



Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero con producción de biogás e hidrógeno. Revisión bibliográfica

Biological treatments of cheese whey for biogas and hydrogen production. Review

Processos biológicos de tratamento do soro de leite para a produção de biogás e hidrogénio. Revisão da literatura

Camino Fernández Rodríguez^{*}; Elia Judith Martínez Torres; Antonio Morán Palao; Xiomar Gómez Barrios

Grupo de Ingeniería Química y Ambiental. Instituto de Recursos Naturales. Universidad de León. Avda Portugal 41, 24009, León, España.

*cferrd@unileon.es

Fecha Recepción: 22 de noviembre de 2015

Fecha Aceptación: 8 de enero de 2016

Resumen

La industria láctea se caracteriza por generar lactosuero como subproducto del proceso de elaboración del queso. El lactosuero presenta un elevado contenido en materia orgánica en forma de lactosa, proteínas y otros compuestos procedentes de la leche. Su vertido incontrolado puede ocasionar problemas de contaminación con un grave impacto ambiental. Sin embargo, la recuperación de algunos componentes del lactosuero permite valorizar este subproducto, encontrando aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y recientemente en la conversión del lactosuero para la producción de biocombustibles. Actualmente, los biocombustibles son una fuente potencial de energía renovable con un papel importante como posibles sustitutos de los combustibles fósiles. Por este motivo, la opción de gestionar el lactosuero mediante una valorización energética ha adquirido gran interés durante los últimos años.

Entre las alternativas disponibles de aprovechamiento energético, se encuentra la digestión anaerobia, la cual es una de las tecnologías más empleadas para el tratamiento de diverso tipo de residuos. En el caso del lactosuero, se han desarrollado múltiples trabajos en los que se han utilizado diferentes configuraciones y condiciones de operación con el objetivo de mejorar el funcionamiento del proceso. Gracias a estos trabajos se han podido identificar algunos de los factores que limitan su aplicación como son: la tendencia a la acidificación o la limitación de nutrientes. Por este motivo se han promovido otras alternativas como son los procesos de co-digestión con varios materiales o la fermentación oscura. El objetivo de este artículo es la realización de una revisión bibliográfica de los principales trabajos realizados en los que se contemplan los procesos biológicos anteriormente mencionados. Se presentan los resultados más relevantes, así como la influencia de las condiciones de operación y los factores que afectan a la producción de biogás.

Palabras clave: *lactosuero, biogás, hidrógeno, fermentación.*

Abstract

Dairy industry is characterized by high generation of cheese whey, a byproduct from cheese factories with a high organic matter content in the form of lactose, proteins and other compounds coming from processed milk. If it is not properly disposed it might favour serious environmental pollution problems. However, it is possible the application of recovery technologies in order to obtain its main compounds for further applications such as food or pharmaceutical industry, and for obtaining biofuels. Nowadays, biofuels are an important source of renewable energy as potential future alternative for fossil fuels. For this reason,

energetic valorisation of cheese whey has become an interesting alternative. Anaerobic digestion is considered one of the most used technologies in wastewater and solid waste treatments. Several studies have been conducted with cheese whey as a suitable substrate with a considerable biogas potential production. However, it presents some disadvantages due to the rapid acidification tendency and nutrient content limitations that might favor failures in the process. For this reason, alternatives like anaerobic co-digestion with other substrates or dark fermentation for hydrogen production have been proposed. This paper intends to review the main works developed applying the mentioned technologies along with its most relevant results considering operation conditions influence and the environmental factors affecting production.

Keywords: *cheese whey, biogas, hydrogen, fermentation.*

Resumo

A industria leiteira caracteriza-se por uma elevada geração de soro de leite, um subproduto do processo de fabricação do queijo, com um elevado conteúdo em matéria orgânica na forma de lactose, proteínas e outros compostos a partir da leite. Por esta razão, considera-se um material suscetível de ser valorizado mediante a recuperação destes produtos para posteriores aplicações alimentárias, farmacéuticas e para a obtenção de biocombustíveis.

Uma das alternativas para aproveitar a energia é a aplicação de tratamentos anaeróbios, sendo uma das tecnologias mais usadas com os resíduos sólidos, líquidos, e também as águas residuais. O lactosuero é considerado um substrato com um elevado potencial para a geração de biogás, é por isso que têm sido aplicado em diferentes estudos. No entanto, apresenta dificuldades devido à sua tendência para a acidificação e a limitação de nutrientes que podem causar falhas durante o processo. Por esta razão, temos promovido outras alternativas, tais como os processos de co-digestão com outros materiais ou a fermentação escura orientada para a produção de hidrogénio. Este artigo centra-se numa revisão bibliográfica dos principais trabalhos que têm sido desenvolvidos aplicando os processos acima descritos, com uma apresentação dos resultados mais relevantes obtidos considerando a influência das condições de operação e os fatores que afetam à produção.

Palabras-chave: *soro de leite, biogás, hidrogénio, fermentação.*

Introducción

La Industria Alimentaria es uno de los principales sectores industriales de la economía mundial. Dentro de esta categoría, el sector lácteo abarca la actividad dedicada a la elaboración de productos procedentes de la leche, destacando el queso, con una producción mundial de 21,3 millones de ton/año [1].

Durante el proceso de elaboración del queso se genera como subproducto el lactosuero. Se trata de la fracción líquida de la leche que se obtiene tras la precipitación y recuperación de la caseína. Este subproducto, supone aproximadamente un 85-95% del volumen total de la leche empleada y en él se estima una retención del 55% de los nutrientes [2]. La producción se establece alrededor de 9L por cada kg de queso producido [2], por lo que se considera que constituye el principal subproducto de la industria quesera.

Debido a su alto contenido en materia orgánica, el lactosuero debe de ser recuperado y recogido para

su adecuada gestión. En el caso de ser vertido directamente al medio acuático o al terreno, se trataría de un importante contaminante. Asimismo, su vertido a la red de saneamiento podría suponer un problema de saturación de las estaciones de depuración de aguas residuales (EDARs).

A pesar de la existencia de varias alternativas tecnológicas para la recuperación de los compuestos de interés, existe una cantidad considerable de producto que permanece inutilizado. Por lo tanto es necesario incentivar su recuperación para reducir los posibles problemas de contaminación ambiental derivados de un vertido incontrolado [3].

Entre las opciones de tratamiento disponibles, se encuentran los procesos biológicos anaerobios. Éstos se caracterizan por la transformación del contenido en materia orgánica en productos de valor añadido como el biogás o el hidrógeno, y sus aplicaciones como biocombustibles.

El principal objetivo de este trabajo ha sido realizar una revisión bibliográfica de los principales

estudios elaborados relacionados con la digestión anaerobia y la fermentación oscura, incluyendo una descriptiva de los diferentes procesos y las tecnologías más empleadas.

Aplicaciones del lactosuero

El lactosuero es un producto susceptible de ser valorizado por su contenido en compuestos de

interés que pueden ser recuperados. En la Figura 1, se representan algunos de los nutrientes que contiene: lactosa, proteínas, sales minerales, ácido láctico y grasas. Además, también se distinguen cantidades apreciables de otros componentes como ácido cítrico, compuestos de nitrógeno no proteico (urea y ácido úrico) y vitaminas [4].

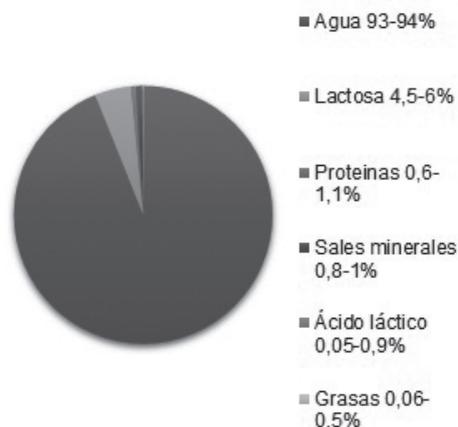


Figura 1. Composición genérica del lactosuero [5].

