert the temperature probe. The leachate generated was filtrated with a removable grid (\varnothing 2 mm) placed at the bottom of the reactor.

The respirometer is equipped with a computer and a signal conditioning module and has a gas flow regulator on the reactor's inlet in order to maintain aerobic conditions (minimum oxygen concentration 16%). The flow rate was maintained within a maximum of 500 L/h ($1.39 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$) and a minimum of 10 L/h ($2.78 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$). The device has its own software, which was developed exclusively by Di, Pro, Ve and Costech International for this method to monitor temperature and oxygen concentration and determine microbiological activity by calculating the DRI. The inlet air oxygen concentration, the outlet air concentration, the volatile solid (VS) (%) of the raw material and the experimental time were used to calculate DRI expressed in $\text{mgO}_2 / \text{kgVS} \cdot \text{h}$.

2.4. Olfactometric characterization: Dynamic olfactometry

Dynamic olfactometry was used to quantify the odor emitted from each substrate individually and the OFMSW-WW mixture. According to the European Standard EN 13725 (2003), dynamic olfactometry is the reference method to establish odor concentration. Dynamic olfactometry is a sensorial technique that determines the odor concentration of an odorous air sample in terms of European odor units per cubic meter (ou_E/m^3). The odor concentration represents the number of dilutions with neutral air required to bring the concentration of the sample to its odor perception threshold concentration. Therefore, the odor concentration is calculated as the geometric mean of the odor threshold values of each panelist multiplied by a factor that depends on the olfactometer dilution step factor.

A T08 olfactometer commercialized by Olfasense GmbH based on the 'Yes/No' method was used to measure odor concentration. All measurements were analyzed within 30 h after sampling under olfactometry laboratory conditions (25°C and 1 atm).

The odor concentration results presented in this study are the arithmetic mean of the odor concentration of two samples with the same maturity time. It is assumed that the results obtained by dynamic olfactometry have a confidence level from half to double the value of the odor perception threshold concentration.

The gaseous samples were taken at the reactor outlet using a standard sampling device that consisted of a vacuum container, which is evacuated with a vacuum pump. The sampling point and the standard sampler are connected by a probe. An 8L-Nalophan™ sampling bag lies inside the container and sucks in the sample air via the probe.

In order to evaluate the need for a biofiltration system at the reactor outlet to minimize or eliminate the odoriferous impact of the co-composting process, the odor emission rate (OER, ou_E/s) was calculated according to Equation 1:

$$\text{Odor emission rate } (ou_E/s) = \text{Odor concentration } (ou_E/m^3) \cdot \text{Air flow rate } (m^3/s) \quad (Eq.1)$$

3. Results and discussion

3.1 Physico-chemical and olfactometric characterization of OFMSW and WW

Table 1. Physico-chemical characterization of the initial compostable substrates

	WW	OFMSW
Physico-chemical characterization		
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	406 \pm 2	2760 \pm 49
pH	3.50 \pm 0.10	5.66 \pm 0.01
% Moisture (w/w)	49.50 \pm 0.26	67.10 \pm 0.03
% Volatile solids	45.36 \pm 1.31	75.00 \pm 4.65
% N-Kjeldahl (w/w)	1.60 \pm 0.10	2.84 \pm 0.01
% N-NH₄⁺	0.15 \pm 0.01	0.57 \pm 0.01
C/N	28.35 \pm 1.67	12.32 \pm 0.73
% P-P₂O₅	0.02 \pm 0.01	1.24 \pm 0.01
% TC_{soluble} (w/w)	2.55 \pm 0.01	6.18 \pm 0.01
% IC_{soluble} (w/w)	0.05 \pm 0.01	0.63 \pm 0.01
% TOC_{soluble} (w/w)	2.50 \pm 0.01	5.55 \pm 0.01
% TN_{soluble} (w/w)	0.15 \pm 0.01	1.03 \pm 0.01
Olfactometric characterization		
Odor concentration (ouE/m³)	15200	4467

Table 1 shows the physico-chemical characterization of WW and OFMSW independently. As can be seen, WW has a more acidic pH than OFMSW, while the conductivity is significantly lower. WW often displays a strong phytotoxicity, which can be attributed to the presence of significant concentrations of organic acids (lactic and acetic acids are the most common) and ethanol (Moldes *et al.*, 2008; Paradelo *et al.*, 2010). The carbon content in soluble form (TOC, %), which is more

readily assailable and biodegradable by microorganisms, was considerably lower in WW than in OFMSW. Moreover, the content in phosphorus and nitrogen was significantly higher in OFMSW, thus indicating that mixing WW with OFMSW favors the presence of these nutrients in the final product.

On the other hand, the odor concentration of both OFMSW and WW was determined by dynamic olfactometry at the beginning of the experiments in the dynamic respirometer. Table 1 also shows that the odor concentration generated by the WW in the freshest conditions before being composted was considerably higher than the odor concentration generated by OFMSW. These preliminary results could indicate that the co-composting of winery waste with OFMSW might minimize the odor impact of the process compared to the composting of winery waste alone.

3.2 Biodegradability of substrates: OFMSW and WW

The biodegradability of OFMSW and WW was determined by static respirometry in liquid phase at laboratory scale, as mentioned in *section 2.2 Materials and Methods*. Firstly, Figure 1 shows the specific oxygen uptake rate (SOUR, $\text{mgO}_2/\text{gVS}\cdot\text{h}$) obtained for each substrate in each of the two experiments carried out. As can be seen, SOUR initially increased until reaching the maximum value of 35 mg and 24 mg $\text{O}_2/\text{gVS}\cdot\text{h}$ for WW and OFMSW, respectively. The SOUR then decreased due to the reduction in biodegradable organic matter (non-biodegradable under these experimental conditions). The area under the curve for SOUR (mg O_2/gVS) vs. time (h) corresponds to the cumulative oxygen demand per gram of volatile solid added (mg O_2/gVS) on dry basis, which is a respirometric variable proportional to the biodegradability of the sample analyzed. This variable depends on the shape of the curve. Curves in peak form are indicative of fast biodegradation of the organic matter, while curves with wide and flat peaks indicate processes where the organic matter is degraded in sequential transformation steps. Therefore, the hydrolytic stage is the limiting stage and the oxygen is consumed more slowly.

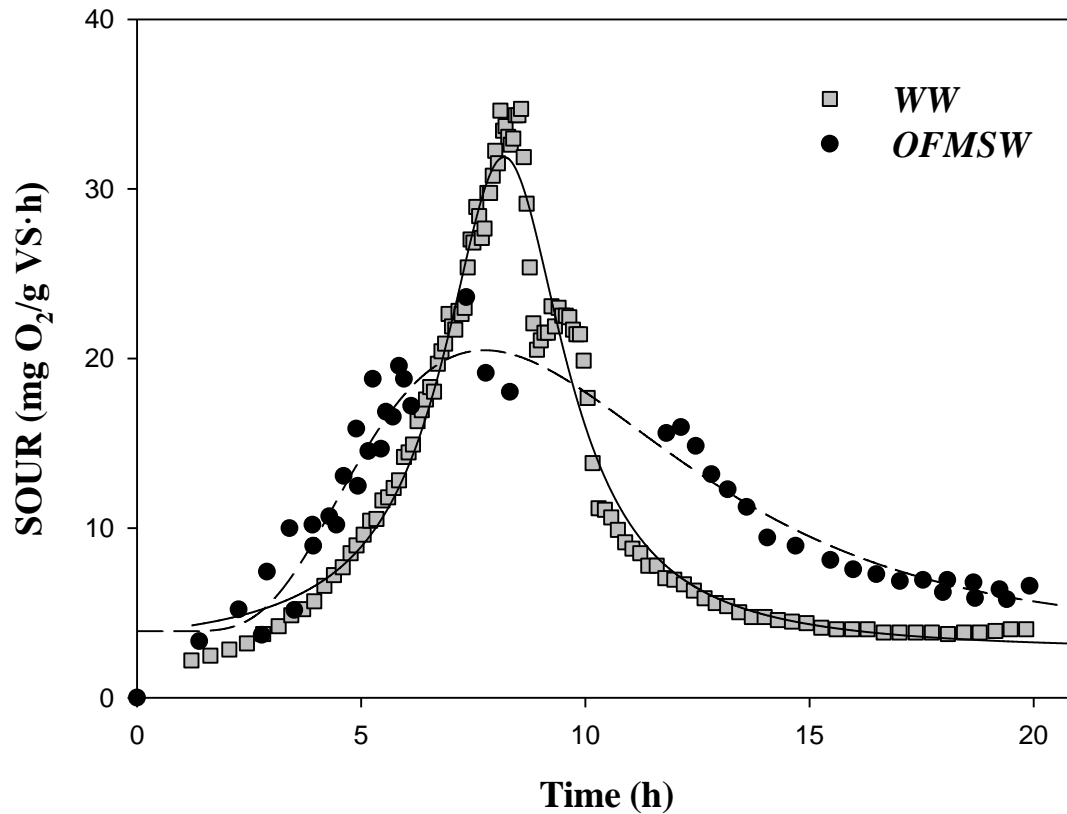


Figure 1 Variation in specific oxygen uptake rate (SOUR, mgO₂/gVS) of OFMSW and WW with time (h).

To sum up, Figure 1 shows that both substrates were biodegradable under aerobic conditions and that the maximum SOUR was reached at the same time (at approximately 8 hours). Moreover, the values of the mean SOUR for WW and OFMSW were 10.41 ± 0.48 and 9.96 ± 0.40 mg O₂/gVS·h. Therefore, although the maximum SOUR value is different in both substrates, the similar times required for biodegradation and the similar mean SOUR obtained for both substrates indicate the feasibility of mixing these substrates for co-composting.

The cumulative oxygen demand (OD_t) during the experiments is another variable related to the biodegradability of the substrates. Figure 2 shows the evolution of OD_t with time during the respirometric process of OFMSW and WW. As can be seen, both substrates show very similar OD_t

values, reaching approximately 100 mg O₂/gVS at 10 hours of experimentation. At the end of the analysis, the OD₂₀ corresponding to OFMSW was close to 225 mg O₂/gVS, which is slightly higher than the OD₂₀ obtained for WW (200 mg O₂/gVS). This minor difference might be associated to the microbial processes involved in organic matter biodegradation. Hence it might be said that, with enough experimental time, both substrates are similarly biodegradable under these experimental conditions.

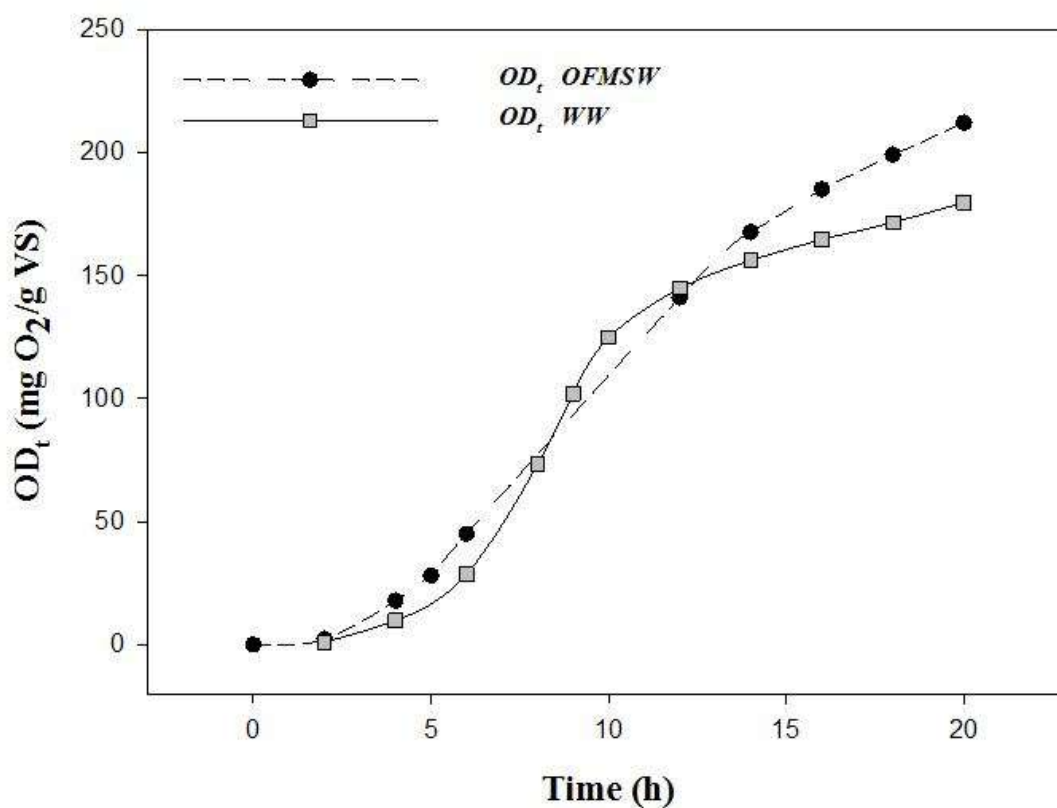


Figure 2 Respirometry in liquid phase: Cumulative oxygen demand (OD_t, mg O₂/gVS) of OFMSW and WW.

3.3 Co-composting process of OFMSW-WW in a dynamic respirometer at pilot scale

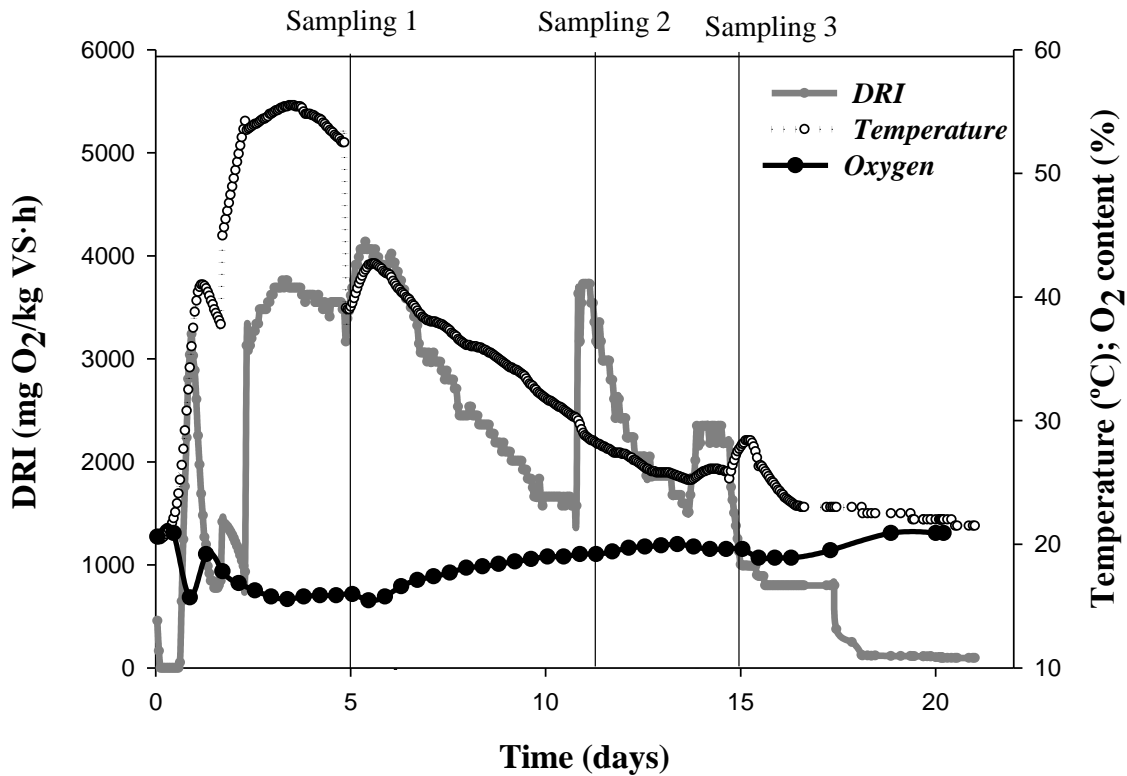


Figure 3 Dynamic respirometry: Evolution of temperature (°C), Dynamic respirometric index (DRI, mg O₂/kgVS) and oxygen concentration (%) with time (days).

Figure 3 shows the results obtained by the respirometer during one of the experiments carried out as an example. The experiment can be divided into three stages according to the samplings carried out. It is worthy to note that the material was turned in each sampling. The first stage of the co-composting (0-5 days) was characterized by a considerable increase in the temperature and the DRI during most of this stage; however, as can be observed, both variables slowed down from the second to the third day of the experiment. This may have been due to the adaptation of the microorganisms to the compounds resulting from the initial biodegradation of the OFMSW-WW mixture. Subsequently, the maximum temperature was reached at the end of this first stage (56 °C) and maintained for approximately 2 days of the co-composting process. Temperature is important in controlling the composting process not only because it is proportional to the microbial activity and odor emissions (Gutiérrez *et al.*, 2014), but also because it is a key factor in order to obtain a

sanitized product (Kim *et al.*, 2008). According to Stentiford (1996), temperatures above 55°C are necessary to obtain a sanitized product. Subsequently, the maximum DRI (4150 mgO₂/kgVS·h) was reached followed by a continuous decrease along with the temperature of the material. As expected, the decrease in microbial activity led to a decrease in oxygen consumed (%). Finally, the last stage of the co-composting process was characterized by a general decrease in the DRI and temperature, which resulted in an increase in the oxygen concentration of the reactor (close to 21% at the end of the experiment).

3.3.1 Monitoring of physico-chemical variables

Table 2. Monitoring of physico-chemical variables of the OFMSW-WW mixture during the co-composting process

Physico-chemical characterization of OFMSW-WW (ratio 50/50% w/w)					
	Initial sample	5 days	11 days	15 days	21 days
Conductivity (µS/cm)	1318 ± 23	1259 ± 22	952 ± 17	1040 ± 19	1030 ± 18
pH	5.57 ± 0.01	4.76 ± 0.01	7.51 ± 0.01	7.46 ± 0.01	8.38 ± 0.01
% Moisture (w/w)	57.86 ± 1.33	58.72 ± 0.06	58.65 ± 0.19	62.04 ± 0.13	62.77 ± 0.06
% Volatile solids	67.10 ± 0.85	75.69 ± 0.84	56.55 ± 1.28	69.13 ± 2.62	76.75 ± 0.41
% N-Kjeldahl (w/w)	2.70 ± 0.03	3.63 ± 0.03	3.75 ± 0.05	4.93 ± 0.04	6.56 ± 0.04
% N-NH₄⁺	0.36 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.80 ± 0.01
C/N	24.85 ± 1.75	20.85 ± 1.14	15.08 ± 1.00	14.02 ± 1.01	11.69 ± 0.37
% P-P₂O₅	0.09 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.13 ± 0.02
% TC_{soluble} (w/w)	1.56 ± 0.01	1.11 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.44 ± 0.01
% IC_{soluble} (w/w)	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01
% TOC_{soluble} (w/w)	1.49 ± 0.01	1.06 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.41 ± 0.01
% TN_{soluble} (w/w)	0.40 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.67 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.80 ± 0.01

In a first stage, the co-composting process was monitored using the most relevant physico-chemical variables. Table 2 shows the initial characterization of the OFMSW-WW mixture (ratio 50:50% w/w), as well as the characterization carried out at days 5, 11, 15 and 21 of the co-composting

process. It is interesting to note the evolution of the pH from acidic values (4-5) to a basic value (8.40 approximately), which is a typical trend in any composting process. Several authors indicate that the composting process evolves in a large pH range (Moldes *et al.*, 2007; Proietti *et al.*, 2015; Proietti *et al.*, 2016). The results of the monitoring of soluble forms of carbon (TOC, %) and nitrogen (TN, %) during the co-composting process are also represented in Figure 4A as the relationship between both nutrients is highly relevant and indicative of the stabilization process involved in composting (Puyuelo *et al.*, 2011). Figure 4A shows that TOC decreased and NT_{soluble} increased considerably with the composting time until reaching final values of 0.4 % and 0.08 %, respectively. Similarly, the C/N ratio, expressed as VS (%) and N-kjeldahl (%), decreased during the process due to the increase in nitrogen content (approximately 40%). Paredes *et al.* (2000) described losses of around 50% of total nitrogen when co-composting olive mill wastewater with solid organic wastes. Minimizing *N* losses during co-composting is desirable as it increases the *N* concentration in the final product (and thus its agronomic and economic value), decreases odor emissions and reduces environmental problems (Liang and Youcai, 2013). On the other hand, the solid volatile content did not change significantly, thus indicating the need to complete the co-composting process with a final stage carried out in an open system (windrow) in order to obtain a totally stabilized final product. Finally, the P-P₂O₅ concentration increased slightly from 0.09 to 0.15%, which may have been due to the loss of mass as a consequence of the biodegradability by microorganisms during the co-composting process.

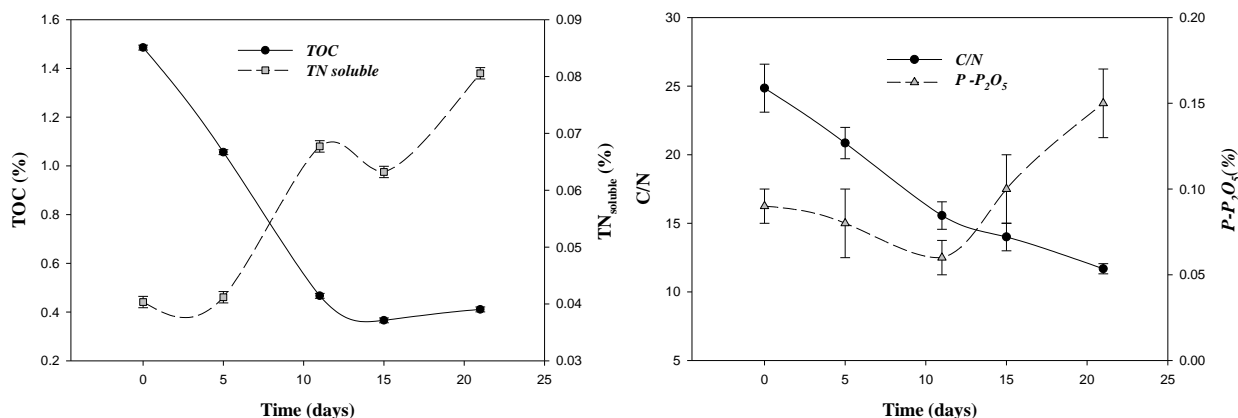


Figure 4 (A) Evolution of total organic carbon (TOC, %) and total nitrogen (TN_{soluble}, %) with composting time. (B) Evolution of the C/N ratio and phosphorus content (P-P₂O₅, %) with composting time.

3.3.2 Monitoring of biodegradability and respirometric variables of OFMSW-WW

The biodegradability of OFMSW-WW was calculated according to Equation 2:

$$\text{Biodegradability (\%)} = \frac{M_i(\text{kg}) - M_f(\text{kg})}{M_i(\text{kg})} \cdot 100 \quad \text{Eq.2}$$

where M_i is the initial mass of OFMSW-WW (kg, dry base) and M_f is the final mass of OFMSW-WW (kg, dry base). In this expression, the initial inorganic matter was considered constant during the co-composting process.

During the 21 days of the OFMSW-WW co-composting process, a loss of 1.31 kg of substrate (being 14.4 kg the initial mass of substrate) resulted in a biodegradability of 21.6%. In comparison, the biodegradability of OFMSW, which was composted under similar experimental conditions, was 36.1% with a loss of 1.5 kg of compostable substrate (the initial mass of substrate was 9.4 kg). This result demonstrates that the presence of WW in the substrate reduced the biodegradability of the OFMSW-WW mixture.

Additionally, Table 3 shows that OFMSW-WW co-composting requires only 15 days to obtain a practically stabilized product (compost) from the point of view of microbiological activity (3 mg O₂/gVS·h). As regards the respirometric variables of the compostable substrate, Figure 5 shows the cumulative oxygen demand (OD), expressed as g O₂/kgVS, considering the volatile solid content determined in each sampling (at days 5, 11, 15 and 21 of composting). OD was also expressed as g O₂/kg per dry sample.

Table 3. Evolution of the metal content in the OFMSW-WW mixture during co-composting and the limit content established under Royal Decree 506/2013 concerning fertilizer products

<i>Metal content (mg/kg)</i>						
	<i>Cu</i>	<i>Cr</i>	<i>Ni</i>	<i>Cd</i>	<i>Pb</i>	<i>Zn</i>
<i>OFMSW</i>	20	36	12	2	12	36
<i>WW</i>	15	9	6	2	7	14
<i>Initial sample (OFMSW-WW)</i>	18	28	19	2	10	23
<i>5 days</i>	24	28	119	2	10	51
<i>11 days</i>	24	27	20	3	11	82
<i>15 days</i>	36	31	21	3	11	80
<i>21 days</i>	59	32	22	3	11	149
<i>RD 506/2013 Compost type A</i>	70	70	25	0.7	45	200
<i>RD 506/2013 Compost type B</i>	300	250	90	2	150	500
<i>RD 506/2013 Compost type C</i>	400	300	150	3	200	1,000

As can be observed, the oxygen consumed per kilogram of volatile solid (mg O₂/kgVS) reached the maximum value (27.8 mgO₂/kgVS) at day 11 of the composting process, which is the stage of highest microbiological activity. However, the oxygen consumed per kilogram of dry sample (g O₂/kg sample) showed a logical trend that increased to a maximum value. Several authors have also reported this trend for OD (mg O₂/kgVS) during the monitoring of composting of different mixtures of wastes (Adani *et al.*, 2004; Gutiérrez, *et al.*, 2016).

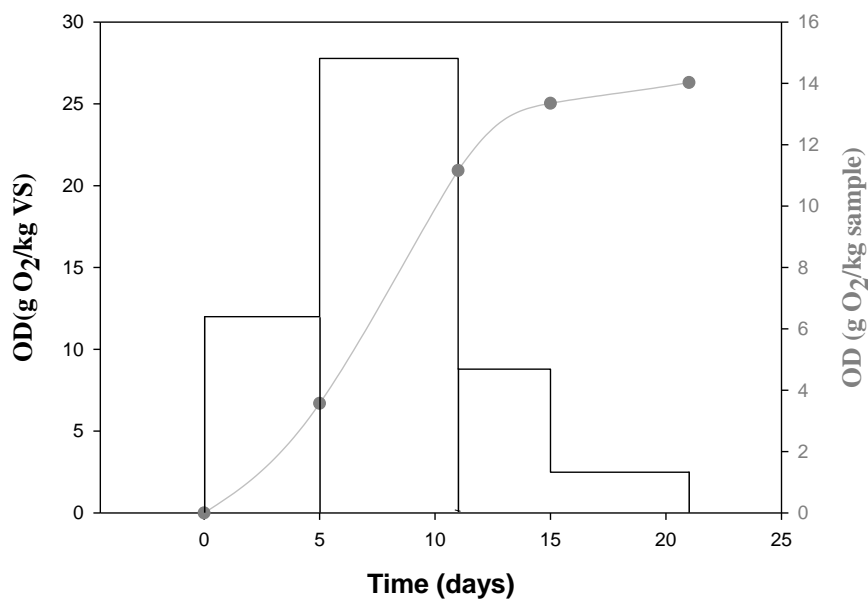


Figure 5 Evolution of the cumulative oxygen demand (ODt) expressed as g O₂/kg VS and g O₂/ kg per dry sample.

3.3.3 Monitoring of metal content

Table 3 shows the concentration of the heavy metals Cu, Cr, Ni, Cd, Pb and Zn, expressed in mg/kg, in the raw materials (OFMSW and WW), as well as in the OFMSW-WW samples taken at days 5, 11, 15 and 21 of the co-composting process. As can be seen, the concentration of the six metals increases during the process; particularly Cu and Zn, whose concentration increased 3.28 and 6.50 times, respectively. A considerable transference of these heavy metals to the organic matter of the compostable substrate was also reported by Gutiérrez *et al.*, (2009). According to Spanish Royal Decree 506/2013 concerning fertilizer products, the compostable substrate has a concentration of five heavy metals corresponding to Compost type A, with the exception of the Cr concentration, which corresponds to Compost type C at the end of the co-composting process. It is worthy to note that the low metal content of WW improves the heavy metal concentration of the

OFMSW-WW mixture. Therefore, the use of this co-composted mixture might be highly adequate for use as a fertilizer in agricultural soils.

3.3.4 Monitoring of odor emissions

The odor emissions produced during the OFMSW-WW co-composting process were evaluated by dynamic olfactometry. Figure 6 shows the odor concentration (ou_E/m^3) determined at days 5, 11, 15 and 21 as well as the odor emissions rates calculated as a function of the air flow required at each moment of the process. As can be seen, the evolution of the odor emissions allowed the hydrolytic and maturity stages to be differentiated. The highest odor emissions were determined during the hydrolytic stages and reached their maximum value ($1.22 \text{ ou}_E/\text{s}$; $9930 \text{ ou}_E/\text{m}^3$) at the beginning of the process. Gutiérrez et al. (2016) determined maximum OER values of approximately $1.6 \text{ ou}_E/\text{s}$ during the composting of OFMSW under similar experimental conditions. The maximum odor emissions produced during the OFMSW composting process were usually reached at week two of the process, with the evolution of the odor emissions being similar to the evolution of the temperature as well as the microbial activity (Gutiérrez et al., 2014). However, the generation of potential odorous compounds during the biodegradation of WW might explain why the maximum value was reached at the beginning of the process. In this experiment, the odor emissions were conditioned more strongly by the composition of the compostable substrate than by the temperature or the microbial activity. The hydrolytic stage finished at day seven of the process and reached a minimum odor emission value of $0.43 \text{ ou}_E/\text{s}$ ($6500 \text{ ou}_E/\text{m}^3$). The minimum odor emission reached at the end of the maturity stage was $1.1 \cdot 10^{-3} \text{ ou}_E/\text{s}$ ($395 \text{ ou}_E/\text{m}^3$).

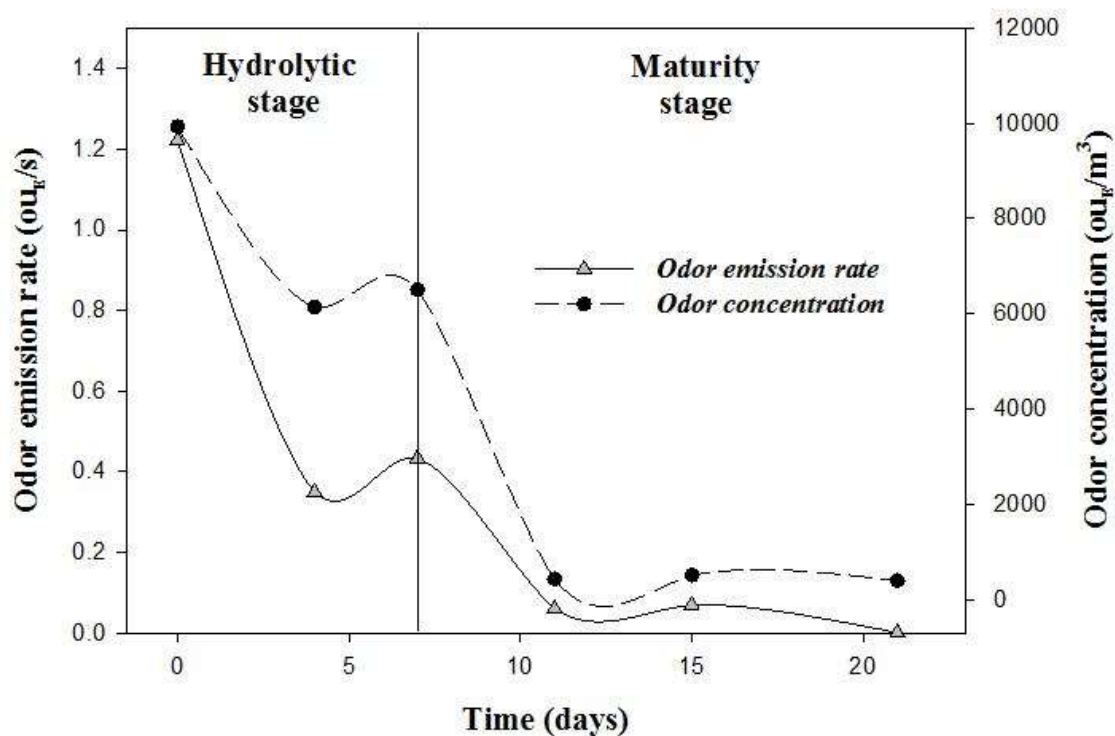


Figure 6 Evolution of odor emissions during the co-composting process expressed as odor emission rate (ou_E/s) and odor concentration (ou_E/m³).

4. Conclusions

From the evaluation of the co-composting process of OFMSW-WW (50:50% w/w), the following advantages and drawbacks were found:

- Winery waste is highly acidic. The OFMSW-WW mixture neutralizes the acidity associated to winery waste and favors recycling through composting.
- The similar biodegradability of both wastes under aerobic conditions, which reached the maximum SOUR at the same time, permitted the composting process to be carried out with the same proportion of both wastes (50:50% w/w).

