



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

**EFFECTO DE LA VELOCIDAD SUPERFICIAL DEL GAS SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO CON VINAZAS VITIVINÍCOLAS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA
BLANCA AIDÉ ALBARRÁN CONTRERAS

TUTOR PRINCIPAL
GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR
OSCAR GÓNZALEZ BARCELÓ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
OSCAR A. MONROY HERMOSILLO, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA - UNIDAD IZTAPALAPA

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, noviembre de 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Bibiana Cercado Quezada
Secretario: Dr. Oscar González Barceló
1^{er} Vocal: Dr. Jorge Arreola Vargas
2^{do} Vocal: Dr. Oscar Armando Monroy Hermosillo
3^{er} Vocal: Dr. Germán Buitrón Méndez

Lugar donde se realizó la tesis: Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas

TUTOR DE TESIS:

Dr. Germán Buitrón Méndez

FIRMA

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el Fondo de Sustentabilidad Energética SENER-CONACYT mediante el proyecto 247006 Clúster de Biocombustibles Gaseosos.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.



Dedicatoria

*A mis padres y mi hermano
porque hoy puedo ver alcanzada mi meta
porque creyeron en mí
porque siempre estuvieron impulsándome
en los momentos más difíciles.*

*Gracias por fomentar en mí el deseo de superación
y el anhelo de triunfo en la vida.*

*Mil palabras no bastan para agradecerles su apoyo,
su comprensión y sus consejos.*

*Espero no defraudarlos y contar siempre
con su apoyo, sincero e incondicional.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el Instituto de Ingeniería (II) y al Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) por la facilidad de ocupar sus instalaciones para la realización del trabajo de investigación.

Al Dr. Germán Buitrón, tutor principal, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por su valiosa guía y asesoramiento durante la realización de este trabajo de investigación.

A los doctores Oscar Monroy y Oscar González por formar parte de mi comité tutor y apoyar en el enriquecimiento de este trabajo de investigación con sus observaciones y comentarios.

Al Dr. Julián Carrillo por su guía y apoyo durante el trabajo en el laboratorio.

A la maestra Gloria Moreno y al maestro Jaime Pérez por su asistencia técnica en el laboratorio, así como todos sus comentarios de apoyo durante los momentos de incertidumbre.

A los compañeros de posdoctorado y doctorado Isaac, Karla, René, Eliane, Martín y Sonia por compartir su conocimiento conmigo, por ayudarme a adquirir nuevos conocimientos, así como su apoyo en el laboratorio, por favor nunca cambien.

A mis compañeras de generación María José, Lupita y Geraldine por su apoyo y consejos durante dos años, por estar unidas en los buenos y malos momentos, muchas gracias.

A la comunidad del LIPATA: David, Beto, Sharon, Lirio, Rodolfo, Carolinas, Lorena, Felipe, Luis, Gerardo, Juan Sebastián por el apoyo, comentarios, consejos y bonitos recuerdos.



Contenido

Financiamiento	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimientos	V
Contenido	VI
Índice de figuras	VIII
Índice de tablas	IX
Índice de ecuaciones	IX
Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Objetivo General.....	5
Objetivos Particulares	5
Capítulo 1. Antecedentes.....	6
1.1. Industria vitivinícola	6
1.1.1. Residuos generados	6
1.1.2. Vinazas vitivinícolas	8
1.1.3. Valorización de las vinazas vitivinícolas	8
1.2. Producción biológica de hidrógeno	10
1.2.1. Fermentación oscura.....	11
1.2.2. Tipo y concentración de sustrato	13
1.2.3. Relación sustrato-biomasa (S_0/X_0)	14
1.2.4. Cultivos mixtos como inóculo.....	15
1.2.5. Tipo de biomasa y reactores	16
1.2.6. Sobresaturación de hidrógeno	17
Hipótesis.....	20
Capítulo 2. Metodología.....	21
2.1. Estrategia experimental.....	21



2.2.	Potencial de producción de hidrógeno	22
2.2.1.	Relación sustrato-biomasa (S_0/X_0)	22
2.2.2.	Concentración de sustrato.....	23
2.3.	Reactor UASB	24
2.4.	Aclimatación de inóculo	25
2.5.	Evaluación de la velocidad superficial del gas	26
2.6.	Técnicas analíticas	27
Capítulo 3.	Potencial de producción de hidrógeno	29
3.1.	Caracterización de las vinazas vitivinícolas	29
3.2.	Determinación de la relación S_0/X_0 idónea para producción de hidrógeno.....	31
3.3.	Determinación de la concentración de sustrato idónea para producción de hidrógeno	36
Capítulo 4.	Producción continua de hidrógeno en un reactor UASB	41
4.1.	Aclimatación del inóculo	41
4.2.	Efecto de la velocidad superficial del gas.....	45
Capítulo 5.	Conclusiones.....	51
Capítulo 6.	Recomendaciones	52
Productividad del trabajo.....		53
Publicaciones en Congresos Internacionales		53
Publicaciones en Congresos Nacionales		53
Referencias		54

Índice de figuras

Figura 1-1 Diagrama de flujo del proceso de vinificación dentro de una bodega.....	7
Figura 1-2 Rutas para la producción biológica de hidrógeno.....	11
Figura 1-3 Seguimiento de los metabolitos gaseosos desde su generación hasta su transferencia a la fase gaseosa	17
Figura 1-4 Rutas potenciales para el consumo de hidrógeno durante la fermentación oscura al emplear cultivos mixtos	18
Figura 2-1 Estrategia experimental	21
Figura 2-2 Esquema de la configuración del reactor UASB empleado.....	24
Figura 2-3 Fotografía de la configuración del reactor UASB empleado.....	25
Figura 3-1 Producción acumulada de hidrógeno y ajuste con la ecuación modificada de Gompertz para cada relación sustrato-biomasa	31
Figura 3-2 Productividad (a) y rendimientos (b, c) obtenidos en cada relación S_0/X_0	33
Figura 3-3 Ácidos grasos volátiles generados en cada relación S_0/X_0	34
Figura 3-4 Concentración inicial y final de etanol en cada relación S_0/X_0	35
Figura 3-5 Producción acumulada de hidrógeno y ajuste con la ecuación modificada de Gompertz para los porcentajes de sustrato en los que se tuvo producción de hidrógeno.....	37
Figura 3-6 Volumen acumulado (a), productividad (b), rendimientos (c, d) y remociones (e, f) obtenidas en cada concentración de sustrato evaluada	38
Figura 3-7 Etanol (a) y otros metabolitos solubles (b) producidos por cada concentración de sustrato evaluada.....	40
Figura 4-1 Composición de biogás durante la etapa de aclimatación	41
Figura 4-2 Tasa específica de producción de hidrógeno durante la etapa de aclimatación..	42
Figura 4-3 Remoción de carbohidratos y DQO durante la etapa de aclimatación	43
Figura 4-4 Fotografías de lodo granular al inicio (izquierda) y al término (derecha) de la etapa de aclimatación	44
Figura 4-5 Tasa específica de producción de hidrógeno en las diferentes condiciones de operación	47

Figura 4-6 Etanol (a) y metabolitos solubles (b) generados durante las diferentes condiciones de operación.....	50
---	----

Índice de tablas

Tabla 1-1 Tratamientos aplicados y productos obtenidos de los residuos de la industria vitivinícola.....	9
Tabla 1-2 Reacciones generales de la fermentación oscura	12
Tabla 3-1 Caracterización de las vinazas vitivinícolas de vino blanco	30
Tabla 3-2 Parámetros cinéticos ajustados con la ecuación modificada de Gompertz	32
Tabla 3-3 Concentraciones de sustrato evaluadas	36
Tabla 4-1 Días de operación, productividad y rendimiento en el periodo estable de cada condición evaluada	48
Tabla 4-2 Resultados de diversas técnicas empleadas para reducir la sobresaturación de hidrógeno.....	49

Índice de ecuaciones

Ecuación 1-1 Modelo de Ludeking-Piret.....	13
Ecuación 1-2 Relación sustrato-biomasa.....	14
Ecuación 1-3 Producción de hidrógeno por medio de la oxidación de Fd (a) y NADH (b) a P_{H_2} menor de 60 Pa	19
Ecuación 2-1 Ecuación modificada de Gompertz	22
Ecuación 3-1 Producción de acetato a partir de etanol.....	35
Ecuación 4-1 Velocidad superficial del biogás	45



Resumen

Las vinazas vitivinícolas son un efluente de la vinificación, por su pH bajo y su alto contenido materia orgánica, provocan impactos negativos en el ambiente si se disponen de manera directa al suelo o agua, por tal motivo es indispensable que las bodegas les den un tratamiento que permita mitigar los impactos ambientales negativos que conlleva su disposición. El dar un tratamiento biológico a este tipo de efluentes tiene una doble ganancia, la obtención de energía que puede ser empleada en las instalaciones de las bodegas y la reducción de los residuos generados. Dentro de los tratamientos biológicos se tiene la fermentación oscura, con este proceso se obtiene como vector energético al hidrógeno y el efluente generado es rico en ácidos grasos volátiles lo que lo hace susceptible a ser utilizado en etapas subsecuentes para producción de más energía.