Con objeto de que se puedan recuperar se aplican tanto tratamientos físico-químicos como biológicos (Figura 2). Posteriormente, algunas de las alternativas planteadas para su aprovechamiento son: aplicación para alimentación animal, alimentación humana, producción de fertilizantes, recuperación de compuestos de interés y valorización energética.

Tradicionalmente, el lactosuero se ha destinado a la alimentación del ganado, principalmente de tipo porcino. Debido a su elevado contenido en agua, es recomendable su concentración en plantas de secado con el objetivo de facilitar su manejo y

transporte. De esta forma, mediante la obtención de lactosuero en polvo, se facilita su incorporación en la dieta animal junto con los piensos.

En relación con la aplicación para la alimentación humana, la elaboración de queso a partir de lactosuero es una técnica frecuentemente realizada en países del Mediterráneo. Se distinguen diferentes variedades según el origen de la leche, el tipo de suero o el proceso de elaboración. En función de la región de fabricación, se distinguen los quesos denominados “Ricotta” o “Requesón”, elaborados en Italia y España respectivamente [7].

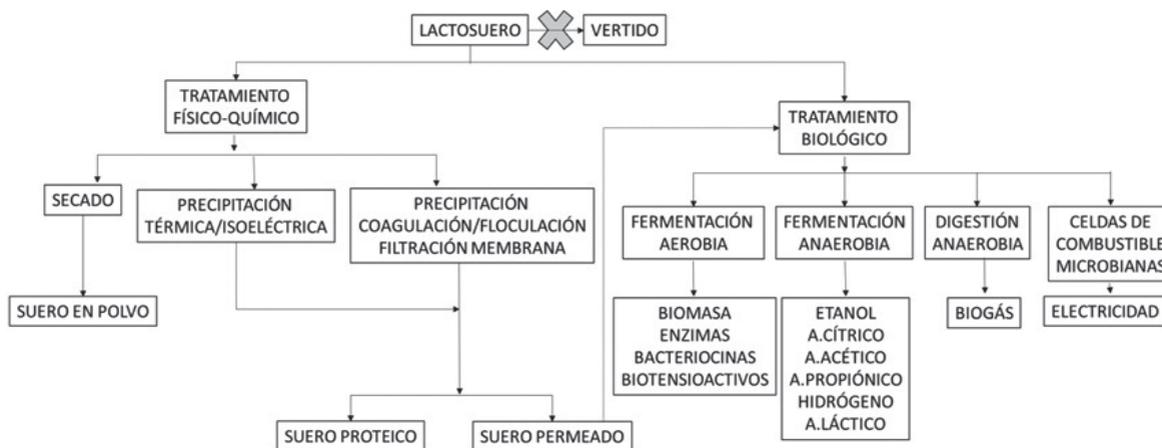


Figura 2. Principales tratamientos del lactosuero y productos derivados de su aplicación [6].

En alimentación también es habitual su empleo como aditivo durante la elaboración de yogures, helados y otro tipo de postres lácteos. Igualmente, es utilizado en la industria cárnica, pastelería, en fabricación de bebidas para deportistas o alimentos infantiles [2].

Otro tipo de utilización comprende su uso como fertilizante aprovechando su alto contenido en agua y nutrientes que sirven como complementos para los cultivos. Sin embargo, su aplicación debe ser controlada para evitar posibles daños en la estructura físico-química del suelo, derivados del contenido en sales, sólidos y grasas [8]

En el caso del aprovechamiento industrial, éste se orienta al fraccionamiento de sus principales componentes para la recuperación de las proteínas y la lactosa. La incorporación de plantas destinadas a este fin es una alternativa viable en el caso de industrias con volúmenes elevados de producción. No obstante, en industrias de dimensiones más reducidas, estos sistemas suponen un elevado coste económico y se opta por la recogida y entrega del lactosuero para su tratamiento posterior en instalaciones externas.

El compuesto mayoritario, la lactosa, es un disacárido que se encuentra presente en todos los tipos de leche. Está constituida por la unión de una molécula de glucosa y otra de galactosa, que pueden ser igualmente recuperadas mediante tratamientos de hidrólisis [9]. El procedimiento habitual es la cristalización de suero concentrado o de suero desproteinizado por ultrafiltración (suero permeado). El producto que se obtiene es una melaza que puede ser secada y utilizada como pienso para animales. Este pienso puede revalorizarse si se desaliniza la melaza y se realiza una adición de proteínas. También, otra posible opción es purificar la lactosa para aplicaciones en procesos farmacéuticos. Otra alternativa es someter la lactosa a un tratamiento de fermentación biológica para la producción de ácido láctico. Ésta es llevada a cabo por microorganismos como *Lactobacillus helveticus* o *Lactobacillus casei* [10]. Se trata de un compuesto con múltiples aplicaciones como conservante y acidulante en bebidas, alimentos, detergentes, cosméticos y productos farmacéuticos [11].

El segundo compuesto de interés son las proteínas. Se aíslan mediante técnicas de precipitación, procesos de separación por membranas o cromatografía. Su recuperación se orienta a la reutilización en el propio proceso de elaboración del queso, o bien para aplicaciones en

otros procesos industriales de alimentación. Por otra parte, se pueden someter a operaciones de separación y purificación con el objetivo de obtener proteínas de mayor pureza para aplicaciones en la industria farmacéutica [12].

Por último, el lactosuero debido a su contenido en lactosa adquiere un considerable contenido en materia orgánica que le convierte en un sustrato susceptible de ser valorizado energéticamente mediante la aplicación en procesos biológicos de fermentación. En función de las condiciones de operación y los microorganismos empleados hay diferentes alternativas de tratamiento. Entre las posibilidades, se pueden aplicar procesos de fermentación alcohólica, orientados a la obtención de etanol, digestión anaerobia para la producción de biogás, fermentación oscura para la obtención de hidrógeno o procesos de dos etapas combinadas para generar ambos.

La fermentación alcohólica para producir etanol ha sido estudiada por diferentes autores, empleando lactosuero bruto [13], lactosuero permeado de ultrafiltración [14] o soluciones preparadas con lactosuero en polvo [15]. En este tratamiento se requiere la utilización de cultivos específicos de microorganismos capaces de metabolizar la lactosa como *Torula cremoris*, *Kluyveromyces fragilis* o *Saccharomyces cerevisiae* [16] o puede ser necesario incluir un tratamiento enzimático previo [5]. El etanol producido se puede utilizar en la industria alimentaria, química, farmacéutica o como combustible [17]. Por otro lado, la fermentación alcohólica del lactosuero orientada a la producción de butanol también ha sido estudiada recientemente de cara a su uso como biocombustible [18,19].

Digestión anaerobia

A lo largo de los últimos años la digestión anaerobia ha recibido una notable atención por la comunidad técnica y científica debido al marco legislativo implantado en los diferentes países, mediante el establecimiento de restricciones específicas sobre el vertido de residuos junto con medidas incentivadoras del reciclaje y la producción de energía a partir de fuentes renovables.

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el que la materia orgánica, mediante la acción de un determinado grupo de bacterias en ausencia de oxígeno, se descompone generando biogás y digestados. El biogás es un producto gaseoso compuesto mayoritariamente por CH₄ y CO₂, con

proporciones que pueden variar entre un 50 y un 70% de CH_4 [20]. Además también puede incluir H_2 , SH_2 y otros gases. Este producto puede utilizarse como combustible en calderas, motores o turbinas para generación de calor o electricidad. Por otra parte, el digestado es un subproducto que contiene una mezcla de compuestos minerales que permiten su aplicación como fertilizante orgánico en cultivos agrícolas [21].