- Winery waste is rich in nitrogen and phosphorus. Therefore, the mixture with OFMSW favors the presence of these nutrients in the compostable substrate as well as in the final product obtained during co-composting, which improves its quality for use as an organic fertilizer.
- The biodegradability of the OFMSW-WW mixture was 21.6% and lower than the biodegradability of OFMSW (36.1%) composted under similar experimental conditions.
- Although the heavy metal content generally increases during the composting of OFMSW-WW, and more substantially the concentration of Cu and Zn, the limit values corresponding to a “compost type A” (Spanish Royal Decree 506/2013 concerning fertilizer products) were not exceeded, with the exception of the Cr concentration, which had a value corresponding to a compost type C at the end of the co-composting process.
- Regarding odor emissions, the maximum OER reached during the co-composting of OFMSW-WW was 1.22 ou_E/s, which was slightly lower than the odor emissions produced during the composting of OFMSW (1.60 ou_E/s) under similar experimental conditions.

Acknowledgements

The authors are very grateful to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for funding this research through Project CTQ2014-60050-R. The authors are also grateful to laboratory technicians Inmaculada Bellido Padillo and Marisa López Campaña.

References

Adani, F., Confalonieri, R., Tambone, F., 2004. Dynamic respiration index as descriptor of the biological activity of organic wastes. *J. Environ. Qual.* 33, 1866-1876.

Cofie, O., Kone, D., Rothenberger, S., Moser, D., Zubruegg, C., 2009. Co-composting of faecal sludge and organic solid waste for agriculture: Process dynamics. *Water Res.* 43, 4665-4675

Colón, J., Mestre-Montserrat, M., Puig-Ventosa, I., Sánchez, A., 2013. Performance of compostable baby used diapers in the composting process with the organic fraction of municipal solid waste. *Waste Manag.* 33, 1097-1103.

Díaz, M.J., Madejón, E., López, F., López, R., Cabrera, F., 2002. Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process. *Process Biochem.* 37, 1143-1150.

Elango, D., Thinakaran, N., Panneerselvam, P., Sivanesan, S., 2009. Thermophilic composting of municipal solid waste. *Appl. Energ.* 86, 663-668.

Ferrer, J., Páez, G., Mármol, Z., Ramones, E., Chandler, C., Marín, M., Ferrer A, 2001. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresource Technol.* 76, 39-44.

Gutiérrez, M.C., Siles, J.A., Diz, J., Chica, A.F., Martín, M.A., 2016. Modelling of composting process of different organic waste at pilot scale: Biodegradability and odor emissions. *Waste manag. (In Press, Corrected Proof, Available online 6 October 2016)*.

Gutiérrez, M.C., Serrano, A., Martín, M.A., Chica, A.F., 2014. Odor in composting processes at pilot scale: monitoring and biofiltration. *Environ. Technol.* 35, 1676-1684.

Gutiérrez, M.C., Corredera, A.B., Chica, A.F., Rosal, A., Martín, M.A., Dios M., Arcos, M.A., Siles, J.A., Martín, A., 2009. La disminución del contenido metálico en el proceso de compostaje de residuos sólidos urbanos es factible. UNIA (ISBN 978-84-7993-099-8)

Ingelmo, F., Canet, R., Ibañez, M., Pomares, F. and Garfa, J., 1998. Use of MSW compost, dried sewage sludge and other wastes as partial substitutes for peat and soil. *Bioresource Technol.* 63, 123-129.

Kim, J.-D., Park, J.-S., In, B.-H., Kim, D., Namkoong, W., 2008. Evaluation of pilot-scale in-vessel composting for food waste treatment. *J. Hazard. Mater.* 154, 272-277.

Komilis, D., Bandi, D., Kakaronis, G., Zouppouris, G., 2011. The influence of spent household batteries to the organic fraction of municipal solid wastes during composting. *Sci. Total Environ.* 409, 2555-2566.

Lhadi, E.K., Tazi, H., Aylaj, M., Genevini, P.L., Adani, F., 2006. Organic matter evolution during co-composting of the organic fraction of municipal waste and poultry manure. *Bioresource Technol.* 97, 2117-2123.

Lianghu, S., Youcai, Z., 2013. Chemical reduction of odor in fresh sewage sludge in the presence of ferric hydroxide. *Environ. Technol.* 34, 165–172.

Madejon, E., Diaz, M., Lopez, R. and Cabrera, F., 2001. Co-composting of sugarbeet vinasse: influence of the organic matter nature of the bulking agents used. *Bioresource Technol.* 76, 275–278.

MAGRAMA, 2013. Gestión de bioresiduos de competencia municipal. Guía para la implantación de la recogida separada y tratamiento de la fracción orgánica (spanish version)

Manios, T., 2004. The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete. *Environ. Int.* 29, 1079–1089.

Moldes, A.B., Cendón, Y., Barral M.T., 2007. Evaluation of municipal solid waste compost as a plant growing media component, by applying mixture design. *Bioresource Technol.* 98, 3069–3075.

Moldes, A.B., Vázquez, M., Domínguez, J.M., Diaz-Fierros, F., Barral, M.T., 2008. Negative effect of discharging vinification lees on soils. *Bioresource Technol.* 99, 5991-5996.

Mondini, C., Sánchez-Monedero, M.A., Sinicco, T., Leita, L., 2006. Evaluation of extracted organic carbon and microbial biomass as stability parameters in ligno-cellulosic waste composts. *J. Environ. Qual.* 35, 2313-2320.

Paredes, C., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J., 2000. Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biol. Fert. Soils* 32, 222–227.

Proietti, P., Calisti, R., Gigliotti, G., Nasini, L., Regni, L., Marchini, A., 2016. Composting optimization: Integrating cost analysis with the physical-chemical properties of materials to be composted. *J. Clean. Prod.* 137, 1086-1099.

Proietti, P., Federici, E., Fidati, L., Scargetta, S., Massaccesi, L., Nasini, L., Regni, L., Ricci, A., Cenci, G., Gigliotti, G., 2015. Effects of amendment with oil mill waste and its derived-compost on soil chemical and microbiological characteristics and olive (*Olea europaea* L.) productivity *Agric. Ecosyst. Environ.* 207, 51–60.

Puyuelo, B., Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2011. Determining C/N ratios for typical organic wastes using biodegradable fractions. *Chemosphere* 85, 653-659.

Ruggieri, L., Cadena, E., Martínez-Blanco, J., Gasol, C.M., Rieradevall, J., Gabarrell, X., Gea, T., Sort, X., Sánchez, A., 2009. Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *J. Clean. Production* 17, 830–838.

Paradelo, R., Villada, A., González, D., Barral, M.T., 2010. Evaluation of the toxicity of heavy metals and organic compounds in compost by means of two germination-elongation tests. *Fresen. Environ. Bull.* 19, 956-962.

Petric, I., Avdihodžić, E., Ibrić, N., 2015. Numerical simulation of composting process for mixture of organic fraction of municipal solid waste and poultry manure. *Ecol. Eng.* 75, 242-249.

Scaglia, B., Acutis, M., Adani, F., 2011. Precision determination for the dynamic respirometric index (DRI) method used for biological stability evaluation on municipal solid waste and derived products. *Waste Manage.* 31, 2–9.

Scoton, E.J., Battistelle, R.A.G., Bezerra, B.S., Akutsu, J., 10 May 2016. A sewage sludge co-composting process using respirometric monitoring method in hermetic rotary reactor. *J. Clean. Prod.* 121, 169-175.

Shen, Y., Chen, T.-B., Gao, D., Zheng, G., Liu, H., Yang, Q., 2012. Online monitoring of volatile organic compound production and emission during sewage sludge composting. *Bioresource Technol.* 123, 463-470.

Siles, J.A., Vargas, F., Gutiérrez, M.C., Chica, A.F., Martín, M.A., 2016. Integral valorisation of waste orange peel using combustion, biomethanisation and co-composting technologies. *Bioresource Technol.* 211, 173-182.

Sort, X., Baraza, X., Toma's V., 2004. Environmental impact evaluation in viticultural activities. In: *Third international specialized conference on sustainable viticulture and winery wastes management*, Barcelona: University of Barcelona.

Stentiford, E.T., 1996. Composting control: Principles and practice. In: De Bertoldi, M., Sequi, P., Lemmes, B., Papi, T. (Eds.). *The Science of Composting*. Chapman & Hall, pp. 49–59.

Taeporamaysamai, O., Ratanatamskul, C., 2016. Co-composting of various organic substrates from municipal solid waste using an on-site prototype vermicomposting reactor. *Int. Biodeter. Biodegr.* 113, 357-366.

The US Department of Agriculture and The US Composting Council. Test methods for the examination of composting and compost (TMECC). Houston (TX): Edaphos International; 2002.

Resumen bloque II: Digestión anaerobia de subproductos y residuos vitivinícolas.

Durante la vinificación se suceden diferentes etapas en las que se generan residuos con características y composición muy diversas, siendo frecuente la generación de fracciones residuales sólidas, como los orujos, y residuos líquidos, como las lías. Estas últimas se generan en la decantación del mosto que tiene lugar tras el prensado de la uva y previamente a su fermentación alcohólica, así como tras la finalización de dicho proceso fermentativo. La composición de las mismas puede variar y, por ende, la eficacia del tratamiento de valorización o eliminación que se lleve a cabo.

Los residuos vitivinícolas suelen almacenarse en la bodega hasta su transporte a una destilería, para la extracción de etanol. Tiempos de almacenamiento en planta elevados conllevan inconvenientes en la bodega ante la falta de espacio, que suponen costes económicos al estar ocupando depósitos que podrían ser empleados en almacenamiento de vino, así como problemas medioambientales asociados al transporte de estos residuos. El almacenamiento de las lías conlleva también incrementa los costes de producción al tener que llevar a cabo operaciones como supone el trasiego durante las diferentes etapas de la crianza, hasta su embotellamiento. Su almacenamiento en tinas o conos requiere gran espacio y, además, el vino debe ser separado de las lías para no conferirle sabores y aromas indeseados, de ahí la importancia en su retirada a tiempo.

Teniendo en cuenta los problemas asociados al almacenamiento de estos residuos y la necesidad de buscar tratamientos alternativos sostenibles y concordantes con la cada vez más restrictiva legislación vigente en cuanto al desarrollo de buenas prácticas medioambientales en el contexto de la economía circular, en este bloque se ha propuesto la biometanización de dichos residuos de elevada carga orgánica, ya que previamente se ha demostrado que los orujos son biodegradables, al menos aerobiamente.

Los orujos y lías procedentes de mosto yema (sin fermentación alcohólica) de la variedad ecológica Pedro Ximénez, así como las lías fermentadas de la variedad ecológica Verdejo, han sido objeto de estudio, de forma individual, en diversos tratamientos de digestión anaerobia a escala de laboratorio.

El objetivo de estos estudios ha sido la valorización de dichos residuos mediante biometanización, evaluando la estabilidad del proceso, su rendimiento en la producción de metano y el poder energético generado, así como la biodegradabilidad de los sustratos. Además, se ha estudiado el impacto que sobre la emisión de CO₂ (huella de carbono) supondría la implementación de esta tecnología en una Denominación de Origen, como es la de Montilla-Moriles, en la provincia de Córdoba.

Todos los ensayos se han llevado a cabo utilizando residuos procedentes de una bodega ecológica, tratándose de estudios preliminares con el fin de poder implementar dicho tratamiento en su bodega o incluso en una Denominación de Origen, apostando por la economía circular y reducir el impacto medioambiental de este tipo de industria. Por ello, se incluye, entre los estudios realizados, la posibilidad de un tratamiento secuencial para abarcar los residuos generados a lo largo de las diferentes estaciones del año; instantes de máxima generación de orujos y progresiva generación de lías en sus distintas variedades.

Descripción del artículo: “Revalorization of grape marc waste from liqueur wine: Biomethanization”

El cultivo de la uva es uno de los más importantes a nivel mundial. Las denominaciones de origen, como la DOP Montilla-Moriles de Córdoba, España, producen vinos generosos, vinos generosos de licor y vinos de licor dulces con un bajo rendimiento, por lo que la gestión sostenible de sus residuos resulta crucial. Así, el aprovechamiento de los residuos generados durante el proceso de vinificación podría proporcionar al sector un aporte económico y de sostenibilidad adicional. En este trabajo se ha evaluado la viabilidad de la digestión anaerobia de orujo de uva de la variedad Pedro Ximénez de cultivo ecológico, en condiciones mesófilas y a escala de laboratorio. La velocidad de producción de metano fue elevada, pero con bajas cargas de residuo en el sistema de biometanización, de forma que se mantuvo la producción de metano con un coeficiente de rendimiento promedio de $252 \pm 31 \text{ NmL CH}_4/\text{g SV}_{\text{añadidos}}$, siendo su biodegradabilidad la más baja de los residuos vitivinícolas estudiados (51%).

No obstante, los resultados muestran que la digestión anaerobia de los orujos de uva Pedro Ximénez es factible y podría implementarse para el manejo de estos residuos, reduciendo así el gran volumen de desechos generados por este cultivo.



**Revalorization of grape marc waste from liqueur wine:
Biomethanization**

Hungría Javier, Siles José Ángel, Gil Aida, Gutiérrez, María del Carmen, Martín María de los Ángeles*

Department of Chemical Engineering, University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Ctra. N-IV, km 396, building Marie Curie (C-3), CP/14071 Córdoba, Spain.

*Corresponding author: Email: iq2masam@uco.es; phone: +34 957212273

Abbreviations

Alk	Alkalinity (mg CaCO ₃ /L)
Cd	Cadmium (mg/mg dry weight)
COD	Chemical oxygen demand (mg O ₂ /g dry weight)
Cr	Chromium (mg/mg dry weight)
Cu	Copper (mg/mg dry weight)
FA	Free ammonia (mg NH ₃ /L)
FS	Fixed solids (g FS/kg sample)
G	Methane volume (mL _{STP} CH ₄ /L)
G_{exp}	Maximum experimental methane volume (mL _{STP} CH ₄ /L)
GAL	Glucose, sodium acetate and lactic acid
Gm	Maximum theoretical methane volume (mL _{STP} CH ₄ /L)

Resultados y discusión/Results and discussion

gmw	Grape marc waste
k	Kinetic constant (h^{-1})
LCP	Lower calorific power ($\text{kJ}/\text{m}^3_{\text{STP}}$)
Ni	Nickel (mg/mg dry weight)
OD₂₄	Cumulative oxygen demand at 24 h ($\text{mg O}_2/\text{g VS}$)
OLR	Organic loading rate ($\text{kg VS}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$)
Pb	Lead (mg/mg dry weight)
PDO	Protected Designation of Origin
r_{CH4}	Methane production rate ($\text{mL}_{\text{STP}} \text{CH}_4/\text{L} \cdot \text{h}$)
SOUR	Specific oxygen uptake rate ($\text{mg O}_2/\text{g VS} \cdot \text{h}$)
STP	Standard temperature and pressure ($0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm)
T	Temperature (Kelvin)
t	Time (h)
TKN	Total Kjeldahl nitrogen ($\text{mg N}/\text{g}$ sample)
TOC	Total soluble organic carbon ($\text{mg C}/\text{L}$)
ton_{gmw}	Tonne grape marc waste
TP	Total soluble phosphorus ($\text{mg P}/\text{g}$ dry weight)
TS	Total solids ($\text{g TS}/\text{kg}$ sample)

Resultados y discusión/Results and discussion

TSN	Total soluble nitrogen (mg N/L)
V	Volume (L; m ³)
V_{ADIS}	Volatile acidity (mg C/L)
V_{AGC}	Volatile fatty acid (mg C ₂ /L)
VS	Volatile solids (g VS/kg sample)
Y_{CH₄/S}	Methane yield coefficient (mL _{STP} CH ₄ /g VS; m ³ CH ₄ STP/kg VS; L _{STP} / ton _{gmw})
Zn	Zinc (mg/mg dry weight)

Abstract

BACKGROUND: Grapes are one of the largest crops produced worldwide and are mainly used to produce wine, which generates a large volume of waste. Certain designations of origin, such as the Montilla-Moriles PDO of Cordoba (Spain) produce liqueur wines at low yield. The possibility of generating by-products from the waste during the winemaking process might provide an additional economic input.

RESULTS: Anaerobic digestion of grape marc waste derived from the Pedro Ximénez c.v. (ecological crop) was evaluated under mesophilic conditions at laboratory scale. The loads added to the reactors varied from 0.50 to 1.25 g VS (volatile solids)/L, with an average methane production coefficient of 252 ± 31 mL_{STP} CH₄ / g VS_{added} (STP: 0 °C, 1 atm). The highest methane rate production was found to be 47.97 ± 4.29 mL_{STP} CH₄/L·h for 1.25 g VS/L of grape marc waste. The volatile fatty acids concentration increased and the pH and alkalinity slightly decreased over the experimental time.

Moreover, the digestate contained lower metals concentration in comparison with waste derived from non-ecological crops.

CONCLUSION: Anaerobic digestion of Pedro Ximénez grape marc waste is feasible and might be implemented for waste management, thus reducing the large volume of waste generated.

Keywords: Anaerobic digestion, Waste treatment, Biogas, Biodegradability, Biomass.

1. Introduction

Due to the growing concern about global warming, the use of renewable energy has become the focal point of several policy proposals and a priority for many countries. Grapes (*Vitis vinifera* c.v.) are one of the crops with the highest volume used for wine production.¹ In 2015, 270 MhL of wine were produced in the world, with a production yield of 1.325 kg of grapes/L wine.² Winemaking process consists of different steps: firstly, after harvesting, grapes are transported to the winery to be pressed. Subsequently, the liquid (must) and solid fractions (grape marc waste) are separated. Grape marc is composed of skins, stems (lignocellulosic residue constituting the bunch of grapes), seeds and others in a proportion of 20–25 kg of grape marc waste per 100 kg of processed grape,³ which is equal to a worldwide volume of 8.9 MT of grape marc waste during the harvest in 2015. The management of this waste causes environmental and economic problems in the wine sector, such as soil and surface water pollution, soil degradation, damage to vegetation and odors.

Resultados y discusión/Results and discussion

In 2013, 281 million tons of wine were produced in the world, with Italy, France and Spain accounting for 46% of worldwide production.⁴ Spain is the third wine-producing country with approximately 45 million hectoliters in 2015⁵ and has the largest surface area of vineyards in the world with approximately 1.2 million hectares.

Alternative treatments for winemaking residues, such as composting or livestock feed, have been studied to reduce the environmental impact of this waste when deposited in landfills after the alcohol is extracted in the distilleries. Ethanol is recovered from grape marc waste after pressing white grape varieties and following the alcoholic fermentation of red grape varieties. Ethanol from grape marc waste can be obtained through the fermentation of sugars contained in the waste followed by distillation. The fermentation of grape marc waste stacks is an option that enables a large volume of alcohol to be recovered after distillation. Moreover, it provides financial profits, as winemakers may sell the recovered alcohol to the distillery industry to produce other alcoholic beverages.⁶ This biomass sold to distilleries for the production of alcohol might undergo a fermentation process as it is stored for several days or a few weeks, thus producing a percentage of ethanol between 4–10% without the addition of any substance.⁷

Grape marc is an organic waste with a considerable number of profitable value-added products such as ethanol, tartrates and malates, among others. The pulp and skin of the crushed grape can also be used as a raw material to produce pullulan, which is a polysaccharide employed in the cosmetics and food industry.⁸ In addition, it can be used as a sorbent of heavy metals, such as chromium, nickel and copper.^{9, 10} Several authors have studied the composting process of lignocellulosic winery waste using different combinations of grape waste and the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW), as well as the use of this waste as an organic fertilizer (e.g.,^{11, 12}). Although in-situ composting has potential environmental, agronomic and economic advantages

for the wine industry,¹³ when composting is carried out far from the production site, these advantages could become disadvantages, among them the increased cost of composting due to transportation costs. Composting also has other disadvantages such as odor emissions and the generation of a highly polluting leachate.

From an environmental perspective, grape marc waste has been used as a bioenergy feedstock for heat production although the drying and combustion processes require further improvements.¹⁴

After processing, grape marc waste can also be used as animal feed. Some authors, such as Alipour and Rouzbehan,¹⁵ monitored the chemical composition transformations of grape marc waste in order to study the effects of ensiling and the addition of polyethylene glycol during the deactivation of tannins in order to use the waste as livestock feed. The authors reported a reduction in the level of free tannins, but not in the case of bound tannins after ensiling, which decrease digestibility and could directly affect livestock productivity. Due to this problem, the use of grape marc waste as livestock feed has been ruled out, making it necessary to find alternative treatments.

Currently, anaerobic digestion is one the most important sustainable treatment technologies to valorize and stabilize abundant organic waste.¹⁶ This treatment produces biogas and a digestate which can be used as organic amendment, from organic waste.¹⁷ The biogas that is produced during the process is mainly composed of methane and carbon dioxide, which may be used to obtain electricity and heat.¹⁸

The aim of this study is to evaluate the recovery of grape marc waste by means of anaerobic digestion for the production of energy in the form of methane and the use of the stabilized digestate as an organic amendment. This research specifically focuses on Pedro Ximénez grape marc waste; an ecological crop variety of the Montilla-Moriles

Resultados y discusión/Results and discussion

Protected Designation of Origin (PDO). The problem with the wastes generated by the Montilla-Moriles PDO is very significant, as the production yield in this PDO is lower than the mean world yield. This is the case of the Pedro Ximénez sweet wine, whose production yield is approximately 2.68 kg grape/L, which means that it produces a higher volume of waste than other wine varieties. This waste is usually stacked up for transport to the distilleries, leading to the generation of greenhouse gases such as carbon dioxide and volatile organic compounds. Wine production and/or waste transport are associated to an energy-intensive consumption, mainly in the form of fossil fuels. As a novel aspect, this study evaluates the possibility of diminishing the carbon footprint of wineries in consonance with their ecological product policies. Additionally, the effect of the ecological crop over the quality of the organic amendment obtained (anaerobic digestate) has been assessed.

2 Materials and methods

2.1 Experimental set-up

The experimental set-up used for the anaerobic digestion of grape marc waste consisted of five 1-L Pyrex reactors (RA, RB, RC, RD, RE) operating in semi-continuous mode under mesophilic conditions through a thermostatic jacket of water at 37 °C. The reactor content was homogenized using a magnetic stirrer. The methane produced during the process was collected and the volume was measured using 1-L Boyle-Mariotte reservoirs connected to each reactor. Before measuring the methane (in a continuous way during each load), the CO₂ was removed by NaOH solution (6 N) contained in cylinders connected to the reactors and the reservoirs. The methane volume displaced an equal measurable volume of water from the reservoir. The reactors were inoculated with granular biomass obtained from the EMACSA water works company of Cordoba, Spain

(VS = 11,282 ± 210 mg/L), with a methanogenic activity of 60 ± 5 mL_{STP} CH₄/g VS·L·h (STP, 0 °C and 1 atm).

2.2 Grape waste

The grape marc waste used for this experiment was generated after pressing the grapes used for making Pedro Ximénez wine (Figure 1).

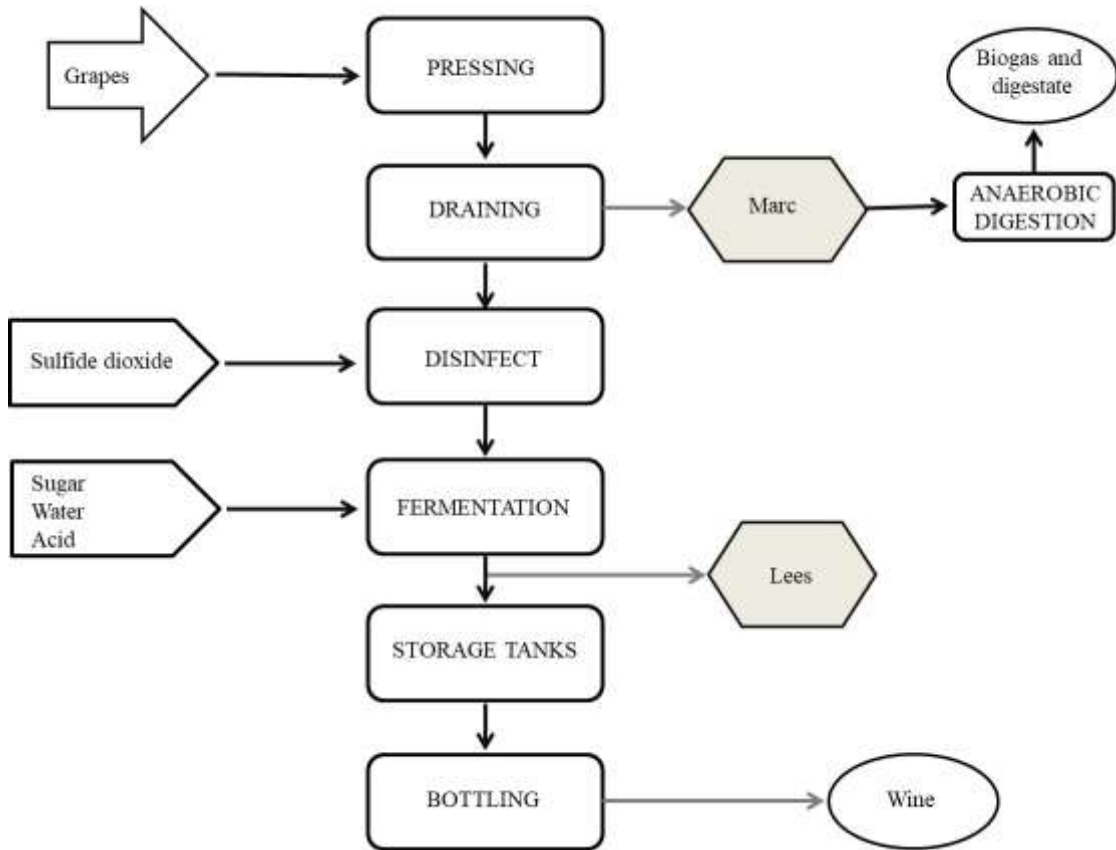


Fig. 1 Winemaking process flowchart.

The waste was provided by the Bodegas Robles Winery (Montilla, Cordoba, Spain), which belongs to the Montilla-Moriles PDO of Andalusia. Table 1 shows the analytical characterization of the waste used as substrate in this study.

Table 1. Analytical characterization of Pedro Ximenez grape marc

	Pedro Ximénez grape marc
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1135 ± 4
pH	3.59 ± 0.02
% Moisture	73.67 ± 0.28
COD (mg O₂/g dry weight)	1293 ± 20
TKN (mg TKN/g dry weight)	16.1 ± 0.8
N-NH₄⁺ (mg N-NH₄⁺/g dry weight)	1.40 ± 0.02
Total soluble phosphorus (mg P/g dry weight)	0.120 ± 0.003
TC soluble (mg/kg dry weight)	$564,755 \pm 100$
IC soluble (mg/kg dry weight)	1000 ± 50
TOC soluble (mg/kg dry weight)	$563,755 \pm 100$
TSN (mg/kg dry weight)	3260 ± 10
FS (g/kg dry weight)	125 ± 5
VS (g/kg dry weight)	874 ± 10
Cu (mg/g dry weight)	1.30 ± 0.18
Cr (mg/g dry weight)	10.96 ± 2.23
Ni (mg/g dry weight)	5.57 ± 0.55
Cd (mg/g dry weight)	1.85 ± 0.37
Pb (mg/g dry weight)	1.48 ± 0.18
Zn (mg/g dry weight)	5.39 ± 0.37
OD₂₄ (mg O₂/g VS)	477
SOUR max (mg O₂/g VS*h)	49

2.3 Anaerobic digesters: Experimental procedure

The reactors were inoculated with 7 g VS of methanogenically-active granular biomass obtained from the EMACSA waterworks company of Cordoba, Spain. In order to

activate the biomass prior to the experiments, the reactors were first fed with a synthetic medium (GAL medium) composed of glucose, sodium acetate and lactic acid at concentrations of 50 g/L, 25 g/L and 20.8 mL/L, respectively.¹⁹ During this initial period, the organic load added to the reactors was 0.50 g VS/L over a 21-day period.

After this activation stage, biomass acclimatization was carried out. The five reactors used were fed with 0.50 g VS/L composed of GAL and grape marc waste (50/50% VS). Five replicates were performed per load in each reactor and the percentage of grape marc waste in the mixture was increased from 50% to 100% over a 15-day period. Following this adaptation period, each reactor was loaded with 100% grape marc waste. The organic load added ranged from 0.50 g VS/L to 1.25 g VS/L, with increased loadings of 0.25 g VS/L each time, whereas the inoculum/substrate ratio varied within the range of 14.0 - 5.6. Up to seven replicates were carried out for each load. In all loads, the duration of each experiment was equal to the time interval required for total gas production. Additionally, the volume of methane was measured as a function of time and samples were taken and analyzed before and after feeding. All the experiments, including the start-up, biomass acclimatization and waste treatment, were carried out over a 64-day period.

2.4 Chemical analyses

The following parameters were determined in the effluents of the reactors at the end of each load and in the waste used as raw material: pH, alkalinity (Alk, mg CaCO₃/L), volatile acidity (VA_{DIS}, mg C/L), conductivity (μS/cm), chemical oxygen demand (COD, mg O₂/g dry weight), total solids (TS) (g TS/kg sample), fixed solids (FS) (g FS/kg sample), volatile solids (VS) (g VS/kg sample), total Kjeldahl nitrogen (TKN; mg N/g sample), total soluble phosphorus (TP mg P/g dry weight), total soluble organic carbon (TOC soluble; mg C/L), total soluble nitrogen (TSN; mg N/L), C₂-C₆ volatile

Resultados y discusión/Results and discussion

fatty acid by gas chromatography (VA_{GC} , mg C₂/L), metals (Cu, Cr, Zn, Ni, Pb, Cd) (mg/g dry weight), specific oxygen uptake rate (SOUR, mg O₂/g VS·h) and cumulative oxygen demand at 20 h (OD₂₀, mg O₂/g VS). All analyses were carried out in accordance with the Standard Methods of the APHA.²⁰

A Shimadzu model TOC-VCSH carbon analyzer was used to determine total soluble carbon (TC soluble), inorganic soluble carbon (IC soluble) and TOC, which is obtained as the difference between TC soluble (mg C/L) and IC soluble (mg C/L). The CO₂ generated by the catalytic oxidation of the carbon in the sample is detected by infrared spectrometry.

TSN was measured using a TOC-V CSH/CSN total organic carbon analyzer. The equipment used to analyze TSN is based on the combustion of the sample at 720 °C to decompose the total nitrogen into gaseous nitrogen monoxide. After the gas is cooled and dehumidified, it is detected using a chemiluminescence gas analyzer.

The content of short-chain volatile fatty acids (acetic, propionic, butyric, isobutyric, valeric, isovaleric and caproic acid) was determined using a Hewlett-Packard HP-560 gas chromatograph. The chromatograph is equipped with a 15 m x 0.53 mm (i.d.) Nukol silica semi-capillary column, a flame ionization detector and an oven to gradually increase the temperature from 100 to 150 °C at a rate of 4 °C/min.

Additionally, the aerobic biodegradability of the grape marc waste was evaluated using a static respirometer in liquid phase at laboratory scale. The respirometer was patented by the Chemical Engineering Research Group (RNM-271) of the University of Cordoba (Publication No. ES2283171 A1 of 16 October 2007). The respirometer consisted of a thermostatic bath and two 1-L Erlenmeyers, magnetically stirred at 300 rpm and two oximeters to monitor the oxygen content in the liquid phase, which was maintained between 6.8-7.0 mg/L through the injection of compressed air. Oxygen concentration

was measured and registered continuously by a data acquisition system. The respirometer test measured the cumulative oxygen demand (OD₂₄, mg O₂/g VS) at 24 h and maximum specific oxygen uptake rate (SOUR, g O₂/g VS·h). The OD and SOUR values were obtained by microbial respiration during the degradation of organic matter.

2.5 Calculation section

2.5.1 Organic loading rate (OLR)

In order to quantify the mass of grape marc waste to be treated under anaerobic conditions as a function of time and reactor volume (treatment capacity), the organic loading rate (OLR) was evaluated. In this experiment, OLR was calculated considering the concentration of substrate added to the reactors and the time required to reach 95% of the total methane production for each load (Eq. 1):

$$OLR = \frac{(Added\ load)}{t_{95}} \quad (Eq. 1)$$

where (*Added load*) is the concentration of grape marc waste added to the reactors (kg VS/m³) and *t*₉₅ time required (d) to reach 95% of the total methane production for each load.

2.5.2 Methane generation kinetics

According to the mathematical model proposed by Borja et al.,²¹ the following equation (Eq. 2) can be used to calculate the kinetics of methane production:

$$G = G_m \cdot (1 - \exp(-k \cdot t)) \quad (Eq. 2)$$

where *G* is the volume of methane accumulated (mL_{STP} CH₄/L), *G_m* is the maximum methane volume (mL_{STP} CH₄/L) in both variables measured under standard conditions (1 atm and 0 °C), *k* is an apparent kinetic constant (h⁻¹) and *t* is time (h). The *k* and *G_m*

Resultados y discusión/Results and discussion

values were calculated numerically from the experimental data obtained by Sigma-Plot software version 14.0.