La concentración de sustrato y la relación sustrato-biomasa tienen un papel importante en la producción de hidrógeno por fermentación oscura, puesto que los valores óptimos de estos favorecen un máximo crecimiento celular, una máxima producción de hidrógeno y disminuyen cualquier efecto inhibitorio de los compuestos presentes en el sustrato. Si la tasa de producción de hidrógeno es mayor al coeficiente de transferencia de masa se provoca una sobresaturación de hidrógeno disuelto en el medio, convirtiendo al hidrógeno en un nuevo sustrato, provocando cambios en la comunidad microbiana y con ello a una disminución o cese en la producción de hidrógeno. Se han empleado diferentes estrategias para incrementar la velocidad de transferencia de masa; sin embargo, la mayoría de ellas emplea gases inertes, lo que hace necesario un proceso de purificación del biogás para la separación del gas inerte y del hidrógeno.

Para mantener una producción continua de hidrógeno en el presente trabajo de investigación se propuso recircular el biogás producido dentro del reactor productor de hidrógeno a partir de vinazas vitivinícolas para aumentar su velocidad de transferencia a la fase gaseosa y así evitar reacciones colaterales que comprometan la estabilidad del sistema.

Los resultados obtenidos mostraron que la concentración y relación sustrato-biomasa idóneas para el proceso de fermentación oscura a partir de vinazas vitivinícolas son de 20 % y 0.20 gCT gST⁻¹, respectivamente, con esta condición se obtuvo una productividad de 110±13 mLH₂ L⁻¹ d⁻¹ y rendimientos de 3±0.3 mL H₂ gDQO⁻¹ y de 0.86±0.10 mol H₂ mol_{hexosa}⁻¹, es importante señalar que en concentraciones superiores (40, 60, 80 y 100%) disminuye la producción de hidrógeno hasta el punto de ser nula debido a la concentración de etanol en las vinazas vitivinícolas y que llega a ser inhibitoria para el inóculo. Al aplicar una velocidad superficial del biogás de 17.8 m d⁻¹ se obtuvo la máxima productividad de hidrógeno (44 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹) y los máximos rendimientos (4.99 mL H₂ gDQO⁻¹ y 0.97 mol mol_{hexosa}⁻¹), estos valores son 2.14 veces mayor a lo obtenido sin recirculación de biogás.



Abstract

The wine vinasses are an effluent of winemaking, its low pH and high content of organic matter, cause negative impacts on the environment if they are disposed directly to the soil or water, therefore it is essential that the wineries give them a treatment that mitigates the negative environmental impacts that its disposition entails. The biological treatment of this type of effluents has a double gain, the obtaining of energy that can be used in the installations of the wineries and the reduction of the waste generated. Dark fermentation is one of the biological treatments, with this process is obtained hydrogen as energy vector and the generated effluent is rich in volatile fatty acids which makes it susceptible to be used in subsequent stages to produce more energy.

The substrate concentration and the substrate-biomass ratio play an important role in the production of hydrogen by dark fermentation, since the optimum values of these favor a maximum cell growth, a maximum hydrogen production and diminish any inhibitory effect of the compounds in the substrate. If the rate of hydrogen production is greater than the mass transfer coefficient, an over-saturation of hydrogen dissolved in the medium is caused, converting the hydrogen into a new substrate, causing changes in the microbial community and thus a decrease or cessation in the hydrogen production. Different strategies have been employed to increase the rate of mass transfer; however, most of them use inert gases, which necessitates a process of biogas purification for the separation of inert gas and hydrogen.

For maintain a continuous hydrogen production it was proposed recirculate the biogas produced inside the reactor hydrogen producing from wine vinasses to increase its transfer rate to the gas phase and avoid collateral reactions that compromise the stability of the system.

The obtained results showed that the concentration and substrate-biomass ratio suitable for the dark fermentation process from wine vinasses are 20% and 0.20 gTC gTS⁻¹, respectively, with this condition a productivity of $110 \pm 13 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and yields of $3 \pm 0.3 \text{ mL H}_2 \text{ gCOD}^{-1}$ and $0.86 \pm 0.10 \text{ mol H}_2 \text{ mol}_{\text{hexose}}^{-1}$, it is important to note that in higher concentrations (40, 60, 80 and 100%), hydrogen production being null due to the concentration of ethanol in the wine vinasses and that becomes inhibitory for the inoculum. The maximum hydrogen productivity ($44 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and the maximum yields ($4.99 \text{ mL H}_2 \text{ gCOD}^{-1}$ and $0.97 \text{ mol H}_2 \text{ mol}_{\text{hexose}}^{-1}$) were obtained by applying a surface gas velocity of 17.8 m d^{-1} , these values are 2.14 times greater than that obtained without biogas recirculation.

Introducción

La demanda de energía a nivel mundial aumenta con el paso de los años como consecuencia del incremento poblacional, el inconveniente que se presenta es que actualmente la principal fuente de energía son los combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural) y su combustión genera gases de efecto invernadero que contribuyen al cambio climático global, la degradación del ambiente y la generación de problemas de salud (Hallenbeck, 2009; Levin et al., 2004). En las últimas décadas se ha buscado disminuir el consumo de este tipo de combustibles y se ha incentivado la búsqueda de nuevas fuentes de energía limpia y amigable con el ambiente; una opción que ha sido ampliamente estudiada es la recuperación de energía a partir del tratamiento anaerobio de aguas residuales (Angenent et al., 2004; Devesa-Rey et al., 2011).

Uno de los biocombustibles más prometedores es el hidrógeno; dentro de sus principales características se tiene su alta densidad energética (142 kJ g^{-1}), su alta eficiencia de conversión energética y que su combustión tiene un bajo impacto ambiental (Levin et al., 2004; Sinha y Pandey, 2011). El hidrógeno puede generarse a partir de diferentes fuentes y procesos, en el año 2011 el 47% fue generado a partir del gas natural, 30% de aceites, 18% del carbón, 4% por electrólisis de agua y 1% por procesos biológicos (Sinha y Pandey, 2011).

Para convertir la producción de hidrógeno en un proceso económicamente favorable es indispensable el empleo de procesos biológicos porque tienen un bajo consumo de energía y dan la posibilidad de emplear como sustrato efluentes agroindustriales bajo condiciones moderadas de reacción, obteniéndose un doble beneficio, el tratamiento del agua residual y la generación de hidrógeno (Angenent et al., 2004; Kyzas et al., 2016; Levin et al., 2004; Redwood et al., 2009; Sinha y Pandey, 2011).

La fermentación oscura es uno de los procesos biológicos que resulta más atractivo para la producción de hidrógeno por su alta eficiencia de producción que se refleja en tasas de producción altas en comparación con otros procesos biológicos, este proceso involucra una cooperación entre diferentes tipos de microorganismos que son capaces de hidrolizar y

fermentar la materia orgánica presente en los efluentes agroindustriales. La fase gaseosa que se obtiene a partir de este proceso es un biogás compuesto principalmente por hidrógeno y dióxido de carbono (Levin et al., 2004; Sinha y Pandey, 2011; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).

La concentración de carbohidratos juega un papel importante en la producción de hidrógeno porque existe una concentración en que se presenta un crecimiento celular máximo que propicia un máximo en la producción (Cavalcante de Amorim et al., 2012; Chu et al., 2013), por su lado la relación sustrato-biomasa influye de manera directa en los patrones de crecimiento celular y ayuda a disminuir el efecto inhibitorio de los compuestos presentes en el sustrato (Liu et al., 1998; Moreno-Andrade y Buitrón, 2003).

Una de las limitantes que se tiene en la producción de hidrógeno es su velocidad de transferencia de la fase líquida a la fase gaseosa, si su tasa de producción es mayor a la de transferencia, se provoca una sobresaturación de hidrógeno en el medio (Frigon y Guiot, 1995; Pauss et al., 1990; Stewart, 2003; Zhang et al., 2012), esta sobresaturación provoca que el hidrógeno se reasimile, lo cual lleva a cambios en las rutas metabólicas, a cambios estructurales en la comunidad microbiana y a una disminución o cese en la producción de hidrógeno al paso del tiempo (Bakonyi et al., 2017; Zumar Bundhoo y Mohee, 2016).

Se han empleado diferentes estrategias para incrementar la velocidad de transferencia del hidrógeno a la fase gaseosa y así mantener una producción continua de hidrógeno a lo largo del tiempo porque se evita que el hidrógeno sea consumido por los microorganismos presentes en el inóculo; estas estrategias incluyen el burbujeo de gases inertes dentro del medio y el incremento de la velocidad de agitación (Bakonyi et al., 2017; Kraemer y Bagley, 2006; Zhang et al., 2012, 2013), el inconveniente que se presenta con este tipo de estrategias es que al emplear gases inertes se vuelve necesario un proceso de purificación del biogás para la obtención del hidrógeno y al emplear altas velocidades de agitación en reactores con lodo granular se puede provocar la reducción de la concentración de la biomasa, la inhibición de la actividad de la biomasa y el lavado celular (Sinha y Pandey, 2011; Zhang et al., 2012).



En el presente trabajo de investigación se propuso evaluar el efecto de la velocidad superficial del biogás sobre la producción de hidrógeno para lograr la valorización de las vinazas vitivinícolas en un proceso de fermentación oscura.

Objetivo General

Evaluar el efecto de la velocidad superficial del gas, la influencia de la concentración de sustrato y la relación sustrato-biomasa sobre la producción de hidrógeno con vinazas vitivinícolas.