El proceso global que tiene lugar es complejo. Se trata del resultado de varias reacciones que tienen lugar de forma secuencial o simultánea mediante el consorcio de diferentes grupos microbianos. En la Figura 3, se representa un esquema en el que se diferencian las principales etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Durante la hidrólisis, la materia orgánica compleja es transformada en moléculas de menor peso molecular como azúcares, alcoholes, aminoácidos y ácidos grasos. A

continuación, se produce su fermentación generando ácidos grasos volátiles entre los que destacan compuestos como el ácido acético, propiónico o butírico. Asimismo, también se pueden detectar otro tipo de productos como el etanol, hidrógeno y dióxido de carbono. Posteriormente, mediante la intervención de las bacterias acetogénicas, se produce la conversión a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono de los productos de la fermentación. Por último, en la metanogénesis, los productos anteriores se transforman en metano y dióxido de carbono. En esta etapa intervienen dos tipos principales de bacterias: las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas, que utilizan el hidrógeno para reducir el dióxido de carbono y producir metano y las bacterias metanogénicas acetoclásticas que hidrolizan el acetato oxidando el grupo carbonilo a dióxido de carbono y reduciendo el grupo metilo a metano [22].

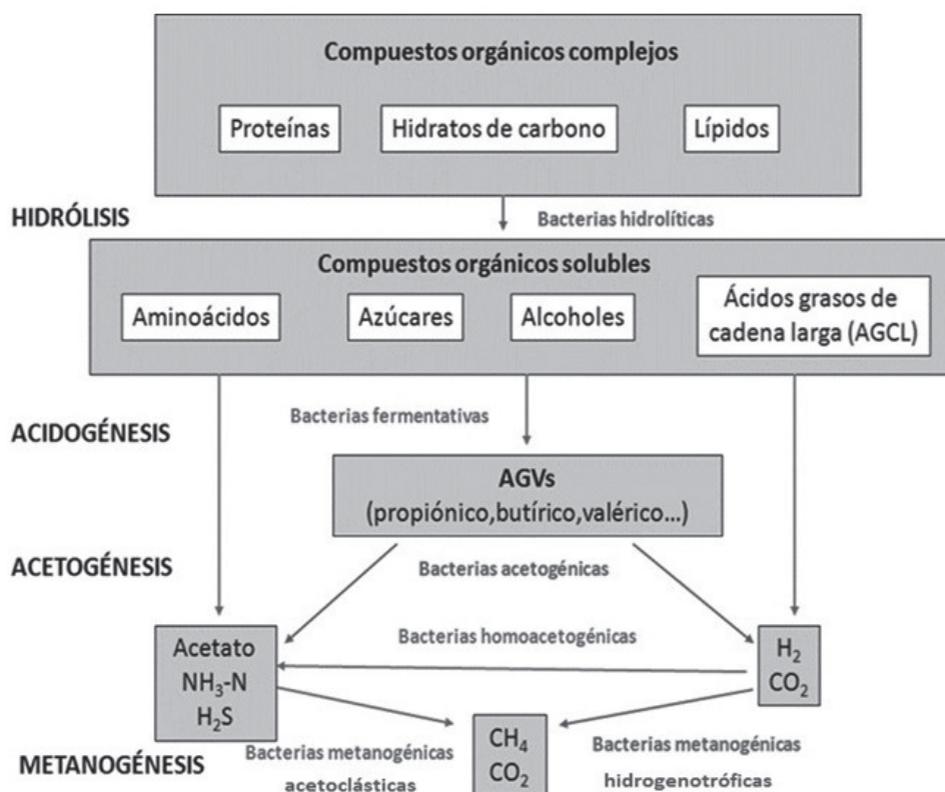


Figura 3. Esquema del proceso de digestión anaerobia [22].

El lactosuero debido a su elevado contenido en materia orgánica, reducida alcalinidad y tendencia a acidificar rápidamente, se ha identificado como un sustrato de difícil tratamiento en digestores anaerobios, especialmente en reactores que operan con cargas orgánicas de alimentación altas [23]. Por ello, se plantea la necesidad de adicionar una dosis inicial de alcalinidad o una dosificación a lo largo del proceso [24]. Sin embargo, el desarrollo y mejora de los sistemas de tratamiento anaerobio ha demostrado que se trata de un sustrato válido e interesante para su valoración energética mediante esta tecnología. Se han realizado diversos estudios de digestión anaerobia a escala de laboratorio y piloto, utilizando diferentes tipos de reactores, variando regímenes de operación y temperatura [25]. Durante los últimos años se han publicado varios trabajos que describen las principales opciones de tratamiento y aprovechamiento del lactosuero, incluyendo la valoración energética [2,5,25,26]. Los reactores que se han utilizado más frecuentemente son los de flujo ascendente con lecho/manto de lodos, conocidos por las siglas UASB, (siglas en inglés de “*upflow anaerobic sludge blanket*”). También es frecuente la utilización de los filtros anaerobios, principalmente de flujo ascendente (UAF), (siglas en inglés “*upflow anaerobic filter*”).

En los reactores UASB, los microorganismos adoptan la estructura de lodo granular, agregándose para formar flóculos y gránulos que sedimentan fácilmente. Estos reactores han sido recomendados para el tratamiento de residuos lácteos ya que permiten el tratamiento de elevados volúmenes de alimentación en cortos periodos de tiempo [26]. Varios autores han publicado trabajos aplicando este tipo de sistemas, que se encuentran resumidos en la Tabla 1 [27-30].

En los filtros anaerobios, la biomasa se encuentra adherida a la superficie de un medio inerte en forma de bio-película, o bien retenida en forma de lodo floculado o granulado. Algunos de los problemas que presentan este tipo de reactores y limitan su eficiencia son derivados de un exceso de acumulación de biomasa que origina

la inundación o la aparición de zonas muertas. El UAF presenta el inconveniente de que la mayor parte de la biomasa fermentativa se acumula en la parte inferior debido a que es la zona en la que se establece el primer contacto con la alimentación. Con el objetivo de reducir esta tendencia, se ha optado por la utilización de filtros con múltiples entradas para la distribución de la alimentación [33].

Para intentar remediar algunos de los problemas de este tipo de reactores, como es el caso de los largos periodos de tiempo necesarios para el arranque, se han propuesto reactores híbridos, como el UASFF (siglas en inglés de “*up-flow anaerobic sludge fixed film*”), en los que se combinan los reactores UASB y los filtros anaerobios. Este tipo de sistemas han sido aplicados para el tratamiento de residuos lácteos [34]. Malaspina *et al.* [23], desarrollaron un reactor híbrido de flujo ascendente y descendente específicamente orientado para el tratamiento de lactosuero. A partir de los resultados diseñaron, construyeron y pusieron en funcionamiento una planta piloto para el tratamiento de 5m³/d en una quesería en la isla de Cerdeña (Italia). Parra *et al.* [35], propusieron un sistema de dos etapas biofiltro-UASB para el tratar cargas puntuales de lactosuero. También se ha planteado la utilización de reactores de bio-película móvil, en los que la biomasa crece adherida sobre un soporte plástico móvil [36].

El reactor continuo de tanque agitado (CSTR), (siglas en inglés de “*continuously stirred tank reactor*”) también se ha utilizado para el tratamiento de lactosuero diluido y soluciones sintéticas de lactosuero. No obstante, debido al lento crecimiento de los microorganismos metanogénicos, este tipo de reactores presenta rendimientos de conversión de materia orgánica decrecientes, 58-18%, al reducir el tiempo de retención hidráulica (TRH) [37]. Sin embargo, modificando la temperatura y operando en régimen termofílico se puede conseguir un incremento significativo en la conversión tal y como lo demuestran los resultados obtenidos por Yang *et al.* [24], quienes consiguieron conversiones de demanda química de oxígeno (DQO) comprendidas entre 94,6-96,4%.