In addition, according to the mathematical model, the methane production rate calculated as the time derivative of methane production (r_{CH_4} , mL_{STP} CH₄/L·h), which is crucial to evaluate the feasibility of the biomethanization process, was determined by the following equation:

$$\frac{dG}{dt} = r_{CH_4} = G_m \cdot k \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (\text{Eq. 3})$$

2.5.3 Energy production

The energy production from grape marc waste was calculated taking into account the methane yield. The energy yield values (kJ/kg VS) were calculated according to equation 4:

$$\text{Energy yield} = Y_{CH_4/S} \cdot LCP \quad (\text{Eq. 4})$$

where $Y_{CH_4/S}$ is the methane yield (m³ CH₄ STP/kg VS) and LCP is the lower methane calorific power (kJ/m³ STP). In addition, electric power was calculated for the optimal load (Eq. 5):

$$\text{Electric power} = \frac{r_{CH_4} \cdot LCP}{\text{Added load} \cdot V} \quad (\text{Eq. 5})$$

where V is the reactor volume (m³).

Heating power was calculated using equation 5 and then multiplied by the efficacy of the biogas engine to produce heat (η_c); where η_c is the energy efficiency of a biogas combustion engine to produce heat, respectively (29,25%) (Eder and Schulz (2007)).

$$\text{Heating power} = \text{Electric Power} \cdot \eta_c \quad (\text{Eq. 6})$$

2.6 Software

Sigma-Plot software version 14.0 was used to perform the statistical analysis of the experimental data obtained in the study and create the graphs.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of grape marc waste

In Andalusia, Spain, the production yields are lower than other regions due to the Montilla-Moriles PDO regulations, which establish that the proper pressure for juice extraction and separation of the grape marc cannot be in any event higher than 70 liters of wine per 100 kilograms of vintage.²²

The results of the characterization of the winery waste used in this research study are shown in Table 1. The pH was 3.59 ± 0.02 ; a low value which could be due to the high organic acid content in these wastes. These organic acids are related to the grape variety, crop soil, maturity stage, fermentation process and harvesting season.²³ The organic matter content was 874 ± 5 g of VS/kg dry weight due to its skin, pulp residues and lignocellulosic composition. This value is in accordance with the results obtained by other authors such as Bustamante et al.,²⁴ who studied the agrochemical characterization of solid by-products and waste from the winery industry.

The grape marc waste used in this experiment derived from organic wine grape crops in which nitrogen and phosphorus are not applied as chemical fertilizers in order to prevent environmental risks caused by leaching, especially risks to underground water resources. The TKN and TP concentrations (16.1 ± 0.8 mg TKN/g and 0.120 ± 0.003 mg P/g, both dry weight) were lower than the value reported by Karaka,²⁵ which were found to be 20.3 ± 1.8 g TKN/kg dry weight and 1.15 ± 0.25 g P/kg dry weight. These

Resultados y discusión/Results and discussion

results can be explained by the fact that the Bodega Robles Winery does not use chemical fertilizers but vegetation covers.

It is important to note that the heavy metal content in grape waste is influenced by the amendment used, the soil variety and the irrigation water. In this work, the concentration in heavy metals, such as Cd, Ni, Cu and Zn, was found to be lower than that reported by Karaka.²⁵ The major differences were found to follow the order Ni>Zn>Cu>Cd and ranged from 35.4 times higher for Ni to 1.3 times higher for Cd. The heavy metal concentrations are shown in Table 1 and are coincident with the results expected for organic vineyards.

Furthermore, Table 1 shows the SOUR (49 mg O₂/gVS·h) obtained for the substrate in the experiment. The area below the SOUR curve (mg O₂/gVS) vs. time (h) corresponds to the cumulative oxygen demand per gram of volatile solid added (OD₂₄, mg O₂/gVS) on a dry basis. This is respirometric variable, which is proportional to the biodegradability of the sample analyzed, has a value of OD₂₄ 477 mg O₂/gVS. These results show that grape marc waste is aerobically biodegradable, even more than other organic wastes such as organic fraction of municipal solid waste (312 mg O₂/g VS), according to Gutiérrez et al.²⁶ In spite of, aerobic and anaerobic processes have different metabolic pathways, some authors such as Buendía et al.²⁷ have tested a high linear correlation between aerobic and anaerobic biodegradability of substrates exists, making the aerobic test an adequate way to evaluate the feasibility of a substrate to be degraded. Therefore, grape marc waste is susceptible to be valorized by a biological treatment instead of being landfilled, as previously reported by Hungría et al.²⁸ In addition to these results, Lim et al.²⁹ showed that composting of organic waste from the Spanish wine industry caused a lower environmental impact than mineral fertilizers in terms of energy requirement. Although composting is less costly and easier than other waste

treatment methods, some studies have shown that solid fuel and biogas generation systems are more prevalent and profitable than composting systems, making the latter less desirable^{29, 30} studied the anaerobic digestion of grape marc waste as an energy source to meet the energy demands of refrigeration during wine fermentation. Compared to other thermal conversion technologies, such as gasification, anaerobic digestion was found to have lower energy requirements.

3.2 Anaerobic digestion of grape marc waste

3.2.1 Organic matter

In order to evaluate the development of the anaerobic process, the variation in the concentration of several variables related to the biodegradability of grape marc waste was monitored. One of these variables is the total organic matter content in the mixing liquor of each reactor, which is measured in g VS/L, and TOC soluble (mg C/L). Both variables were found to increase across the experiment, due to the enhancement of the organic load added to the reactors. An almost linear relationship with a slope of 206 mg C/g VS was observed between the variables. Moreover, all the data was within a 95% confidence interval (Figure 2A). Organic matter was observed to gradually accumulate in all the reactors with the loads. Specifically, when the loads were increased from 0.50 to 1.25 g VS/L, the concentration in VS increased from 7.36 ± 0.23 to 8.11 ± 0.24 g VS/L. As shown in Figure 2A, the soluble organic matter was found to be proportional to the total organic matter, thus indicating that 0.206 g C/g VS of the initial organic matter was not biodegraded. These results are in line with the values obtained for VFA in these experiments. Figure 2B shows the relation between VA_{GC} (mg C/L) and TOC soluble (mg C/L). As can be seen, the concentration of TOC soluble continued to increase and VFA shows an increasing trend with the TOC soluble within the range 5–

Resultados y discusión/Results and discussion

40 mg C/L, with acetic and isobutyric acid being the most frequent. This figure shows that the inhibition of the methanogenic archaea might be due to the accumulation of non-biodegradable substrate under the study conditions.

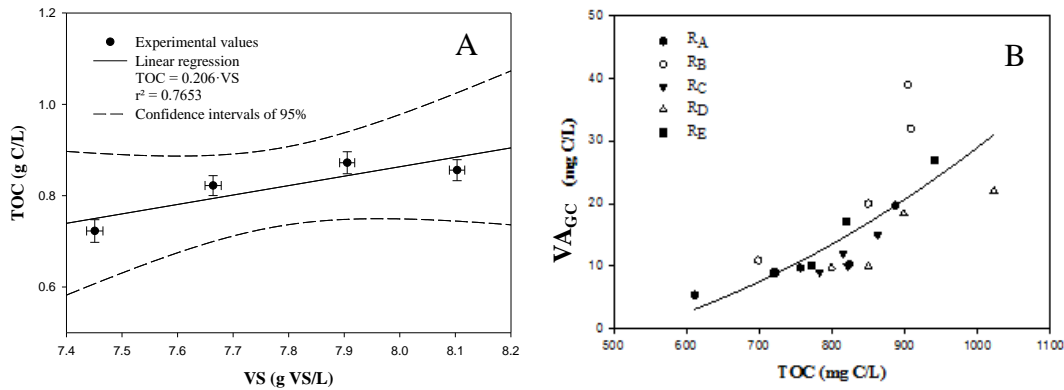


Fig. 2 (A) Relation between total organic carbon (mg C/L) and volatile solids (g VS/L). (B) Relation between volatile fatty acids (mg C/L) and total organic carbon (mg C/L).

As the load of substrate added to the reactors was increased, the concentration of VFA increased, which caused a slight decrease in the pH within the range 7.72 ± 0.06 and 7.15 ± 0.02 (Figure 3). These values are in line with those reported in the literature for the optimal pH range for methanogenic archaea under mesophilic conditions, which is 6.8 to 7.5.³¹ Figure 3 also shows the evolution of Alk (mg C/L), which slightly decreased at higher loads, although the range was within the optimal range of values reported by Parkin and Owen.³² In contrast, VFA always increased with the load, as can be seen in the figure.

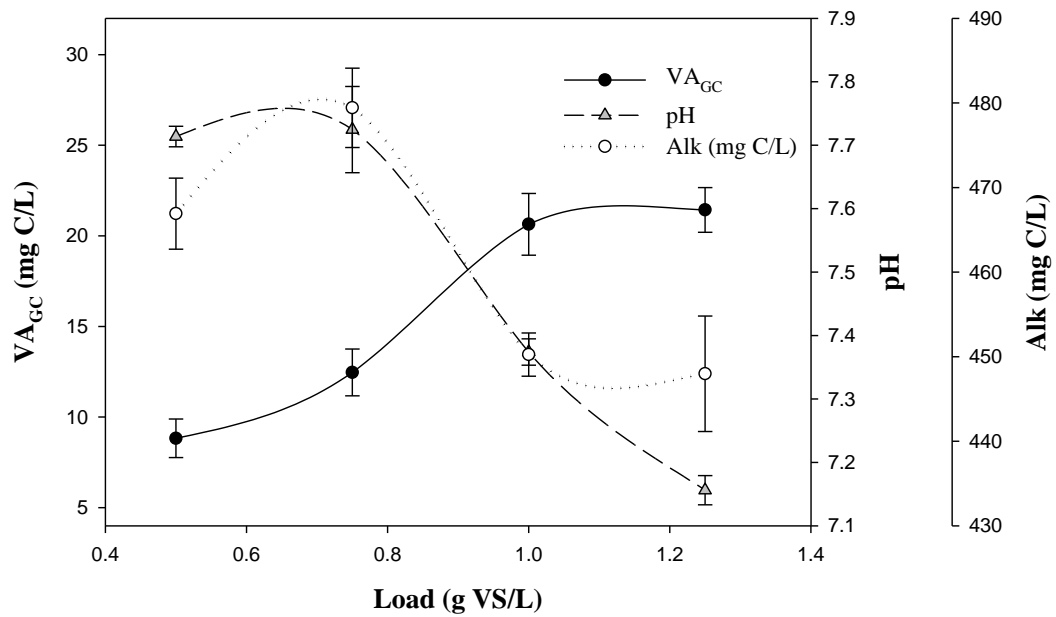


Fig. 3 Relation between volatile fatty acids (mg C/L) and pH with the loads (g VS/L).

As regards stability, the grape marc waste anaerobic digestion process was stable under the experimental conditions. Given the decreasing value of the carbon concentration of Alk, it is possible to conclude that the Alk species diminish as the carbon VFA increases (Figure 3).

3.3 Soluble nitrogen

An anaerobic treatment is a set of interactions between several microbial species and chemical reactions that occur during the process. The higher concentration or presence of certain substances, such as ammonia, could have an inhibitory or toxicity effect on the anaerobic process. These substances can come from the raw material or be produced during the degradation of the feedstock, such as the ammonia produced by the degradation of nitrogenous matter.³³ According to Liu and Sung et al.,³⁴ ammonia is beneficial to the anaerobic process at concentrations lower than 200 mg/L. The toxicity concentration varies across studies. According to Kayhanian,³³ a digester could operate

Resultados y discusión/Results and discussion

at concentrations of up to 1000 mg/L of total ammonia nitrogen without any inhibitory effect.

The presence of ammoniacal nitrogen in aqueous solution in the form of ammonium ion (NH_4^+) and un-ionized ammonia (NH_3) depends on the pH and temperature.³⁵ Moreover, the difference in the inhibitory effect of the free ammonia concentration depends on certain environmental conditions, such as the presence of ions like Na^+ , Ca^{+2} and Mg^{+2} , which might have an antagonistic effect on ammonia inhibition, light metal ions or the different adaptation of methanogens to inhibitory substances, among others.^{35, 36}

Free ammonia (FA) can be calculated attending to the concentration of N-NH_4^+ , pH and the temperature of the solution according to the formula proposed by Østergaard,³⁷ as shown in equation (1):

$$\frac{[\text{N-NH}_3]}{[\text{N-NH}_4^+]} = \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\left(0.09018 + \frac{2729.92}{T(K)}\right)}} \right)^{-1} \quad \text{(Eq. 7)}$$

where NH_3 is the concentration of FA (mg/L), N-NH_4^+ is the total ammonia concentration (mg/L) and T is the temperature (Kelvin).

The FA concentrations decreased with the loads and showed the same evolution as pH. FA values were found to be in the range 27–3 mg $\text{N-NH}_3/\text{L}$ across the experiment, as shown in Figure 4. The ammonia concentration decreased from 498 ± 28 to 215 ± 23 mg N/L . Obviously, as reactors work at a constant temperature and the pH also decreases, FA and N-NH_4^+ showed the same trend. In both cases, the observed concentration was far from the toxicity concentration previously reported by other authors.^{35, 38}

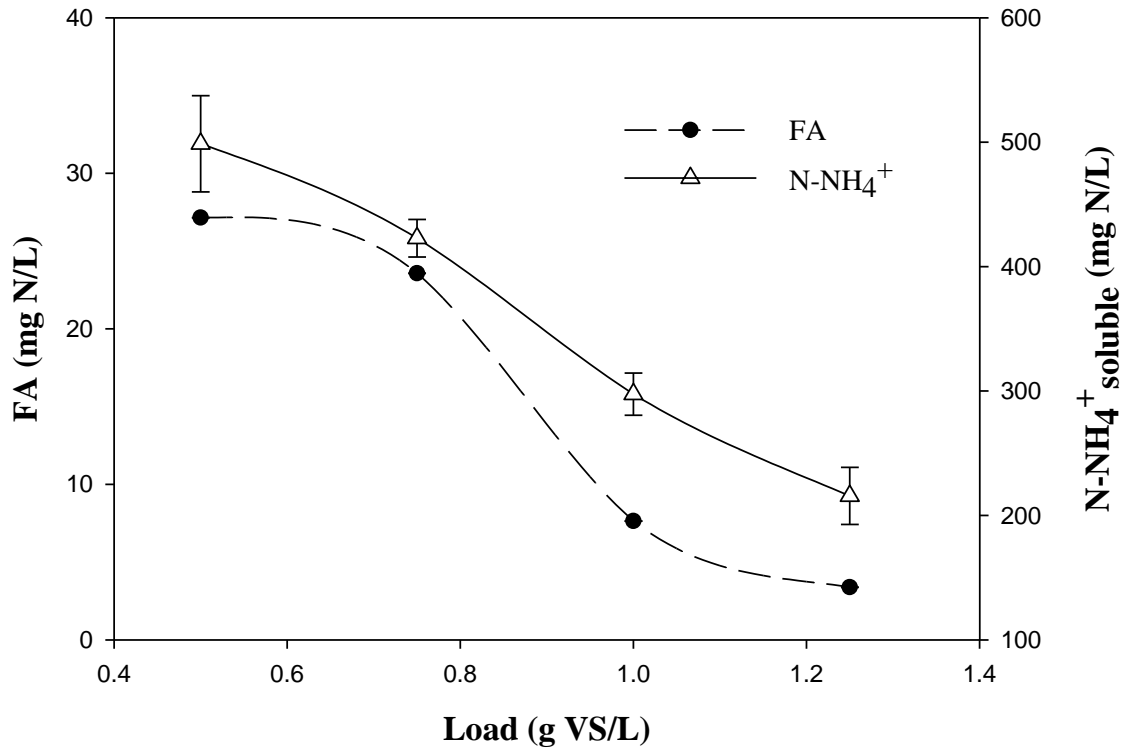


Fig. 4 Variation in free ammonia (mg N/L), N-NH₄⁺ soluble (mg N/L) and alkalinity (mg C/L) with the loads.

3.4 Methane yield coefficient

The methane yield coefficient ($Y_{CH_4/S}$) was determined from the experimental maximum methane volume produced (G_{exp}) and the load added to the reactors (g VS added/L). The highest methane production yield was 285 ± 21 mL_{STP} CH₄/g VS for the load of 0.75 g VS/L, while the lowest production yield was observed for the load of 1.25 g VS/L (215 ± 20 mL_{STP} CH₄/g VS) (Figure 5A). These values were slightly higher than those obtained by Dinuccio et al.,³⁹ who studied methane production from grape stalks under mesophilic conditions ($40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) and reported a biogas yield of 225 mL/g VS under standard conditions. However, Fabbri et al.⁴⁰ obtained different results using a white and red grape variety (Greco and Nero Buono, respectively). The authors found that the biogas yield was 340 mL_{STP}/g VS and 256 mL_{STP}/g VS for Greco grape skins and Nero

Resultados y discusión/Results and discussion

Buono skins, respectively. Moreover, they obtained different biogas yields using Greco grape stalks and Nero Buono seeds.

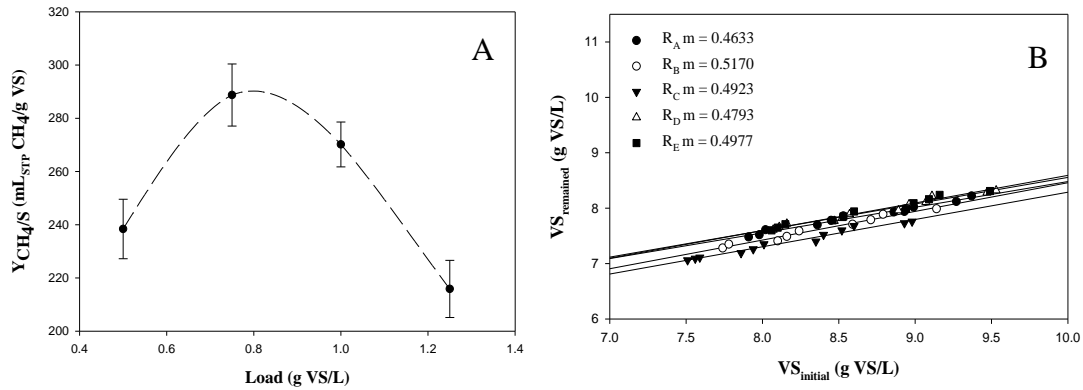


Fig. 5 (A) Methane yield coefficient ($Y_{CH_4/S}$) determined from the experimental maximum methane volume produced (G) and the load added to the reactors (g VS added). (B) Biodegradability of grape marc waste.

Some differences in biogas yield detected in studies on grape marc waste could depend on the variety and maturity stage of the grape used as raw material, which in turn depend on the winemaking process. The differences between several grape varieties can be considerable. Beres et al.⁴¹ studied the protein and soluble sugar contained in four grape crop varieties (Mario Mucato, Merlot, Pinot Noir, Marselan and Cabernet Sauvignon), which showed protein values ranging from 5.4 to 13.8 g/100 g dry matter and a soluble sugar concentration ranging from 1.34 to 77.53 g/100 g dry matter.

The $Y_{CH_4/S}$ value obtained in this study is similar to the value obtained by Carchesio et al.,⁴² who showed experimentally that grape seeds have a net methane production of 253 mL_{STP}/g VS in spite of the content of wax and lignin compounds. The authors demonstrated that grape marc waste is biodegradable despite the lignin and wax content, even when this fraction of waste requires solubilization and hydrolysis.

In our research, the $Y_{CH_4/S}$ value did not increase proportionally with the loads. The optimal load was found to be 0.75 g VS/L, which corresponds to an organic loading rate (OLR) of 1.016 kg VS/m³·d. In this case, the maximum $Y_{CH_4/S}$ obtained was 285 ± 12 mL_{STP}/g VS (Figure 5A).

Another variable of interest is the biodegradability of the waste. Anaerobic biodegradability was determined from the slope value of the linear representation of the remaining VS concentration against the initial VS concentration in the reactors (Figure 5B). As can be seen in the figure, a linear regression was fitted to each reactor, and showed the same trend with an average slope of 0.4899 ± 0.0201 g VS_{remaining}/g VS_{initial}. Thus, the mean biodegradability value of the grape marc waste was 51.01 ± 0.02 %, expressed as VS. This result is in accordance with the $Y_{CH_4/S}$ obtained in this experiment. The calculation was performed taking into account the COD/VS ratio in the substrate and that 1 g COD of a substrate cannot generate more than 350 mL_{STP} CH₄/g COD_{added} since a fraction of the removed COD is used to grow, maintain and metabolism of the microorganisms involved in the anaerobic digestion process.^{43, 44}

Other studies, such as Fabbri et al.,⁴⁰ obtained a biodegradability percentage of 70.52 % for Greco grape marc waste. However, the characteristics of the waste strongly depend on the winemaking activity and are very difficult to compare.

3.5 Kinetics of methane production

The kinetic study was carried out using the exponential mathematical model proposed in equation 2. The validation of the proposed mathematical model was quantified by determining the relation between the maximum accumulated volume of experimental methane (G_{exp}) and the theoretical value (G_m) (Figure 6A). The slope of the regression line, whose value is close to 1.0000 (0.9321) shows the accuracy of the mathematical

Resultados y discusión/Results and discussion

model to simulate the experimental results. In addition, 98% of the data are within an error band of 20%.

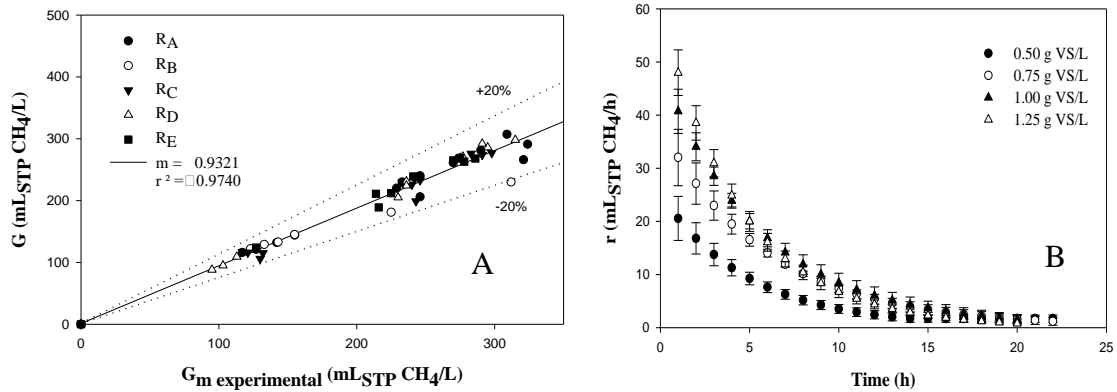


Fig. 6 (A) Validation of mathematical model determined from the experimental maximum methane volume produced (G) and the maximum volume of methane (G_m) (mL_{STP} CH₄/L). (B) Methane rate production as a function of experimental time (mL_{STP} CH₄/L·h).

On the other hand, as can be seen in Figure 6B, the methane production rate decreases continuously (Eq. 3), with a large difference observed between 0.50 g VS/L and the rest of the loads. The trend of the methane rate was asymptotic, so no substantial changes were found within the range 10–15 h. In terms of methane yield, the optimal selected load was 0.75 g VS/L (equivalent to an OLR of 1.20 kg VS/m³·d). However, as 0.75 g VS/L was not the highest load, it might be convenient to choose a global criterion for the operational conditions.

3.6 Energy production

The energy production from grape marc waste was calculated taking into account the methane yield production. The net energy-economic benefit was a good criterion to select the operational conditions.

Resultados y discusión/Results and discussion

The economic assessment estimation was made based on six assumptions. (1) According to Figure 5B, 15 hours was the time required in all the experiments to decrease the methane rate production and also to produce the most methane. (2) The OLR has been quantified at 15 hours, with 0.050 kg VS/m³·h being the value for the optimal load 0.75 g VS/L. (3) The electrical and calorific efficiencies, which are calculated based on biogas combustion, are 35% and 29.25%, respectively.^{45, 46} (4) The maximum energy yield produced is to be calculated using the methane yield production maximum reached experimentally. (5) 1000 kg of grape marc waste per day is the calculation basin. The time required for the start-up of the digester would be 30–60 days depending on some factors such as date of the harvest, quality of the waste and company criteria. (6) Finally, the price of electricity and heat was established at €0.119/kWh and €0.071/kWh, respectively.⁴⁷

Table 2 shows the energy balance according to the previous assumptions. To achieve optimal digester stability and methane production, some fossil fuel or remnant biogas is necessary to warm up the biodigester during the initial period (start-up). The influent, which is grape marc waste suspended in water, needs to reach the operational temperature (from 20 °C to 35 °C). The cost of heating power depends on the amount of water used for the waste suspension. If full heating power is used for influent warming, the solid concentration in the influent should not exceed 24%.

Resultados y discusión/Results and discussion

Table 2. Previous assumptions and experimental data

Assumptions	
Electricity efficiency (%)	35.00
Heat production efficiency (%)	29.25
Electricity price (€/kWh)	0.119
Heat price (€/kWh)	0.071
Experimental data (grape marc waste)	
Load concentration (g VS/L)	0.75
OLR (kg VS/m ³ ·d)	1.20
Moisture (%)	73
Energy generation	
Energy yield (kJ/kg VS) (Eq. 4)	10880
Electrical power (kW/ton _{gmw} wet weight) (Eq. 5)	3.63
Heating power (kW/ton _{gmw} wet weight) (Eq. 6)	3.03
Design calculation	
Treatment flow (ton _{gmw} wet weight/d)	1
Start-up cost	
Depends on the used fossil fuel or remnant biogas	-
Benefits	
Electrical economic benefit (€/ton _{gmw} wet weight)	0.43
Heat economic benefit (€/ton _{gmw} wet weight)	0.21

The real benefit would be to use the electric power (e.g., in the company itself, at on-site facilities or by selling the energy, etc). The electric power was 3.63 kW/ton_{gmw} in wet

weight. Thus, given the price of electricity, the net economic balance would be €0.43/ton_{gmw} in wet weight.

Taking into consideration the economic assessment carried out in this research and European Union subsidies to implement renewable energies, the anaerobic digestion of grape marc waste would be an excellent alternative treatment since biomethanization produces low-volume residues of high value, such as organic fertilizer, as well as electricity and heat, which improve the economics and sustainability of the winemaking process. In addition, the rest of the winemaking waste such as lees, which are produced during different seasonal along the year and can be easily stored, might be used as complementary substrates to be treated, allowing a continuous operation mode in the winery waste treatment facilities.

4. Conclusions

- Anaerobic digestion was stable across all loads. VFA increased, FA decreased and Alk did not modify pH significantly with increasing loads. The average biodegradability was 51%.
- The optimal operational conditions were 0.75 g VS / L, which is equivalent to an OLR of 0.050 kg/h·m³.
- By burning the biogas, it is possible to generate an electrical power of 3.63 kW/ton_{gmw}, which could be transformed into €0.43/ton_{gmw} depending on the electricity price. Part of the heat generated might be used to maintain the reactor temperature.
- The maximum yield methane coefficient obtained was 65.55 ± 2.76 L_{STP}/ ton_{gmw}, with a biodegradability of $51.01 \pm 0.02\%$, under these experimental conditions. Even so,

Resultados y discusión/Results and discussion

further studies might be required to evaluate the viability of scaling-up the biomethanization process to industrial scale.

Acknowledgements

The authors are very grateful to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project CTQ2014-60050-R), the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (Grant FPU2013) for funding this research. The authors would also like to thank BODEGAS ROBLES S.A. (Montilla, Cordoba, Spain) for supplying the grape marc waste and to Inmaculada Bellido and María Luisa López for their contribution to this research.

References

- 1 - Castellucci, F. World Vitiviniculture situation in 2012. In: XXXVIth World Congress of Vine and Wine. Bucarest, (3rd June 2013).
- 2 - OIV, State of condition report, October (2015).
- 3 - Sessa, M.; Casazza, A. A.; Perego, P.; Tsao, R.; Ferrari, G.; Donsì, F. Exploitation of polyphenolic extracts from grape marc as natural antioxidants by encapsulation in lipid-based nanodelivery systems. *Food Bioprocess Technol.* **6**, 2609-2620 (2012).
- 4 - OIV, State of condition report, (2013).
- 5 - MAGRAMA. Sub-Directorate General for Statistics Ministry of Agriculture, Food and Environment (in Spanish) (Publication date 15/12/2015).
- 6 - Buglass, A.J. Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects. John Wiley & Sons, Chichester, UK. (2015).

7 - Cortés, S., Salgado, J.M., Rodríguez, N., Domínguez, J.M. The storage of grape marc: Limiting factor in the quality of the distillate. *Food control*. **21**, 1554-1549 (2010).

8 - Arvanitoyannis, I.S., Ladas, D., Mavromatis, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *Int J Food Sci Tech*. **41**,475-487 (2016).

9 - Chand, R., Narimura, K., Kawakita, H., Ohto, K., Watari, T., Inoue, K. Grape waste as a biosorbent for removing Cr (VI) from aqueous solution. *J Hazard Mater*. **163**, 245–250 (2009).

10 - Villaescusa. I., Fiola. N., Martínez, M., Miralles, N., Poch, J., Serarols, J. Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions by grape stalks wastes. *Water Res*. **38** (4) 992–100 (2004).

11 - Ferrer, J., Páez, G., Mármol, Z., Ramones, E., Chandler, C., Marín, M., Ferrer, A. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresource Technol*. **76**, 39-44 (2001).

12 - Paradelo, R., Modes, A.B., Barral. M.T. Evolution of organic matter during the mesophilic composting of lignocellulosic winery wastes. *J Environ Manage*. **116**, 18-26 (2013).

13 - Ruggieri, L., Cadena, E., Martínez-Blanco, J., Gasol, C.M., Rieradevall, J., Gabarrell, X., Gea, T., Sort, X., Sánchez, A. Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *J Clean Prod*. **17**, 830–838 (2009).

Resultados y discusión/Results and discussion

14 - Benetto, E., Jury, C., Kneip, G., Vázquez-Rowe, I., Huck, V., Minette, F. Life cycle assessment of heat production from grape marc pellets. *J Clean Prod.* **87**, 149-158 (2015).

15 - Alipour, D., Rouzbehan, Y. Effects of ensiling grape marc waste and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial biomass yield. *Anim Feed Science and Technology.* **137**, 138–149 (2007).

16 - Gil, A., Siles, J. A., Martín, M. A., Chica, F. A., Estévez-Pastor, F. S., Toro-Baptista, E. Effect of microwave pretreatment on semi-continuous anaerobic digestion of sewage sludge. *Renew Energ.* **115**, 917-925 (2018).

17 - Zhang, Q., Hu, J., Lee, D. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. *Renew Energ.* **98**, 108-119 (2016).

18 - Castellucci, S., Cocchi, S., Allegrini, E., Vecchione. Anaerobic digestion and co-digestion of slaughterhouse wastes. 2013, *J Agr Eng Res.* **44**, 526-530 (2013).

19 - Serrano, A., Siles, J.A., Martín, M.A., Chica, A.F., Estévez-Pastor, F.S., Toro-Baptista, E. Improvement of anaerobic digestion of sewage sludge through microwave pre-treatment. *J Environ Manage.* **177**, 231-239 (2016).

20 - APHA, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th 6 ed.). Washington, DC: American Public Health Association, (1989).

21 - Borja, R., Martín, A., Banks, C.J., Alonso, V., Chica, A. A kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environ pollut.* **88**, 13-18 (1995).

22 - BOJA (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía) 22 de diciembre de 2011, Núm. 249. Página núm. 155.

23 - Vogt, E., Jakob, L., Lemperle, E., Weiss, E. El vino: obtención, elaboración y análisis (Wine: Obtaining, production, and analysis). Acribia S.A. (Ed.), Zaragoza, p. 294 (1986).

24 - Bustamante, M., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manage.* **28**, 372–380 (2008).

25 - Karaka, A. Effect of organic wastes on the extractability of cadmium, copper, nickel, and zinc in soil. *Geoderma.* **122**, 297-303 (2004).

26 - Gutiérrez, M.C. Siles, J. Diz, J., Chica, A.F., Martín, M.A. Modelling of composting process of different organic waste at pilot scale: Biodegradability and odor emissions. *Waste Manage.* **59**, 48–58 (2017).

27 - Buendía, I.M., Fernández, F.J., Villaseñor, J., Rodríguez, L. Biodegradability of meat industry wastes under anaerobic and aerobic conditions. *Water Res.* **42**, 3767-3774 (2008).

28 - Hungría, J., Gutiérrez, M.C., Siles, J.A., Martín, M.C. Advantages and drawbacks of OFMSW and winery waste co-composting at pilot scale. *J Clean Prod.* **164**, 1050-1057 (2017).

29 - Lim, S.L., Lee, L.H., Wu, T.Y. Sustainability of using composting and vermicomposting technologies for organic solid waste biotransformation: recent

Resultados y discusión/Results and discussion

overview, greenhouse gases emissions and economic analysis. *J Clean Prod.* **111**, 262-278 (2016).