Objetivos Particulares

- ✓ Caracterizar fisicoquímicamente las vinazas vitivinícolas
- ✓ Evaluar la influencia de la velocidad superficial del biogás sobre la productividad de hidrógeno utilizando diferentes tasas de recirculación del biogás en un reactor UASB con un inóculo granular aclimatado a vinazas vitivinícolas.
- ✓ Determinar la influencia de la concentración de sustrato y la relación sustrato-biomasa sobre la producción de hidrógeno.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1. Industria vitivinícola

En el año 2014 se produjeron 26,989 millones de litros de vino, concentrándose el 64.87% de la producción en el continente Europeo, dado que este continente alberga a los tres principales productores: Francia (4, 653 millones de litros), Italia (4,423 millones de litros) y España (3,949 millones de litros). En México se produjeron 2.93 millones de litros de vino para el mismo año (Organización Internacional de la Vid y el Vino, 2017).

La industria vitivinícola mexicana tiene un valor anual que oscila en los 4,232 millones de pesos, está conformada con más de 100 bodegas y cuenta con una oferta mayor a 500 etiquetas provenientes de 12 estados productores (Consejo Mexicano Vitivinícola, 2017). Querétaro es el segundo estado productor del país y su industria vitivinícola está creciendo a una tasa anual entre el 15 y 20% , generando más de 500 empleos directos con una producción de 3 millones de botellas anuales distribuidas en las 100 etiquetas del estado (Asociación de Vitivinicultores de Querétaro, 2017).

1.1.1. Residuos generados

Los residuos que genera la industria vitivinícola tienen un gran impacto ambiental dado que provocan contaminación del agua, degradación del suelo, daño a la vegetación, generación de olores y emisiones, entre otros aspectos. Los requerimientos para hacer una correcta disposición de los residuos generados son únicos para cada bodega por las grandes cantidades que se generan en cortos periodos de tiempo, además de la variabilidad en cuanto a composición y cvolumen de los efluentes (Buelow et al., 2015; Bustamante et al., 2008; Kyzas et al., 2016; Lofrano y Meric, 2016; Oliveira y Duarte, 2016).

En la Figura 1-1 se muestra el diagrama de flujo de la vinificación, como se observa en cada operación se obtienen diferentes tipos de residuos o subproductos que pueden emplearse para diferentes propósitos, los efluentes generados durante este proceso se dividen

en agua residual y vinazas (Bustamante et al., 2005; Devesa-Rey et al., 2011). Diversos autores han analizado estos dos tipos de efluentes y encontraron que tenían un pH entre 3.8 y 11.8, una alcalinidad entre 30.8 y 62.4 meq L⁻¹, una conductividad eléctrica entre 0.08 y 1.16 S m⁻¹, un alto contenido de materia orgánica (DQO 0.73 – 296 g L⁻¹, DBO 3.25 – 130 g L⁻¹), sales como sodio (7 – 570 mg L⁻¹), potasio (29 – 403 mg L⁻¹) y calcio (174 – 9,071 mg L⁻¹), altas concentraciones de polifenoles (29 - 766 mg L⁻¹), altas concentraciones de sólidos totales (1.6 – 113.6 g L⁻¹), bajas concentraciones de nutrientes (nitrógeno 0 – 1.3 g L⁻¹, carbono 0.11 – 11.12 g L⁻¹ y fósforo 1.9 – 472.7 mg L⁻¹) y bajas concentraciones de metales pesados (cobre 0.5 – 8.6 mg L⁻¹, zinc 0.9 – 2.67 mg L⁻¹ y plomo 0.3 – 1.74 mg L⁻¹) (Bustamante et al., 2005; Kyzas et al., 2016; Lofrano y Meric, 2016).

1.1.2. Vinazas vitivinícolas

Las vinazas vitivinícolas son el residuo que se obtiene de la clarificación, se produce en gran volumen (entre 8 y 10 L de vinazas por cada litro de vino) durante pocos meses (entre septiembre y noviembre) y se caracteriza por ser un efluente de color marrón si proviene del vino blanco; este residuo es una mezcla de vino exhausto, lías de vino y sedimentos de la fermentación; su composición incluye ácidos orgánicos, carbohidratos, sales, etanol, glicerol, compuestos fenólicos, compuestos polifenólicos, y un alto contenido de sólidos conformados por bacterias y levaduras muertas, así como la semilla, el orujo y la pulpa de la uva (Buelow et al., 2015; Bustamante et al., 2008, 2005; Espana-Gamboa et al., 2011; Kyzas et al., 2016; Lofrano y Meric, 2016).

Las características de las vinazas dependen de la materia prima utilizada y del periodo de producción, ya que las vinazas generadas durante la cosecha tienen un pH menor y un mayor contenido de materia orgánica en comparación con las generadas durante la post-cosecha (Buelow et al., 2015; Bustamante et al., 2005; Lofrano y Meric, 2016).

1.1.3. Valorización de las vinazas vitivinícolas

Hoy en día existen diversas técnicas que permiten el aprovechamiento de las vinazas vitivinícolas como puede ser la obtención de compuestos de alto valor añadido, el empleo en la agricultura o la obtención de combustibles; se han explorado este tipo de alternativas por el costo que representa su disposición (Devesa-Rey et al., 2011; HAprowINE, 2011).

En la actualidad se emplean métodos fisicoquímicos para la obtención de compuestos comercialmente atractivos de las vinazas, tal es caso de los taninos que se emplean para el curtido de pieles, el ácido tartárico que se ocupa como aditivo en alimentos, los polifenoles que tienen propiedades antioxidantes y el gas de síntesis (hidrógeno y dióxido de carbono) que se emplea como combustible (Devesa-Rey et al., 2011; HAprowINE, 2011).

También se pueden emplear métodos biológicos para su valorización, en este caso se logra la transformación de los compuestos presentes en las vinazas en compuestos de mayor valor como el etanol, ácidos orgánicos, aminoácidos, hidrógeno, metano o diésel (HAprowINE, 2011). Algunos de los tratamientos empleados actualmente en las bodegas se presentan en la tabla 1-1.

Tabla 1-1 Tratamientos aplicados y productos obtenidos de los residuos de la industria vitivinícola

Residuo	Tratamiento	Productos
Orujo de uva	Fraccionamiento de la semilla	Polifenoles
	Hidrólisis y fermentación	Ácido láctico Biosurfactantes y bioemulsionantes
	Destilación	Etanol Acido tartárico
	Extracción	Taninos, polifenoles y aceites
	Fermentación de la semilla	Lacasa (enzima)
	Compostaje	Sustrato para las plantas
Sedimentos de la fermentación	Solubilización y precipitación	Ácido tartárico
	Compostaje	Sustrato para las plantas
Tallos	Compostaje	Sustrato para las plantas
	Liofilización y extracción	Polifenoles
Lodo	Compostaje	Sustrato para las plantas
	Digestión anaerobia	Producción de biogás
Vinazas vitivinícolas	Tratamiento alcalino, microondas, fermentación	Ácido láctico
	Solubilización y precipitación	Ácido tartárico
	Fermentación	Biomasa fúngica rica en proteínas
	Compostaje	Sustrato para las plantas

Fuente: Adaptado de Devesa-Rey et al. (2011) y Oliveira y Duarte (2016).

1.2. Producción biológica de hidrógeno

Uno de los biocombustibles con gran importancia es el hidrógeno molecular (H_2) dado que se trata de un vector energético con alta densidad energética (142 kJ g^{-1}) que se puede emplear de manera directa para producir electricidad y durante su combustión sólo se generan vapor de agua y calor. Para la producción de hidrógeno se han desarrollado varias tecnologías como los procesos fisicoquímicos (electrólisis del agua, reformado de los hidrocarburos con vapor) y biológicos (Buelow et al., 2015; dos Reis et al., 2015; Hallenbeck y Ghosh, 2009; Kisieleska et al., 2015; Kyzas et al., 2016; Levin et al., 2004).

Las ventajas que tienen los procesos biológicos son el bajo consumo de energía y la posibilidad de emplear residuos orgánicos como sustrato bajo condiciones moderadas de reacción, como es presión atmosférica ambiente y temperatura mesofílica. El emplear residuos orgánicos, como las vinazas vitivinícolas, para la producción de hidrógeno tiene un doble beneficio, el tratamiento del agua residual y la generación de energía (Kyzas et al., 2016; Levin et al., 2004; Redwood et al., 2009).

Los diferentes procesos biológicos de producción de hidrógeno requieren condiciones anaerobias de producción y se dividen en dependientes e independientes de la luz, como se aprecia en la Figura 1-2. La biofotólisis directa e indirecta requiere de un periodo de incubación de la biomasa en la oscuridad para activar las enzimas envueltas en el metabolismo del hidrógeno y así inducir la síntesis de hidrógeno, este proceso es sensible a la formación de oxígeno y presenta bajas tasas de producción ($1.8 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con *C. reinhardtii* y $7.95 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con *A. variabilis* PK84). La fotofermentación requiere condiciones de deficiencia de nitrógeno para poder catalizar hidrógeno y es necesario que la biomasa este inmovilizada para alcanzar altas tasas de producción ($40\text{-}50 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con *Rb. spheroides*). La fermentación oscura, por su parte, no requiere periodos de luz-oscuridad permitiendo una producción continua de hidrógeno, además se pueden emplear sustratos no estériles y cultivos mixtos para alcanzar altas tasas de producción (por ejemplo, $184 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con cultivo mixto empleando molasas) (Levin et al., 2004).