Tabla 1. Trabajos de digestión anaerobia de lactosuero.

Tipo de reactor	T(°C)	Carga orgánica	Rendimiento/ Producción volumétrica	Conversión materia orgánica (%)	Referencia
UASB	35	4,5-38,1gDQO/L	9,6LCH ₄ /Ld	98	[27]
UASB	35	77gDQO/L	-	90	[28]
UASB	35	22,6-24,6gDQO/Ld	-	95-97	[29]
UASB	35	2,7-3 gDQO/Ld	-	85-99	[30]
UAF	37	12-60gDQO/L	6,7L/Ld	81	[31]
UAF	35	1-4gDQO/Ld	280L/kgDQO	80-90	[32]
Filtro anaerobio varias alimentaciones	35	20g/Ld	-	85-99	[33]
UASFF	36	7,9-45,4gDQO/Ld	6,8L/d	98	[34]
Reactor híbrido multietapa	35	10gDQO/Ld	-	98	[23]
Sistema biofiltro- UASB	15- 20	5,2-10,5gDQO/Ld		56	[35]
Biopelícula móvil	35	15,2gDQO/Ld	333,4LCH ₄ /kgDQO	81	[36]
CSTR	36	0,6-2,1gDQO/Ld	110L CH ₄ /kg DQO	78-90	[38]
CSTR	35	1,5-2,3gDQO/Ld	-	83-92	[30]
CSTR	55	1gDQO/Ld	350LCH ₄ /kgDQO	94,6	[24]
CSTR	37	9gDQO/Ld	95,4-150,7LCH ₄ /kg DQO	-	[39]
CSTR	35	1gDQO/Ld	-	-	[40]
ASBR	50	1,6-12,8gDQO/Ld	122-197LCH ₄ /kgDQO elim	68	[42]
ASBR	55	1,5gDQO/Ld	314,5LCH ₄ /kgDQO	87	[43]
ASBR	30	0,6-4,8gDQO/Ld	-	90	[44]

Gavala *et al.* [30] realizaron una comparativa de los reactores UASB y CSTR para el tratamiento de lactosuero. Demostraron que para concentraciones superiores a 40-42gDQO/L, el TRH necesario en un UASB era relativamente alto por lo cual en estas condiciones, la aplicación de un reactor CSTR podría ser recomendable. Debido a las oscilaciones de concentración que puede presentar el lactosuero, Kim *et al.* [40] decidieron realizar pruebas en un reactor CSTR con aumentos o choques de carga orgánica puntuales. Comprobaron que si se controlaba el pH por encima de 7, la carga se podía aumentar hasta 8gDQO/Ld sin desestabilizar el sistema. Por el contrario, sin controlar el pH, la resistencia

del sistema era menor, produciéndose fallos con cargas inferiores (3gDQO/Ld).

Los reactores anaerobios secuenciales (ASBR) (siglas en inglés de “*anaerobic sequencing batch reactor*”) son otra modalidad que ha sido empleada [41-44]. Operan mediante un régimen semi-continuo, contando con una etapa de alimentación, reacción, sedimentación (para la separación de la biomasa granular del líquido tratado) y finalmente una fase de descarga, en donde el sobrenadante es retirado. Se ha podido reducir el TRH hasta 6 horas, consiguiéndose conversiones de DQO y de demanda biológica de oxígeno 5d (DBO₅) del 62 y el 75%, respectivamente [41].

Göblos *et al.* [42], utilizaron lactosuero bruto y acidificado en ASBR sin control de pH, tras una fermentación previa con *Kluyveromyces lactis*. El TRH se redujo de 40 a 5 días con variaciones en la carga orgánica de 1,6-12,8gDQO/Ld. Observaron un descenso de la tasa de eliminación de DQO al aumentar la carga de alimentación y ésta fue mayor empleando lactosuero acidificado. En cambio, Fernández *et al.* [43], seleccionaron este tipo de reactor, pero optaron por un régimen de temperatura termofílica. Mediante esta estrategia, lograron reducir el TRH hasta 8,3 días y obtuvieron un rendimiento de producción de 314,5LCH₄/kgDQO.

Co-digestión anaerobia

Si se aplica la modalidad de tratamiento simultáneo de varios residuos, se lleva a cabo el proceso denominado co-digestión anaerobia. La ventaja más relevante, es el aprovechamiento de la sinergia de las mezclas al compensarse las carencias de la digestión por separado de cada uno de los sustratos. Como resultado, se incrementa el potencial de producción de biogás y se evitan problemas de inhibición. Además, se unifica la gestión de los residuos al compartir las instalaciones y se reducen costes de inversión y explotación [45].

La utilización del lactosuero en procesos de co-digestión se ha propuesto como una alternativa para evitar algunos de los posibles problemas derivados de su reducido contenido en alcalinidad o nutrientes. La mayoría de los trabajos publicados se han orientado a la co-digestión con residuos ganaderos [46-49]. Esta categoría de residuos se caracteriza por su reducido contenido en materia orgánica frente al nitrógeno, favoreciendo reducidas relaciones C/N. Sin embargo, en su composición hay presencia tanto de micro como macronutrientes, necesarios para el crecimiento de los microorganismos anaerobios, así como suficiente alcalinidad para evitar problemas de acidificación [50].

Los principales reactores utilizados son de tipo CSTR, pero sin embargo mediante la aplicación de reactores UASB se han podido obtener mayores producciones de gas [50-51]. Bertin *et al.* [52], aplicaron un sistema de dos fases para la co-digestión con estiércol y lactosuero. Realizaron pruebas para determinar la proporción de mezcla más adecuada y compararon la operación de un sistema en continuo de 2 fases frente a un digestor individual. Se detectó una notable mejoría con

el sistema de 2 fases que permitió registrar una producción de 258mLCH₄/gSV.

Se han llevado a cabo estudios para cuantificar la generación de los principales residuos agroindustriales en zonas concretas y evaluar su posible tratamiento mediante co-digestión. En el caso del trabajo realizado en la región de Puglia (Italia), se seleccionó una mezcla de sueros lácteos con residuos de producción de aceite de oliva y se realizaron ensayos en un reactor de capacidad 2m³. Obtuvieron resultados de producción de 1,23LCH₄/Ld, que consideraron favorables de cara a una futura construcción de una planta a escala industrial [53].

También, se han obtenido resultados favorables aplicando lactosuero como co-sustrato para mejorar la productividad de los digestores anaerobios de lodos de EDAR, con el fin de favorecer instalaciones energéticamente autosuficientes o incluso que puedan exportar el excedente de energía a la red [54-56].

Producción de hidrógeno

La obtención de hidrógeno ha suscitado interés como alternativa a los combustibles tradicionales debido a su elevado poder calorífico, 141,8MJ/kg, casi tres veces superior que el del metano [57]. Del mismo modo, es distintivo el carácter limpio asociado a su combustión, con la generación exclusiva de agua y dióxido de carbono como productos.

Habitualmente, la producción de hidrógeno se lleva a cabo mediante la aplicación de procesos térmicos o electroquímicos a partir de combustibles fósiles, biomasa o agua. Igualmente, existe la vía biológica en la que microorganismos específicos producen hidrógeno junto con el resto de productos de la fermentación. En la Figura 3, se presentan los principales métodos biológicos utilizados: biofotólisis, fotofermentación, celdas de electrólisis microbiana (MEC) o fermentación oscura. La principal diferencia entre ellos es la dependencia de la luz para su desarrollo.