30 - Cáceres, C., Cáceres, R., Hein, D., Molina, M., Pia, J. Biogas production from grape pomace: Thermodynamic model of the process and dynamic model of the power generation system. *Int J Hydrogen Energ.* **37**, 10111-10117 (2012).

31 - Martí, N. Phosphorus precipitation in anaerobic digestion process. Dissertation.com. Boca Raton, Florida (2006).

32 - Parkin G.F. and Owen W.F. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. *J Env Eng Div ASCE.* **112**, 867-920 (1986).

33 - Kayhanian, M. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: an overview and practical solutions. *Environ Technol.* **20**, 355–365 (1999).

34 - Liu, T., Sung, S. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. *Water Sci Technol.* **45**, 113–120 (2002).

35 - Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technol.* **99**, 4044-4064 (2008).

36 - De Baere, L.A., Devocht, M., van Assche, P., Verstraete, W. Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic associations. *Water Res.* **18**, 543–548 (1984).

37 - Østergaard, N. Biogasproduktion i det thermofile temperaturinterval. STUB rapport nr. 21. Kemiteknik Dansk Teknologisk Institut, Taastrup (1985).

38 - Sung, S., Liu, T. Ammonia inhibition on thermophilic digestion. *Chemosphere.* **53**, 43–52 (2003).

39 - Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., Menardo, S. Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresource Technol.* **101**, 3780-3783 (2010).

40 - Fabbri, A., Bonifazi, G., Serranti, S. Micro-scale energy valorization of grape marc wastes in winery production plants. *Waste Manage.* **36**, 156–165 (2015).

41 - Beres, C., Costa, G. N.S., Cabezudo, I., da Silva-James, N.K., Teles, A.S.C., Cruz, A.P.G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R.V., Cabral, L.M.C., Freitas, S.P. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manage.* **68**, 581-594 (2017).

42 - Carchesio, M., Tatàno, F., Lancellotti, I., Taurino, R., Colombo, E., Barbieri, L. Comparison of biomethane production and digestate characterization for selected agricultural substrates in Italy. *Environ Technol.* **35**, 2212-2226 (2014).

43 - Martín, M.A., Fernández, R., Serrano, A., Siles, J.A. Semi-continuous anaerobic co-digestion of orange peel waste and residual glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Waste Manage.* **33**, 1633-1639 (2013).

44 - Wheatley. *Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology*. Elsevier. London (1990).

45 - Reza Baratia, M., Aghbashloa, M., Ghanavatib, H., Tabatabaeib, M., Sharifia, M., Javadiradd, G., Dadaka, A., Mojarab Soufiyana, M. Comprehensive exergy analysis of a gas engine-equipped anaerobic digestion plant producing electricity and biofertilizer from organic fraction of municipal solid waste. *Energ Convers Manage.* **151**, 753–763 (2017).

Resultados y discusión/Results and discussion

46 - Eder, B., Schulz, H. Biogas Praxis – Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit. Ökobuch Verlag, Staufen (2007).

47 - EUROSTAT. 2015. http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Electricity_price_statistics (accesed 11/11/2017).

Descripción del artículo: “Technical evaluation and potential energy recovery from anaerobic digestion of grape lees: inoculum importance”

La industria del vino es una de las más extendidas en todo el mundo, distribuidas, normalmente, en forma de Denominaciones de Origen Protegido, constituidas a su vez por bodegas más pequeñas, cuya actividad genera residuos y problemas medioambientales. Denominaciones de origen, como la DOP Montilla-Moriles de Córdoba, España, tienen una producción de 33,5 toneladas de Pedro Ximenez *cv*. En este trabajo se ha evaluado la viabilidad de la digestión anaerobia mesófila de las lías de esta variedad de uva, utilizando dos inóculos de distinta procedencia (industria cervecera y papelera). Bajo las condiciones experimentales mesófilas ensayadas, el inóculo granular, procedente de la industria cervecera, obtuvo una biodegradabilidad superior a 79%, sin diferencias significativas con respecto al inóculo no granular, que fue del 78%. Por otro lado, la producción de metano fue de $96,35 \pm 8,22$ y $92,64 \pm 10,03$ NL CH₄/kg de lías, utilizando el inóculo granular y no granular, respectivamente.

Los resultados obtenidos en este estudio, transformados en datos energéticos y de emisiones, se estiman en la generación de una potencia eléctrica de 1,29 kW·h/día y una reducción en las emisiones de CO₂ de 2,45 toneladas de CO₂/año, para este residuo y en esta Denominación de Origen Protegido.



Technical evaluation and potential energy recovery from anaerobic digestion of grape lees: inoculum importance.

Hungría J., Siles J.A., Gutierrez M.C, Chica A.F., Martín M.A.*

Department of Chemical Engineering, University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Ctra. N-IV, km 396, building Marie Curie (C-3), CP/14071 Córdoba, Spain.

*Corresponding author: Email: iq2masam@uco.es; phone: +34 957212273

Abstract

Wine industry is one of the most common industries across the world in form of Designation of Protected Origin formed by smaller wineries, whose activity generates waste and environmental problems. Designations of origin, such as the Montilla-Moriles PDO of Cordoba (Spain) produces wine with Pedro Ximenez cv, principally. Lees from this grape variety was evaluated under mesophilic conditions in anaerobic digestion, using two different inoculums to compare the differences associated to the use of different inoculums. Using lees as raw material and brewery industry inoculum showed the best behaviour with a biodegradability higher than 79% and a methane yield production of $96.35 \pm 8.22 \text{ L}_{\text{STP}} \text{ CH}_4/\text{kg}$ wine lees. The anaerobic process of grape lees was stable under study conditions, with an Organic Loading Rate maximum of $102.79 \text{ kg lees}_{\text{dry weight}}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$. These results might lead to obtain an electric power as high as 1.29 kWh/day and a saving CO_2 emissions of $2.45 \text{ tonnes CO}_2/\text{year}$ in this Designation of Protected Origin.

Keywords: Biomethanization; Grape lees; Grapes, organic crop, energy assessment.

1. Introduction

World area planted with vines, including those which were not producing yet in 2016 was 7.1 millions of hectares, corresponding 3.44 of them to Europe. The world production of wine, excluding juice and must, was 27.44 million of cubic meter (Mm³) in 2015, being Spain the third country manufacturer with 3.72 Mm³, remaining the 13.5% of the worldwide production in 2015, (OIV, 2016).

Although vine crop is a seasonal crop, this agricultural activity represents 10% of the total agricultural production in Spain. Italy, France and Spain produce 15.9, 14.8 and 13.5% of the global volume of wine produced, respectively (OIV, 2017). This agricultural practice produces large volume of waste: grapes stalks, seeds, skins, lees and wastewater. Spain generates a volume of wine wastewater (18×10^6 m³/year approximately), six times higher than the first and second countries wine producer, Italy and France respectively (Rivas et. al., 2006). The grape harvest in Spain was 5.93 million of tonnes (Mt) in 2016 of which 3.20 Mt was used to make wine (FAOSTAT). The winemaking process in Spain, generated approximately 0.416 Mt of marcs, 0.192 Mt of lees, 0.096 Mt of stalks and 5.28 m³ of wastewater in 2012, according to the results obtained by Oliveira and Duarte (2014), who studied the residues derived from the winemaking process in wineries.

Grape lees is a winemaking waste from wine fermentation. Lees have a large concentration of highly biodegradable organic compounds, such as organic acids, yeast, proteins, etc. (Zhihui et al., 2008). The composition of wine lees depends on several parameters such as winemaking process, grape variety, temperature conditions in the winery, etc. It is worth noting that the winemaking process of red wine is carried out by the fermentation of the must with marc grape (seeds, stalks and skins grape), known as

maceration stage. This stage brings aroma, flavor and other organoleptic characteristics to the wine, and also to the lees generated. However, during the winemaking of white wine, the must is separated from the seeds and skins after crushing. The must obtained after crushing of white grape is rested in tanks to precipitate the solid particles to the bottom. This settled residue comes from wine alcoholic fermentation after crushing grapes in the winery. Alcoholic fermentation is a biological process that takes place under anaerobic conditions, caused by the activity of some microorganisms that process carbohydrates (sugars, as a general rule) to obtain ethanol, carbon dioxide and some ATP molecules that the microorganisms themselves consume in their anaerobic energy cellular metabolism. Consequently, the winemaking differences between white and red wine elaboration such as the maceration cause differences in lees compositions (i.e. metals concentration) (Bustos et al., 2004).

Usually, wine lees applications are to recover ethanol by distillation to produce liquors. In fact, in the most of case, distilleries buy the lees grape to the winery, converting it in a by-product. Before distillation, grape seeds are separated from lees to sold it to extract oil, as well as marc are separated, dried and used such as fuel in the boiler to distillate lees. Other application of lees is to recover tartaric acid. This acid is very common in this residue and has properties very interesting for food industry. Tartaric acid is applied as natural acid in beverages, candies, jams, etc. (Versary et al., 2001). These authors reported good yields for the extraction of tartaric acid from grape lees (83%). However, further studies were required to improve the procedure in terms of reducing the process cost (Salgado et al., 2010). Nevertheless, after the extraction of tartaric acid, highly polluted wastewater is generated and efficient treatment is required before spilling.

In addition, the application of lees grape as soil fertilizer has been also studied, but their pH and content in phenolic compound might have negative effects on soil physico-

chemical properties. Phenolic compounds control many aspects of plant-soil interaction, and play a role as intermediary in humus formation interactions (Muscolo et al. 2001).

Anaerobic digestion shows several advantages as non-conventional treatment of different agrifood waste, producing biogas, which can be used as sustainable energy to produce heating and electricity due to the heating value specific of methane (35.793 kJ/m³, under standard temperature and pressure conditions (STP), 1 atm and 0 °C)(Wheatley,1990).

As a result of this economic and environmental potential benefits, this research focuses on studying the technological viability of the biomethanization of grape lees. Also the CO₂ emissions saving in a winery has been evaluated, with the aim to reduce the environmental impacts in the vine region and provide other economical industry in this rural area, which might chance the opportunity of an increased economic viability.

The problem associated to winemaking wine is very important in countries where there is a consolidated wine tradition, like France, Italy or Spain. In Spain there are 89 production areas of quality wines with 67 Designation of Protected Origin (DPO) in 2014, according to Pérez-Bibbins et al., (2015). Some of them have started to produce their wines under ecological conditions, so it is very important for them, research other possibilities to treat their residues, within the frame of circular economy.

As a result of these environmental problems associated to winemaking process, and taking into account the development of an increasingly restrictive legislation, the objective of this work is the technological evaluation of the biomethanization of wine lees, coming from the PX variety of organic crop, as the most representative variety from the PDO Montilla-Moriles (31.7 tonnes of 33.5 tonnes of total production) (Consejo Regulador PDO Montilla-Moriles, 2017).

2. Materials and methods

2.1 Experimental set-up

The biogas production from wine lees was quantified using three 1-L Pyrex reactors in batch mode maintained under mesophilic conditions by means of a thermostatic jacket containing water at 37 °C. The content of reactors was homogenized by a magnetic stirrer. The biogas produced during the anaerobic process contains CO₂, which is removed in a tightly closed bubblers containing a NaOH solution (6 N) were connected between the reactor and 1-L Boyle–Mariotte reservoirs. The volume of methane produced was quantified by water displacement. The reactors were inoculated with two different inoculums. One of them belonged to brewery industry (Waterleau), while the other one belonged to the paper industry, obtained from EMACSA S.L (Córdoba, Spain) ($14,885 \pm 1966$ and $89,533 \pm 404$ mg/L mg VS/L, respectively), and a methanogenic activity of 84 ± 3 and 136 ± 5 mL_{STP} CH₄/g VS·h (STP, 0 °C and 1 atm).

2.2 Anaerobic digesters. Experimental procedure

Three anaerobic reactors were initially loaded with 7 g VS of two different inoculum,s belonging to paper and brewing industry. In order to activate the biomass prior to the experiments, the reactors were first fed with a synthetic medium (GAL medium) composed of glucose, sodium acetate and lactic acid at concentrations of 50 g/L, 25 g/L and 20.8 mL/L, respectively (Serrano et al., 2014). During this initial period, the organic load added to the reactors was increased gradually from 0.50 to 1 g VS/L over a 17-day period in total.

After this initial stage, biomass acclimatization was carried out. The three reactors were fed with 0.50 g VS/L composed of GAL (0.25 g VS/L) and wine lees (0.25 g VS/L).

Then, next load contained a mixture of 0.125 g VS/L of GAL and 0.375 g VS/L of wine lees. This step took a 15-day period in total. After this adaptation period, each reactor was loaded with 100% grape lees. The organic load added was increased by 0.5 g VS/L from 1.0 g VS/L to 3.5 g VS/L. Two repetitions were carried out for each loading and reactor, till achieve the maximum gas production. The limiting factor was the time interval required for maximum gas production, which was the duration of each experiment. Finally, the volume of methane was measured as a function of time and samples were taken and analyzed before and after feeding. All the experiments, including the start-up, biomass acclimatization and waste treatment, were carried out over a 59 days period. The time required to exhaust biogas production from each load carried out length from 6 hours (0.75 g VS GAL/L) to 27 hours, approximately (3.5 g VS/L).

2.3 Calculation section

2.3.1 Organic loading rate (OLR)

In order to quantify the amount of wine lees to be treated under anaerobic digestion, has been evaluated the treatment capacity, determined by the organic loading rate (OLR), which relates the amount of the waste added to the reactor with its volume and time. In this experiment, OLR was calculated considering the substrate concentration added to the reactors and the time required to reach 95% of the total methane production for each load.

$$\text{OLR} = \frac{[\text{Added load}]}{t_{95}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where *[Added load]* is the mass of waste mixture added to the reactors (kg VS) and t_{95} time required (d) to reach 95% of the total methane production for each load.

2.3.2 Generation Methane kinetics

The mathematical model proposed by Borja et al. (1995) shown in Eq. (2), has been used to calculate the kinetic methane production:

$$G = G_m \cdot [1 - \exp(-k \cdot t)] \quad (\text{Eq. 2})$$

where G is the volume of methane accumulated, G_m is the maximum methane volume ($\text{mL}_{\text{STP}} \text{CH}_4/\text{L}$) in both variables per liter of reactor measured under standard conditions (1 atm and 0 °C), k is an apparent kinetic constant (h^{-1}) and t is time (h). The k and G_m values were calculated numerically from the experimental data obtained.

According to the mathematical model, the methane production rate calculated as the time derivative of methane production (r_{CH_4} , $\text{mL}_{\text{STP}} \text{CH}_4/\text{L} \cdot \text{h}$), which is crucial to evaluate the feasibility of the biomethanization process, calculated by the following equation:

$$\frac{dG}{dt} = r_{\text{CH}_4} = G_m \cdot k \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (\text{Eq. 3})$$

2.3.4 Electric power

The value of electric power (kW/ton) was obtained from the methane rate production ($\text{mL}_{\text{STP}} \text{CH}_4/\text{h}$) and the Lower Calorific Power (LCP) for methane (11,973 kcal/kg) (Eq. 4), where η_c and η_e is the energy efficiency of a biogas combustion engine to produce electricity and heat, respectively (35% and 85%, respectively) (Reza et al. (2017); Eder and Schulz (2007)), f_c is the operational hours (0.9 h) and ρ is the density of the methane ($0.656 \text{ kg CH}_4/\text{m}^3$) at 25 °C and 1 atm of pressure. The following equation was employed to calculate the electric power:

$$\text{Electric power} = r_{\text{CH}_4} \cdot \text{LCP} \cdot \eta_c \cdot \eta_e \cdot f_c \cdot \rho \quad (\text{Eq. 4})$$

2.3.5 Saving CO₂ emissions

It is possible saving CO₂ emission by using alternative energies as biogas derived from AD. The CO₂ saving (tonnes of CO₂/year) in form of biogas captured has been calculated using equation 5,

$$\text{Saving CO}_2 = [Y_{\text{CH}_4/\text{S}} \cdot X_{\text{lees}} \cdot T_p \cdot 21] + [\text{Electric power} \cdot F_{\text{EE}}] \quad (\text{Eq. 5})$$

where $Y_{\text{CH}_4/\text{S}}$ is the methane yield production (mL_{STP} CH₄/g VS), X_{lees} is the production of lees per ton of grapes (ton lees/ton grape), T_p is the total production of grapes (tonne/year), LCP is the Lower Calorific Power of methane (35,793 kJ/m³), and F_{EE} is the emission factor of CO₂ to produce electricity in Spain (0.392 kg CO₂/kW·h) (Ministry of Industry, Energy and Tourism (2018)).

2.4 Physico-chemical characterization

The following parameters were determined in the effluents of each load and/or in waste as raw material for its initial characterization: pH, Alkalinity (Alk, mg CaCO₃/L), Volatile Acidity (VA_{dis}, mg C/L), Conductivity (μS/cm), Chemical Oxygen Demand (COD, mg O₂/g dry weight), Fixed Solids (FS) (g FS/kg sample), Volatile Solids (VS) (g VS/kg sample), Total Kjeldahl Nitrogen (TKN; mg N/g sample), Total Organic Carbon (TOC; mg C/L), Total Soluble Nitrogen (TSN; mg N/L), Volatile Fatty Acid (VFA_{GC}; mg C/L) by gas chromatography, Metals (Cu, Cr, Zn, Ni, Pb and Cd) (mg/g dry weight). All analyses were carried out in accordance with the Standard Methods of the APHA (1989).

A Shimadzu model TOC-VCSH carbon analyzer was used to determine TOC. The method is based on the catalytic oxidation of all the carbon present in the sample to CO₂ and the subsequent detection of CO₂ by infrared spectrophotometry.

The total soluble nitrogen (TSN) was measured with the Total Organic Carbon Analyzer TOC-V CSH/CSN. The operating of the equipment for the analysis of TSN is based on the combustion of the sample at 720 ° C to decompose the total nitrogen into gaseous nitrogen monoxide. This gas cools and dehumidifies, detecting it with a chemiluminescent gas analyzer.

Separate volatile fatty acids (acetic, propionic, butyric, isobutyric, valeric, isovaleric, and caproic acids) were determined using a Hewlett-Packard HP-5890 gas chromatograph equipped with a 15 m -0.53 mm (i.d.) Nukol-silica semicapillary column and a flame ionization detector. The oven temperature was gradually increased from 100 to 150°C at a rate of 4°C/min. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min.

Additionally, the microbiological activity of the raw material was analyzed by means of a respirometric test carried out with a static-respirometer in liquid phase at laboratory scale. The respirometer was patented by the Chemical Engineering Research Group (RNM-271) of the University of Cordoba (Publication No. ES2283171 A1 of 16 October 2007). The respirometric variables determined were maximum specific oxygen uptake rate (SOUR, mg O₂/g VS·h) and cumulative oxygen demand at 24 h (OD₂₄, mg O₂/g VS), both of which are the result of microbial respiration due to the degradation of organic matter. To prevent oxygen uptake due to the activity of nitrifying bacteria, thiourea was added as a nitrification inhibitor in all the experiments. Microbial activity was analyzed in duplicate.

In addition, the reducing sugars were measured, carried out in accordance with the Method OIV-MA-AS311-01A, as well as alcoholic strength by volume in compliance with OIV-MA-F1-03: R2011 (OIV, 2015).

2.5 Software

The software used in this work to create graphs and statistical analysis was Sigma-Plot software (version 14.0).

3. Results and discussion

3.1 Composition of grape lees

The wine lees were provided by Bodegas Robles S.A. winery (Montilla, Cordoba (Spain)), derived from the ecological wine grape crop. Wine lees is “the residue that forms at the bottom of recipients containing wine, after fermentation, during storage or after authorized treatments, as well as the residue obtained following the filtration or centrifugation of this product” defined by EEC regulation No. 337/79. Currently, wine ageing on lees is usual in several areas, improving its organoleptic characteristics. Although the composition of lees is variable, lees is composed by microorganisms, mainly yeasts, and by tartaric acid and inorganic matter. Due to their composition, yeast lees autolysis plays an important role in lees composition and in wine ageing (Pérez-Serradilla and Luque de Castro, 2008).

The results of the characterization of the grape lees used in this research study are shown in Table 1. The pH was 4.23 ± 0.01 , low value which could be because of the high content of organic acids in these wastes, with a concentration of acetic acid of 26 mg/g dry weight.

Table 1: Physicochemical characterization of grape lees.

	Pedro Ximenez lees
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1938 \pm 7
pH	4.23 \pm 0.01
Moisture (%)	72.43 \pm 0.06
COD (g O₂ / kg dry weight)	1179 \pm 98
TKN (mg NTK / g dry weight)	23.41 \pm 0.56
N-NH₄⁺ (mg N-NH₄⁺ / g dry weight)	2.82 \pm 0.17
TSN (mg/ g dry weight)	5 \pm 1
Phosphorus (mg P / g dry weight)	0.77 \pm 0.07
TC soluble (mg/ g dry weight)	344 \pm 1
IC soluble (mg/ g dry weight)	1 \pm 1
TOC soluble (mg/ g dry weight)	343 \pm 1
FS (g/kg dry weight)	355 \pm 10
VS (g/kg dry weight)	650 \pm 10
Acetic acid (mg/ g dry weight)	24
Propionic acid (mg/ g dry weight)	<i>n.d.</i>
Isobutiric acid (mg/ g dry weight)	3
Butiric acid (mg/ g dry weight)	1
Isovaleric acid (mg/ g dry weight)	<i>n.d.</i>
Valeric acid (mg/ g dry weight)	<i>n.d.</i>
Total Acetic acid (mg/ g dry weight)	26
Reduction sugars (mg/L)	64 \pm 4
° Ethanol (% w/w)	5.88 \pm 0.64
Cu (mg/kg dry weight)	88 \pm 1
Cr (mg/ kg dry weight)	12 \pm 1
Ni (mg/ kg dry weight)	13 \pm 3
Cd (mg/ kg dry weight)	6 \pm 1
Pb (mg/ kg dry weight)	32 \pm 1
Zn (mg/ kg dry weight)	36 \pm 1
OD₂₄ (mg O₂/g VS)	1163 \pm 2
SOUR máx (mg O₂/g VS·h)	116 \pm 1

* *n.d.*: Undetected

Also, the heavy metals content in this residual is significantly lower than the results obtained by Da Ros et. al., (2014). They reported a concentration in Cu and Zn of 801 \pm 120 and 132 \pm 13 mg/kg dry weight, respectively, while in this experiment the concentration of such metals was found to be 88 \pm 1 and 36 \pm 1 mg/kg dry weight (Table 1). This lower content in heavy metals could be due this raw material come from ecological winemaking where there is not use of fertilizer, in favour of use of vegetation cover.

On the other hand, there is another parameter important in anaerobic digestion, due could be an inhibitory factor, such as TKN, which was 23 mg TKN/g dry weight, lower than the 70 ± 6 mg/g dry weight, obtained by Da Ros et al., (2014). The high concentration of nitrogen could be due the lees is a waste rich in carbohydrates, nitrogen and other compounds coming from the yeast such as vitamins, microorganisms, purine and pyrimidine (Salgado et al., 2009). In addition, these values are in concordance with the results expected from ecological winery harvesting, due to no fertilizer in used.

In order to evaluate the biodegradability of this waste, a respirometric test was carried out in a dynamic respirometer in static phase. Table 1 shows the maximum specific rate of oxygen uptake (SOUR, mg O₂/g VS·h) obtained for the substrate in the experiment carried out, and cumulative oxygen demand at 24 h (OD₂₄, mg O₂/g VS), both of which are the result of microbial respiration due to the degradation of organic matter. Furthermore, as can be seen in Figure 1, SOUR initially increased until reaching the maximum value of 116 mg O₂/g VS·h (hydrolytic stage) at 7 hours approximately, the time from which decreased due to the reduction in biodegradable organic matter under these experimental conditions where the oxygen was consumed more slowly. The area below the curve OD₂₄, (mg O₂/g VS), is a respirometric variable proportional to the biodegradability of the sample analyzed, which was 1163 mg O₂/g VS approximately, at 24 hours of experimentation. These results show that grape lees is biodegradable aerobically and therefore susceptible to be valorized by a biological treatment. There is a previous study, which links the aerobic respirometric test to predict the biodegradation fraction under anaerobic conditions, through a mathematical model proposed by Buendía et al, (2008).

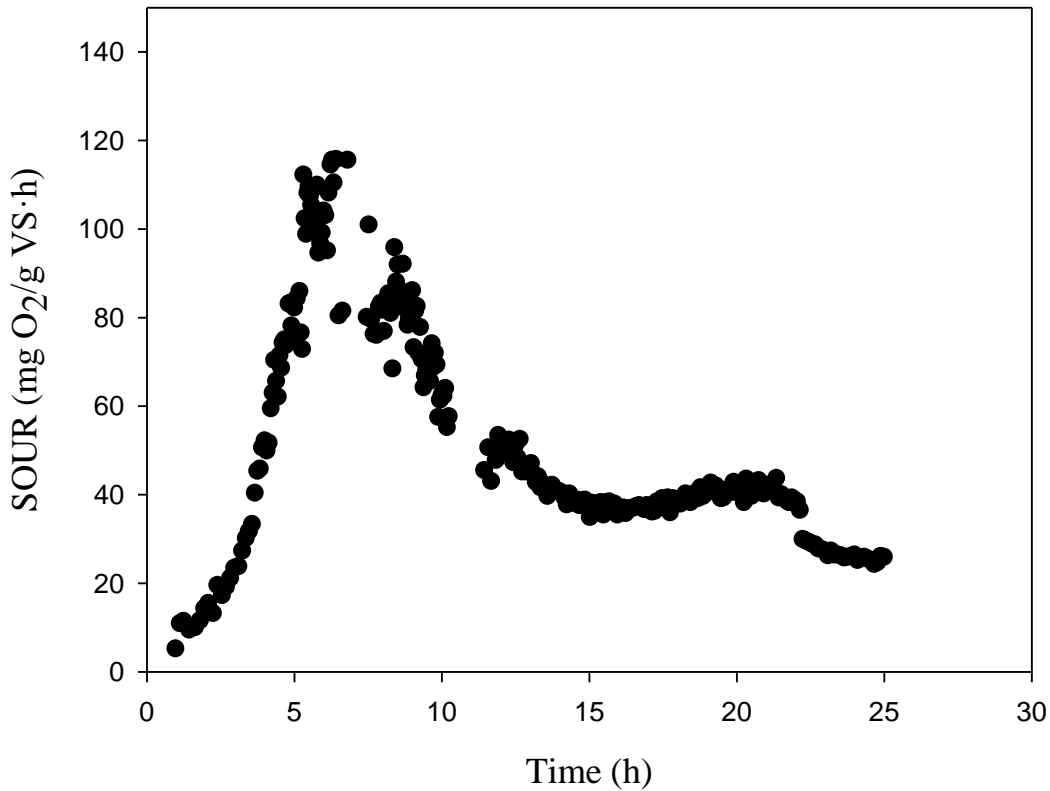


Figure 1: Biodegradability test of wine lees by static respirometry in liquid phase at laboratory-scale, under aerobically conditions.

Additionally, in order to evaluate the possible benefit resulting of the lees sale to distillery to obtain ethanol, reducing sugar and alcoholic content have been also measured (Table 1). Reducing sugars are composed of a free aldehyde group or a free ketone group, which is important to evaluate because it is considered as a starting material for the production of ethanol. The absence of this element could mean that the alcoholic fermentation has been completed. Taking into account the negligible amount of reducing sugar and, also, that the alcoholic content is slightly higher than the minimum value to be distilled (4% w/w) in Spain, according to Ley 24/2003, (DOE, n.º 46, 9/03/2010), it might be possible to affirm the residual character of lees.

3.2 Stability of anaerobic digestion process

To control the anaerobic process, it is necessary to check if the experimental procedure has been developed under stable conditions. The stability of the process was monitored by means of the evolution of pH, conductivity, alkalinity, volatile acidity and volatile acidity/alkalinity ratio (VA/Alk). The pH values were constant approximately across the experiments, especially in the experiment with inoculum belong to paper industry (Figure 2A), whose alkalinity was slightly higher than in the case of brewery inoculum, 2937 ± 49 and 2643 ± 49 mg CaCO₃/L, respectively. Alkalinity concentration is a measure of the buffer capacity of the anaerobic medium. pH value is situated on the optimal range for anaerobic microorganisms, which is between 7.10 and 7.80 (Wheatley, 1990).

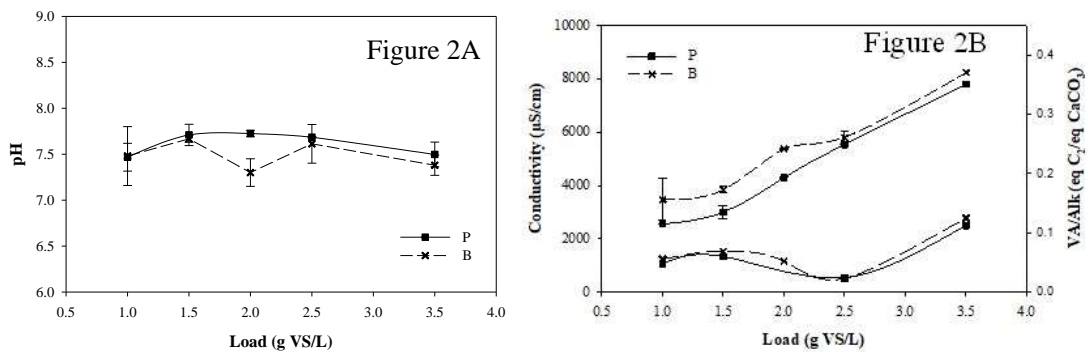


Figure 2 (A): Evolution of pH. (B): Evolution of conductivity (mS/cm) and VA/Alk ratio (eq C₂/eq CaCO₃) along the loads. (C): Relation between VA (mg C/L) and TOC (mg C/L).

According to Figure 2B, can be showed that the ratio VA/Alk reached values in the range between 0.02 to 0.14 eq C₂/eq CaCO₃. That relation is an indicative parameter of the evolution of the reactor, which in this case, is far from the limit values (0.3-0.4 eq C₂/eq CaCO₃), associated to an acidification of the reactors (W.P.C.F, 1967). There is a

slight decrease of the VA/Alk ratio along to the increasing loads, within the stability range, even so there were an increase of this variable for both inoculums due to a decrease of VA and Alk, stronger of VA than Alk. Also, Figure 2B show an increase of the conductivity due to lees contains few soluble nutrients which can ionize, causing a rising in the conductivity, as can be seen along the loads.

It is also important to note that the VA concentration was constant along the increase of TOC concentrations, determined in the soluble fraction soluble. As can be seen in Figure 2C, there is not a significant increase of VA, it could be due that the acetoclastic methanogenic bacterial use the acetic acid as substrate to produce methane (Martí, 2006). The same Figure shows an increase of TOC because of an accumulation of soluble organic compounds, different of VA, which are not biodegradable such as lignocellulosic compounds, ethanol, etc. (Bustamante et al, 2008) (Camarillo and Rincon, 2009).

With the aim to evaluate the proper operation of the anaerobic process, kept track of variables related with the biodegradability of the raw material, such as soluble organic matter and nitrogen. Figure 3A and 3B show the variation of soluble organic matter and nitrogen with each assay. As can be seen, no difference was shown in both inoculums. Even then, having initial values of both variables in the case of the brewery inoculum, the increase of TOC were 2133 and 1887 mg TOC/L for paper and brewery industry, respectively. Similar tendency showed for TSN with an increase of 864 and 564 mg TSN/L with paper and brewery sludge, respectively.

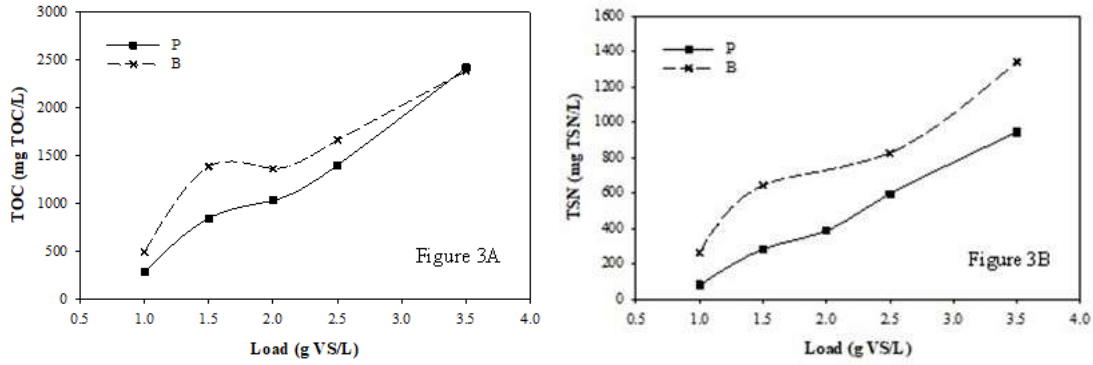


Figure 3 (A): Variation of TOC (mg C/L) along the loads (g VS/L); (B): Variation of TSN (mg TSN/L) along the loads (g VS/L).