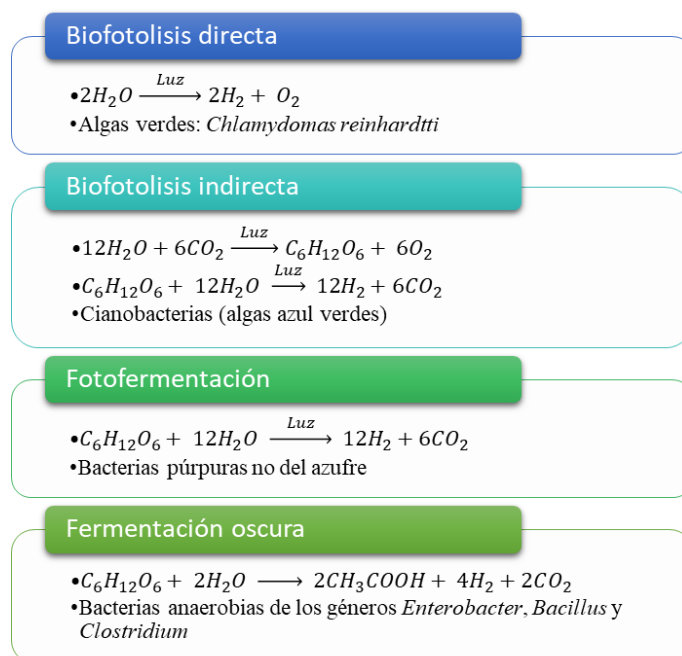


Figura 1-2 Rutas para la producción biológica de hidrógeno

Fuente: Levin et al. (2004).

1.2.1. Fermentación oscura

La fermentación oscura es el proceso biológico más conveniente para la producción de hidrógeno ya que permite obtener las tasas de producción más altas en comparación con otros procesos biológicos, además de que no necesita luz solar, tiene un método de operación sencillo, hay nula quema de hidrocarburos y se realiza una reducción de la descarga de nutrientes al ambiente (Levin et al., 2004; Redwood et al., 2009).

Este proceso implica la cooperación de microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos para lograr una fermentación estable, en primer instancia las bacterias hidrolíticas obtienen moléculas monoméricas a partir de macromoléculas (proteínas, lípidos, polisacáridos), después las bacterias fermentativas consumen estas moléculas para producir ácidos grasos volátiles, alcohol y productos gaseosos (principalmente hidrógeno y dióxido de carbono) (Angenent et al., 2004; Levin et al., 2004; Moletta, 2005; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).

El rendimiento teórico de hidrógeno depende de los metabolitos solubles formados durante la fermentación oscura, el rendimiento más alto (4 mol H_2 mol glucosa⁻¹) se alcanzaría si los únicos metabolitos solubles generados fueran ácido acético o acetona por lo tanto al formarse otro tipo de metabolitos el rendimiento será menor (Levin et al., 2004; Sinha y Pandey, 2011). Los rendimientos que se han obtenido en todos los ensayos de fermentación oscura son menores al máximo teórico, esto se debe a que la composición y degradación del sustrato propicia la diversificación de rutas metabólicas dentro de las cuales se encuentran algunas que no generan o que consumen hidrógeno como se aprecia en la Tabla 1-2 (Ghimire et al., 2015; Levin et al., 2004).

Tabla 1-2 Reacciones generales de la fermentación oscura

Producto generado	Ecuación
Ácido acético	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$
Acetona	$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3COCH_3 + 3CO_2 + 4H_2$
Ácido butírico	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$
Ácido propiónico	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$
Etanol	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$
Ácido Láctico	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$

Fuente: Adaptada de Sinha y Pandey (2011); Ghimire et al. (2015)

El hidrógeno producido en este proceso es un metabolito intermediario que puede ser empleado como donador de electrones por las arqueas metanogénicas y bacterias homoacetogénicas en la digestión anaerobia; ya que la fermentación oscura es parte de la digestión anaerobia es importante tener condiciones operacionales que permitan interrumpir el proceso en la etapa de acidogénesis para tener una producción de hidrógeno (Angenent et al., 2004; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Los factores a tomar en cuenta para interrumpir el proceso incluyen temperatura, pH, tiempo de residencia hidráulico, entre otros; los efectos de estos factores han sido reportados en varios estudios (Hallenbeck y Benemann, 2002; Hallenbeck y Ghosh, 2009; Hernández-Mendoza y Buitrón, 2014; Levin et al., 2004; Sinha y Pandey, 2011).

1.2.2. Tipo y concentración de sustrato

La concentración de carbohidratos tiene una relación directa con la producción de hidrógeno, sin embargo, al sobrepasar la concentración idónea se impacta de manera negativa la producción de hidrógeno, por tal motivo no se recomienda trabajar con altas o bajas concentraciones de carbohidratos (Cavalcante de Amorim et al., 2012; Chu et al., 2013). La relación existente entre la velocidad de crecimiento celular y la velocidad de formación de producto está planteada en el modelo de Luedeking-Piret (Mu et al., 2006).

$$\frac{dP_i}{dt} = \alpha_i \frac{dX}{dt} + \beta_i X$$

Ecuación 1-1 Modelo de Luedeking-Piret

Donde, α_i es el coeficiente de formación de producto i asociado al crecimiento, β_i es el coeficiente de formación de producto i no asociado al crecimiento, P_i es la formación del producto i , X es la concentración de biomasa.

Chu et al., (2013) encontraron una máxima tasa de crecimiento microbiano (0.28 h^{-1}) a una concentración de $40 \text{ g azúcares totales L}^{-1}$, en esta condición los metabolitos generados fueron principalmente ácido butírico (67.1%) y ácido acético (21.1%); los valores inferiores y superiores ($20, 30, 60$ y 100 g L^{-1}) disminuyeron la tasa de crecimiento microbiano y presentaron una mayor diversificación de metabolitos en la fase soluble. Como se aprecia la concentración de carbohidratos influye en la producción de hidrógeno, por tal razón al emplear sustratos complejos como los efluentes agroindustriales, es necesario que estos sean abundantes, de bajo costo y que tengan un alto contenido de carbohidratos, puesto que estos representan la fracción del sustrato que será convertida a hidrógeno (Ghimire et al., 2015).

En la literatura existen trabajos publicados sobre la producción de hidrógeno a partir de efluentes agroindustriales como es el caso de las vinazas tequileras y de caña de azúcar (Arreola-Vargas et al., 2016; Buitrón et al., 2014a, 2014b; Buitrón y Carvajal, 2010; dos Reis et al., 2015; Espinoza-Escalante et al., 2009; Lazaro et al., 2014; Marino-Marmolejo et al., 2015; Nunes Ferraz Júnior et al., 2014); sin embargo, todavía no existen trabajos publicados empleando como sustrato vinazas vitivinícolas.

1.2.3. Relación sustrato-biomasa (S_0/X_0)

Se ha demostrado que la relación S_0/X_0 influye directamente en los patrones de crecimiento celular (anabolismo o catabolismo) dado que el crecimiento puede estar limitado o no por la concentración inicial de sustrato, por tal razón es importante establecer una relación S_0/X_0 adecuada para favorecer la formación de productos (Liu et al., 1998; Moreno-Andrade y Buitrón, 2003). La relación S_0/X_0 se puede calcular considerando la concentración de DQO o de carbohidratos totales del sustrato empleando la ecuación 1-2.

$$S_0/X_0 \left(\frac{g \text{ CT}}{g \text{ SV}} \right) = \frac{CT_s}{ST_i}$$

Ecuación 1-2 Relación sustrato-biomasa

Donde, CT_s es la concentración de carbohidratos totales del sustrato en el medio ($gCT L^{-1}$); ST_i es la concentración de sólidos totales del inóculo en el medio ($gST L^{-1}$).

La relación S_0/X_0 cobra importancia al emplear sustratos complejos o con compuestos inhibitorios dado que la toxicidad de los compuestos se refleja en una reducción de la actividad microbiana y por ende en una reducción en la producción de metabolitos como el hidrógeno (Moreno-Andrade y Buitrón, 2003).

Moreno-Andrade y Buitrón, (2003) probaron diferentes relaciones S_0/X_0 para evaluar la inhibición de la actividad microbiana a diferentes concentraciones de 4-clorofenol en glucosa, en sus ensayos encontraron que la inhibición depende de la concentración del compuesto tóxico, así como de la concentración y tipo de biomasa, concluyendo que la inhibición de la actividad microbiana disminuye conforme la relación S_0/X_0 disminuye, es decir, la concentración de biomasa es la variable más importante para disminuir la inhibición.