La producción de hidrógeno por fermentación de compuestos orgánicos en condiciones anaerobias es posible mediante la aplicación del proceso conocido como fermentación oscura. Se trata de una tecnología que ha sido evaluada por diversos autores debido a la similitud y experiencia adquirida en los procesos de digestión anaerobia para la obtención de biogás [59].

En la fermentación oscura, el hidrógeno es un producto formado junto con los ácidos grasos

volátiles durante la transformación de la materia orgánica. Intervienen bacterias estrictamente anaerobias o anaerobias facultativas, como las especies del género *Clostridium* o *Enterobacter sp* [60]. Se trata de un proceso

complejo, influenciado por varios factores que van a condicionar el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos involucrados. Los más relevantes son: el tipo de inóculo, pH, temperatura, sustrato o tipo de reactor [60].

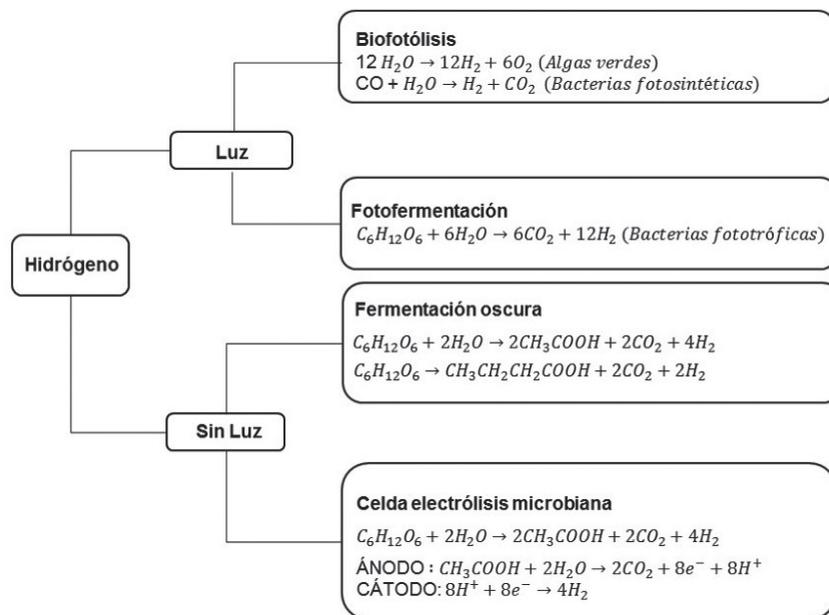


Figura 4. Procesos biológicos de producción de H₂ [58].

La producción de H₂ utilizando lactosuero como sustrato ha sido estudiada por diferentes autores. Se diferencian publicaciones de trabajos en régimen discontinuo y continuo empleando principalmente reactores tipo CSTR [61-63], UASB [64-65] y reactores empaquetados [66-67].

Los principales trabajos desarrollados en modo discontinuo, se encuentran resumidos en la Tabla 2. La influencia del pH debido a su importancia en la actividad de los microorganismos ha sido estudiada por varios autores intentando establecer un valor que optimice el rendimiento de producción. Ferchichi *et al.* [68], realizaron pruebas de fermentación de lactosuero con *C.saccharoperbutylacetonicum* evaluando la influencia del pH inicial sobre el potencial de producción de hidrógeno, los tiempos de retardo y la duración de la fermentación. En el estudio mencionado se obtuvieron los mejores resultados para un pH inicial de 6. Davila Vazquez *et al.* [69], aplicaron un cultivo mixto como inóculo y realizaron un diseño de experimentos analizando el efecto del pH y la concentración inicial de sustrato. De nuevo, obtuvieron resultados satisfactorios para pH 6. Yang *et al.* [61], también optaron por esta opción de inóculo en los ensayos que realizaron aplicando diferentes relaciones de concentración

inóculo/sustrato inicial.

Otro parámetro de interés es la temperatura de la fermentación. Lo más habitual es la operación en régimen mesofílico (35°C). Sin embargo, hay algunos trabajos en los que se ha optado por aplicar régimen termofílico (55°C), obteniendo como resultado mejores rendimientos de producción [70-71].

La importancia de la microbiología de la fermentación ha suscitado el interés en varias investigaciones. Rai *et al.* [72], mejoraron los rendimientos de producción a partir de lactosuero a través de la inmovilización de *Enterobacter aerogenes*, Rosales Colunga *et al.* [73], plantearon la posibilidad de manipular genéticamente cepas de *Escherichia coli* con esta misma finalidad. Por otro lado, también se han probado nuevas técnicas de pretratamiento como la denominada cavitación hidrodinámica [74] para favorecer a las especies productoras de H₂. La posibilidad de mejorar el rendimiento de producción mediante la realización de la fermentación de una mezcla de varios sustratos resulta una alternativa de interés. Recientemente, se han llevado a cabo pruebas de co-fermentación de lactosuero con restos de fruta que han permitido producir 449,8mLH₂/gDQO [75].

Tabla 2. Trabajos de producción de H₂ en régimen discontinuo.

Sustrato	Inóculo	T (°C)	Rendimiento	Referencia
Lactosuero diluido	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	30	2,3molH ₂ /mol lactosa	[68]
Lactosuero en polvo	Cultivo mixto	35	3-3,8mol/mol lactosa	[61]
Lactosuero en polvo	Cultivo mixto	37	3,1molH ₂ /mol lactosa	[69]
Lactosuero en polvo	Cultivo mixto	37	1,8molH ₂ /mol lactosa	[75]
Lactosuero en polvo	Cultivo mixto	35	0,89molH ₂ /mol lactosa	[70]
Lactosuero en polvo	Cultivo mixto	55	1,55molH ₂ /mol lactosa	[70]
Lactosuero en polvo	<i>Escherichia Coli W3110 ΔhycA</i>	37	2,74molH ₂ /mol lactosa	[73]
Lactosuero diluido	<i>E. aerogenes MTCC 2822</i>	30	1,35-3,50molH ₂ /mol lactosa	[72]
Lactosuero diluido	Cultivo mixto	55	1,57molH ₂ /mol glucosa	[71]
Lactosuero diluido	Cultivo mixto	39	7,6mmolH ₂ /gTOC	[76]
Lactosuero desproteinizado	Cultivo mixto	35	2,8-3,6molH ₂ /mol lactosa	[77]
Lactosuero diluido	Cultivo mixto	36	3,3molH ₂ /mol lactosa	[74]

El régimen discontinuo no resulta práctico para aplicaciones industriales, por lo que habitualmente únicamente se emplea en los experimentos de laboratorio como paso previo al escalado en régimen continuo. En la Tabla 3, se muestran los estudios que se han realizado en régimen continuo. Generalmente, se han centrado en la evaluación de diferentes condiciones de operación modificando las variables características de temperatura, carga orgánica o tiempo de retención hidráulica (TRH) [61-63]. En estos sistemas el empleo de cultivos mixtos de bacterias es aconsejable debido a que se facilita la operación y control de los sistemas. Sin embargo, el principal problema que se ha manifestado es la reducción de la producción de H₂ debido a la presencia de bacterias consumidoras de hidrógeno, homoacetogénicas o metanogénicas hidrogenofílicas, además de bacterias que desarrollan fermentaciones propiónicas o lácticas, sin producción de hidrógeno [64,66,67]. Por este motivo, se han propuesto diferentes pretratamientos, entre lo que destaca el choque térmico tanto en el inóculo como en el sustrato [62,63,65] para favorecer la permanencia de

bacterias con capacidad de producir endoesporas, como *Clostridium*. En muchos de los trabajos se han realizado análisis de identificación de las poblaciones microbianas mediante técnica PCR-DGGE para poder disponer de mayor información acerca de cómo se está desarrollando realmente la fermentación [62-67]

El efluente de los diferentes sistemas, se caracteriza por un elevado contenido en materia orgánica en forma de ácidos grasos volátiles, por lo que es necesario la realización de un tratamiento secundario.