Given the importance of nutrients relation, such as C and N, in anaerobic digestion has been evaluated the relation between TSN and TOC, due to might affect to methane yield (Wang et al, 2012). As can be seen, in Figure 4A the pairs of TSN-TOC points can be fitted to a straight line in both essays. As can be seen, most of the value pairs (77% of them) fit correctly to a straight line within a confidence interval of 95%. Therefore, the increase in the carbon present in the soluble fraction is proportional to the solubilisation of nitrogen. More specifically, the proportion between TSN and non-biodegradable soluble TOC was 1:2 respectively, as the slope of the straight line indicates, as shown in

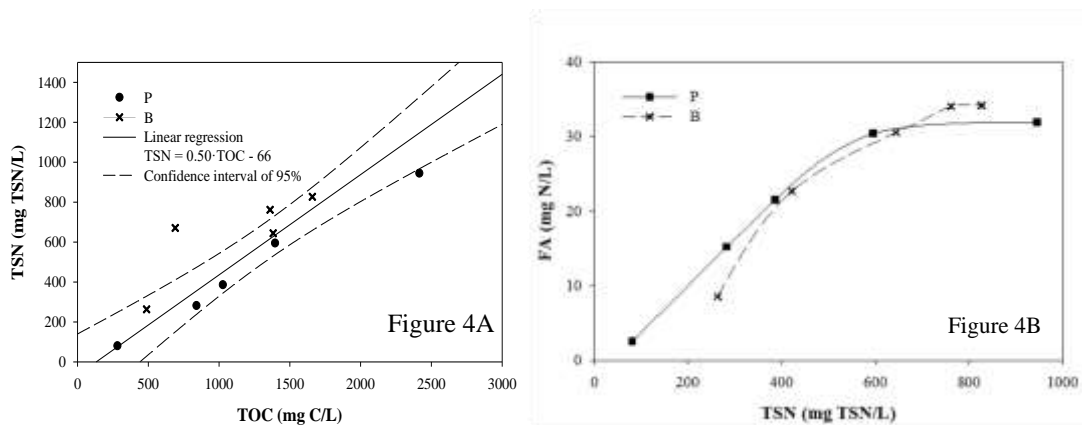


Figure 4 (A): Relation between TSN (mg TSN/L) and TOC (mg C/L). (B): Relation between FA (mg N/L) and TSN (mg TSN/L).

The ammonium produced by the biological degradation of the nitrogen matter, shaped like proteins and urea, mainly (Kayhanian, 1999). The ammonium ion (NH_4^+) and the free ammonia (NH_3) are the main ways of soluble ammonia nitrogen contained in the anaerobic digesters, being the free ammonia the major inhibition factor, due it is been able to cross the bacterial membrane (Kroeker et al., 1979; de Baere et al., 1984). The presence of ammoniacal nitrogen in aqueous solution is in the form of ammonium ion (NH_4^+) and un-ionised ammonia (NH_3) depends on pH and temperature (Chen et al., 2008). Free ammonia (FA) can be calculated attending to the concentration of TSN (mg N/L), pH and temperature of the solution (K), according to the formula proposed by Østergaard (1985):

$$\frac{[\text{NH}_3]}{[\text{TSN}]} = \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-(0.09018 + \frac{2729.92}{T(K)})}} \right)^{-1} \quad (\text{Eq. 8})$$

Figure 4B shows the evolution of the concentration of free ammonia and TSN (mg N/L), along the increase of loads, distant values of the toxicity concentration explained previously by other authors, such as Koster and Lettinga (1984) who proposed a level of 80 mg N/L of free ammonia as the minimum inhibitory level, while others authors reported inhibitory values higher than 10 g/L (Jarrell et al., 1987). The FA concentrations increased along the loads, showing similar trend in both inoculums, with a range of FA values between 3.00 ± 0.01 to 32.00 ± 0.01 and 9.00 ± 0.01 to 36.00 ± 0.01 mg N/L, for paper and brewing inoculums respectively, consequently, we can claimed that FA was not inhibitory causes of the process, according to the inhibitory concentrations explained previously. As can be seen the differences were only at the beginning of the experiment due to the different alkalinity of the inoculum, explained previously.

3.3 Biodegradability

With the aim to evaluate the development of the anaerobic process, the variation in the concentration of several variables related with biodegradability of grape lees has been monitored. One of these variables is the total organic matter content in the mixing liquor of each reactor, measured in g VS/L. This variable showed similar evolution in both inoculum used, with a slight increase in the case of brewery industry sludge due to the existence of granulometry differences, which might affect in the type of mass transfer between inoculum and substrate (Lettinga 1996) (Figure 5A).

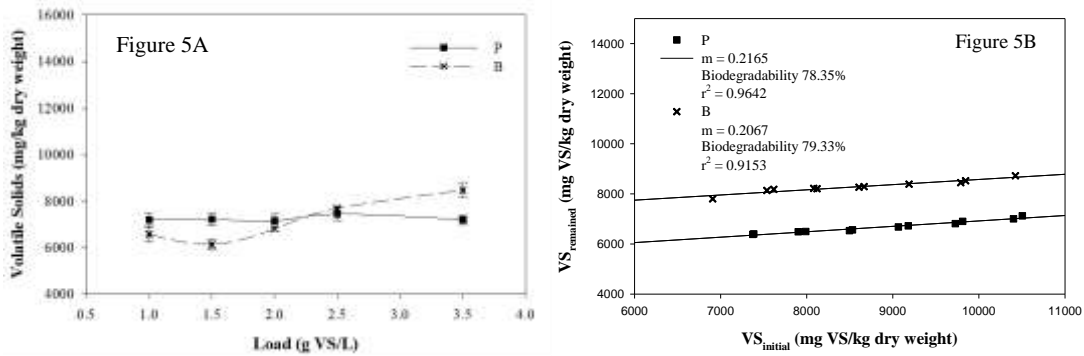


Figure 5 (A): Variation of VS (mg VS/kg dry weight) along the loads (g VS/L); (B): Biodegradability of grape lees.

The biodegradability was determined by the remained VS concentration against the initial VS concentration (remaining plus added) for each load and each inoculum. According to Figure 5B, the biodegradability of the grape lees was 78.35% and 79.33%, for paper and brewing industry, respectively. As can be seen, no difference was shown in biodegradability for both inoculums used, showing similar trend. These values are similar than the biodegradability obtained by Da Ros et al. (2016) (80%), who determined the biogas production of wine lees using biochemical methane potential (BMP) tests at 55 °C.

It is convenient to take into account that the non-biodegradable organic matter under anaerobic conditions is fairly stabilized in view of its possible use for agricultural amendment. This result confirms what was explained above. In fact, the TOC/TSN ratio in the mixing liquor, which would be very similar to the digestate, is 2.0 and 2.3 for brewery and paper industry inoculum respectively, values appropriated to use as amendment. This value would be interesting with the aim to use the liquid digestate such as fertilizer in soil with deficit of nitrogen, or in combination with other carbon source, in order to achieve the optimal C/N ratio, 20-30 approximately, according to Habiba et al, (2009).

3.4 Kinetics of methane production

The mathematical model described in Eq. 2 was applied to quantify the kinetics of methane production. The validation of the exponential mathematical model (Equation 2) was carried out by determining the relation between the maximum accumulated volume of methane obtained experimentally (G_{exp}) and the theoretical value (G_m) (Figure 6A).

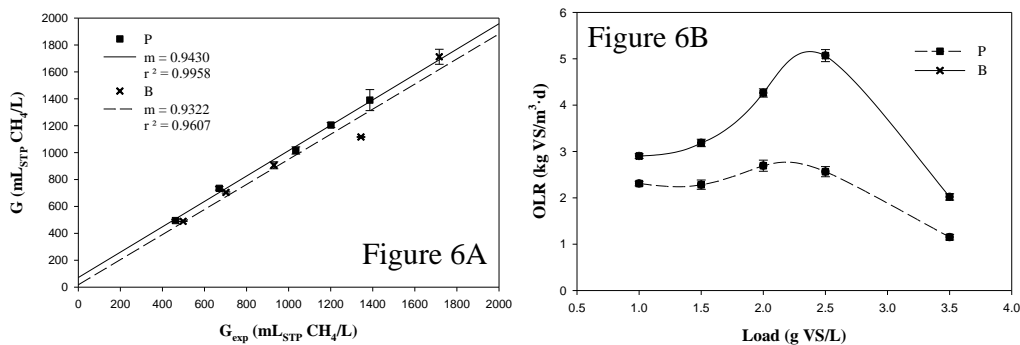


Figure 6 (A): Validation of mathematical model determined from the experimental maximum methane volume produced (G) and the maximum volume of methane (G_m) (mL_{STP} CH₄/L). Evolution of OLR (kg VS/m³·d) along the loads.

The slope of the regression lines were 0.9430 and 0.9322 for paper industry and brewery inoculum respectively, showing that the results obtained with the mathematical model are similar than the obtained experimentally. In addition, the kinetic constant decreased along the loads in both cases from 0.362 ± 0.009 to 0.072 ± 0.003 and 0.288 ± 0.013 to 0.041 ± 0.004 , in brewery and paper industry inoculum, respectively.

To evaluate the volume of wine lees, what could be treated, the *OLR* ($kg\ VS/m^3 \cdot d$) was evaluated using the equation (1) described in materials and methods. The *OLR* showed an increasing evolution in both cases till achieve a maximum in a range load of 2.00 to 2.50 g VS/L, from then on showed a decrease in both cases (Figure 6B). As can be seen, the peak *OLR* value was slight higher than 5 $kg\ VS/m^3 \cdot d$ ($102.79\ kg\ wine\ lees/m^3 \cdot d$), reached using the paper industry inoculums and 2.79 $kg\ VS/m^3 \cdot d$ ($54.61\ kg\ wine\ lees/m^3 \cdot d$). At higher loads, the *OLR* decrease in both situations, which it might due to is an increase of relation VA/Alk.

Another variable to be studied was the methane production rate (r_{CH_4} ($mL_{STP}\ CH_4/h$)). This variable was determined at the time needed to reach most of the total methane determined experimentally in each load per unit of volume of the reactor (Eq 3). As can be seen in Table 2A, the r_{CH_4} showed constant values with a peak ($8.68\ mL_{STP}\ CH_4/h$) obtained for 2 g VS/L, while in the case of paper industry sludge the increase of the methane production rate was most remarkable, achieving the higher value ($17.00\ mL_{STP}\ CH_4/h$) at 2.5 g VS/L, similar than *OLR* performance.

These values are in concordance with the *OLR* and maximum methane yield production, achieved at optimal loads (2.0 and 2.5 g VS/L for brewing and paper industry, respectively).

Table 2A. Methane production rate using paper industry as inoculum.

Load (g VS/L)	Y_{CH₄/S} (mL_{STP}CH₄/gV S)	OLR (kg lees_{dry} weight/m³·d)	rG (mL_{STP}CH₄/h)
1.0	462 ± 3	46.81	6.65
1.5	447 ± 15	46.32	6.37
2.0	517 ± 56	54.61	8.68
2.5	480 ± 8	52.01	7.68
3.5	396 ± 16	23.32	2.84

Table 2B. Methane production rate using brewing industry as inoculum.

Load (g VS/L)	Y_{CH₄/S} (mL_{STP}CH₄/gVS)	OLR (kg lees_{dry} weight/m³·d)	rG (mL_{STP}CH₄/h)
1.0	499 ± 10	58.83	9.02
1.5	470 ± 1	64.60	9.31
2.0	475 ± 40	86.46	12.37
2.5	539 ± 46	102.79	17.00
3.5	502 ± 23	40.95	6.18

The methane production yield was stable along the experiment for brewery and paper industry inoculum, in both cases (Table 2A and 2B), with an average value of 517 ± 56 and 539 ± 46 mL_{STP} CH₄/g VS in paper and brewing industry sludges, respectively. These values were slightly higher than the results obtained by Da Ros et al. (2016) who studied the methane production from grape lees under mesophilic conditions (36 °C ± 2 °C), with a methane yield production of 488 mL_{STP} CH₄/g VS under standard conditions.

The differences in methane yield production published in other papers, using wine lees as raw material might be due to several factors, such as grape variety, yeast used, maturity stage, operational procedure of the winery, etc. In addition, the protein and sugar contained in grape fruit is very different depending of the crop variety. The raw material subject of this study had a protein content of 14.63 g/100 g dry matter, while according to Beres et al. (2017), who studied the protein and soluble sugar contained in

four grape crop varieties (Mario Mucato, Merlot, Pinot Noir, Marselan and Cabernet Sauvignon), proved these differences, showing a protein content which ranged from 5.4 to 13.8 g/100 g dry matter and a soluble sugar concentration which ranged from 1.34 to 77.53 g/100 g dry matter.

Taking into account this variables, it is possible to assert that the optimal loading are 2.0 and 2.5 g VS/L using paper and brewing industry as inoculum, respectively, decreasing the yield methane, rG and OLR as loading increase.

3.5 Potential energetic power and saving CO₂ emissions.

Has been carried out an assessment of the energetic power using lees as raw material in anaerobic digestion and also, the potential decrease of the problems associated to the emissions of gases from fossil energies, such as CO₂. Taking into account the maximum methane yield production obtained for the optimal load with any inoculum, has been calculated the potential energy using Eq 4. As can be seen in Table 3, potential energy was higher using brewery inoculum (531.30 L_{STP} CH₄/day).

Table 3. Potential energetic power and saving CO₂ emissions.

	Y_{CH₄/S} (mL _{STP} CH ₄ /g VS)	L_{STP} CH₄/day	Electric power (kW/ton)	Saving CO₂ emissions (tonnes CO ₂ /year)
Paper industry	517 ± 56	509.62	1.23	2.35
Brewing industry	539 ± 46	531.30	1.29	2.45

The saving CO₂ emissions was determinated taking into account the following assumptions:

1- The energy efficiency of a biogas combustion engine is 35% and 85% to produce electricity and heat, respectively (Reza Barati et al., (2017) and Eder and Schulz, 2007).

2- Operational hours was 0.9, considering 10% of the total time for maintenance, technical stoppages, etc.

3- The emission factors of CO₂ was 0.392 kg CO₂/kWh for electricity (Ministry of Industry, Energy and Tourism of Spain).

4- A production of 33.5 tonnes of PX grapes in DPO Montilla.Moriles (Consejo Regulador PDO Montilla-Moriles, 2017) with a lees production of 0.06 tonnes of lees per tonne of grape.

According to Eq. 5, the total saving of CO₂ emissions might be 2.35 and 2.45 tonnes of CO₂/year in this DPO, using paper or brewery industry as inoculum respectively, decreasing environmental problems associated to the emission of this gas, such as greenhouse effect.

In consideration of the potential energetic assesment, carried out in this research, the European union subsidies to implement renewable energies and the environmental impacts associated to the current use of wine lees, and the saving CO₂ emissions associated to this practical, anaerobic digestion of wine lees would be a great alternative treatment due that biomethanization produce low-volume residues with high value such as organic fertilizer, in addition to electricity and heat, which improve the economics and sustainability aspects of the winemaking process.

4. Conclusions

- This grape lees showed a biodegradability close to 80%, with a heavy metals content and TKN lower than other lees due this raw material comes from an ecological winery harvesting.

- Anaerobic digestion was stable along the loads using paper and brewery inoculum interchangeably, without any inhibition signal such as FA concentration, whose higher values were 32.00 ± 0.01 and 36.00 ± 0.01 mg N/L, for paper and brewing inoculums respectively.
- The maximum OLR (102.79 kg wine lees/ $m^3 \cdot d$) and r_G (17.00 mL CH_4/h) were achieved using brewing industry inoculum, with a yield methane production of 96.35 ± 8.22 $L_{STP} CH_4/kg$ wine lees.
- Grape lees of Pedro Ximenez cv, might produce an electric power of 1.29 kWh/day and a saving CO_2 emissions of 2.45 tonnes $CO_2/year$ in this DPO, decreasing the environmental impact associated to this industry and the creation of a new industry in this area.

Acknowledgements

The authors are very grateful to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project CTQ2014-60050-R), Ministry of Education, Culture and Sport (Grant FPU2013) and the Junta of Andalucía for funding this research and the company BODEGAS ROBLES S.A. (Montilla, Córdoba, Spain) for supplying the winemaking wastes. The authors wish to express our gratitude to Inmaculada Bellido and María Luisa López for their contribution to this research.

References:

- Borja, R., Martín, A., Banks, C.J., Alonso, V., Chica, A. 1995. A kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environmental pollution*, 88, 13-18.
- Buendía, I.M., Fernández, F.J., Villaseñor, J., Rodríguez, L., 2008. Biodegradability of meat industry wastes under anaerobic and aerobic conditions. *Water research* 42, 3767-3774.
- Bustamante, M., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M., 2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manage.* 28, 372–380.
- Bustos, G., Moldes, A.B., Cruz, J.M., Domínguez, J.M., 2004b. Formulation of low-cost fermentative media for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* using vinification lees as nutrients. *J. Agric. Food Chem.* 52 (4), 801–808.
- C. Da Ros, C. Cavinato, D. Bolzonella, P. Pavan. Renewable energy from thermophilic anaerobic digestion of winery residue: Preliminary evidence from batch and continuous lab-scale trials. *Biomass and Bioenergy* 91 (2016) 150-159.
- Camarillo, R. and Rincón, J. 2009. Effect of inhibitory compounds on the anaerobic digestion performance of diluted wastewaters from the alimentary industry. *J Chem Technol Biotechnol* 2009; 84: 1615–1623.
- Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99, 4044-4064.

- Consejo Regulador PDO Montilla-Moriles.
<http://www.montillamoriles.es/estadisticas/2015.pdf> (Accesed on 26/09/2018).
- Council Regulation (EEC) No 337/79 of 5 February 1979 on the common organization of the market in wine. <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/c908ef22-1fb5-49ee-bb41-ab65eb608bad/language-en>. (accessed 08/05/2018).
- Da Ros, C., Cavinato, C., Bolzonella, D., Pavan, P. 2016. Renewable energy from thermophilic anaerobic digestion of winery residue: Preliminary evidence from batch and continuous lab-scale trials. *Biomass and Bioenergy*. 91, 150-159.
- Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P., Bolzonella, D., 2014. Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Waste Management* 34, 2028-2035.
- De Baere, L. A., Devocht, M., van Assche, P., Verstraete, W., 1984. Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic associations. *Water. Res.* 18, 543-548.
- DOE, n.º 46, 9/03/2010. Ley 24/2003, de 10 de julio , de la Viña y del Vino.
- Eder, B., Schulz, H., 2007. *Biogas Praxis – Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit*. Ökobuch Verlag, Staufen.
- EUROSTAT, 2015. EUROSTAT.
http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Electricity_and_natural_gas_price_statistics (2013). (Accessed 18.10.17)

- Habiba L, Hassib B, Moktar H. Improvement of activated sludge stabilisation and filterability during anaerobic digestion by fruit and vegetable waste addition. *Bioresource Technol.* 2009;100:1555–1560.
- Ministry of Industry, Energy and Tourism of Spain. <https://www.mincotur.gob.es> (accessed 25/10/18)
- Jarrell, K.F., Saulnier, M., Ley, A., 1987. Inhibition of methanogenesis in pure cultures by ammonia, fatty acids, and heavy metals, and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge. *Can. J. Microbiol.* 33, 551–555.
- Kayhanian, M., 1999. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: an overview and practical solutions. *Environ. Technol.* 20, 355-365.
- Koster, I.W., Lettinga, G., 1984. The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agric. Wastes* 9, 25–216.
- Kroeker, E. J., Schulte, D. D. Sparling, A. B., Lapp, H. M., 1979. Anaerobic treatment process stability. *J. Water Pollution Control Fed.* 37, 97-116.
- Kumar M., Ou Yan L., Lin J.G., 2010. Co-composting of green waste and food waste at low C/N ratio. *Waste Manage.* 30, 602-609.
- Martí, N., 2006. Phosphorus precipitation in anaerobic digestion process. *Dissertation.com*. Boca Raton, Florida (United State of America).
- Muscolo A., Pauccio M.R., Sidari M. (2001): The effects of phenolic acids extracted from two different soils in Aspromonte on germination of *Pinus laricio* seeds. *Fresenius Environmental Bulletin*, 10: 659–663.

- OIV, 2015. <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-wines-and-musts-2-vol> (accessed 09/05/18)
- OIV, 2016. <http://www.oiv.int> (accessed 18/12/17).
- OIV, 2017. <http://www.oiv.int> (accessed 05/02/18).
- Oliveira, M. and Duarte, E., 2014. Integrated approach to winery waste: waste generation and data consolidation. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 10, 168-176.
- Østergaard, N., 1985. Biogasproduktion i det thermofile temperaturinterval. STUB rapport nr. 21. Kemiteknik Dansk Teknologisk Institut, Taastrup.
- Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J.M., Pinheiro de Souza Oliveira, R., Domínguez, J.M.. Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste Management* 40 (2015) 72–81.
- Pérez-Serradilla, J.A., Luque de Castro, M.D. (2008) Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry* 111, 447–456.
- Reza Baratia, M., Aghbashloa, M., Ghanavatib, H., Tabatabaeib, M., Sharifia, M., Javadiradd, G., Dadaka, A., Mojarab Soufiyana, M. 2017. Comprehensive exergy analysis of a gas engine-equipped anaerobic digestion plant producing electricity and biofertilizer from organic fraction of municipal solid waste. *Energy Conversion and Management*. 151, 753–763.
- Rivas, B., Torrado, A., Beleán Moldes, A., and Domiánguez, J.M.. Tartaric Acid Recovery from Distilled Lees and Use of the Residual Solid as an Economic Nutrient for *Lactobacillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2006), 54, 7904-7911.

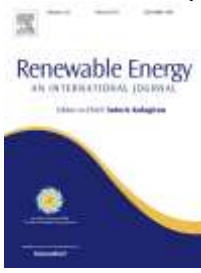
- Salgado, J.M., Rodríguez, N., Cortés, S., Domínguez, J.M. (2009). Development of cost-effective media to increase the economic potential for larger-scale bioproduction of natural food additives by *Lactobacillus rhamnosus*, *Debaryomyces hansenii*, and *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.*57, 10414–10428.
- Salgado, J.M., Rodríguez, N., Cortés, S., Domínguez, J.M., 2010. Improving downstream processes to recover tartaric acid, tartrate and nutrients from vinasses and formulation of inexpensive fermentative broths for xylitol production. *J. Sci. Food Agric.* 90 (13), 2168–2177.
- Versari, A., Castellari, M., Spinabelli, U., Galassi, S., 2001. Recovery of tartaric acid from industrial enological wastes. *Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 485–488.
- W.P.C.F. (Water Pollution Control Federation). 1967. *Anaerobic Sludge Digestion, Manual of Practice* N° 16.
- Wang X, Yang G, Feng Y, Ren, G., Han, X., 2012. Optimizing feeding composition and carbon–nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw. *Bioresour. Technol.*120, 78–83.
- Wheatley A 1990. *Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology*. Elsevier (ed.). London (UK).
- Zhihui, B., Bo, J., Yuejie, L., Jian, C., Zuming, L., 2008. Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Science* 20, 353-358.
- Zhu N., 2006. Composting of high moisture content swine manure with corncob in a pilotscale aerated static bin system. *Bioresour. Technol.* 97, 1870–1875.

-Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J.M., de Souza Oliveira, R.P., Domínguez, J.M. 2015. Potential of lees from wine: beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: an overview. *Waste Management* 40, 72-81.

Descripción del artículo: “Evaluation of anaerobic digestion of Verdejo lees from an ecological crop”

La industria vitivinícola genera grandes cantidades de residuos tras el procesado de la uva para la producción de vino. Tras el proceso fermentativo, se genera un residuo llamado lías, cuyo fin último suele ser la destilación para la extracción de etanol y producción de bebidas espirituosas o alcohol vínico. En este trabajo se ha evaluado la digestión anaerobia, bajo condiciones mesófilas, de las lías derivadas del proceso de producción ecológica de vino blanco a partir de uva de la variedad Verdejo. Con el objetivo de estudiar la viabilidad de dicho proceso de valorización, se ha evaluado la biodegradabilidad de dicho sustrato residual, confirmándose que es altamente biodegradable (aproximadamente 53%), bajo las condiciones de estudio ensayadas. El proceso anaeróbico fue estable, de acuerdo con las variables estudiadas en esta investigación a escala de laboratorio, mostrando un rendimiento medio en metano de 332 ± 37 NmL CH₄/g SV, sin señales inhibitorias para las cargas de residuo de hasta 4,0 g SV/L.

Adicionalmente, dado que las lías derivan de un cultivo ecológico, el contenido en metales pesados en el digestado es inferior al derivado del tratamiento de residuos derivados de otros sistemas de cultivo y, en consecuencia, el licor de mezcla del sistema anaerobio resulta un medio beneficioso para el mantenimiento de las arqueas metanogénicas. Este hecho, posibilitaría su reutilización como fuente de nutrientes retornados a los terrenos de cultivo, encontrándose en consonancia con la tendencia hacia la sostenibilidad y economía circular tan demandada en la sociedad actual como garante de la conservación de recursos.



Evaluation of Anaerobic Digestion of Verdejo Lees from an Ecological Crop

Javier Hungría, José A. Siles, María C. Gutiérrez, Arturo F. Chica, and María A. Martín*

5

Department of Chemical Engineering, University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Ctra. N-IV, km 396, building Marie Curie (C-3), CP/14071 Córdoba, Spain

Corresponding Author

*(M.A.M) Phone: +34-9-57212-273. E-mail: iq2masam@uco.es

ABSTRACT

The winemaking industry generates large volumes of residue from the processing of grapes that can be recycled and valorized to produce Verdejo wine. The nutrients in lees meant the residue was highly biodegradable (approximately 53%) by methanogenic microorganisms, achieving as much as 77.45 ± 0.09 mg N/L in the digester liqueur in free ammonia form, without inhibiting the process. Given the lees belong to an ecological crop, the heavy metals content was lower than other studies, and consequently more beneficial for the maintenance of methanogenic archaea. The anaerobic process was stable, according to the variables studied in this laboratory-scale research, showing a mean methane yield of 332 ± 37 mL_{STP} CH₄/g VS, without inhibitory signals for the loads up to 4.0 g VS/L.

KEYWORDS: Anaerobic digestion; wine lees; ecological crop; Verdelho; methane production

ABBREVIATIONS AND NOMENCLATURE

Alk	Alkalinity (mg CaCO ₃ /L)
COD	Chemical oxygen demand (mg O ₂ /g dry weight)
FA	Free ammonia (mg/L)
FS	Fixed solids (g/kg dry weight)
G	Volume of methane accumulated (mL _{STP} CH ₄ /L)
GAL	Glucose, sodium acetate and lactic acid solution
G_{exp}	Volume of methane accumulated experimentally (mL _{STP} CH ₄ /L)
G_m	Theoretical maximum volume of methane (mL _{STP} CH ₄ /L)
IC	Inorganic carbon in soluble form (mg/g dry weight)
k	Apparent kinetic constant (h ⁻¹)
n.d.	Not detected
N-NH₄⁺	Ammoniacal nitrogen (mg N-NH ₄ ⁺ /g dry weight)
OD₂₄	Cumulative oxygen demand at 24 h (mg O ₂ /g VS)
OTA	Ochratoxin A
POD	Protected origin denomination
P-P₂O₅	Phosphorus concentration expressed as P ₂ O ₅ (mg P/g dry weight)
SOUR	Specific oxygen uptake rate (mg O ₂ /g VS·h)
STP	Standard pressure and temperature (0°C, 1 atm)
t	Time (h)
TC	Total carbon in soluble form (mg/g dry weight)
TKN	Total Kjeldahl nitrogen (mg TKN/g dry weight)

TOC	Total organic carbon in soluble form (mg/g dry weight)
TSN	Total soluble nitrogen (mg/g dry weight)
VA	Volatile acidity (mg CH ₃ COOH/L)
V_{ADIS}	Volatile acidity (mg C/L)
V_{AGC}	Volatile fatty acid (mg C ₂ /L)
VS	Volatile solids (g/kg dry weight)

INTRODUCTION

The world production of wine, excluding juice and must, was $27,440 \times 10^6$ L in 2015, with Spain ranked the third largest manufacturing country at 3720×10^6 L, contributing to 13.5% of the worldwide production in 2015.¹ However, this seasonal vine crop only represents 10% of the total agricultural production in Spain. Moreover, this agricultural activity produces large volumes of waste, including grape stalks, seeds, skins, lees and wastewater. In fact, according to the International Organization of Vine and Wine, Spain generates approximately 18×10^6 m³/year of wine wastewater, which is six times higher than Italy and France.²

Vinification or winemaking is the process of fermenting grapes into wine. In white wine production, once the grapes are harvested and taken to the winery for crushing, the must is separated from the solid fraction. During malolactic and alcoholic fermentation, which occurs in the liquid fraction, a by-product of the débourbage, called lees, is obtained. An additional type of polluting waste, also called lees, is generated in the industrial fermentation of alcoholic drinks, such as wine, cider and beer, but its composition differs from the lees obtained after the débourbage.³ It consists of a liquid fraction and a solid phase that contains all the deposits precipitated in the stainless-steel tanks, which mainly comprises yeasts and fermenting bacteria. During wine aging, cell membranes are disintegrated, a phenomenon known as autolysis, causing the release of

intracellular constituents, including hydrolytic enzymes and other biopolymers, which are hydrolyzed into low molecular weight products that can also end up in the solid phase.⁴ Also present are insoluble carbohydrates, such as cellulosic or hemicellulosic materials, phenolic compounds that contribute to the organoleptic characteristics (e.g., color, flavor) of wine, lignin, proteins, metals, inorganic salts, organic acid salts (mainly tartrates in the case of wine lees) and other materials, such as pulp and marc (seeds, fruit skins and stalks).⁵

Lees is an underestimated by-product of the winemaking industry, in comparison with the value of wine generated. Its major use is for recuperation of ethanol and tartaric acid, which is intended primarily as an alternative natural acid to the citric and phosphoric acids, commonly used in the food and beverage industries.⁶ Nonetheless, this practice involves financial costs in the transporting of lees from the winery to distillery, energy costs and environmental risks associated with the process (for example, gas and odor emission, chemical use, waste generation).

Other uses of lees include the removal of undesirable substances from wine, thereby functioning as a natural adsorbent. Several studies have described the role of lees during the vinification process, including the evolution of toxic compounds, such as ochratoxin A (OTA) ($C_{20}H_{18}ClNO_6$). The function of yeast cells to absorb mycotoxins was supported by Moruno et al.,⁷ who demonstrated the utility of yeast lees for natural removal of OTA from wines. After contact for 7 days, the OTA reduction was greater than 70% with white wine lees and around 50% with red wine lees. The better results obtained with white wine lees were due to the competition between polyphenols and OTA for the same binding sites on the surface of the yeast cells. Also, De Melo Abreu et al.⁸ observed that during wine production with maceration, famoxadone residues, derived from the application of the fungicide to wine grapes, were removed with the

cake and lees at the end of the fermentation process, whereas, without maceration, this fungicide was only partially removed. Caputi et al.⁹ demonstrated that lees aids in the natural removal of defoaming agents, such as mono- and diglycerides of oleic acid, commonly added during the fermentation of wine. Therefore, lees might be useful in the treatment of other liquid streams, but further processing of lees would be necessary, which would increase the final price of the process.

Furthermore, Gómez et al.¹⁰ proposed lees as a dietary complement for human and animals, due to its high content of polyunsaturated fatty acids. Conversely, Nogales et al.¹¹ prepared vermicomposts from a 2:1 ratio of lees and vine shoot (wet weight basis), by the earthworm *Eisenia andrei*. The authors described the potential use of vermicompost as an organic amendment of soils, in spite of the lignocellulosic compounds present in vine shoot or high level of acids in winery wastes. Vermicomposting decreased the phenolic compound content, increased the pH, nutrient contents and significantly reduced the phytotoxicity of the winery waste.

Considering the energy costs associated with wine production (e.g., pressing grapes, cooling of the must) and the drawbacks related to other treatments of lees, explained above, such as energy and transport costs involved with obtaining ethanol, for example, this research primarily aimed to evaluate the anaerobic treatment of grape lees as a possibility to decrease the costs and provide financial support to some wines produced according to the protected designation of origin (PDO), with low yield. White wine lees have been the focus of this laboratory-scale research, to produce biogas under mesophilic conditions and digestate used as organic fertilizer. Lees waste belongs to an ecological crop, which makes it even more interesting to implement alternative treatments according to their production parameters and in support of citizen awareness of the environment.

MATERIALS AND METHODS

Substrates. The fermented wine lees used in this study were derived from the production of the white wine, Verdejo wine (Montilla PDO, Cordoba, Spain). In the production of this wine, the harvested grapes are put into horizontal pneumatic presses to extract the must (a step known as crushing). Next, the must, which includes the skins, stems and seeds, in the case of red wine principally, is stored in different tanks and then déburbaged. The fermentation stage, which is the transformation of sugar into alcohol by the natural yeasts in the must, follows, generating the lees, i.e., the raw material of this study. Before bottling, membrane filtration is performed to clarify and stabilize the wine (Figure 1). The residues were provided by the ecological winery Bodegas Robles, S.A., which belongs to the Montilla-Moriles PDO in Andalusia, Spain.