1.2.4. Cultivos mixtos como inóculo

El empleo de cultivos mixtos en la fermentación oscura posibilita el empleo de sustratos complejos y no estériles; al emplear este tipo de inóculo se debe tomar en cuenta que en estos consorcios microbianos coexisten microorganismos productores y consumidores de hidrógeno (Hernández-Mendoza y Buitrón, 2014; Saady Cata, 2013; Sinha y Pandey, 2011), por tal razón es importante dar un pretratamiento que conlleve a la selección de los microorganismos, lo cual ayudará a preservar la actividad de los microorganismos productores de hidrógeno y a suprimir la actividad de los microorganismos consumidores de hidrógeno (Hernández-Mendoza y Buitrón, 2014; Saady Cata, 2013; Sinha y Pandey, 2011). Dentro de los métodos que se utilizan para lograr un enriquecimiento de bacterias productoras de hidrógeno en los cultivos mixtos se tienen los siguientes (Bundhoo et al., 2015; Hernández-Mendoza y Buitrón, 2014; Saady Cata, 2013; Sinha y Pandey, 2011):

- ✓ Térmico: el cultivo se somete a una temperatura alta por largo tiempo
- ✓ Choque ácido-alcalino: se crean condiciones de bajo y alto pH en cortos periodos de tiempo
- ✓ Aireación: reduce la actividad de las arqueas metanogénicas por el efecto tóxico que tiene el oxígeno en los microorganismos anaerobios estrictos
- ✓ Radiación: puede ser luz ultravioleta, ultrasonido, infrarrojo y rayos gamma
- ✓ Adición de compuestos químicos inhibitorios: BESA, cloroformo, acetileno
- ✓ Control continuo de crecimiento de las arqueas metanogénicas con las condiciones de operación: crea una presión de selección continua dentro del reactor

1.2.5. Tipo de biomasa y reactores

En varios estudios se emplean reactores de mezcla completa con flujo continuo (CSTR) porque cuenta con un control de la velocidad de agitación que permite mejorar la eficiencia de transferencia de masa, sin embargo, es necesario un sedimentador para recuperar el inóculo y poderlo ingresar de nuevo al reactor (Chu et al., 2013; Lofrano y Meric, 2016). Los sistemas de biomasa suspendida corren el riesgo de un lavado celular al emplearse altas tasas de carga orgánica, además tienen el inconveniente de que la biomasa formada es sensible a las fluctuaciones del medio como es el pH y la temperatura, para no tener el problema de la sensibilidad de la biomasa suspendida se recomienda el empleo de biomasa fija (Mu y Yu, 2006).

Los sistemas de biomasa fija son capaces de tratar aguas residuales con una alta carga orgánica debido a que presentan una alta concentración de biomasa, lo que se refleja en una mayor estabilidad y resistencia a cambios en las condiciones del medio como pH, temperatura, concentración de toxinas o inhibidores, además de que permite la recuperación y reutilización de la biomasa; la inmovilización de la biomasa puede ser por la formación de gránulos, de biopelícula o de biopartículas atrapadas en gel (Show et al., 2008).

Los gránulos son la unión de diferentes microorganismos con forma definida por la adhesión con sustancias poliméricas extracelulares, la estructura inicial sigue creciendo en una estructura compacta siempre y cuando se tengan condiciones favorables para mantenerla, si las fuerzas de corte o cizallamiento dentro del reactor no son las adecuadas se favorece su disgregación (Bhunja y Ghangrekar, 2008; Mu y Yu, 2006). Esta estructura celular ha sido ampliamente utilizada para la producción de hidrógeno en el tratamiento de aguas residuales en los reactores de lodos anaerobios de flujo ascendente (UASB), en este tipo de reactor los gránulos se mantienen en suspensión por la producción de biogás y por el flujo del influente (Moletta, 2005; Show et al., 2008).

1.2.6. Sobresaturación de hidrógeno

En los reactores con lodos granulares se tienen tres fases: la fase sólida que corresponde a los gránulos, la fase líquida que corresponde al medio y la fase gaseosa que corresponde al biogás generado (Nicolella et al., 2000). Una de las limitantes en la producción de hidrógeno es su transferencia de la fase líquida a la fase gaseosa, es decir, la dispersión de las burbujas a través del medio; si la tasa de producción de hidrógeno es mayor al coeficiente de transferencia de masa (K_{La}) se provoca una sobresaturación de hidrógeno disuelto en el medio (Frigon y Guiot, 1995; Pauss et al., 1990; Stewart, 2003; Zhang et al., 2012). En la Figura 1-3 se observa el seguimiento del hidrógeno desde su generación hasta su transferencia a la fase gaseosa.

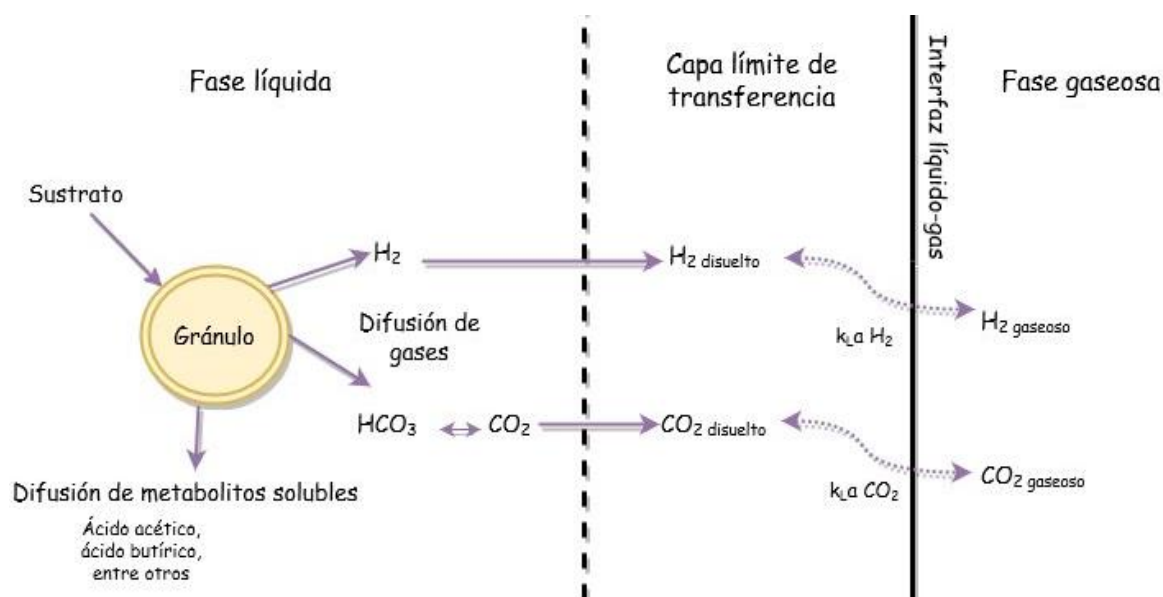


Figura 1-3 Seguimiento de los metabolitos gaseosos desde su generación hasta su transferencia a la fase gaseosa

Fuente: Adaptada de Beckers et al. (2015)

La sobresaturación de hidrógeno provoca un cambio en las rutas metabólicas, viéndose favorecido la producción de metano, ácido acético, ácido propiónico, sulfuro de hidrógeno y amoníaco porque el hidrógeno deja de ser un producto metabólico y se convierte en un nuevo sustrato; esto conlleva a cambios estructurales en la comunidad microbiana (composición y abundancia) (Bakonyi et al., 2017; Zumar Bundhoo y Mohee, 2016).

En la Figura 1-4 se muestran las rutas potenciales para el consumo de hidrógeno durante la fermentación oscura al emplear cultivos mixtos, así como sus productos finales.

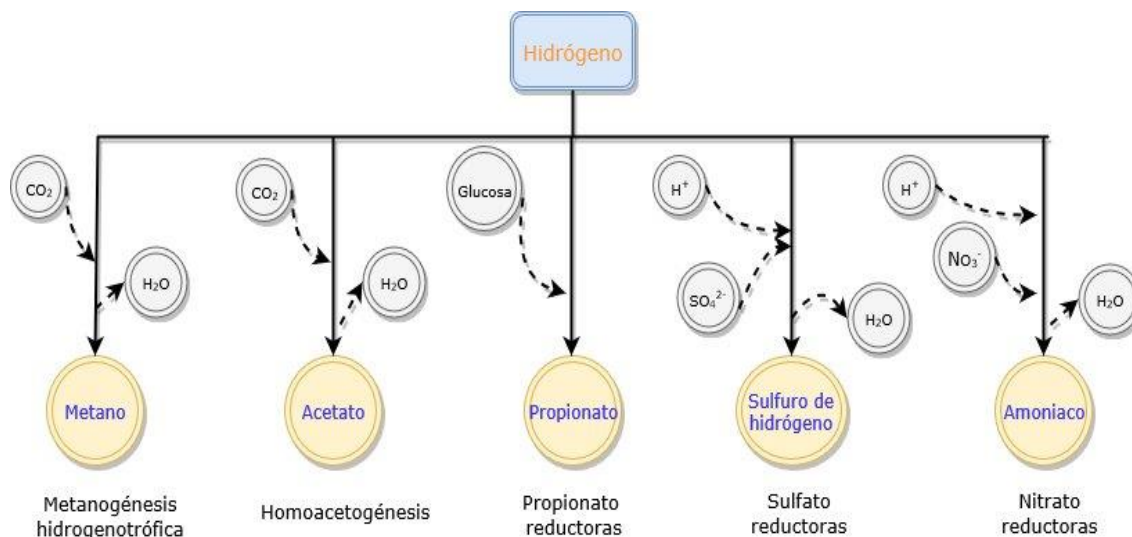


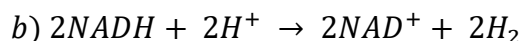
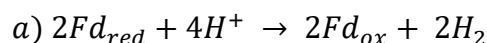
Figura 1-4 Rutas potenciales para el consumo de hidrógeno durante la fermentación oscura al emplear cultivos mixtos

Fuente: Adaptada de Zumar Bundhoo y Mohee (2016)

Se han empleado diferentes estrategias para disminuir la concentración de los gases disueltos en el medio (hidrógeno y dióxido de carbono) en procesos de fermentación oscura para incrementar la producción de hidrógeno, estas estrategias incluyen el burbujeo de gases inertes dentro del medio, la liberación continua de gas, el incremento de la velocidad de agitación, la reducción del espacio de cabeza (aplicación de vacío) y el empleo de membranas inmersas que directamente remueven los gases disueltos (Bakonyi et al., 2017; Frigon y Guiot, 1995; Kisielewska et al., 2015; Kraemer y Bagley, 2006; Liang et al., 2002; Logan et al., 2002; Mandal y Nath, 2006; Mizuno et al., 2000; Zhang et al., 2012; Zumar Bundhoo y Mohee, 2016).