En el caso del lactosuero, lo más habitual han sido trabajos que contemplan una segunda etapa de digestión anaerobia [79-81]. Asimismo, se han realizado otro tipo experimentos con alternativas como las celdas de electrólisis microbianas [82] o los sistemas de fotofermentación [72].

Sistemas de digestión en dos etapas

La separación de la etapa de acidogénesis y metanogénesis, empleando procesos anaerobios de dos etapas se presenta como una alternativa apropiada para el tratamiento de lactosuero. Hay

varios trabajos publicados que se enfocan hacia el aprovechamiento tanto de la producción de biogás como de H_2 . Sin embargo, la mayoría se centran en añadir una primera etapa para mejorar el rendimiento de producción de biogás sin orientarse a la producción de hidrógeno.

Yilmazer *et al.* [83] utilizaron un reactor tipo CSTR

para la acidificación y un filtro anaerobio para la metanogénesis. Aplicando un TRH de 24 horas en el primer reactor, se alcanzó una acidificación del 50%. Posteriormente, en el reactor metanogénico con un TRH de 4 días, se eliminó un 90% del contenido en DQO con una producción de biogás de $0,55m^3/kgDQO$.

Tabla 3. Trabajos de producción de H_2 a partir de lactosuero.

Tipo de reactor	Inóculo	T (°C)	Carga orgánica	Rendimiento	Referencia
CSTR	Cultivo mixto	35	5-12gDQO/Ld	1,8-2,3mmol H_2 /gDQO	[61]
CSTR	Cultivo mixto	55	21-47gDQO/Ld	5-22mmol/gDQO	[62]
CSTR	Cultivo mixto	37	155,2gDQO/Ld	7,3mmol H_2 /gDQO	[63]
UASB	Cultivo mixto	30	20gDQO/Ld	0,3mmol/gDQO	[64]
UASB	Cultivo mixto	22-25	20gDQO/Ld	0,8mmol/gDQO	[65]
UASB	Cultivo mixto	35	20gDQO/Ld	0,5mmol H_2 /gDQO	[79]
Lecho empaquetado (polietileno)	Cultivo mixto	30	37gDQO/Ld	1,8mmol H_2 /gDQO	[66]
Lecho empaquetado (poliuretano)	Cultivo mixto	35	18,8gDQO/Ld	1,3mmol H_2 /gDQO	[67]
CSTR	Cultivo mixto	35	-	1,8mmol H_2 /gDQO	[80]
CSTR	Cultivo mixto	35	60gDQO/Ld	4,2mmol H_2 /gDQO	[81]

Por otra parte, Gannoun *et al.* [32] acidificaron el lactosuero en presencia de *Lactobacillus paracasei* durante 20 horas. Posteriormente, el efluente se neutralizó y se trató en un reactor UAF. Estos autores, operando con un TRH de 2 días y cargas orgánicas de hasta 4gDQO/Ld alcanzaron una tasa de eliminación de DQO comprendida entre el 80-90%, acompañada de un rendimiento de producción de metano de 280L/kgDQO.

Empleando un sistema compuesto por dos reactores tipo CSTR, que incorpora una unidad de filtración de membrana para la recirculación en la segunda etapa, se consiguió operar con cargas de hasta 19,8gDQO/Ld con un eliminación de DQO del 79% [84].

Diamantis *et al.* [85], evaluaron un sistema de dos fases compuesto de un reactor CSTR para la acidificación, seguido de un reactor UASB para la metanización. Estos autores alcanzaron conversiones de biomasa de hasta un 90% con rendimientos de producción de metano de $0,37m^3CH_4/kgDQO$ eliminado.

Los sistemas con producción diferenciada tanto de H_2 como de biogás han sido evaluados por varios autores. Antonopoulou *et al.* [80], estudiaron la

digestión anaerobia de lactosuero en dos etapas empleando un reactor CSTR para la producción de H_2 y un reactor PABR (siglas en inglés de “*periodic anaerobic baffled reactor*”) para la generación de metano, alcanzando una eliminación de la DQO del 94% para un TRH de 4 días.

Venetseneas *et al.* [81], evaluaron la influencia del pH durante la fase acidogénica. Los mejores resultados se obtuvieron operando con un TRH de 24 horas y corrigiendo el pH del sistema acidogénico mediante la adición de Na_2CO_3 . Se detectaron rendimientos máximos de producción de H_2 de $0,78molH_2/mol$ glucosa consumida. El efluente de esta primera etapa, fue introducido en un reactor metanogénico en condiciones de TRH de 20 días alcanzando una producción de $6,7LCH_4/L$ alimentación, con una eliminación global de DQO del 95,3%.

Kisielewska [79], evaluó el funcionamiento de un sistema de 2 fases compuesto por 2 reactores UASB con un volumen de 4,5L cada uno para el tratamiento de permeado de lactosuero por ultrafiltración. La producción de H_2 , operando con un TRH de 12 h, carga orgánica 20gDQO/Ld, alcanzó un valor de $0,97L/d$ mientras que el tratamiento

del efluente en un reactor metanogénico con un TRH 3 días (carga orgánica 2gDQO/Ld) produjo 2,2LCH₄/d. Con esta configuración se consigue una eliminación global de DQO del 95%.

Fernández *et al.* [43], propusieron un sistema de un reactor de fermentación tipo CSTR seguido de un digestor anaerobio ASBR. Durante el ensayo, detectaron problemas en el funcionamiento del reactor metanogénico posiblemente asociados a un aumento del contenido en sodio y potasio derivado de la adición de alcalinidad en el reactor de fermentación para la corrección del pH.

Recientemente, para evitar este tipo de problemas, se está evaluando el proceso con mezclas de residuos. La co-digestión de una mezcla de lactosuero, residuos de producción de aceite de oliva y fracción líquida de estiércol de vacuno fue probada en un sistema de dos etapas. De esta manera, se pudo alcanzar una producción volumétrica de 1,72LH₂/L_Rd mientras que en el segundo reactor se generaron 0,33LCH₄/L_Rd [86]. En otro trabajo similar se propuso la co-digestión de sorgo, lactosuero y fracción líquida de estiércol vacuno (55/40/5). Con esta mezcla se consiguió aumentar la producción, 2,14LH₂/L_Rd junto con 0,90LCH₄/L_Rd [87].

Conclusiones

El lactosuero producido en la industria láctea, se caracteriza por ser un subproducto con un elevado contenido en materia orgánica. Debe ser correctamente gestionado para evitar problemas de contaminación como consecuencia de un vertido incontrolado. Entre las alternativas disponibles para su tratamiento, se encuentra la valorización energética la cual suscita un gran interés debido a la posibilidad de producir biocombustibles como el biogás o el hidrógeno. En este artículo, se ha realizado una revisión bibliográfica de trabajos en los que se han evaluado diferentes tratamientos biológicos con esta finalidad. La digestión anaerobia ha sido la opción más ampliamente aplicada. En general, la digestión anaerobia es un proceso complejo, el cual presenta varios inconvenientes que pueden impedir un adecuado desarrollo de la digestión como son: la rápida acidificación y en ocasiones el limitado contenido en nutrientes. Ante esto, se ha optado por la utilización del lactosuero mezclado con otros sustratos en sistemas de co-digestión anaerobia. Esta opción ha permitido conseguir resultados favorables, principalmente cuando se emplea en combinación con residuos

ganaderos. Por último, otra alternativa estudiada ha sido la fermentación oscura para producción de hidrógeno. En la actualidad, se trata de una tecnología prometedora en la que únicamente se han desarrollado trabajos experimentales a escala laboratorio. Por lo tanto, es necesaria la realización de más estudios orientados a la operación en régimen continuo a gran escala que permitan establecer el control necesario de las condiciones de funcionamiento para favorecer la estabilidad de las poblaciones microbianas con el objetivo de mejorar los rendimientos de producción de hidrógeno.