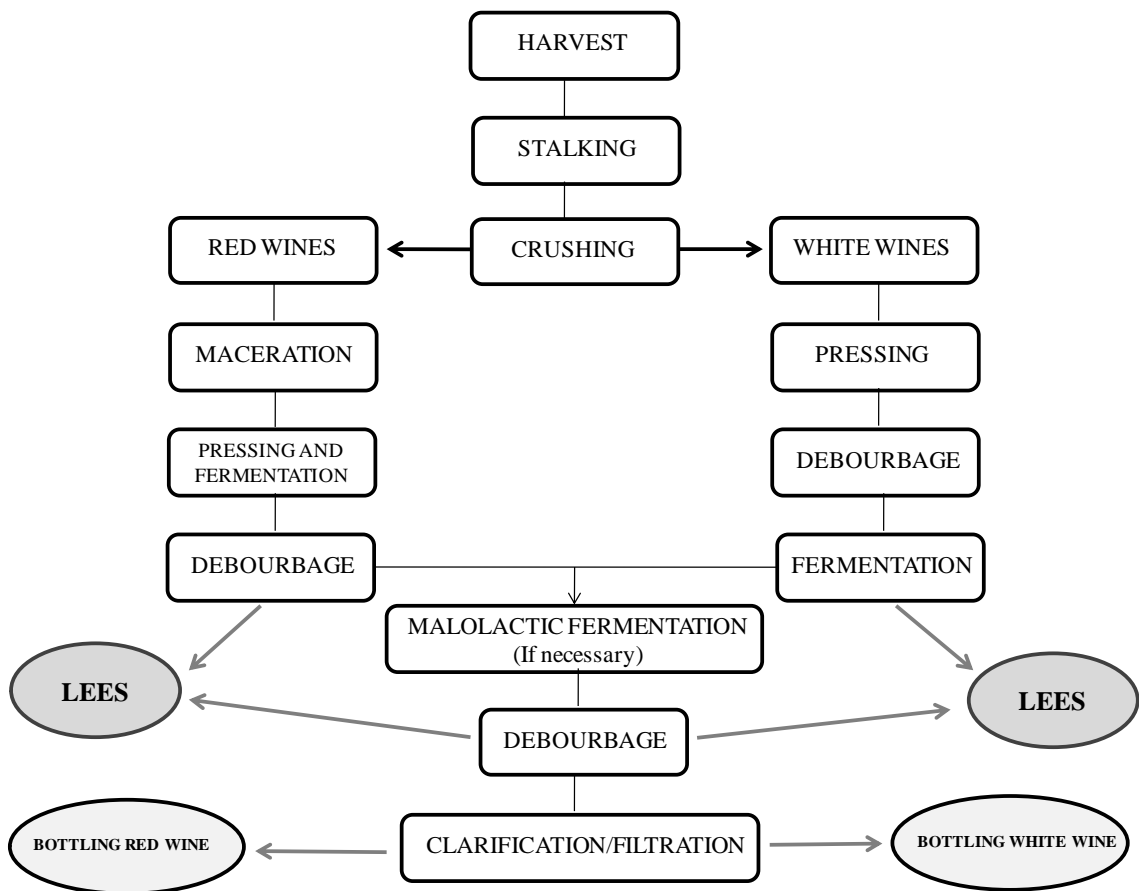


Figure 1. Winemaking process flowchart.

Experimental Set-Up. The experimental set-up used for the anaerobic digestion of grape lees consisted of two 1-L Pyrex reactors operating under mesophilic conditions in batch mode, using a thermostatic water jacket at 37°C, to maintain the temperature. The mixture was magnetically stirred. Both reactors have four connections to load feedstock, sample the effluent, inject N to remove the O₂ and circulate the biogas generated. The biogas produced during the anaerobic process contains CO₂, which is removed in tightly closed bubblers containing a NaOH solution (6 N) connected between the reactor and water reservoir. After this step, only the volume of CH₄ was measured, using 1-L Boyle–Mariotte reservoirs connected to each reactor. The CH₄ volume displaced an equal measurable volume of H₂O from the reservoir. The reactors were inoculated with granular sludge, obtained from EMACSA S.L. (Spain), from a full-scale digester used to treat the effluents derived from a vinasse bakery industry (volatile solids [VS] = 11.94 ± 0.11, fixed solids [FS] = 14.78 ± 0.03 g/kg, and methanogenic activity = 34 ± 3 mL_{standard temperature and pressure (STP)} CH₄/g chemical oxygen demand (COD)·L·h, where STP is defined as 0 °C and 1 atm).

Anaerobic Digesters. Experimental Procedure. The anaerobic reactors were initially loaded with 7 g VS/L of granular sludge. To activate the biomass before the experiments, the reactors were first fed with a synthetic medium (GAL medium) composed of glucose (50 g/L), sodium acetate (25 g/L) and lactic acid (20.8 mL/L).¹² During this initial period, the organic load added to the reactors was 1.00 g VS/L, in loadings of 0.25 g VS/L.

After this initial stage, biomass acclimatization was undertaken. Both reactors were fed with 0.50 g VS/L, composed of GAL and grape lees (50/50% VS). This load was repeated three times per load in each reactor. The start-up and acclimatization were performed over 45 days. Following this adaptation period, each reactor was loaded with

100% grape lees. The organic load added was increased from 1.0 (initial) to 5.5 g VS/L, in loadings of 0.5 g VS/L, with three replicates per load. In all instances, the duration of each experiment was equal to the time interval required for maximum gas production, from 21.50 to 78.00 h, the time required for 1.0 and 4.0 g VS/L, respectively. Also, the volume of CH₄ was measured as a function of time and samples were taken and analyzed before and after feeding. The waste treatments were done over a 43-day period.

Chemical Analyses. The following parameters were determined in the effluents of each load and/or in the waste, as the raw material: pH, alkalinity (Alk, mg CaCO₃/L), volatile acids (VA, mg C/L), conductivity (μS/cm), COD (mg O₂/g dry weight), FS (g FS/kg sample), VS (g VS/kg sample), total Kjeldahl nitrogen (TKN; mg N/g sample), total organic carbon (TOC; mg C/L), total soluble nitrogen (TSN; mg N/L) and metals (Cu, Cr, Zn, Ni, Pb and Cd) (mg/g dry weight). All analyses were conducted in accordance with the Standard Methods of the APHA (1989).¹³

A Shimadzu TOC-VCSH carbon analyzer (Jiangsu, China) was used to determine the TOC. The method is based on the catalytic oxidation of all the carbon present in the sample to CO₂ and the subsequent detection of CO₂ by infrared spectrophotometry.

To measure the TSN, a Shimadzu TOC-VCSH/CSN TOC/N analyzer was used. During operation, the sample is combusted at 720 °C to decompose the total N into gaseous NO that cools and dehumidifies and may be detected with a chemiluminescent gas analyzer.

The VA was determined by two methods. One approach was a steam distillation of the sample, acidified previously (VA_{DIS}). Furthermore, short-chain VA (VA_{GC}) (acetic, propionic, butyric, isobutyric, valeric, isovaleric and caproic acids) was determined using a Hewlett-Packard HP-5890 gas chromatograph equipped with a 15 m by 0.53

mm (i.d.) Nukol-silica semi-capillary column and a flame ionization detector. The oven temperature was gradually increased from 100 to 150 °C at a rate of 4 °C/min. Helium was used as the carrier gas, at a flow rate of 1.0 mL/min.

In addition, a respirometric test was carried out with a static-respirometer in the liquid phase at laboratory-scale, patented by the Chemical Engineering Research Group (RNM-271) of the University of Cordoba (Publication No. ES2283171 A1 of 16 October 2007). The respirometric variables determined were maximum specific oxygen uptake rate (SOUR, mg O₂/g VS·h) and cumulative oxygen demand at 24 h (OD₂₄, mg O₂/g VS), both of which are the result of microbial respiration, due to the degradation of organic matter. Thiourea was added as a nitrification inhibitor in all the experiments, to avoid the activity of nitrifying bacteria. Each sample was analyzed in duplicate.

Software. Sigma-Plot software (version 11.0) was used to create graphs and perform the statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Composition of Grape Lees. The grape lees evaluated in this study were derived from the ecological winemaking process of *c.v.* Verdejo crop. Table 1 shows the results of the characterization of the grape lees. The pH was 3.24 ± 0.07 . This low value could be because of the high content of organic acids in these by-products, with 990 mg acetic acid/kg dry weight. Also, the heavy metal contents in this residue (5 ± 0.1 , 17 ± 1 and 26 ± 17 mg/kg dry weight of Cu, Zn and Pb, respectively; Table 1) are significantly lower than the results obtained by Da Ros et al.,¹⁴ where the concentrations of Cu, Zn and Pb were 801 ± 120 , 131 ± 13 and 6 ± 3 mg/kg dry weight, respectively. Other components are important in anaerobic digestion, as they could be inhibitory factors. For instance, there was 1.76 ± 0.11 mg TKN/g dry weight, which was lower than the 70

± 6 mg TKN/g dry weight obtained by Da Ros et. al.¹⁴ These values are in concordance with the results expected from ecological winery harvesting, because no fertilizer is used.

Table 1. Physico chemical characterization of grape lees.

	Wine lees
Conductivity ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	1834 \pm 0.07
pH	3.24 \pm 0.07
Moisture (%)	83.90 \pm 0.06
COD (mg O₂ / g dry weight)	1565 \pm 5
TKN (mg NTK / g dry weight)	1.76 \pm 0.11
N-NH₄⁺ (mg N-NH₄⁺ / g dry weight)	1.63 \pm 0.01
Phosphorous (mg P / g dry weight)	0.15 \pm 0.01
TC soluble (mg/ g dry weight)	683
IC soluble (mg/ g dry weight)	0.03
TOC soluble (mg/ g dry weight)	683
TSN (mg/ g dry weight)	0,22
FS (g/kg dry weight)	126.44 \pm 2.91
VS (g/kg dry weight)	873.55 \pm 12.61
Acetic acid (mg/ g dry weight)	990
Propionic acid (mg/ g dry weight)	<i>n.d.</i>
Isobutiric acid (mg/ g dry weight)	362
Butiric acid (mg/ g dry weight)	<i>n.d.</i>
Isovaleric acid (mg/ g dry weight)	25
Valeric acid (mg/ g dry weight)	<i>n.d.</i>
Total Acetic acid (mg/ g dry weight)	1252
Total without Acetic acid (mg/ g dry weight)	261
Reduction sugars (mg/L)	572 \pm 32
C₃/C₂ (mg/ g dry weight)	<i>n.d.</i>
Cu (mg/kg dry weight)	<i>n.d.</i>
Cr (mg/ kg dry weight)	<i>n.d.</i>
Ni (mg/ kg dry weight)	22 \pm 2
Cd (mg/ kg dry weight)	9 \pm 1
Pb (mg/ kg dry weight)	26 \pm 17
Zn (mg/ kg dry weight)	17 \pm 1
OD₂₄ (mg O₂/g VS)	475
SOUR máx (mg O₂/g VS·h)	52

Table 1 also provides the SOUR (mg O₂/g VS·h) obtained for the grape lees studied. The biodegradability of wine lees was determined by static respirometry in the liquid phase on a laboratory-scale, as mentioned in the materials and methods section. Figure 2 displays the evolution of SOUR (mg O₂/g VS·h) obtained for the substrate.

Initially, the SOUR increased until reaching the maximum value of 52 mg O₂/g VS·h (at ca. 15 h) and then decreased, due to the reduction in the biodegradable organic matter (non-biodegradable under these experimental conditions). The substrate was biodegradable under aerobic conditions. The area under the curve for SOUR (mg O₂/g VS) vs. time (h) corresponds to the OD₂₄ (mg O₂/g VS) on a dry basis, which is a respirometric variable proportional to the biodegradability of the sample analyzed. This variable depends on the shape of the curve. Fast biodegradation of the raw material is represented by a curve in peak form, whereas, a curve with wide and flat peaks describes a sequential transformation of organic matter. In the cases of organic matter with a fast biodegradability, the hydrolytic stage is the limiting stage, and consequently, the oxygen is consumed relatively more slowly.

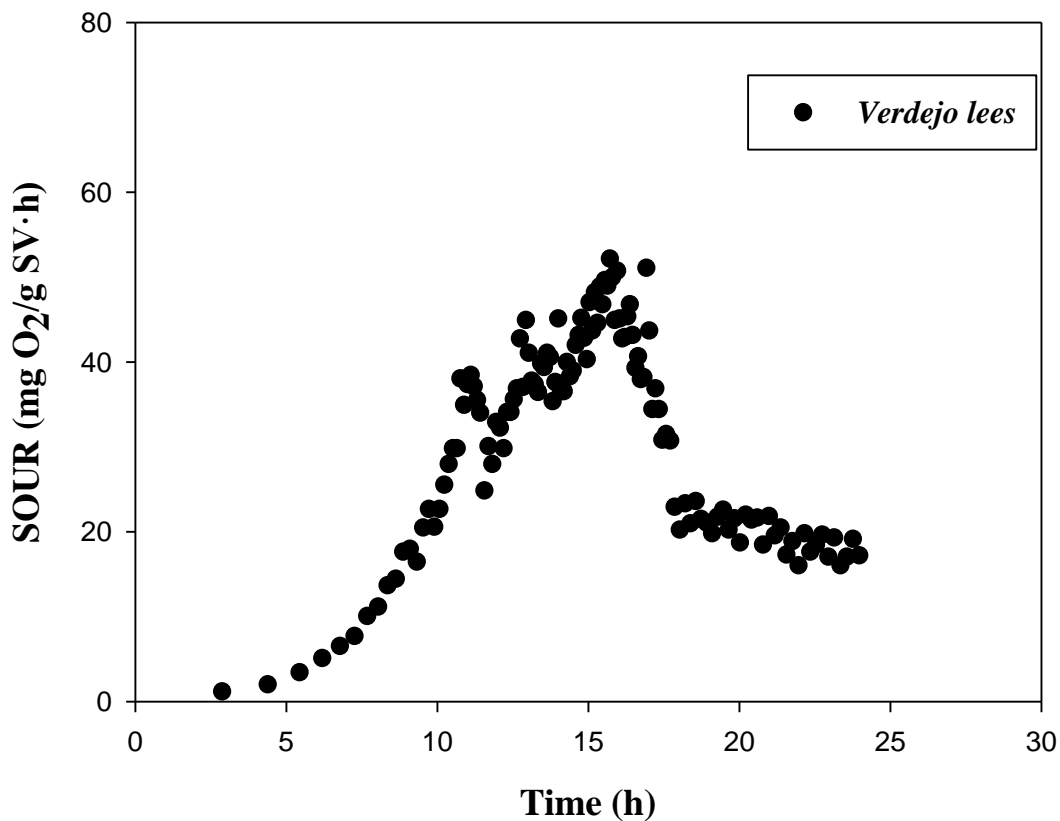


Figure 2. Biodegradability test of wine lees by static respirometry in liquid phase at laboratory-scale, under aerobically conditions.

During the experiments, the OD₂₄ reached 475 mg O₂/g VS. The OD₂₄ for grape lees was 396 mg O₂/g VS for this experiment. Lower OD₂₄ values have been found for other organic wastes, such as the organic fraction of municipal solid waste (312 mg O₂/g VS), horticultural sorting, rice straw and bulking agent at 5:5:1 volume ratio (0 mg O₂/g VS) and the organic fraction of municipal solid waste with orange peel waste (248 mg O₂/g VS).¹⁵ Based on these results, Verdelho grape lees is aerobically biodegradable, and also susceptible to be valorized by a biological treatment

Stability of Anaerobic Digestion Process. Control of an anaerobic digestion process is necessary if the biomethanization is developing under stable conditions. The stability of the process was monitored by the evolution of pH, conductivity, Alk, VA and VA_{GC}/VA_{DIS}. The pH was approximately constant across the experiment, showing a slight increase from pH 7.77 ± 0.07 to 8.04 ± 0.04 with the load increase in (Figure 3A). This range of values is close to the optimal range for methanogenic bacteria, which is between 7.10 and 7.80.¹⁶ Conversely, after the first load, the conductivity slightly increased with subsequent loads, from 8.23 ± 0.35 to 6.10 ± 0.33 mS/cm, due to the soluble nutrients added by lees grapes, which can ionize, thereby contributing to the conductivity variable.

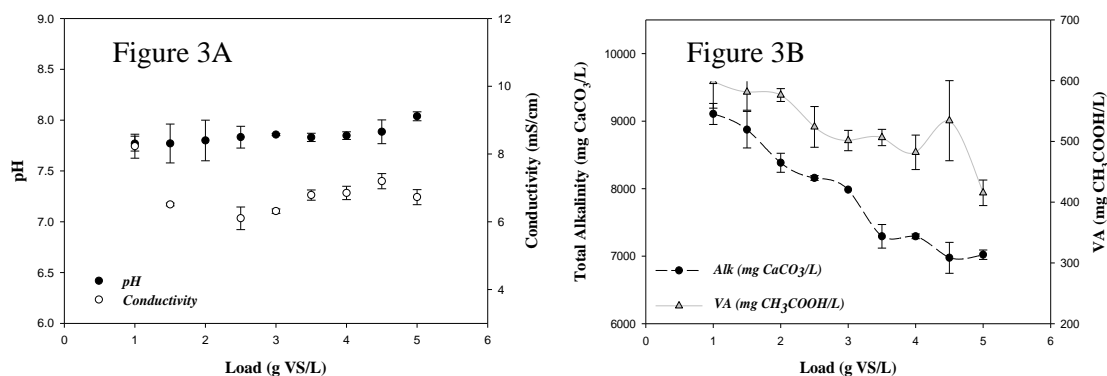


Figure 3. (A) Evolution of pH and conductivity (mS/cm) along the loads. (B) Evolution between total alkalinity (mg CaCO₃/L) and Volatile Alkalinity (VA) (mg CH₃COOH/L) during the loads.

The Alk and VA (mg CH₃COOH/L) evolved similarly to each other during the experiments, showing a decrease from 9106 ± 155 to 6975 ± 229 mg CaCO₃/L, and a range of 600 and 415 mg CH₃COOH/L, respectively (Figure 3B). The Alk is a measure of the mixing liqueur buffer capacity to neutralize acids and is produced in anaerobic digestion through the degradation of the feedstock.¹⁷ The reduction of VA is due to the transformation in biogas, despite an expected increase of VA during biomethanization under batch mode, but in the event of high organic overloading and microbial inhibition, the accumulation of VA might reduce the treatment capacity.^{18,19} Figure 4A reveals there was an increase of VA_{GC}, as well as the VA_{GC}/VA_{DIS} ratio. The decrease in long-chain acids explained previously in Figure 3B, might affect the formation of short-chain acids during the acetogenesis step and, consequently, biogas production during the methanogenesis step.²⁰ The decrease in short-chain acids might have been affected by the reduction in Alk, as well as the decline in VA_{DIS}, described above, thereby causing a reduction of biogas as a consequence of inhibition of the methanogenic archaea activity.

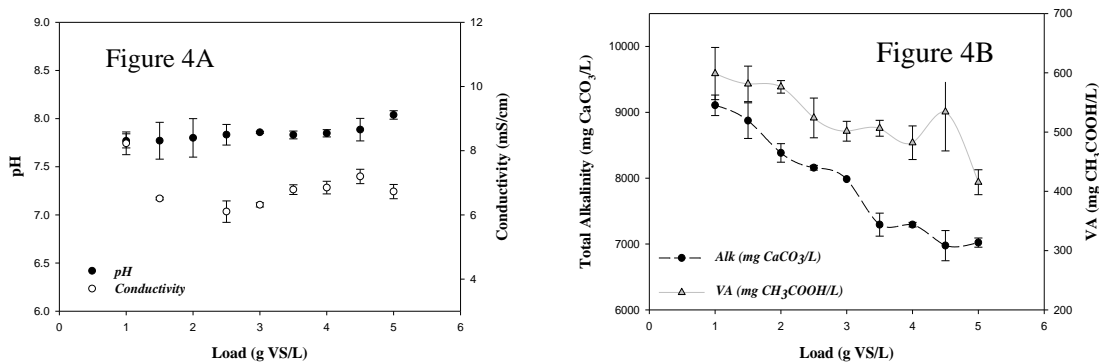


Figure 4. (A) Variation in volatile fatty acids (mg C/L) and VA_{GC}/VA ratio with the loads. (B) Evolution of volatile and fixed solids (mg/kg) during the loads.

Evolution of Organic Matter. The evolution of organic matter (g VS/L) was monitored to evaluate the development of the anaerobic process. Figure 4B

demonstrates the evolution of VS according to the loads was practically constant over the experiment. This slight accumulation might be due that lees are composed by a solid fraction, which consists of microbial biomass, insoluble carbohydrates, phenolic compounds, proteins and also non-biodegradable compounds, such as lignin, metals and inorganic salts. In addition, it is composed by a liquid phase that is rich in organic acids, as well as ethanol,³ an inhibition factor when present at concentrations higher than 250 mg/L.²¹ The FS showed a similar trend, with a mean value of 9602 ± 459 mg/kg during the experiment, because the inoculum used in this experiment, derived from the bakery industry, has a high concentration of FS.

Effect of N and P on Wine Lees Digestion. Macronutrients, such as N and P, are required to enhance process stability and maintain a stable operation for anaerobic digestion processes.²² In addition, the concentration ratio between these macronutrients is important for efficient and rapid start-up, considering 300:5:1 is the COD:N:P for anaerobic digestion.²³ Figure 5A displays the relation between TSN and $N-NH_4^+$ for each assay. In Figure 5A, most of the 89% of the value pairs of TSN– $N-NH_4^+$ dots can be fitted to a straight line within a confidence interval of 95%. There is a linear relationship between the TSN and $N-NH_4^+$ concentration after carrying out each experiment because most of the N content is in the form of $N-NH_4^+$, which belongs to grape lees. There was a decrease in TSN during the loads, in a range of 942 to 683 mg/L, and a similar tendency for $N-NH_4^+$, where the initial values (862 mg/L) achieved the lowest concentration at the highest load (712 mg/L). According to the slope of the straight line, the TSN present is proportional to the ammoniacal nitrogen ($N-NH_4^+$), in a 2:1 ratio, respectively.

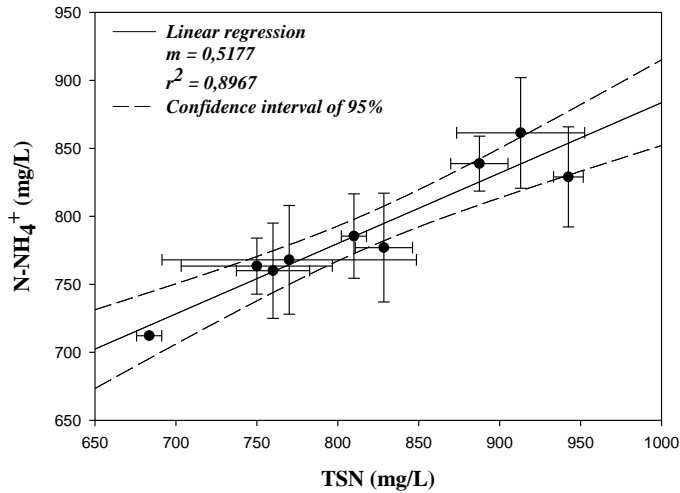


Figure 5A

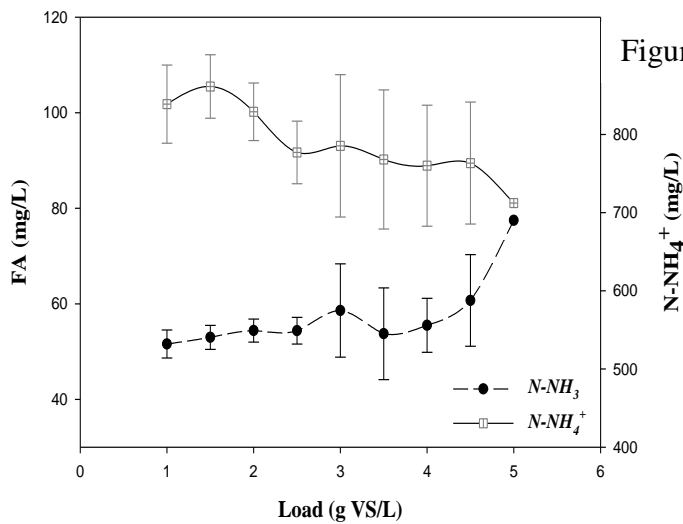


Figure 5B

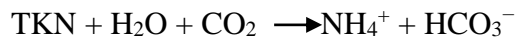
Figure 5. (A) Relation between $N-NH_4^+$ and soluble nitrogen (mg N/L). (B) Variation in free ammonia (mg/L) and $N-NH_4^+$ (mg/L) with the loads.

NH_4^+ and free ammonia (FA) are two of the main forms of NH_3-N contained in the anaerobic digesters, being the NH_3 an inhibitory factor, as it can cross the bacterial membrane.^{24,25} The presence of N in the form of NH_4^+ or un-ion ammonia (NH_3) depends on the pH and temperature of the aqueous solution.¹⁷ The FA can be calculated from the NH_4^+ concentration, pH and temperature of the solution, according to the formula below:²⁶

$$\frac{[\text{NH}_3]}{[\text{NH}_4^+]} = \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-(0.09018 + \frac{2729.92}{T(K)})}} \right)^{-1} \quad (1)$$

The FA concentration increased during the loads, showing the most important change at the last load. A similar trend was observed for the pH along the loads, as the FA value depends on the pH, among other variables. The FA values were situated between 51.59 ± 0.12 to 77.45 ± 0.09 mg N/L, during the experiment (Figure 5B). These values are distant of the toxicity concentration noted by other authors, such as Koster and Lettinga,²⁷ who proposed 80 mg N/L of FA as the minimum inhibitory level, while other authors are resistant to ammonia levels higher than 10 g/L.²⁸

Likewise, the ammonium produced by the biological degradation of the nitrogenous matter (expressed as TKN) represents mainly proteins and urea.²⁹ The destruction of this N might cause the production of ammonium bicarbonate and the reaction of the released $\text{NH}_3\text{-N}$ with the CO_2 produced, which could explain the increase of N-NH_4^+ (Figure 5B), according to the following reaction:³⁰



CH₄ Yield Coefficient. The CH₄ yield coefficient was determined from the experimental maximum CH₄ volume produced per liter of the reactor (*G*), and the load added to the reactors (g VS added/L). The mean value of yield production was 332 ± 37 mL_{STP} CH₄/g VS for the loads up to 4 g VS/L, fitting 46% of the total values to a straight line within a confidence interval of 95% (Figure 6A). These values were slightly lower than the results obtained by Da Ros et al.,³¹ who studied the biochemical methane potential test from wine lees under thermophilic conditions (55 °C). The net biogas yield obtained in that investigation was 370 mL/g VS under standard conditions,

which led to a less favorable energy balance, due to the energy requirement for the maintenance of the thermophilic conditions.³¹ The wine lees used in the same study³¹, were derived from wine clarified using bentonite before the bottling, and stored at -20 °C in a freezer before use. Thus, the temperature of the experiment might also have affected the volume obtained. Furthermore, the value pairs for loads from 4.5 to 5.5 g VS/L showed inhibitory symptoms or the CH₄ production process affectation.

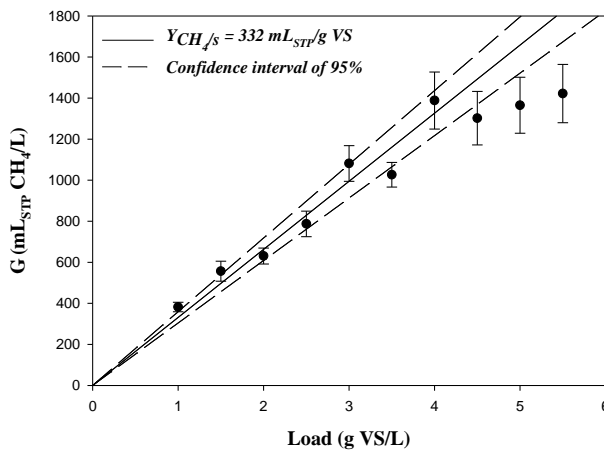


Figure 6A

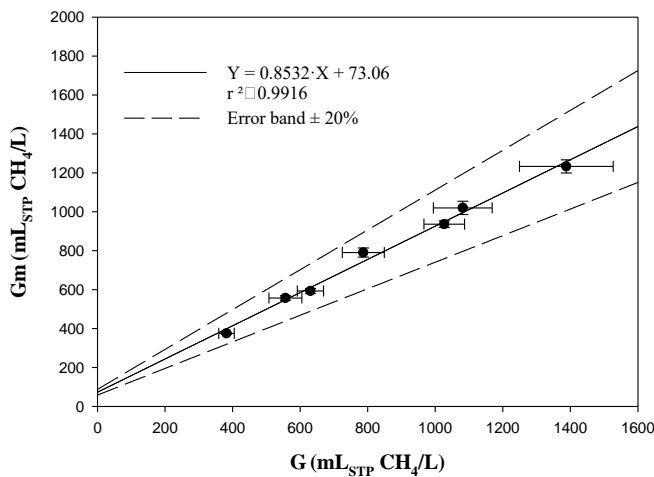


Figure 6B

Figure 6. (A) Methane rate production as a function of experimental time (mL_{STP} CH₄/L·h). (B) Validation of mathematical model determined from the experimental maximum methane volume produced (*G*) and the maximum volume of methane (*Gm*) (mL_{STP} CH₄/L). (C) Evolution of kinetic constant (h⁻¹) during the loads.

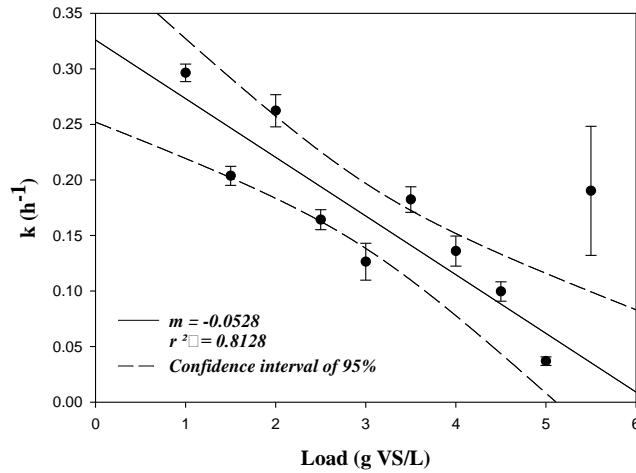


Figure 6C

Based on the mean value of yield production, the biodegradability was quantified considering that 350 mL_{STP} CH₄/g COD is the maximum CH₄ produced per gram of COD.¹⁵ According to this information, the biodegradability of wine lees, as CH₄ production, was 52.92%. The COD represents the biodegradable organic matter, especially, highly biodegradable organic matter, such as the reducing sugars (572 ± 32 mg/L) content in this raw material. The remaining organic matter is used to grow and metabolize the microorganisms involved in the anaerobic digestion process while there is also a portion that is not biodegradable (e.g., lignocellulosic compounds, waxes).

To extrapolate the experimental results to other working scales, a kinetic study was done, according to an exponential mathematical model proposed by Borja et al.:³²

$$G = G_m \cdot [1 - \exp(-k \cdot t)] \quad (2)$$

where G is the volume of CH₄ accumulated per liter of the reactor under STP conditions (1 atm and 0 °C), G_m is the maximum volume of CH₄ (mL_{STP} CH₄/L), k is an apparent kinetic constant (h⁻¹), and t is time (h).

The k and G_m values were calculated from the experimental data obtained. Table 2 lists the values of G , G_m and k , showing a decrease of r^2 at 5.50 g VS/L. Likewise, there was a decrease of k values at 4 g VS/L, due to a reduction in the Inoculum/Substrate ratio, which might cause an inhibition by the substrate, as has been explained above. However, the mathematical model proposed was validated and quantified by determining the relation between the maximum accumulated volume of experimental CH_4 (G_{exp}) and the theoretical value (G_m) obtained by the software (Figure 6B). All pairs of values correctly fit a straight line with a slope close to 1, within an error band of 20%, indicating the suitability of the mathematical model proposed under these experimental conditions.

Table 2. Parameters of mathematical model

Load (g VS/L)	G (mL _{STP} CH ₄ /L)	G_m (mL _{STP} CH ₄ /L)	r^2
1.0	382 ± 22	375 ± 5	0.9967
1.5	557 ± 48	557 ± 12	0.9876
2.0	631 ± 39	592 ± 13	0.9712
2.5	787 ± 62	790 ± 23	0.9702
3.0	1082 ± 87	1020 ± 34	0.9540
3.5	1027 ± 60	936 ± 17	0.8887
4.0	1176 ± 30	1232 ± 34	0.9574
4.5	1287 ± 21	1360 ± 32	0.9828
5.0	1365 ± 15	1560 ± 82	0.9865
5.5	1205 ± 306	1164 ± 172	0.7286

In addition to the maximum yield production, it is important to quantify the rate transformation of organic matter, in order to design the reactor on an industrial scale. Figure 6C shows the values of the apparent kinetic constant as a function of the load, revealing a mild reduction of the kinetic rate during the loads, with a slope of -0.0528. More than 81% of the value pairs fit correctly to a straight line within a confidence interval of 95%, showing values out of range for higher loads, concretely for 5.5 g VS/L, due to a substrate inhibition, as explained above.