Anteriormente se creía que el incremento en la producción de hidrógeno obtenido al aplicar alguna de las estrategias señaladas se debía a la disminución de la presión parcial de hidrógeno (P_{H_2}) en el espacio de cabeza a valores inferiores de 60 Pa (6×10^{-4} atm), lo que favorece la producción de hidrógeno por medio de la oxidación del NADH y de la ferredoxina

(Fd), pudiéndose obtener de esta manera hasta cuatro moles de hidrógeno por cada mol de glucosa (Angenent et al., 2004), de acuerdo con las siguientes ecuaciones.



Ecuación 1-3 Producción de hidrógeno por medio de la oxidación de Fd (a) y NADH (b) a P_{H_2} menor de 60 Pa

Fuente: Angenent et al. (2004)

Varios investigadores han medido la P_{H_2} en reactores de fermentación oscura bajo las estrategias de burbujeo de gases inertes y aumento de velocidad de agitación, lo que encontraron es que con esas estrategias no se ha podido alcanzar una P_{H_2} menor a 60 Pa, es decir, no se ha logrado producir hidrógeno por la oxidación del NADH; tomando en cuenta lo anterior concluyen que la disminución de la concentración de hidrógeno disuelto evita que la reducción de los protones a hidrógeno se vuelva termodinámicamente desfavorable y así se mantiene una producción de hidrógeno a lo largo del tiempo (Kraemer y Bagley, 2006; Zhang et al., 2012; Zumar Bundhoo y Mohee, 2016).

Por su parte Zhang et al., (2012) evaluaron el efecto de la carga orgánica de glucosa y de la velocidad de agitación sobre la sobresaturación de hidrógeno en un reactor CSTR, encontrando que la sobresaturación tiene una relación directa con la carga orgánica y que existe una velocidad de agitación que ayuda a disminuir al mínimo la concentración de hidrógeno disuelto, las condiciones óptimas encontradas fueron carga orgánica de 38.3 mmol L^{-1} y velocidad de agitación de 450 rpm para obtener un rendimiento de 2 mol H_2 mol glucosa $^{-1}$, una concentración de hidrógeno disuelto de 0.68 mmol L^{-1} y una disminución de la relación de sobresaturación de hidrógeno de 2.8 a 1.8, es importante señalar que aún bajo estas condiciones de operación no se logró suprimir la sobresaturación de hidrógeno, esto se debió a que encontraron que entre menor sea la P_{H_2} mayor es el valor de K_{La} requerido para evitar la sobresaturación de hidrógeno, concluyendo que es difícil evitar la sobresaturación del hidrógeno en los reactores productores de hidrógeno.

En un estudio previo Frigon y Guiot, (1995) evaluaron el impacto de la velocidad de recirculación del biogás producido dentro de un reactor de flujo ascendente con filtro (UASFB) alimentado con sacarosa sobre el valor de K_{La} ; el máximo valor de K_{La} (20.9 h^{-1}) lo obtuvieron con una tasa de recirculación de $85 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, este valor fue 29 veces mayor que el obtenido en el control sin recirculación de biogás (0.7 h^{-1}), con esta velocidad se logró disminuir la concentración del hidrógeno disuelto de 1.097 a $0.653 \text{ } \mu\text{M}$ y la relación de sobresaturación de hidrógeno de 13.6 a 2.5 , el inconveniente que tuvieron fue el corto tiempo de retención de sólidos causado por la velocidad de recirculación, esto puede provocar el lavado celular. Ellos concluyeron que la recirculación de biogás incrementa el área interfaz de las fases líquida y gaseosa del reactor, permitiendo una transferencia de masa más eficiente del hidrógeno.

Tomando en cuenta lo anterior se concluye que al aumentar la velocidad de transferencia de la fase líquida a la fase gaseosa se logra disminuir la concentración de hidrógeno disuelto en el medio, esto favorece la producción continua de hidrógeno porque se mantiene constante la oxidación de Fd, además de que se evita que el hidrógeno producido sea reasimilado por los microorganismos; este aumento de velocidad se puede lograr disminuyendo la carga orgánica de los carbohidratos totales y aumentando la velocidad de agitación en el reactor. Se debe tomar en cuenta que altas velocidades de agitación en reactores con lodos granulares provocan la disgregación de los gránulos por las fuerzas de corte, inhibe la actividad de la biomasa y se reduce su concentración (Sinha y Pandey, 2011; Zhang et al., 2012).

Hipótesis

La recirculación del biogás producido en el reactor UASB favorecerá la transferencia del hidrógeno de la fase líquida a la fase gaseosa, lo cual se verá reflejado en un aumento en la productividad de hidrógeno.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Estrategia experimental

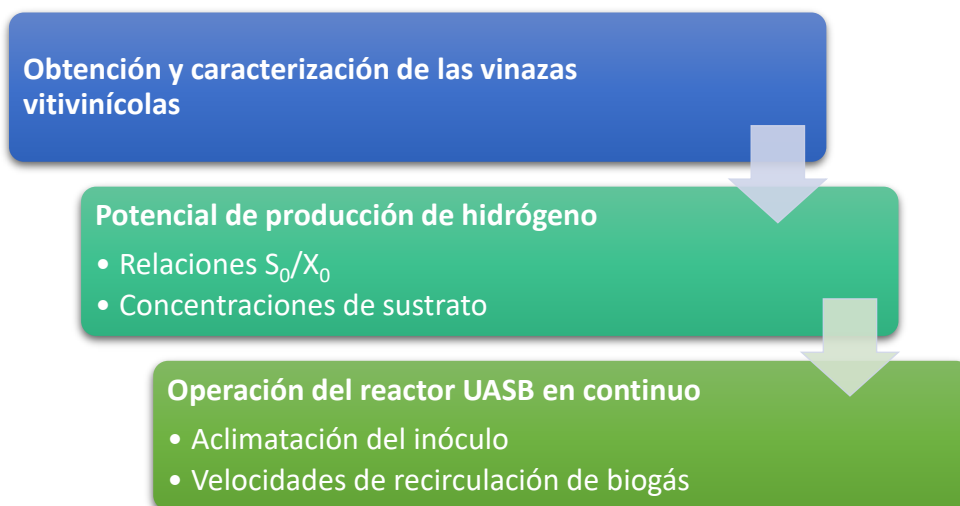


Figura 2-1 Estrategia experimental

El sustrato empleado en toda la experimentación fueron vinazas vitivinícolas de vino blanco provenientes de dos bodegas (Freixenet y La Redonda) del Estado de Querétaro. Para su caracterización se determinó: pH, densidad, demanda química de oxígeno (Métodos Estándar), demanda biológica de oxígeno (Métodos Estándar), sólidos suspendidos totales, volátiles y suspendidos (Métodos Estándar), fenoles, carbohidratos totales (método fenol-ácido sulfúrico), sulfatos (cromatografía de iones) y metales pesados (espectrofotometría de absorción atómica).

El inóculo empleado fue lodo granular anaerobio proveniente de un reactor UASB industrial empleado para tratar el agua residual de la industria cervecera. Para el caso de los ensayos en lote se le dio un pretratamiento térmico (104 °C por 24h) para inhibir la actividad metanogénica, de acuerdo al protocolo de producción específica de hidrógeno de la Red Latinoamericana de BioHidrógeno. Para el caso del reactor en continuo la aclimatación del lodo granular se describe en la sección 2.4.

Las condiciones de los ensayos en lote con que se obtuvieron los mejores resultados para la producción de hidrógeno se emplearon para operar el reactor UASB en continuo.

2.2. Potencial de producción de hidrógeno

2.2.1. Relación sustrato-biomasa (S_0/X_0)

La prueba se llevó a cabo por triplicado en botellas serológicas con un volumen de 120 mL y un volumen de trabajo de 80 mL; a cada botella se le agregó una de las concentraciones de vinazas vitivinícolas (4, 10, 25, 35 y 50 gDQO L⁻¹), 12.5 gST L⁻¹ de inóculo pretratado térmicamente, así como la solución amortiguadora de fosfatos con medio mineral como lo recomienda Mizuno et al., (2000). Las relaciones S_0/X_0 (gCT gST⁻¹) evaluadas fueron: 0.04, 0.14, 0.29, 0.45 y 0.59. El control positivo se realizó con glucosa (5 g L⁻¹), también se determinó la producción endógena del inóculo y del sustrato, en los cuales sólo se agregó inóculo (12.5 gST L⁻¹) o vinazas (10 gDQO L⁻¹) y solución amortiguadora de fosfatos con medio mineral a cada botella.