Referencias bibliográficas

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (FAOSTAT). Statistical Data production livestock processed (Sitio en internet). Disponible en: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QP/E>. Acceso el 20 de Octubre de 2015.
- [2] Remón J, Laseca M, García L, Arauzo J. Hydrogen production from cheese whey by catalytic steam reforming: Preliminary study using lactose as a model compound. *Energy Convers. Manage.* 2016;114:122-41.
- [3] Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J. Fenton-like application to pretreated cheese whey wastewater. *J. Environ. Manage.* 2013;129(15):199-205.
- [4] Panesar PS, Kennedy JF, Gandhi DN, Bunko K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem.* 2007;105(1):1-14.
- [5] Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.* 2012;110:48-68.
- [6] Pintado ME, Macedo AC, Malcata FX. Review: Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Sci. Technol. Int.* 2001;7(2):105-16.
- [7] Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J, Patanita M, Dôres J. Pretreated cheese whey wastewater management by agricultural reuse: Chemical characterization and response of tomato plants *Lycopersicon esculentum Mill.* under salinity conditions. *Sci. Total Environ.* 2013;463-464,943-51.
- [8] De Wit JN. *Lecturer's Handbook on Whey and Whey Products.* Bélgica: European Whey Products Association; 2001.
- [9] Plessas S, Bosnea L, Psarianos C, Koutinas AA, Marchant R, Banat IM. Short

- communication: lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresour. Technol.* 2008;99(13):5951-5.
- [10] Ibrahim SA. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus spp.*: Other Species. Reference Module in Food Science: Elsevier; 2016.
- [11] Santos MJ, Teixeira JA, Rodrigues LR. Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography. *Journal Chromatogr. B.* 2011;879(7-8):475-9.
- [12] Zafar S, Owais M. Short communication: Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. Eng. J.* 2006;27(3):295-8.
- [13] Sansonetti S, Curcio S, Calabrò V, Iorio G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass Bioenerg.* 2009;33(12):1687-92.
- [14] Ozmihci S, Kargi F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme Microb. Technol.* 2007;41(6-7):876-80.
- [15] Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv.* 2010;28(3):375-84.
- [16] Staniszewski M, Kujawski W, Lewandowska M. Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product. Kinetic model predictions considering glucose repression. *J. Food Eng.* 2009;91(2):240-9.
- [17] Stoeberl M, Werkmeister R, Faulstich M, Russ W. Biobutanol from food wastes – fermentative production, use as biofuel and the influence on the emissions. *Procedia Food Science.* 2011;1:1867-74.
- [18] Raganati F, Olivieri G, Procentese A, Russo ME, Salatino P, Marzocchella A. Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor. *Bioresour. Technol.* 2013;138:259-65.
- [19] Yadav JSS, Yan S, Pilli S, Kumar L, Tyagi RD, Surampalli RY. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* 2015;33(6):756-74.
- [20] Ward AJ, Hobbs PJ, Holliman PJ, Jones DL. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour. Technol.* 2008;99(17):7928-40.
- [21] Albuquerque JA, de la Fuente C, Bernal MP. Chemical properties of anaerobic digestates affecting C and N dynamics in amended soils. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2012;160:15-22.
- [22] Massé DI, Droste RL. Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 2000;34(12):3087-3106.
- [23] Malaspina F, Cellamare CM, Stante L, Tilche A. Anaerobic treatment of cheese whey with a downflow-upflow hybrid reactor. *Bioresour. Technol.* 1996;55(2):131-9.
- [24] Yang K, Yu Y, Hwang S. Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation. *Water Res.* 2003;37(10):2467-77.
- [25] Chatzipaschali AA, Stamatis AG. Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. *Energies.* 2012;5:3492-525.
- [26] Demirel B, Yenigun O, Onay TT. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. *Process Biochem.* 2005;40(8):2583-95.
- [27] Yan JQ, Lo KV, Liao PH. Anaerobic digestion of cheese whey using an upflow anaerobic sludge blanket reactor: III. Sludge and substrate profiles. *Biomass.* 1990;21(4):257-71.
- [28] Kalyuzhnyi SV, Martinez EP, Martinez JR. Anaerobic treatment of high-strength cheese-whey wastewaters in laboratory and pilot UASB-reactors. *Bioresour. Technol.* 1997 4;60(1):59-65.
- [29] Ergüder TH, Tezel U, Güven E, Demirel GN. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Manage.* 2001;21(7):643-50.
- [30] Gavala HN, Kopsinis H, Skiadas IV, Stamatelatos K, Lyberatos G. Treatment of Dairy Wastewater Using an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *J. Agric. Eng. Res.* 1999;73(1):59-63.
- [31] Patel P, Desai M, Madamwar D. Biomethanation of cheese whey using anaerobic upflow fixed film reactor. *J Ferment Bioeng.* 1995;79(4):398-9.
- [32] Gannoun H, Khelifi E, Bouallagui H, Touhami Y, Hamdi M. Ecological clarification of

- cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. *Bioresour. Technol.* 2008;99(14):6105-11.
- [33] Puñal A, Méndez-Pampín RJ, Lema JM. Characterization and comparison of biomasses from single- and multi-fed upflow anaerobic filters. *Bioresour. Technol.* 1999;68(3):293-300.
- [34] Najafpour GD, Hashemiyeh BA, Asadi M, Ghasemi MB. Biological Treatment of Dairy Wastewater in an Upflow Anaerobic Sludge-Fixed Film Bioreactor. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2006;4:251-7.
- [35] Parra RA. Digestión Anaerobia de Lactosuero: Efecto de Altas Cargas Puntuales. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 2010;63(1):5385-94.
- [36] Rodgers M, Zhan X, Dolan B. Mixing Characteristics and Whey Wastewater Treatment of a Novel Moving Anaerobic Biofilm Reactor. *J. Environ. Sci. Health., Part A.* 2004;39:2183-93.
- [37] Yan JQ, Liao PH, Lo KV. Methane production from cheese whey. *Biomass.* 1988;17(3):185-202.
- [38] Lebrato J, Pérez Rodríguez JL, Maqueda C, Morillo E. Cheese factory wastewater treatment by anaerobic semicontinuous digestion. *Resour. Conserv. Recy.* 1990;3(4):193-9.
- [39] Rugele K, Mezule L, Dalecka B, Larsson S, Vanags J, Rubulis J. Application of fluorescent in situ hybridisation for monitoring methanogenic archaea in acid whey anaerobic digestion. *Agron. Res.* 2013;11(2):373-80.
- [40] Kim J, Lee C. Response of a continuous biomethanation process to transient organic shock loads under controlled and uncontrolled pH conditions. *Water. Res.* 2015;73:68-77.
- [41] Banik GC, Daguet RR. ASBR treatment of low strength industrial wastewater at psychrophilic temperatures. *Water Sci. Technol.* 1997;36(2-3):337-44.
- [42] Göblös S, Portörő P, Bordás D, Kálmán M, Kiss I. Comparison of the effectivities of two-phase and single-phase anaerobic sequencing batch reactors during dairy wastewater treatment. *Renew. Energy.* 2008;33(5):960-5.
- [43] Fernández C, Cuetos MJ, Martínez EJ, Gómez X. Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H₂ and CH₄ production. *Biomass Bioenergy.* 2015;81:55-62.
- [44] Mockaitis G, Ratusznei SM, Rodrigues JAD, Zaiat M, Foresti E. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. *J Environ. Manage.* 2006;79(2):198-206.
- [45] Mata-Alvarez J, Mace S, Llabres P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour. Technol.* 2000;74(1):3-16.
- [46] Lo KV, Liao PH. Anaerobic-aerobic biological treatment of a mixture of cheese whey and dairy manure. *Biol. Waste.* 1989;28(2):91-101.
- [47] Comino E, Riggio VA, Rosso M. Biogas production by anaerobic co-digestion of cattle slurry and cheese whey. *Bioresour. Technol.* 2012;114:46-53.
- [48] Kavacik B, Topaloglu B. Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. *Biomass Bioenergy.* 2010;34(9):1321-9.
- [49] Gelegenis J, Georgakakis D, Angelidaki I, Mavris V. Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. *Renew. Energy.* 2007;32(13):2147-60.
- [50] Rico C, Muñoz N, Fernández J, Rico JL. High-load anaerobic co-digestion of cheese whey and liquid fraction of dairy manure in a one-stage UASB process: Limits in co-substrates ratio and organic loading rate. *Chem. Eng. J.* 2015;262:794-802.
- [51] Rico C, Muñoz N, Rico JL. Anaerobic co-digestion of cheese whey and the screened liquid fraction of dairy manure in a single continuously stirred tank reactor process: Limits in co-substrate ratios and organic loading rate. *Bioresour. Technol.* 2015;189:327-33.
- [52] Bertin L, Grilli S, Spagni A, Fava F. Innovative two-stage anaerobic process for effective codigestion of cheese whey and cattle manure. *Bioresour. Technol.* 2013;128:779-83.
- [53] Battista F, Fino D, Erriquens F, Mancini G, Ruggeri B. Scaled-up experimental biogas production from two agro-food waste mixtures having high inhibitory compound concentrations. *Renew. Energy.* 2015;81:71-7.
- [54] Shilton A, Powell N, Broughton A, Pratt C, Pratt S, Pepper C. Enhanced biogas production using cow manure to stabilize co-digestion of whey and primary sludge. *Environ. Technol.* 2013;34(17):2491-6.
- [55] Powell N, Broughton A, Pratt C, Shilton A. Effect of whey storage on biogas produced by co-digestion of sewage sludge and whey. *Environ. Technol.* 2013;34(19):2743-8.
- [56] Fernández C, Blanco D, Fierro J, Martínez EJ,