Taking into account the results shown in this paper, anaerobic digestion of verdejo lees might be an interesting treatment of this waste, with a significant biodegradability (52.92%). These results are because the residue belonged to an organic cellar, which does not use chemical fertilizers, which affect the composition of its wines and waste generated. This fact makes it of great interest and contributes a novelty in this investigation, since to the best of our knowledge, there have not been previous studies that have used residues of ecological cultivation.

ACKNOWLEDGMENTS

The company Bodegas Robles S.A. (Montilla, Córdoba, Spain) is gratefully acknowledged for supplying the winemaking wastes. The authors also wish to express their gratitude to Inmaculada Bellido and María Luisa López for their contribution to this research, and to Juan Moreno and Jaime Moreno, members of the AGR-146 research group of the University of Córdoba.

Funding

The authors are very grateful to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project CTQ2014-60050-R), Ministry of Education, Culture and Sport for funding this research.

LITERATURE CITED

- (1) International Organization of Vine and Wine: OIV, 2016.
(<http://www.oiv.int/en/databases-and-statistics>) (Accessed April 16, 2018)

- (2) Rivas, B.; Torrado, A.; Moldes A.B.; Dominguez, J.M. Tartaric acid recovery from distilled lees and use of the residual solid as an economic nutrient for *Lactobacillus*. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7904–7911.
- (3) Pérez-Bibbins, B.; Torrado-Agrasar, A.; Pérez-Rodríguez, N.; Aguilar-Uscanga, M.G.; Domínguez, J.M. Evaluation of the liquid, solid and total fractions of beer, cider and wine lees as economic nutrient for xylitol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2014**, *90*, 1027–1039.
- (4) Guilloux-Benatier, M.; Chassagne, D. Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 746–751.
- (5) Pérez-Bibbins, B.; Torrado-Agrasar, A.; Salgado, J.M.; de Souza Oliveira, R.P.; Domínguez, J.M. Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: an overview. *Waste Manag.* **2015**, *40*, 72–81.
- (6) Salgado, J.M.; Rodríguez, N.; Cortés, S.; Domínguez, J.M. Development of cost-effective media to increase the economic potential for larger-scale bioproduction of natural food additives by *Lactobacillus rhamnosus*, *Debaryomyces hansenii*, and *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10414–10428.
- (7) Moruno, E.G.; Sanlorenzo, C.; Boccaccino, B.; Di Stefano, R. Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 73–76.
- (8) De Melo Abreu, S.; Caboni, P.; Pirisi, F.M.; Cabras, P.; Alves, A.; Garau, V.L. Residues of the fungicide famoxadone in grapes and its fate during wine production. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 289–294.

- (9) Caputi, A.; Ribeiro, A.; Byrne, K.J. Gas chromatographic determination of mono- and diglycerides in wine and their natural removal from wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 415–417.
- (10) Gómez, M.E.; Igartuburu, J.M.; Pando, E.; Luis, F.R.; Mourente, G. Lipid composition of lees from Sherry wine. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4791–4794.
- (11) Nogales, R.; Cifuentes, C.; Benítez, E. Vermicomposting of winery wastes: a laboratory study. *J. Environ. Sci. Health B* **2005**, *40*, 659–673.
- (12) Siles, J.Á.; Martín, M.A.; Martín, A.; Raposo, F.; Borja, R. Anaerobic digestion of wastewater derived from the pressing of orange juice peel generated in orange juice production. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1905–1914.
- (13) APHA, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th 6 ed.). Washington, DC: American Public Health Association, 1989.
- (14) Da Ros, C.; Cavinato, C.; Pavan, P.; Bolzonella, D. Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Waste Manag.* **2014**, *34*, 2028–2035.
- (15) Gutiérrez, M.C.; Siles, J.A.; Diz, J.; Chica, A.F.; Martín, M.A. Modelling of composting process of different organic waste at pilot scale: biodegradability and odor emissions. *Waste Manag.* **2017**, *59*, 48–58.
- (16) Wheatley, A. *Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology*; Elsevier: London, UK, 1990.
- (17) Fagbohunbe, M.O.; Herbert, B.M.J.; Hurst, L.; Ibeto, C.N.; Li, H.; Usmani, S.Q.; Semple, K.T. The challenges of anaerobic digestion and the role of biochar in optimizing anaerobic digestion. *Waste Manag.* **2017**, *61*, 236–249.

- (18) Chen, Y.; Cheng, J.J.; Creamer, K.S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 4044–4064.
- (19) Rétfalvi, T.; Tukacs-Hájos, A.; Albert, L.; Marosvölgyi, B. Laboratory scale examination of the effects of overloading on the anaerobic digestion by glycerol. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*(8), 5270–5275.
- (20) Dasa, K.T.; Westman, S.Y.; Millati, R.; Cahyanto, M.N.; Taherzadeh, M.J.; Nicklasson, C. Inhibitory effect of long-chain fatty acids on biogas production and the protective effect of membrane bioreactor. *BioMed Res. Int.* **2016**, Article 7263974. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7263974> (accessed June 19, 2018).
- (21) Camarillo, R.; Rincón, J. Effect of inhibitory compounds on the two-phase anaerobic digestion performance of diluted wastewaters from the alimentary industry. *Chem. Eng. J.* **2012**, *193–194*, 68–76.
- (22) Kayhanian, M.; Rich, D. Pilot-scale high solids thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste with an emphasis on nutrient requirements. *Biomass Bioenergy* **1995**, *8*(6), 433–444.
- (23) Aiyuk, S.; Forrez, I.; Lieven, D.K.; van Haandel, A.; Verstraete, W. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates—A review. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 2225–2241.
- (24) Kroeker, E.J.; Schulte, D.D.; Sparling, A.B.; Lapp, H.M. Anaerobic treatment process stability. *J. Water Pollut. Control Fed.* **1979**, *51*, 718–727
- (25) de Baere, L.A.; Devocht, M.; van Assche, P.; Verstraete, W. Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic associations. *Water Res.* **1984**, *18*, 543–548.

- (26) Østergaard, N. *Biogasproduktion i det termofile temperaturinterval. STUB rapport nr. 21*. Kemiteknik Dansk Teknologisk Institut: Taastrup, Denmark, 1985.
- (27) Koster, I.W.; Lettinga, G. The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agric. Wastes* **1984**, *9*, 205–216.
- (28) Jarrell, K.F.; Saulnier, M.; Ley, A. Inhibition of methanogenesis in pure cultures by ammonia, fatty acids, and heavy metals, and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge. *Can. J. Microbiol.* **1987**, *33*, 551–555.
- (29) Kayhanian, M. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: an overview and practical solutions. *Environ. Technol.* **1999**, *20*, 355–365.
- (30) Grady, L.C.P., Daigger, G.T., Lim, H.C. *Biological Wastewater Treatment* (2nd ed.), Marcel Dekker: New York, NY, 1999.
- (31) Da Ros, C.; Cavinato, C.; Bolzonella, D.; Pavan, P. Renewable energy from thermophilic anaerobic digestion of winery residue: preliminary evidence from batch and continuous lab-scale trials. *Biomass Bioenergy* **2016**, *91*, 150–159.
- (32) Borja, R.; Martín, A.; Banks, C.J.; Alonso, V.; Chica, A. A kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environ. Pollut.* **1995**, *88*, 13–18.

Descripción del artículo: “Anaerobic co-digestion of winery waste: Comparative assessment of grape marc waste and lees derived from organic crops”

La uva es uno de los principales cultivos frutales del mundo, con cerca de 77 millones de toneladas cosechadas al año. La fracción principal de la producción total se consume como zumo de uva, mosto o pasas. Las uvas son comúnmente utilizadas para producir vino, un proceso que genera diferentes desechos como pieles, semillas, raspones, lías y otros residuos. Para reducir el impacto ambiental asociado a dicha actividad industrial, este estudio evalúa la recuperación de los principales residuos de bodega por digestión anaerobia para producir energía en forma de metano y utilizar el digestado estabilizado como enmienda orgánica. Los residuos de orujos de uva y las lías de los vinos Verdejo y Pedro Ximenez (PX) se sometieron a biometanización en condiciones mesofílicas, mostrando el proceso un comportamiento estable. Las lías PX permitieron alcanzar una mayor producción de metano (433 NL CH₄/kg SV) con una velocidad de carga orgánica máxima de 25,6 kg de lías de vino PX/m³·d. En el rango evaluado, el proceso fue estable con una biodegradabilidad en el rango 51-79%. El tratamiento secuencial de las lías de PX, así como de las derivadas de la variedad Verdejo y de los orujos de uva podría llevarse a cabo en diferentes fases en un mismo reactor para completar el ciclo anual de generación/gestión y promover la economía circular en la D.O.P. Montilla-Moriles, de donde derivan los residuos objeto de estudio.



Anaerobic co-digestion of winery waste: Comparative assesment of grape marc waste and lees from ecological crops.

Hungría Javier, Siles José Ángel, Chica Arturo Fco., Martín María de los Ángeles*

Department of Chemical Engineering, University of Córdoba, Campus

Universitario de Rabanales, Ctra. N-IV, km 396, building Marie Curie (C-3), CP/14071 Córdoba,

Spain. *Corresponding author: Email: iq2masam@uco.es; phone: +34 957212273

Abstract

Grapes are one the world's leading fruit crops, with close to 77 million tonnes harvested per year. The main fraction of the total production is consumed as grape juice, grape must or dried grapes. Grapes are most commonly used to produce wine; a process which generates different wastes such as skins, seeds, stalks, lees and other residues. To reduce environmental impacts associated to industrial activities within a circular economy framework, this study evaluates the recovery of winery waste by anaerobic digestion to produce energy in the form of methane and use the stabilized digestate as an organic amendment. Grape marc waste and Verdejo and Pedro Ximenez (PX) wine lees were digested under mesophilic conditions, showing a stable behavior. The PX lees showed the highest methane yield production (433 L_{STP} CH₄/kg VS) with a maximum OLR of 25.6 kg PX wine lees/m³·d. In the evaluated range the process was stable with a biodegradability of approximately 79–51%. The sequential treatment of PX lees, Verdejo lees and grape marc waste could be carried out in different stages in the same reactor to complete the annual cycle and promote the circular economy in the Montilla-Moriles PDO.

Introduction

Grape harvesting is one the world's most leading fruit crop, with a production close to 75 million of tonnes per year. Almost half the grape production (35.9 millions of tonnes) is mainly aimed to produce wine, one third of the total production is consumed as table grape, while the rest of them is dried, consumed as grape juice or grape must (FAO, 2016).

As mentioned above, the use of grape to produce wine is the most common, generating different wastes such as skins, seeds, stalks, lees, etc. The composition of these wastes depends of the grape variety, environmental conditions and the methodology to produce the wine, principally. Grape marc waste (skins, seeds and stalks), belonging to white wine contains residuals sugars after crushing, however, in the case of grape marc from red wine elaboration has also some ethanol content, due to the maceration of the must with grape marc.

Grape marc waste comes from the pressing of grapes, first step of the wine making process. After separate liquid (must) from solid (grape marc waste), the must is stored to clarify the must and it is disinfected with sulfide dioxide. Fermentation is the next stage, whereupon it is generated other waste called lees. Grape marc waste is stacked in the winery till the distillery pick up the residues to obtain ethanol, while lees are stored in tanks to extract ethanol and tartrate acid, principally (Muhlack et al., (2018)). In spite of winery waste might be used as byproducts, its disposal in landfill is still frequent at local scale, leading to serious environmental problems. In this context, the EC regulation 479/2008 recommends the investigation and development of novel products and sustainable processes of all wastes produced by wineries, in line with the requirements of bio-economy (Dimou et al. 2016).

Several Protected Designation of Origin (PDO), such as Montilla-Moriles PDO, located in Córdoba (Spain) is composed by small wineries where traditional wine making process is carried out. These traditional practices include, for example, ageing wine with lees, which is very common in white and sparkling wines (Dos Santos et al., (2000); Feuillat and Charpentier, 1982). Commonly, lees has to

be separated from the wine after alcoholic fermentation, to avoid any organoleptic compound undesirable (Alcaide-Hidalgo, et al., (2008)).

In Montilla-Moriles PDO the total production was 33.5 tonnes of grapes to produce wine, during the harvest 2017 (Consejo Regulador PDO Montilla-Moriles, 2017). Taking into account that grape marc waste represents 20-25% of processed grape and wine lees involve 2-6% of total grape ((Sessa et al., 2012) and Bai et al., (2008)), the treatment of these wastes is crucial due to the large volume generated, particularly in the case of organic crop in order to minimize the carbon foot print of ecological wineries. This DPO carries out a traditional winemaking process, whose production yield is one the lower (2.68 kg grape/L) (Consejo Regulador PDO Montilla-Moriles) in the case of the Pedro Ximenez sweet wines, in comparison with the production yield mean on the world (1.325 kg of grapes/L wine) (OIV (2015)).

This residual matter is generated in a seasonal period, however Verdejo lees and PX lees are produced in different stage during the winemaking. In Montilla-Moriles PDO the harvest usually starts at the end of July, so after pressing great piles of grape marc waste are dumped in the winery, till middle September. On the other hand, lees are generated in different time periods due to in this DPO are made different kinds of wine whose harvest and fermentation process vary depending of the wine to produce.

The storage of winery waste has different problems. In addition to affecting manoeuvrability in the winery due to the volume it occupies, it can also lead to environmental problems such as bad odors or leachate, the risk of fire due to the fermentation that is taking place in the pile, and even health problems. When the grape marc waste is crowded, due to moisture and high temperatures it becomes a focus of pests and insects that can spread through the surrounding crops or nearby populations, due to the high sugar content of some of them. In some cases, uncontrolled incineration of these wastes is a source of pollution and nuisance to nearby areas. On the other side, lees is stacked up for transport

to the distilleries, whose shipping leading to the generation of greenhouse gases such as carbon dioxide and unburnt fuel.

Currently, anaerobic digestion is one the most important sustainable technologies, to treat and stabilize organic waste, at the same time that produces biogas and a digestate which can be used as organic amendment (Gil et al., (2018) and Zhang et al., (2016)). The biogas that is produced during the process is mainly composed of methane and carbon dioxide, which may be used to obtain electricity and heat (Castelluci et al., 2013). In fact, has been carried out different researches of anaerobic treatment of winery waste (grape marc waste or lees) independently, such as El Achkar et al., (2018).

Taking into account that lees can be stored in tanks without any environmental risk, the use of grape marc waste and lees to evaluate in anaerobic digestion, jointly, has been carried out. Due to grape marc waste is susceptible to be a focus of health and environmental problems, should be used directly at the same time is generated after pressing grapes. Considering that a study of the integral assessment of energy and flow in the same reactor has not been carried out, the aim of this study is to evaluate the recovery of winery waste by means of anaerobic digestion for the production of energy in the form of methane and the use of the stabilized digestate as an organic amendment, within the framework of Montilla-Moriles DPO. Owing to the problems associated to the currently use of these winemaking wastes and the growing environmental awareness, has been carried out the viability study of grape marc waste and lees (belonging to different kind of wines) as raw material in anaerobic digestion. Also, the novelty of this research is the joint evaluation of waste generated in a winery, staggering the treatment along the year. This study has not been published before. The construction of a biorreactor might promote the grape waste valorisation in the vine region, provide other economical industry in this rural area and promoting the circular economy.

2 Materials and methods

2.1 Experimental set-up

The experimental set-up used for the anaerobic digestion of winery waste consisted in separate tests for each waste, with five 1-L Pyrex reactors for each of the three tests, operating in semi-continuous mode under mesophilic conditions through a thermostatic jacket of water at 37 °C. While a magnetic stirrer, the reactor content was homogenized. In addition, the CO₂ contained in the biogas was removed by NaOH solution (6 N) present in cylinders connected to the reactors and the reservoirs. The volume of methane was measured using 1-L Boyle-Mariotte reservoirs connected to each reactor. The methane volume displaced an equal measurable volume of water from the reservoir. The reactors were inoculated with three granular biomass whose characterization and methanogenic activity are showed in Table 1.

Table 1. Characterization of inoculum

	B	P	Verdejo	GMW
TS (mg/kg)	19,851±2,043	114,917±1399	26,725±199	36,369±328
FS (mg/kg)	4,966±115	25,384±1,050	14,750±138	12,559±230
VS (mg/kg)	14,885±1,966	89,533±404	11,975±98	23,810±377
Moisture (%)	98.01±0.2	88.51±0.14	97.25±0.3	96.46±0.30
pH	7.17±0.01	6.39±0.01		
Conductivity (mS/cm)	3.48±0.01	2.77±0.01		
Total Alkalinity (mg CaCO₃/L)	2,643±49	2,937±49		
Volatile acidity (mg C₂/L)	294±3	734±7		
Methanogenic activity (mL_{STP} CH₄/g VS·h)	84±3	136±5	34±3	60±5

2.2 Winery waste

The winery waste used for this experiment was generated after pressing the grapes used for making Pedro Ximénez wine and after alcoholic fermentation to produce Pedro Ximénez wine and Verdejo wine, all of them belonging to ecological crop. The wastes were provided by the Bodegas Robles Winery (Montilla, Cordoba, Spain), which belongs to the Montilla-Moriles PDO of Andalusia. Table 2 shows the analytical characterization of the waste used as substrate in this study.

Table 2. Characterization of winery wastes

	Orujo PX	Lías Verdejo	Lías PX
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1,135 \pm 4	1,834 \pm 0.07	1,938 \pm 7
pH	3.59 \pm 0.02	3.24 \pm 0.07	4.23 \pm 0.01
Moisture (%)	73.67 \pm 0.28	83.90 \pm 0.06	72.43 \pm 0.06
COD (mg O₂/ g dry weight)	1,293 \pm 20	1,380 \pm 19	1,179 \pm 98
TKN (mg NTK / g dry weight)	16.10 \pm 0.80	1.76 \pm 0.11	23.41 \pm 0.56
N-NH₄⁺ (mg N-NH₄⁺ / g dry weight)	1.40 \pm 0.02	1.63 \pm 0.01	2.82 \pm 0.17
Phosphorus (mg P / g dry weight)	0.120 \pm 0.003	0.15 \pm 0.01	0.77 \pm 0.07
TC soluble (mg/ g dry weight)	564 \pm 1	683 \pm 1	344 \pm 1
IC soluble (mg/ g dry weight)	1.00 \pm 0.05	0.03 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01
TOC soluble (mg/ g dry weight)	563 \pm 1	683 \pm 1	343 \pm 1
TSN (mg/ g dry weight)	3.26 \pm 0.10	0.22 \pm 0.01	5.00 \pm 0.01
FS (g/kg dry weight)	125 \pm 5	126 \pm 3	353 \pm 7
VS (g/kg dry weight)	874 \pm 10	874 \pm 13	647 \pm 11
Cu (mg/kg dry weight)	1.30 \pm 0.18	<DL	88 \pm 1
Cr (mg/ kg dry weight)	10.96 \pm 2.23	<DL	12 \pm 1
Ni (mg/ kg dry weight)	5.57 \pm 0.55	22 \pm 2	13 \pm 3
Cd (mg/ kg dry weight)	1.85 \pm 0.37	9 \pm 1	6 \pm 1
Pb (mg/ kg dry weight)	1.48 \pm 0.18	26 \pm 17	32 \pm 1
Zn (mg/ kg dry weight)	5.39 \pm 0.37	17 \pm 1	36 \pm 1
Acetic acid (mg/ g dry weight)	58	990	24
Propionic acid (mg/ g dry weight)	<DL	<DL	<DL
Isobutyric acid (mg/ g dry weight)	29	362	3
Butyric acid (mg/ g dry weight)	1	<DL	1
Isovaleric acid (mg/ g dry weight)	44	25	<DL
Valeric acid (mg/ g dry weight)	<DL	<DL	<DL
Total Acetic acid (mg/ g dry weight)	834 \pm 2	1,252 \pm 2	26 \pm 1
CaO₂₄ (mg O₂/g VS)	477	475	1,163
SOUR máx (mg O₂/g VS·h)	49	52	116

2.3 Anaerobic digesters: Experimental procedure

In each test (grape marc waste, Pedro Ximénez lees and Verdejo lees) the reactors were inoculated with 7 g VS of methanogenically-active granular. With the aim to activate the biomass prior to the experiments, the reactors were first fed with a synthetic medium (GAL medium) composed of glucose, sodium acetate and lactic acid at concentrations of 50 g/L, 25 g/L and 20.8 mL/L, respectively (Serrano et al., 2016).

After this activation stage, biomass acclimatization was carried out. The five reactors used in each test were fed with 0.50 g VS/L composed of GAL and winery waste (50/50% VS). Five replicates

were performed per load in each reactor and the percentage of winery waste in the mixture was increased from 50% to 100% over a time period showed in Table 3. Following this adaptation period, each reactor was loaded with 100% winery waste. The organic load added as well for each load, ranged relying on the winery waste used (Table 3). In all loads, the duration of each experiment was equal to the time interval required for total gas production and the number of replicates were seven and three for grape marc waste and lees, respectively. Additionally, the volume of methane was measured as a function of time and samples were taken and analyzed before and after feeding. All the experiments, including the start-up, biomass acclimatization and waste treatment, were carried out over a day period showed in Table 3.

Table 3. Experimental procedure of anaerobic digestion of grape marc waste, Pedro Ximenez lees and Verdejo lees

	GMW	LPX	LV
Activation stage (days)	21	17	26
Adaptation period (days)	15	15	19
Experimental period (days)	64	59	43

*GMW= Grape marc waste; LPX= Lees of Pedro Ximénez; LV= Lees of Verdejo.

2.4 Chemical analyses

The following parameters were determined in the effluents of the reactors at the end of each load and in the waste used as raw material: pH, alkalinity (Alk, mg CaCO₃/L), volatile acidity (VA_{DIS}, mg C/L), conductivity (μS/cm), chemical oxygen demand (COD, mg O₂/g dry weight), total solids (TS) (g TS/kg sample), fixed solids (FS) (g FS/kg sample), volatile solids (VS) (g VS/kg sample), total Kjeldahl nitrogen (TKN; mg N/g sample), total soluble phosphorus (TP mg P/g dry weight), total soluble organic carbon (TOC soluble; mg C/L), total soluble nitrogen (TSN; mg N/L), C₂-C₆ volatile fatty acid by gas chromatography (VA_{GC}, mg C₂/L), metals (Cu, Cr, Zn, Ni, Pb, Cd) (mg/g dry weight), specific oxygen uptake rate (SOUR, mg O₂/g VS·h) and cumulative oxygen demand at 20 h

(OD₂₀, mg O₂/g VS). All analyses were carried out in accordance with the Standard Methods of the APHA (APHA, 1989)

A Shimadzu model TOC-VCSH carbon analyzer was used to determine total soluble carbon (TC soluble), inorganic soluble carbon (IC soluble) and TOC, which is obtained as the difference between TC soluble (mg C/L) and IC soluble (mg C/L). The CO₂ generated by the catalytic oxidation of the carbon in the sample is detected by infrared spectrometry.

TSN was measured using a TOC-V CSH/CSN total organic carbon analyzer. The equipment used to analyze TSN is based on the combustion of the sample at 720 °C to decompose the total nitrogen into gaseous nitrogen monoxide. After the gas is cooled and dehumidified, it is detected using a chemiluminescence gas analyzer.

The content of short-chain volatile fatty acids (acetic, propionic, butyric, isobutyric, valeric, isovaleric and caproic acid) was determined using a Hewlett-Packard HP-560 gas chromatograph. The chromatograph is equipped with a 15 m x 0.53 mm (i.d.) Nukol silica semi-capillary column, a flame ionization detector and an oven to gradually increase the temperature from 100 to 150 °C at a rate of 4 °C/min.

Additionally, the aerobic biodegradability of the grape marc waste was evaluated using a static respirometer in liquid phase at laboratory scale. The respirometer was patented by the Chemical Engineering Research Group (RNM-271) of the University of Cordoba (Publication No. ES2283171 A1 of 16 October 2007). The respirometer consisted of a thermostated bath and two 1-L Erlenmeyers, magnetically stirred at 300 rpm and two oximeters monitored the oxygen content, which was maintained between 6.8-7.0 mg/L through the injection of compressed air. Oxygen concentration was measured and registered continuously by a data acquisition system. The respirometer test measured the cumulative oxygen demand (OD₂₄, mg O₂/g VS) at 24 h and maximum specific oxygen uptake rate (SOUR, g O₂/g VS·h). The OD and SOUR values were obtained by microbial respiration during the degradation of organic matter.

2.5 Software.

Sigma-Plot software version 14.0 was used to perform the statistical analysis of the experimental data obtained in the study and create the graphs.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of grape marc waste

In Montilla-Moriles PDO, Córdoba (Spain), the production yields are lower than other regions due to the traditional winemaking process and the Montilla-Moriles PDO regulations, which establish that the proper pressure for juice extraction and separation of the grape marc cannot be in any event higher than 70 liters of wine per 100 kilograms of vintage (BOJA, 2011).

The results of the characterization of the winery waste used in this research study are shown in Table 1. In spite of the composition of winery waste depends on several parameters as winemaking process, variety grape, temperature conditions in the winery, etc, has been showed that these wastes have a large concentration of organic compounds highly biodegradable, such as organic acid, yeast, protein, etc. according to Zhihui et al., (2008). The biodegradability of winery waste were determined by static respirometry in the liquid phase on a laboratory-scale, as was explained in the materials and methods section. Table 1 shows the maximum specific rate of oxygen uptake (SOUR, mg O₂/g VS·h) obtained for all substrates in the experiment carried out, and cumulative oxygen demand at 24 h (OD₂₄, mg O₂/g VS), both of which are the result of microbial respiration due to the degradation of organic matter. As can be seen, lees of PX showed the best results with 1,163 mg O₂/g VS approximately, at 24 hours of experimentation. According to Buendía et al, (2008) aerobic respirometric test might be used to predict the biodegradation fraction under anaerobic conditions, through a mathematical model. These results show that winery waste are biodegradable aerobically and therefore susceptible to be valorized by an anaerobic treatment. In order to evaluate the feasibility of the winery waste as raw material for anaerobic digestion, it is necessary to determine the content

in organic matter and major nutrients, particularly the C/N ratio. In this context, C/N ratio of grape marc waste was 54, lees of PX was 27, while in the case of verdejo lees achieved 496, due to its low TKN content (1.76 ± 0.11). These values were similar than the results obtained by Bustamante et al., (2008), who achieved 45 and 21 C/N ratio for marc waste and lees, respectively.

The winery waste were provided by Bodegas Robles S.A. winery (Montilla, Cordoba (Spain)), derived from the ecological wine grape crop. It must be noted that the heavy metal content in winery waste is influenced by the amendment used, where there is not used of fertilizer, in favour of use of vegetation cover, the soil variety and the irrigation water. As can be seen in Table 1, the concentration in heavy metals in the case of grape marc waste was found to be lower than that reported by Karaka (2004) in Cd, Ni, Cu and Zn concentration. Also, the heavy metals content in grape lees (Table 1) were significantly lower than the results obtained by Da Ros et al., (2014) where the concentration in Cu and Zn were 801 ± 120 and 132 ± 13 mg/kg dry weight.

Taking into account these variables winery waste are interesting to be treated by anaerobic digestion, and also to be valorized their digestate as amendment, after to be degraded.

3.2 Stability of anaerobic digestion process

Anaerobic treatment is a process which requires if the experimental procedure has been developed under stable conditions. The stability of the process was monitored by means of the evolution of pH and acidity/alkalinity ratio (VA/Alk). The pH of grape marc waste showed a decrease of 7.29% in the higher load (1.25 g VS/L), while lees showed a stable evolution along the loads with a slight decrease of the pH in the case of lees of Pedro Ximénez (Figure 1). In all cases, the values were situated in the optimal pH range for anaerobic microorganisms, which is between 7.10 and 7.80 (Wheatley, 1990). The differences between grape marc waste and lees might be due that Alk is lower for grape marc waste (480 mg C/L as higher concentration) than lees (903 mg C/L as top concentration), which affect to the buffer capacity of the anaerobic medium. Another variable to control the anaerobic process is VA/Alk ratio. In all cases the values were constants with a slight increase in the case of Pedro

Ximénez lees till achive $0.099 \pm 0.001 \text{ eq C}_2/\text{eq CaCO}_3$. However, the values in all cases were far to inhibitory levels, which are located in a range of 0.3-0.4 eq $\text{C}_2/\text{eq CaCO}_3$, associated to an acidification of the reactors (W.P.C.F, 1967).

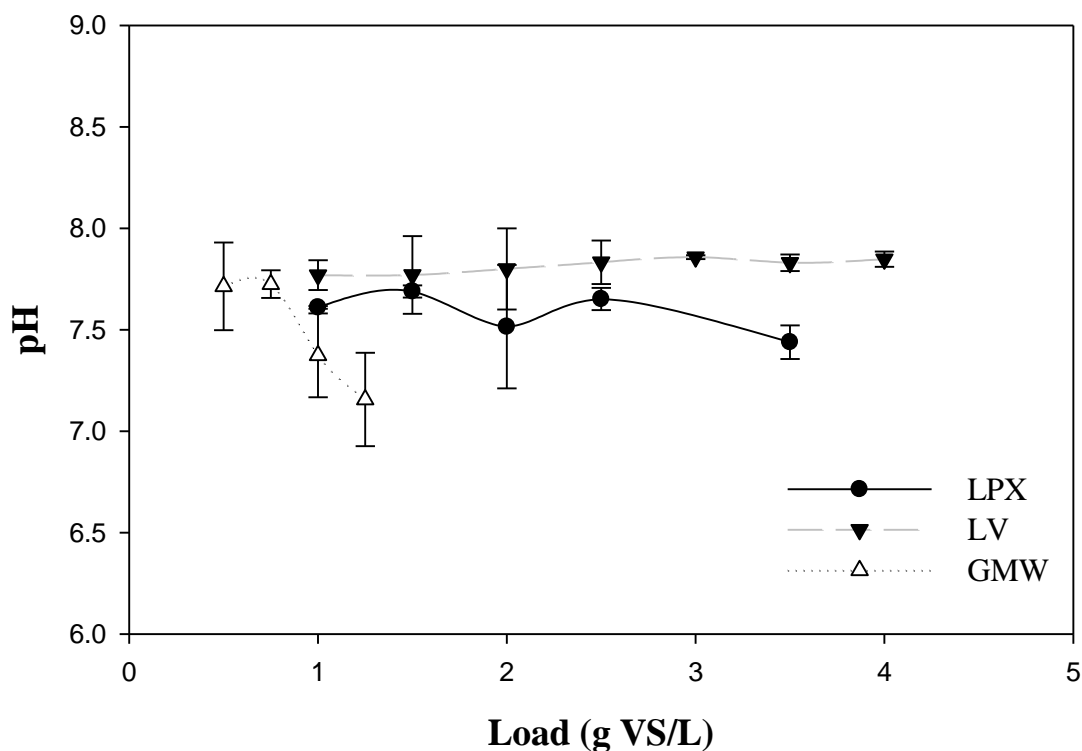


Figure 1: Evolution of pH.

3.3 Effect of N in anaerobic digestion. Free ammonia.

An anaerobic treatment is a set of interactions between several microbial species and chemical reactions that occur during the process. Macronutrients, such as N, is required to enhance process stability and maintain a stable operation for anaerobic digestion processes. The winery waste used in this experiment belong to an organic crop in which nitrogen is not applied as chemical fertilizers in order to prevent environmental risks caused by leaching, especially risks to underground water resources. This might be the reason because the TKN concentration ($16.1 \pm 0.8 \text{ mg TKN/g dry}$

weight) (Table 1) of grape marc waste was lower than the value reported by Karaka (2004), which were found to be 20.3 ± 1.8 mg TKN/g dry weight.

The higher concentration or presence of certain substances, such as ammonia, could have an inhibitory or toxicity effect on the anaerobic process. The toxicity concentration varies across studies, while authors such as Kayhanian et al., (1999) showed that a biorreactor can work at concentrations up to 1,000 mg/L of total ammonia without any inhibitory problem, other authors such as Liu and Sung (2002) claim the level of toxicity in 200 mg/L of total ammonia. Actually, many authors obviate the fact that what must be compensated is the relationship between different nutrients, at least C / N, although Gil et al. (2017) showed that methane production is affected to a lesser extent if the C: N: P ratio (quantified in equivalents) is modified jointly by N and P. Realmente, muchos autores obvian el hecho de que lo que debe estar compensado en la reacción entre los distintos nutrientes, al menos C/N, aunque Gil et al. 2017/8 demuestran que se afecta en menor medida la producción de metano si la relación C/NP -cuantificada en equivalentes- se modifica de forma conjunta por el N y P.