El pH inicial se ajustó a 6 con una solución 5N de NaOH, el espacio de cabeza fue purgado por un minuto con nitrógeno para asegurar condiciones anaerobias dentro de cada botella, la incubación se realizó en una incubadora WiseCube, Daihan Scientific Co., Korea a 36 °C con agitación orbital a 150 rpm hasta que la producción de biogás se detuvo.

La producción de biogás se determinó dos veces al día con el método de desplazamiento de líquido; la composición de biogás, demanda química de oxígeno, carbohidratos totales y ácidos grasos volátiles se determinaron con las técnicas del apartado 2.6. El análisis cinético se basó en la producción acumulada de hidrógeno y se empleó la ecuación modificada de Gompertz (Ecuación 2-1) (Buitrón y Carvajal, 2010; Moreno-Andrade et al., 2015).

$$H(t) = H_{max} * \left[-\exp\left(\frac{2.71828 * R_{max}(\lambda - t)}{H_{max}} + 1\right) \right]$$

Ecuación 2-1 Ecuación modificada de Gompertz

Donde, $H(t)$ es la cantidad total de hidrógeno (mL) producido en el tiempo t (h), H_{max} es la máxima cantidad de hidrógeno producido (mL), R_{max} es la máxima tasa de producción de hidrógeno (mL h⁻¹), λ es el tiempo de latencia (h).

2.2.2. Concentración de sustrato

El ensayo se basó en el protocolo de producción específica de hidrógeno de la Red Latinoamericana de BioHidrógeno y se llevó a cabo por triplicado en el equipo AMPTS II, Bioprocess Control, Lund, Suecia equipado con una trampa de sosa (NaOH 3N) para capturar el dióxido de carbono producido. Se emplearon botellas Schott con volumen total de 500 mL y un volumen de trabajo de 360 mL, a cada botella se le agregó 22.6 mL de medio mineral con nutrientes y MES, una de las concentraciones de vinazas vitivinícolas (1.07, 2.15, 3.22, 4.30 y 5.04 gCT L⁻¹) y una de las concentraciones de inóculo pretratado térmicamente a 104 °C por 24 h (5.37, 10.75, 16.12, 21.50 y 25.18 gST L⁻¹). Con estas concentraciones iniciales se logró mantener constante la relación S_0/X_0 (gCT gST⁻¹) en 0.2. El control positivo se realizó con glucosa (5 g L⁻¹) a dos relaciones S_0/X_0 (g gST⁻¹) 0.2 y 2.7, también se determinó la producción endógena del inóculo y del sustrato, en los cuales sólo se agregó inóculo (8.7 gST L⁻¹) o vinazas (2.15 gCT L⁻¹) y medio mineral con nutrientes y MES en cada botella.

El pH inicial se ajustó a 6 con una solución 8N de NaOH, el espacio de cabeza fue purgado por un minuto con nitrógeno para asegurar condiciones anaerobias dentro de cada botella, la incubación se realizó a 37 °C con agitación a 120 rpm durante un minuto por cada tres minutos de descanso del motor hasta que la producción de biogás se detuvo.

La producción de hidrógeno se determinó de manera continua en el equipo; la composición de biogás, la demanda química de oxígeno, los carbohidratos totales y los ácidos grasos volátiles y solventes se determinaron con las técnicas señaladas en el apartado de Técnicas analíticas. Los cálculos del análisis cinético se basaron en la producción acumulada de hidrógeno, se empleó la ecuación modificada de Gompertz (Ecuación 2-1) (Buitrón y Carvajal, 2010; Moreno-Andrade et al., 2015) para el análisis de datos.

2.3. Reactor UASB

La configuración del reactor UASB empleada para la aclimatación de la biomasa granular y para la evaluación del efecto de la recirculación de biogás se muestra en las figuras 2-2 y 2-3. El reactor diseñado se construyó con vidrio, teniendo un volumen nominal de 1.5 L y un volumen de trabajo de 1.4 L, altura de 55 cm, diámetro interno de 8.25 cm y un fondo cónico para promover una distribución uniforme del medio y de las biopartículas, en la parte alta cuenta con un estrangulamiento para dirigir el biogás al separador de tres fases de vidrio.

El reactor se equipó con dos bombas peristálticas (Masterflex, Easy-Load) para la alimentación proveniente de un tanque de alimentación y la recirculación del medio o del biogás, el flujo de recirculación se tomó dos cm por debajo de la superficie del líquido o dos cm por encima de la superficie del líquido; el flujo de alimentación, el flujo de recirculación y el flujo de álcali se unen en la manguera que se encuentra al fondo del reactor; adicionalmente se instaló una bomba peristáltica (Masterflex, Easy-Load) para la dosificación de hidróxido de sodio (1N NaOH) en función del controlador del pH (EUTECH Instruments, serie 140), el pH se midió con un electrodo combinado (Sensorex, BNC), la cuantificación de biogás se realizó en línea con el empleo de un medidor de flujo (Ritter tipo MGC-1 V3.2 PMMA), la temperatura se reguló con la recirculación de agua caliente ubicada en un baño de agua.

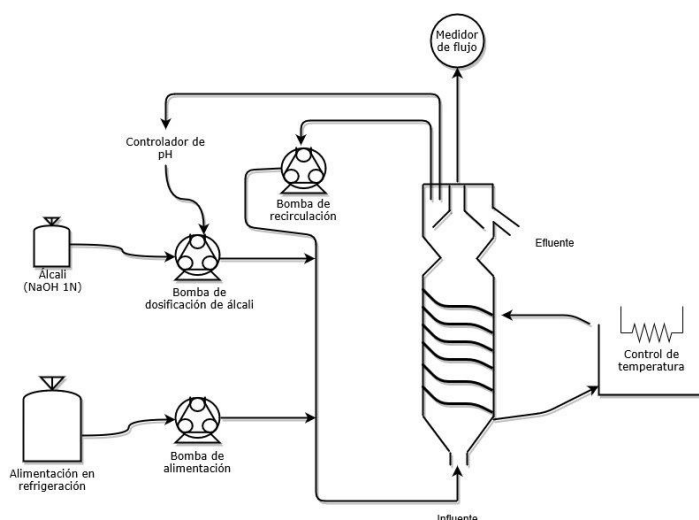


Figura 2-2 Esquema de la configuración del reactor UASB empleado

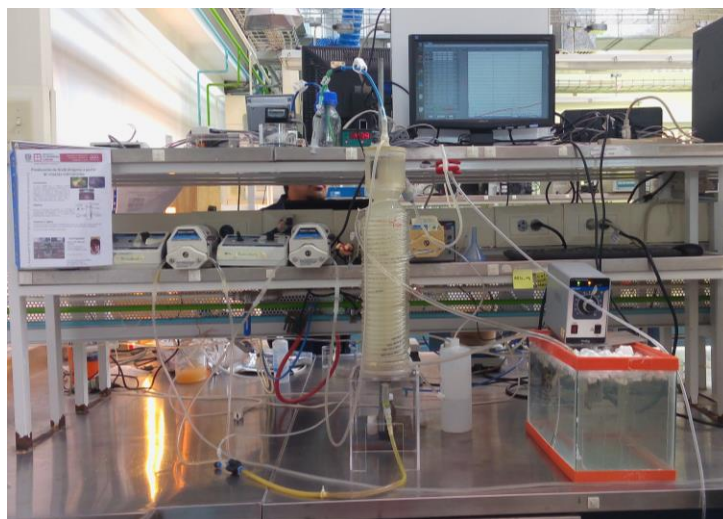


Figura 2-3 Fotografía de la configuración del reactor UASB empleado

2.4. Aclimatación de inóculo

La aclimatación del inóculo se realizó en modo continuo en un reactor UASB, para lograrlo se utilizó la metodología descrita por Hernández-Mendoza y Buitrón (2014). Durante esta etapa se empleó la configuración del reactor UASB descrita anteriormente; las concentraciones de vinazas vitivinícolas empleadas fueron 35 y 50 gDQO L⁻¹, la concentración del inóculo fue de 7.3 gSV L⁻¹; las condiciones operacionales empleadas fueron pH de 4.5 ± 0.2 , temperatura de 37 ± 1 °C, TRH de 5.5 h, cargas orgánicas de 153 y 219 gDQO L⁻¹ d⁻¹, flujo de alimentación 7.6 mL min⁻¹, flujo de recirculación del efluente de 171 mL min⁻¹ para obtener una velocidad ascensional de líquido de 2 m h⁻¹.

La aclimatación del inóculo se consideró finalizada cuando se obtuvieron productividades de hidrógeno similares (coeficiente de variación menor a 10 %) en la concentración de 50 gDQO L⁻¹ durante al menos cinco ciclos, lo que se consideró como estabilidad en el proceso; la composición de biogás, la producción de biogás, la demanda química de oxígeno, los sólidos suspendidos totales y volátiles, los carbohidratos totales y los ácidos grasos volátiles y solventes se determinaron con las técnicas señaladas en el apartado de Técnicas analíticas.

2.5. Evaluación de la velocidad superficial del gas

Una vez que se consiguió tener un lodo granular anaerobio productor de hidrógeno se operó el reactor con una concentración de vinazas vitivinícolas de 50 gDQO L⁻¹ con recirculación de líquido a una velocidad ascensional de 0.5 m h⁻¹, una vez que se obtuvieron productividades de hidrógeno estables se procedió a operar el reactor con tres velocidades de recirculación de biogás (36, 66 y 106 mL min⁻¹). Durante esta etapa se empleó la configuración del reactor UASB descrita anteriormente, la concentración del inóculo fue de 7.3 gSV L⁻¹; las condiciones operacionales empleadas fueron pH de 5.3 ± 0.1, temperatura de 37 ± 1 °C, TRH de 5.5 h, carga orgánica de 218 gDQO L⁻¹ d⁻¹, flujo de alimentación 7.6 mL min⁻¹.