- Gómez X. Anaerobic Co-digestion of Sewage Sludge with Cheese Whey under Thermophilic and Mesophilic Conditions. *Int. J. Energy Eng.* 2014;4(2):26-31.
- [57] Park W, Hyun SH, Oh SE, Logan BE, Kim IS. Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environ Sci Technol.* 2005;39(12):4416-20.
- [58] Ghimire A, Frunzo L, Pirozzi F, Trably E, Escudie R, Lens PNL, et al. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl. Energy.* 2015;144:73-95.
- [59] Gómez X, Fernández C, Fierro J, Sánchez ME, Escapa A, Morán A. Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation. *Bioresour. Technol.* 2011;102(18):8621-7.
- [60] Wang J, Wan W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2009;34(2):799-811.
- [61] Yang P, Zhang R, McGarvey JA, Benemann JR. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2007;32(18):4761-71.
- [62] Azbar N, Çetinkaya Dokgöz FT, Keskin T, Korkmaz KS, Syed HM. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2009;34(17):7441-7.
- [63] Davila-Vázquez G, Cota-Navarro CB, Rosales-Colunga LM, de León-Rodríguez A, Razo-Flores E. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2009;34(10):4296-304.
- [64] Castelló E, García y Santos C, Iglesias T, Paolino G, Wenzel J, Borzacconi L, et al. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2009;34(14):5674-82.
- [65] Carrillo-Reyes J, Celis LB, Alatraste-Mondragón F, Razo-Flores E. Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2012;37(7):5591-601.
- [66] Perna V, Castelló E, Wenzel J, Zampol C, Fontes Lima DM, Borzacconi L, Varesche MB, Zaiat M, Etchebehere C. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2013;38(1):54-62.
- [67] Fernández C, Carracedo B, Martínez EJ, Gómez X, Morán A. Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: Effect of organic loading rate. *J. Environ. Sci. Health., Part A.* 2014;49(2):210-7.
- [68] Ferchichi M, Crabbe E, Gil G, Hintz W, Almadidy A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *J Biotechnol.* 2005;120(4):402-9
- [69] Davila-Vazquez G, Alatraste-Mondragón F, de León-Rodríguez A, Razo-Flores E. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2008;33(19):4989-97.
- [70] Kargi F, Eren NS, Ozmihci S. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. *Int J Hydrogen Energy.* 2012;37(3):2260-6.
- [71] Azbar N, Dokgöz FT, Keskin T, Eltem R, Korkmaz KS, Gezgin Y, et al. Comparative evaluation of bio-hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. *International Journal of Green Energy.* 2009;6(2):192-200.
- [72] Rai P, Singh SP, Asthana RK. Biohydrogen Production from Cheese Whey Wastewater in a Two-Step Anaerobic Process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012;167(6):1540-9.
- [73] Rosales-Colunga LM, Razo-Flores E, Ordoñez LG, Alatraste-Mondragón F, De León-Rodríguez A. Hydrogen production by *Escherichia coli* ΔhycA Δlacl using cheese whey as substrate. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2010;35(2):491-9.
- [74] Seo YH, Yun Y, Lee H, Han J. Pretreatment of cheese whey for hydrogen production using a simple hydrodynamic cavitation system under alkaline condition. *Fuel.* 2015;150:202-7.
- [75] Gomez-Romero J, Gonzalez-Garcia A, Chairez I, Torres L, García-Peña EI. Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2014;39(24):12541-50.
- [76] Davila-Vazquez G, de León-Rodríguez A, Alatraste-Mondragón F, Razo-Flores E. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community

- composition in non-axenic cultures. *Biomass Bioenergy*. 2011;35(7):3174-81.
- [77] De Gioannis G, Friargiu M, Massi E, Muntoni A, Poletini A, Pomi R, *et al.* Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2014;39(36):20930-41.
- [78] Teli A, Ficara E, Malpei F. Bio-hydrogen production from cheese whey by dark fermentation. *Chem. Eng. Trans.* 2014;37:613-8.
- [79] Kisielewska M. Feasibility of Bioenergy Production from Ultrafiltration Whey Permeate Using the UASB Reactors. En: *Biogas*. Kumar S, Editor. Croacia: InTech; 2012 .p. 191-222.
- [80] Antonopoulou G, Stamatelatos K, Venetsaneas N, Kornaros M, Lyberatos G. Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2008;47(15):5227-33.
- [81] Venetsaneas N, Antonopoulou G, Stamatelatos K, Kornaros M, Lyberatos G. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour. Technol.* 2009;100(15):3713-7.
- [82] Moreno R, Escapa A, Cara J, Carracedo B, Gómez X. A two-stage process for hydrogen production from cheese whey: Integration of dark fermentation and biocatalyzed electrolysis. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2015;40(1):168-75.
- [83] Yilmazer G, Yenigün O. Two-phase anaerobic treatment of cheese whey. *Water Sci. Technol.* 1999;40(1):289-95.
- [84] Saddoud A, Hassaïri I, Sayadi S. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresour. Technol.* 2007;98(11):2102-8.
- [85] Diamantis VI, Kapagiannidis AG, Ntougias S, Tataki V, Melidis P, Aivasidis A. Two-stage CSTR-UASB digestion enables superior and alkali addition-free cheese whey treatment. *Biochem. Eng. J.* 2014;84:45-52.
- [86] Dareioti MA, Kornaros M. Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. *Bioresour. Technol.* 2014;167:407-15.
- [87] Dareioti MA, Kornaros M. Anaerobic mesophilic co-digestion of ensiled sorghum, cheese whey and liquid cow manure in a two-stage CSTR system: Effect of hydraulic retention time. *Bioresour. Technol.* 2015;175:553-62.