Free ammonia (FA) can be calculated attending to the concentration of TSN (mg N/L), pH and temperature of the solution (K), according to the formula proposed by Østergaard (1985):

$$\frac{[NH_3]}{[TSN]} = \left(1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-(0.09018 + \frac{2729.92}{T(K)})}} \right)^{-1} \quad (Eq. 1)$$

The higher value of FA (91 ± 11 mg N/L) was achieved at 0.75 g VS/L using grape marc waste as raw material. Nevertheless, in all cases FA was significantly lower than inhibitory concentrations. Despite this, the evolution of FA along the loads was determined by the pH in the case of grape marc waste, while in the cases of Pedro Ximénez lees and Verdejo lees had a relation between TSN and FA (Figure 2). This relation between TSN and FA might be due to an accumulation of nitrogen, in the case of lees of Pedro Ximénez, or a higher initial concentration of the raw material (5.00 ± 0.01 mg/g dry weight), as is the case of lees of Verdejo.

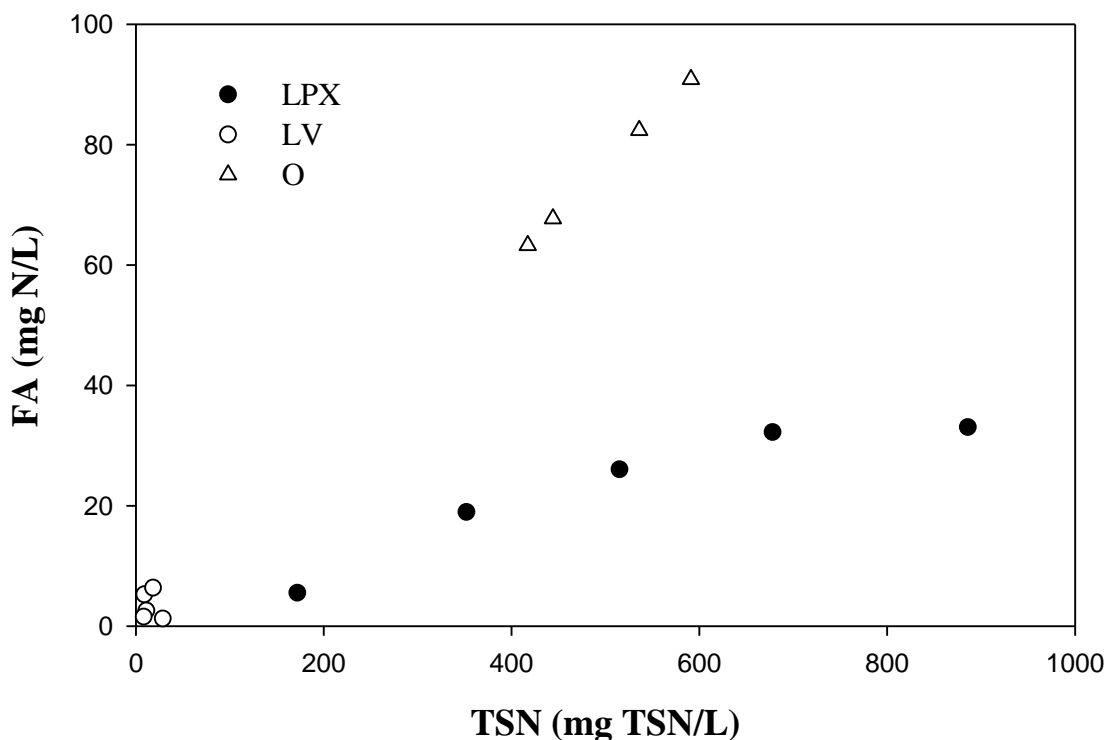


Figure 2: Relation between FA (mg N/L), TSN (mg TSN/L) and pH along the loads (g VS added).

3.4 Methane yield coefficient. Biodegradability.

The methane yield coefficient ($Y_{CH_4/S}$) was determined from the experimental maximum methane volume produced (G_{exp}) and the load added to the reactors (g VS added/L). The mean value of yield production are showed in Figure 3.

As can be seen, lees of Pedro Ximénez reached the higher yield production (433 mL_{STP} CH₄/g VS) in comparison with the other raw materials. These values were slightly lower than the results obtained by Da Ros et al. (2016) who studied the methane production from grape lees under mesophilic conditions (36 °C ± 2 °C), with a methane yield production of 488 mL_{STP} CH₄/g VS under standard conditions. On the other hand, lees of Verdejo showed an intermediate value of methane yield production, with a slope of 315 mL_{STP} CH₄/g VS. The differences in methane yield production using wine lees as raw material might be due to several factors, such as grape variety, yeast used, maturity stage, operational procedure of the winery, etc. In the case of grape marc waste, this raw material

achieved the lower methane yield production ($200 \text{ mL}_{\text{STP}} \text{ CH}_4/\text{g VS}$). This value was slightly lower than the methane yield obtained by Dinuccio et al. (2010), who studied methane production from grape stalks under mesophilic conditions ($40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) and reported a biogas yield of 225 mL/g VS under standard conditions. In spite of the methanogenic activity were different between the raw materials (Table 2), verdejo lees showed better results than grape marc waste even though its methanogenic activity was lower than grape marc waste, 34 ± 3 and $60 \pm 5 \text{ mL}_{\text{STP}} \text{ CH}_4/\text{g VS}\cdot\text{h}$, respectively.

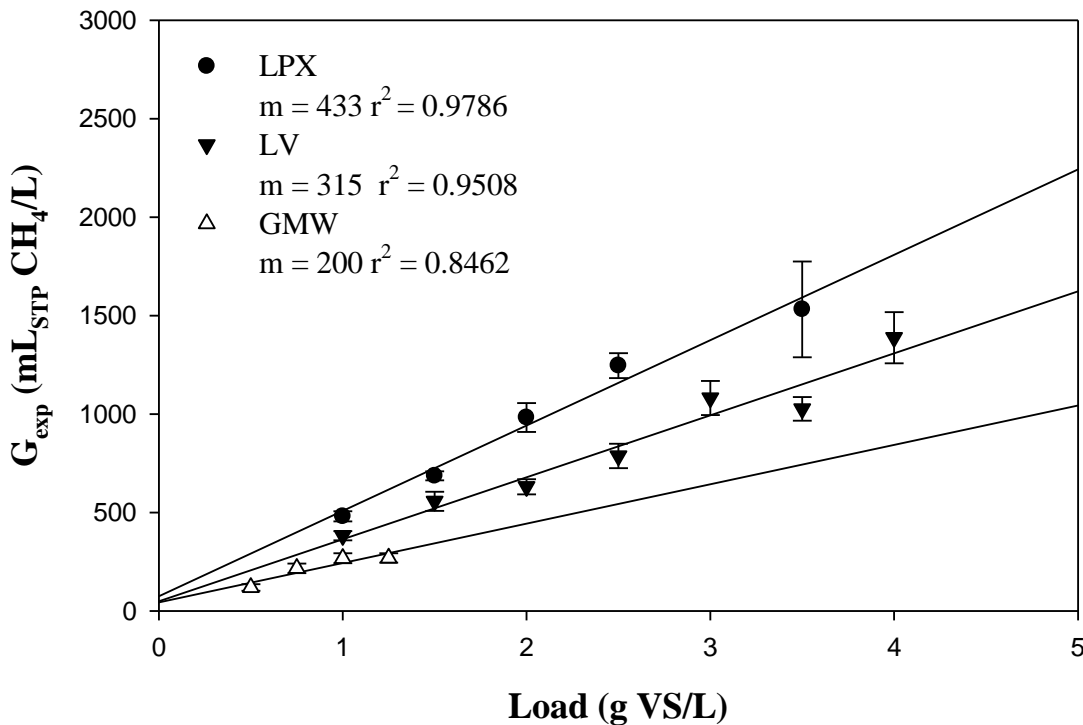


Figure 3: Methane yield coefficient ($Y_{\text{CH}_4/\text{S}}$) determined from the experimental maximum methane volume produced (G) and the load added to the reactors (g VS added).

With the aim to evaluate the development of the anaerobic process and compare the different behaviour of the raw materials has been monitored several variables related with biodegradability. The biodegradability was determined from the mean value of VS removed for each load and each raw

material. According to this, the biodegradability of lees of Pedro Ximénez and grape marc waste were 78.84% and 51.01% respectively. In the case of lees of Verdejo, the biodegradability of lees of Verdejo was 52.92%. In the case of lees of Pedro Ximénez value is similar than the biodegradability obtained by Da Ros et al. (2016) (80%), who determined the biogas production of wine lees using biochemical methane potential (BMP) tests at 55 °C according to the guidelines provided by Angelidaki et al. (2009). The differences showed in lees biodegradability might be due to the acetic acid content, which could be inhibitory effects in the case of verdejo lees (990 mg/g dry weight), in addition because a high C/N ratio, explained previously, and, in general, because it belong to a different grape variety, winemaking process, maturity stage, etc.

3.5 Organic matter.

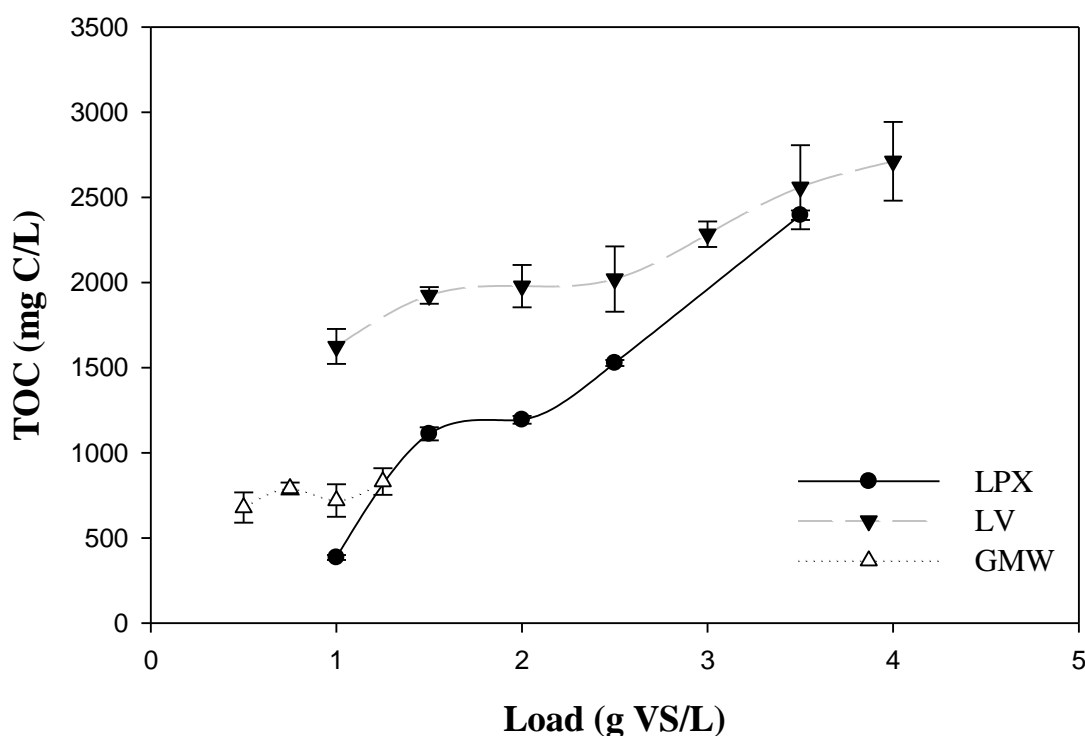


Figure 4: Variation of TOC (mg C/L) along the loads (g VS/L).

In order to control the anaerobic process, has been monitored the evolution of TOC. This variable shows the evolution of accumulated organic soluble matter along the loads. As can be seen in Figure 4, there was an accumulation of soluble organic matter which are not biodegradable such as were, lignocellulosic compounds, waxes, etc (Bustamante et al, 2008) (Camarillo and Rincon, 2009). However exist differences between grape marc waste and lees, due to lees are composed by microbial biomass from yeast autolysis, and also proteins and other non-biodegradable compounds such as ethanol, inorganic salts, etc (Pérez-Bibins et al., (2014)).

3.6 Organic loading rate (OLR)

To evaluate the mass of winery waste to be treated under anaerobic digestion as a function of time and reactor volume, has been quantified the treatment capacity, defined as the organic loading rate (OLR). In this experiment, OLR was calculated considering the substrate concentration added to the reactors and the time required to reach 95% of the total methane production for each load.

$$OLR = \frac{(Added\ load)}{t_{95}} \quad (Eq. 2)$$

where (*Added load*) is the concentration of grape marc waste added to the reactors (kg VS/m³) and *t*₉₅ time required (d) to reach 95% of the total methane production for each load.

As can be seen in Figure 5 the optimal OLR varied depending of the raw material treated. The optimal OLR in the case of grape marc waste was achieved in the load 0.75 g VS/L (10.3 kg wine grape marc waste/m³·d). Using lees of Pedro Ximénez as raw material, showed an increasing evolution till achieve a maximum in a range load of 2.00 to 2.50 g VS/L, from then on showed a decrease, which it might due to is an increase of relation VA/Alk. As can be seen, the peak OLR value of lees of Pedro Ximénez was 4.58 kg VS/m³·d (25.6 kg wine lees PX/m³·d), while using lees of Verdejo was 5.10 kg VS/m³·d (36.2 kg wine lees Verdejo/m³·d) (Table 4).

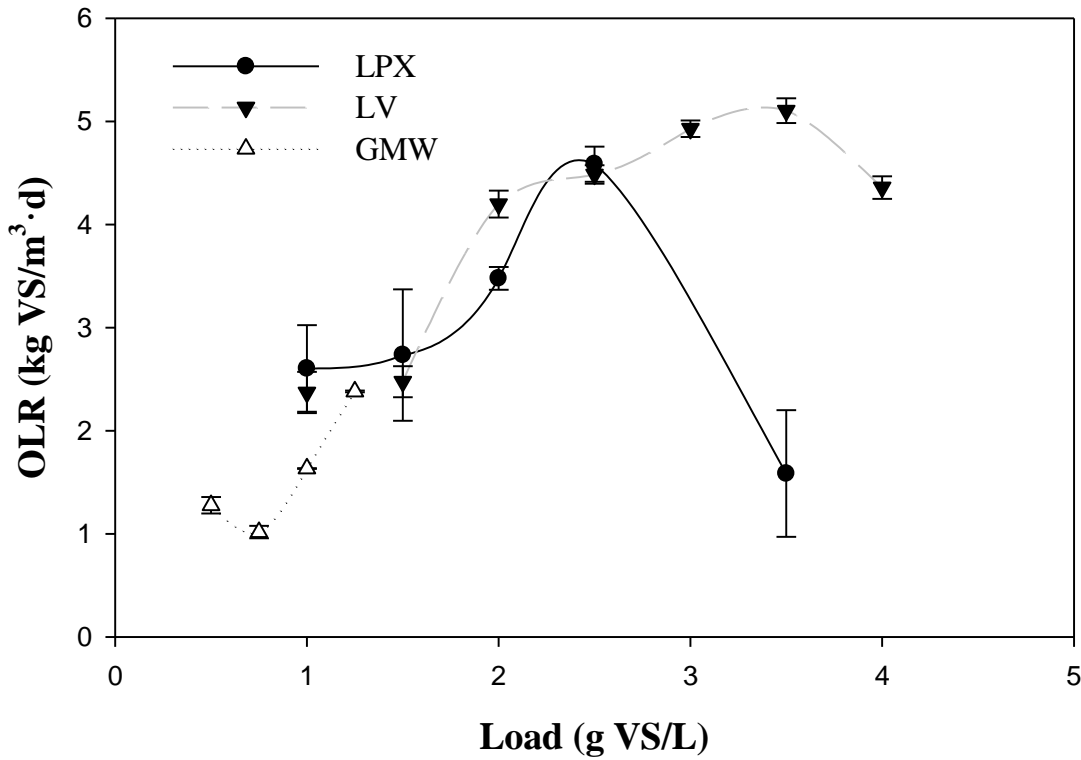


Figure 5: Evolution of OLR (kg VS/m³·d) along the loads.

Table 4. Methane production kinetics

	GMW	LPX	LV
OLR (kg winery waste/m ³ ·d)	10.3	25.6	36.2
Availability (tonnes/year)	2.01	8.37	0.70
Treatment period (days)	32	317	16
Methane Yield Production (m ³ _{STP} CH ₄ /ton waste)	46.1	77.4	44.3

*GMW= Grape marc waste; LPX= Lees of Pedro Ximénez; LV= Lees of Verdejo.

In consideration with the availability of the raw material and the biodegradation kinetics has been calculated the treatment period (Table 4), in order to quantify the volume of the reactor (m³) to treat the winery wastes along the year, using the following equation:

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{OLR}{Availability} \cdot \beta_{GMW} \right)_{GMW} + \left(\frac{OLR}{Availability} \cdot \beta_{LPX} \right)_{LPX} + \left(\frac{OLR}{Availability} \cdot \beta_{LV} \right)_{LV} \quad (\text{Eq. 3})$$

Where β is the Treatment period (Table 4) for each raw material.

According to Eq. 3, the volume of the reactor was quantified in 1 m³, producing different methane yield production relying upon the raw material treated. As can be seen in Table 4, Lees of Pedro Ximénez is the raw material with an intermediate OLR, the waste more rich and those with the higher methane yield production (77.4 m³_{STP} CH₄/ton waste).

4. Conclusion.

This study evaluated the viability of recovering winery waste from different types of wine by anaerobic digestion to produce energy and stabilized organic amendment in the Montilla-Moriles PDO.

Anaerobic digestion was stable across all loads for all raw materials. The pH values were stable, showing a slight decrease in the case of grape marc waste (7.38 %). The VA/Alk ratio values were constant in all cases, with a slight increase in the Pedro Ximenez lees until reaching 0.099 ± 0.001 eq C₂/eq CaCO₃.

The highest yield was achieved with the Pedro Ximenez lees (433 L_{STP} CH₄/kg VS) with a maximum biodegradability of approximately 78%.

The Verdejo lees showed the highest OLR with 36.2 kg Verdejo wine lees/m³·d.

The waste generated in a winery, staggering the treatment throughout the year.

Taking into account the availability (tonnes/year) and the treatment period (days), the reactor volume was quantified (1 m³). This indicates that these winery wastes could be treated sequentially, thus promoting the circular economy in this PDO.

References:

- Alcaide-Hidalgo, J.M., Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Pueyo, E. 2008. Partial characterization of peptides from red wines. Changes during malolactic fermentation and ageing with lees. Food Chemistry 17, 622-630.

- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., et al., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology* 59, 927-934.
- APHA, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th 6 ed.). Washington, DC: American Public Health Association, (1989).
- Bai, Z., Jin, B., Li, Y., Chen, J., Li, Z. 2008. Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Science* 20, 353-358.
- BOJA (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía) 22 de diciembre de 2011, Núm. 249. Página núm. 155.
- Buendía, I.M., Fernández, F.J., Villaseñor, J., Rodríguez, L., 2008. Biodegradability of meat industry wastes under anaerobic and aerobic conditions. *Water research* 42, 3767-3774.
- Bustamante, M., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M., 2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management* 28, 372–380.
- Camarillo, R. and Rincón, J. 2009. Effect of inhibitory compounds on the anaerobic digestion performance of diluted wastewaters from the alimentary industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84, 1615–1623.
- Castellucci, S., Cocchi, S., Allegrini, E., Vecchione, L. 2013. Anaerobic digestion and co-digestion of slaughterhouse wastes. *Journal of Agricultural Energy Resource* 44, 526-530 (2013).
- Consejo Regulador PDO Montilla-Moriles. <http://www.montillamoriles.es/estadisticas/2015.pdf> (Accesed on 26/09/2018).
- Da Ros, C., Cavinato, C., Bolzonella, D., Pavan, P. 2016. Renewable energy from thermophilic anaerobic digestion of winery residue: Preliminary evidence from batch and continuous lab-scale trials. *Biomass and Bioenergy*. 91, 150-159.

- Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P., Bolzonella, D., 2014. Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Waste Management* 34, 2028-2035.
- Dimou, C., Vlysidis, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou^a, S., Koutinas^a, A.A., Kookos I.K. 2016. Techno-economic evaluation of wine lees refining for the production of value-added products. *Biochemical Engineering Journal* 16, 157-165.
- Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., Menardo, S. 2010. Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresource Technology* 101, 3780-3783.
- Dos Santos, A.M., Feuillat, M., Charpentier, C. 2000. Flor yeast metabolism in a model system similar to the cellar aging of the French “win jaune”, evolution of some by-products nitrogen compounds and polysaccharides. *Vitis* 39, 129-134.
- El Achkar, J., Lendormi, T., Salameh, D., Louka, N., Maroun, R.G., Hobaika, J.L. 2018. Anaerobic digestion of grape pomace: Effect of the hydraulic retention time on process performance and fibers degradability. *Waste Management* 17, 137-146.
- FAO-OIV FOCUS, 2016. <http://www.fao.org/3/a-i7042e.pdf> (Accessed 11/05/2018).
- Feuillat, M., Charpentier, C. 1982. Autolysis of Yeasts in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture* 33, 6-13.
- Gil, A., Siles, J. A., Márquez, P., Gutiérrez, M. C., Martín M. A. 2017. Optimizing the selection of organic waste for biomethanization. *Environmental Technology* 15, 1-12.
- Gil, A., Siles, J. A., Martín, M. A., Chica, F. A., Estévez-Pastor, F. S., Toro-Baptista, E. 2018. Effect of microwave pretreatment on semi-continuous anaerobic digestion of sewage sludge. *Renewable Energy* 115, 917-925.
- Karaka, A. 2004. Effect of organic wastes on the extractability of cadmium, copper, nickel, and zinc in soil. *Geoderma*. 122, 297-303.
- Kayhanian, M. 1999. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: an overview and practical solutions. *Environmental Technology* 20, 355–365.

- Liu, T., Sung, S. 2002. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. *Water Science & Technology* 45, 113–120.
- OIV. October 2015. State of condition report.
- Østergaard, N. 1985. *Biogasproduktion i det termofile temperaturinterval. STUB rapport nr. 21*. Kemiteknik Dansk Teknologisk Institut: Taastrup, Denmark.
- Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Pérez-Rodríguez, N., Aguilar-Uscanga, M.G., Domínguez, J.M. 2014. Evaluation of the liquid, solid and total fractions of beer, cider and wine lees as economic nutrient for xylitol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnololy* 90, 1027–1039.
- Muhlack, R.A., Potumarthi, R., [Jeffery, D.W.](#) 2018. Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. [Waste Management](#) 72, 99-118.
- Serrano, A., Siles, J.A., Martín, M.A., Chica, A.F., Estévez-Pastor, F.S., Toro-Baptista, E. 2016. Improvement of anaerobic digestion of sewage sludge through microwave pre-treatment. *Journal of Environmental Management* 177, 231-239.
- Sessa, M.; Casazza, A. A.; Perego, P.; Tsao, R.; Ferrari, G.; Donsì, F. 2012. Exploitation of polyphenolic extracts from grape marc as natural antioxidants by encapsulation in lipid-based nanodelivery systems. *Food Bioprocess Technology* 6, 2609-2620.
- W.P.C.F. (Water Pollution Control Federation). 1967. *Anaerobic Sludge Digestion, Manual of Practice N° 16*.
- Wheatley A. 1990. *Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology*. Elsevier (ed.). London (UK).
- Zhang, Q., Hu, J., Lee, D. 2016. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. *Renewable Energy* 98, 108-119.

- Zhihui, B., Bo, J., Yuejie, L., Jian, C., Zuming, L., 2008. Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Science* 20, 353-358.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONES

Esta Tesis Doctoral ha abordado alternativas de tratamiento para los residuos vitivinícolas más significativos, inicialmente más sostenibles que las actualmente implantadas. Entre los requerimientos de los tratamientos seleccionados se ha planteado la necesidad de minimizar el impacto ambiental asociado a ellos y, a su vez, puedan revertir en un input económico en el sector. Los resultados de esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la idoneidad de los tratamientos planteados: compostaje y digestión anaerobia, ambos procesos biológicos. Así, de la discusión de los resultados de los estudios se han extraído las siguientes conclusiones globales:

- 1- Los ensayos respirométricos preliminares, han permitido evaluar la biodegradabilidad aerobia del orujo de uva (de la variedad PX) procedentes de Bodegas Robles (DOP Montilla-Moriles (Córdoba)), residuo potencialmente problemático para ser valorizado mediante un tratamiento biológico. En concreto, el orujo de uva PX es biodegradable aeróbicamente, alcanzando un valor máximo de velocidad de consumo de oxígeno (VECO) de 260 mg O₂/g de Sólidos Volátiles (SV)·h y de consumo acumulado de oxígeno (CAO) de 530 mg O₂/g SV. Se observa una etapa de adaptación al sustrato por parte de los microorganismos, sin mostrar efectos inhibitorios significativos. Así mismo, se ha determinado la influencia de las variables físico-químicas sobre la actividad aerobia de los microorganismos a través del estudio y seguimiento de dichas variables durante los experimentos. El pH, Sólidos Totales (ST) y Nitrógeno Total Soluble (NTS) las variables con mayor importancia en la

biodegradabilidad del orujo PX y cinética de la misma (85% y 69% de influencia para VECO y CAO, respectivamente).

- 2- Se ha comprobado la viabilidad del co-compostaje de orujo de la variedad Pedro Ximénez con la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU), en proporción 1:1 en peso. Sin embargo, la biodegradabilidad de FORSU-Orujo fue menor que la de la FORSU de forma individual (15%), para el mismo tiempo de tratamiento, ya que se ralentiza el proceso de estabilización de la materia orgánica mediante esta alternativa de gestión.

El residuo de la uva tiene la particularidad de poseer un contenido bajo de Cu y Zn debido a que procede de un cultivo ecológico en el que no se utilizan fertilizantes químicos. El compost obtenido corresponde a un compost tipo “A”, de acuerdo al Real Decreto Español 506/2013, a excepción de su contenido en Cr, que es ligeramente superior.

Atendiendo a las emisiones de olor, el co-compostaje de orujo y FORSU muestra valores inferiores de tasas de emisión de olor (1,22 ou_E/s, como valor máximo alcanzado) respecto a las cuantificadas durante el compostaje de FORSU individualmente (1,60 ou_E/s).

La correcta gestión mediante co-compostaje de dichos residuos en las zonas de producción agrícola permitiría producir un nuevo producto comercializable, claramente enmarcado en el concepto de economía circular.

- 3- La digestión anaerobia de los residuos vitivinícolas orujo procedente de uva de la variedad Pedro Ximenez y lías, procedentes estas últimas de diferentes

variedades (Verdejo y Pedro Ximénez) ha transcurrido de forma estable, sin mostrar efectos inhibitorios a lo largo del proceso. El orujo ha sido el residuo que mostró menor porcentaje de biodegradabilidad (51%), seguido de lías Verdejo (53%) y lías PX (79%). Así mismo, el digestado puede utilizarse como enmienda orgánica, ya que contiene un bajo contenido en metales pesados al tratarse de un residuo procedente de un cultivo ecológico.

- 4- El rendimiento en metano, como resultado del tratamiento anaerobio, ha sido variable dependiendo del residuo valorizado; siendo las lías Verdejo las que muestran alcanzan un menor valor ($44,3 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4/\text{tonelada residuo}$), seguida de orujo y lías PX ($46,1$ y $77,4 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4/\text{tonelada residuo}$, respectivamente). En cambio, la velocidad de carga orgánica es máxima para las lías Verdejo ($36,2 \text{ kg residuo}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$), seguido de lías PX y orujo PX ($25,6$ y $10,3 \text{ kg residuo}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$, respectivamente).

- 5- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y dada la disponibilidad de residuos generada a lo largo del año en la industria vitivinícola, se ha evaluado el volumen de digestor requerido para el tratamiento secuencial de los residuos vitivinícolas generados en las instalaciones de la bodega. Un reactor de 1 m^3 es suficiente para el volumen de producción de vino.

La potencia eléctrica generada en la combustión del biogás procedente de las lías PX, que es el cultivo predominante en esta DOP, se ha estimado en $1,29 \text{ kW} \cdot \text{h}/\text{d}$, suponiendo un ahorro en emisiones de CO_2 de hasta $2,45$ toneladas de $\text{CO}_2/\text{año}$.

Por lo tanto, la digestión anaerobia y co-compostaje de residuos vitivinícolas no solo suponen tratamientos alternativos viables, sino que además permiten conseguir un beneficio social y ambiental, con reducciones de emisiones de gases contaminantes, generación de energía limpia, una enmienda orgánica de calidad y la posibilidad de creación de una economía circular que reporte beneficios en la propia región vitivinícola. Los tratamientos alternativos propuestos en esta tesis están en consonancia con los Objetivos de Desarrollo Sostenible ODS7 para 2030 (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo), que ahonda en la necesidad de invertir en fuentes de energía limpias, suponiendo un objetivo crucial que puede estimular el crecimiento y a la vez ayudar al medio ambiente.

5. CONCLUSIONS

This Doctoral Thesis has addressed treatment alternatives for the most significant wine residues, initially more sustainable than those currently implemented. Among the requirements of the selected treatments, the need to minimize the environmental impact associated with them has been raised and, in turn, can revert to an economic input in the sector. The results of this Doctoral Thesis show the suitability of the proposed treatments: composting and anaerobic digestion, both biological processes. Thus, the following global conclusions have been drawn from the discussion of the results of the studies:

1- Preliminary respirometric tests have allowed the evaluation of the aerobic biodegradability of grape marc (of the PX variety) from Bodegas Robles (PDO Montilla-Moriles (Córdoba)), a potentially problematic residue to be assessed through a biological treatment. Specifically, the PX grape pomace is biodegradable aerobically, reaching a maximum value of oxygen consumption rate (SOUR) of 260 mg O₂/g Volatile Solids (VS) · h and cumulative oxygen consumption (OD) of 530 mg O₂/g VS. A stage of adaptation to the substrate by the microorganisms is observed, without showing significant inhibitory effects. Likewise, the influence of the physicochemical variables on the aerobic activity of the microorganisms has been determined through the study and monitoring of these variables during the experiments. The pH, Total Solids (TS) and Total Soluble Nitrogen (TSN) variables with the greatest importance in the biodegradability of the PX pomace and its kinetics (85% and 69% of influence for SOUR and OD, respectively).

2- The viability of the co-composting of pomace of the Pedro Ximénez variety with the organic fraction of urban solid waste (OFUSW), in a 1: 1 proportion by weight, has been verified. However, the biodegradability of OFUSW-grape marc waste was lower than that of OFUSW individually (15%), for the same treatment time, since the process of stabilization of organic matter is slowed by this management alternative.

The grape residue has the peculiarity of having a low content of Cu and Zn because it comes from an organic crop in which chemical fertilizers are not used. The compost obtained corresponds to a type “A” compost, according to Spanish Royal Decree 506/2013, with the exception of its Cr content, which is slightly higher.

According to the odor emissions, the co-composting of Marc and OFUSW shows lower values of odor emission rates (1.22 ouE/s, as maximum value reached) with respect to those quantified during the composting of OFUSW individually (1, 60 ouE/s).

The correct management by co-composting of said waste in agricultural production areas would allow the production of a new marketable product, clearly framed in the concept of circular economy.

3 - The anaerobic digestion of the grape marc waste from grapes of the Pedro Ximenez and lees variety, from the latter of different varieties (Verdejo and Pedro Ximénez) has been stable, without showing inhibitory effects throughout the process. The pomace was the residue that showed the lowest percentage of biodegradability (51%), followed by lees Verdejo (53%) and

lees PX (79%). Likewise, digestate can be used as an organic amendment, since it contains a low heavy metal content as it is a residue from an organic crop.

4- The yield in methane, as a result of anaerobic treatment, has been variable depending on the valued residue; the Verdejo lees being the ones that show a lower value ($44.3 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 / \text{tonne residue}$), followed by pomace and PX lees (46.1 and $77.4 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4/\text{tonne residue}$, respectively). On the other hand, the organic loading speed is maximum for Verdejo lees ($36.2 \text{ kg waste/m}^3 \cdot \text{d}$), followed by PX lees and PX pomace (25.6 and $10.3 \text{ kg waste/m}^3 \cdot \text{d}$, respectively).

5- Taking into account the results obtained and given the availability of waste generated throughout the year in the wine industry, the volume of digester required for the sequential treatment of wine residues generated in the winery facilities has been evaluated. A 1 m^3 reactor is sufficient for the volume of wine production. The electrical power generated in the combustion of biogas from the PX lees, which is the predominant crop in this PDO, has been estimated at $1.29 \text{ kW} \cdot \text{h} / \text{d}$, assuming a saving in CO_2 emissions of up to 2.45 tons of $\text{CO}_2 / \text{year}$.

Therefore, anaerobic digestion and co-composting of wine residues not only imply viable alternative treatments, but also allow for a social and environmental benefit, with reductions in pollutant emissions, clean energy generation, an organic quality amendment and the possibility of creating a circular economy that reports benefits in the wine region itself. The alternative

treatments proposed in this thesis are in line with the SDG7 Sustainable Development Goals for 2030 (United Nations Development Program), which deepens the need to invest in clean energy sources, assuming a crucial objective that can be stimulated growth and at the same time help the environment.