El reactor se operó con cada velocidad de recirculación de biogás hasta alcanzar productividades de hidrógeno similares (coeficiente de variación menor a 10 %) durante al menos cinco ciclos; la composición de biogás, la producción de biogás, la demanda química de oxígeno, los sólidos suspendidos totales y volátiles, los carbohidratos totales y los ácidos grasos volátiles y solventes se determinaron con las técnicas señaladas en el apartado de Técnicas analíticas.



2.6. Técnicas analíticas

Los ácidos grasos volátiles (AGV) y solventes se determinaron empleando un cromatógrafo de gases (7890 B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna Zebron ZB-FFAP de 15 m de longitud ($530\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$), el gas acarreador fue nitrógeno a una velocidad de $2.5\ \text{mL min}^{-1}$, las temperaturas del inyector y detector se mantuvieron en $190\ ^\circ\text{C}$ y $210\ ^\circ\text{C}$, respectivamente. La temperatura de la columna se mantuvo a $60\ ^\circ\text{C}$, se incrementó hasta $90\ ^\circ\text{C}$ a una velocidad de $15\ ^\circ\text{C min}^{-1}$, se tuvo un segundo incremento hasta $170\ ^\circ\text{C}$ a una velocidad de $25\ ^\circ\text{C min}^{-1}$, esta temperatura se mantuvo durante cuatro minutos. Las muestras a analizar se acidificaron a un pH menor a dos con ácido sulfúrico, se centrifugaron por 10 minutos a 3500 rpm, se filtraron con filtros de nitrocelulosa de $0.45\ \mu\text{m}$ y se almacenaron a $4\ ^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

Los carbohidratos totales se determinaron siguiendo el método de fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956) utilizando glucosa como estándar.

La composición de biogás (hidrógeno, metano y dióxido de carbono) se analizó con un cromatógrafo de gases (8610C, SRI Instruments, Torrance, CA, USA) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas empacadas (ambas de 6 pies x 1/8 pulgada, una de silica gel y la otra de tamiz molecular 13x), el gas acarreador fue nitrógeno a una velocidad de $20\ \text{mL min}^{-1}$, las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron en $90\ ^\circ\text{C}$ y $150\ ^\circ\text{C}$, respectivamente. La temperatura de la columna se mantuvo a $40\ ^\circ\text{C}$ durante cuatro minutos y se incrementó hasta $110\ ^\circ\text{C}$ a una velocidad de $20\ ^\circ\text{C min}^{-1}$, esta temperatura se mantuvo durante 1.5 minutos. Para realizar el análisis se tomó una muestra de 5 mL de las botellas o del reactor con ayuda de una jeringa, succionando y desplazando el biogás tres veces, para asegurar la homogeneidad.

La cuantificación de biogás se midió utilizando un medidor de flujo Ritter tipo MGC-1 V3.2 PMMA el cual es un contador de gas diseñado para medir bajos caudales de gas, el flujo mínimo requerido es de $1\ \text{mL h}^{-1}$ y el flujo máximo es de $1\ \text{l h}^{-1}$, con una resolución de 3 mL y una precisión de $\pm 3\%$. Este equipo funciona con la medición discreta de volúmenes, los cuales son medidos a partir del balanceo de una campana de volumen

conocido que se encuentra sumergida, cada vez que se llena la campana, deja escapar el gas y la medida es registrada por medio de imanes que envían la señal.

La demanda química de oxígeno (DQO) se midió empleando un método colorimétrico a reflujo cerrado utilizando tubos Hach con una solución estándar (dicromato de potasio, ácido sulfúrico, sulfato de mercurio y sulfato de plata) para determinar la DQO en un rango de 20 a 1500 mgDQO L⁻¹, la determinación del valor de la DQO se realizó en un espectrofotómetro portátil (Hach DR/2010) de acuerdo a lo indicado en los métodos estándar (APHA et al., 1999).

El lactato se determinó empleando un cromatógrafo de iones (Dionex ICS-1500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipado con una columna REIC IonPac AS23 250x4 mm, el eluyente consistió en una mezcla de bicarbonato de sodio (0.8 mM NaHCO₃) y carbonato de sodio (4.5 mM Na₂CO₃), se empleó un flujo isocrático de 3 mL min⁻¹ a 30 °C y se utilizó una corriente supresora de aniones de 25 mA. Las muestras a analizar se acidificaron a un pH menor a dos con ácido sulfúrico, se centrifugaron por 10 minutos a 3500 rpm, se filtraron con filtros de nitrocelulosa de 0.45 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Los sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos se determinaron por gravimetría de acuerdo al procedimiento descrito en los Métodos Estándar (APHA et al., 1999).

Capítulo 3. Potencial de producción de hidrógeno

3.1. Caracterización de las vinazas vitivinícolas

Las vinazas vitivinícolas de vino blanco se recolectaron de dos bodegas del estado de Querétaro (Freixenet y La Redonda) durante el periodo de post-cosecha, se realizó su caracterización y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3-1. La concentración de carbohidratos totales representa el 14% de la DQO total, porcentajes similares se han reportado en las vinazas tequileras que han sido empleadas en la fermentación oscura (Buitrón et al., 2014b). Respecto a compuestos inhibitorios que han sido ampliamente reportados se detectaron fenoles, sulfatos y metales pesados; sin embargo, estos se encuentran en concentraciones por debajo de lo reportado para causar toxicidad en los microorganismos (Tai et al., 2010; Zumar Bundhoo y Mohee, 2016). Otro compuesto que disminuye la formación y crecimiento celular, así como la producción de hidrógeno es el etanol (Tang et al., 2012; Zumar Bundhoo y Mohee, 2016); dado que las vinazas son un efluente de la fermentación alcohólica de la uva se espera una alta concentración de etanol, en este caso su concentración representa el 46% de la DQO total.

La relación DBO_5/DQO que se obtuvo fue de 0.22 lo que indica que se trata de un agua residual de difícil biodegradación, el valor obtenido es cercano al 0.30 que obtuvieron Bustamante et al., (2005) con el promedio de las vinazas vitivinícolas analizadas; una explicación que se tiene para este valor es la alta concentración de sólidos y la alta concentración de etanol, estos factores pueden limitar el consumo del sustrato.

La cantidad de sólidos presentes en las vinazas vitivinícolas resultaría inadecuada para la producción de hidrógeno si se quisieran utilizar tal cual, pues podría existir una limitación de la transferencia de masa del sustrato a los microorganismos (Ramos et al., 2012), así que se procedió a estandarizar una técnica para obtener vinazas vitivinícolas con una menor cantidad de sólidos. De esta forma, se procedió a centrifugar las vinazas vitivinícolas por 10 minutos a 4,500 rpm, con este procedimiento se obtuvo un sobrenadante con un máximo de 500 mgST L⁻¹.



Tabla 3-1 Caracterización de las vinazas vitivinícolas de vino blanco

Parámetro	Unidades	Valor	D.E.
pH	-	3.53	0.01
Sólidos totales	mg L ⁻¹	57,500	283
Sólidos volátiles	mg L ⁻¹	51,135	163
Sólidos fijos	mg L ⁻¹	6,365	445
Sólidos suspendidos totales	mg L ⁻¹	34,922	120
Sólidos suspendidos volátiles	mg L ⁻¹	32,698	262
Sólidos suspendidos fijos	mg L ⁻¹	2,223	141
DBO ₅ total	mg L ⁻¹	55,556	1,388
DQO total	mg L ⁻¹	252,400	9,051
DBO ₅ /DQO		0.22	
Carbohidratos totales	mg L ⁻¹	32,920	863
Fenoles solubles	mg L ⁻¹	197	15
Carbono soluble total	mg L ⁻¹	49,625	219
Nitrógeno soluble total	mg L ⁻¹	496	37
Fósforo soluble total	mg L ⁻¹	287	6
Densidad	kg m ⁻³	1,013	1
Etanol	mg L ⁻¹	55917	351
Sulfatos	mg L ⁻¹	175	2
Cloruros	mg L ⁻¹	101	0
Fosfatos	mg L ⁻¹	359	1
Hierro	µg L ⁻¹	180	
Níquel	µg L ⁻¹	130	
Cobre	µg L ⁻¹	48	
Zinc	µg L ⁻¹	737	
Cobalto	µg L ⁻¹	6	
Cadmio	µg L ⁻¹	ND	
Cromo	µg L ⁻¹	ND	
Plomo	µg L ⁻¹	ND	

ND: No detectado; D.E.: Desviación Estándar

3.2. Determinación de la relación S_0/X_0 idónea para producción de hidrógeno

La finalidad de este ensayo fue conocer la relación S_0/X_0 que convierta la mayor parte de los carbohidratos totales del sustrato a metabolitos gaseosos, para así obtener la mayor cantidad posible de hidrógeno y la obtención de un efluente rico en ácidos grasos que pueda emplearse en una segunda etapa de producción de energía.

El cálculo de la relación S_0/X_0 se hizo con base en los carbohidratos totales (CT) de las vinazas, para obtener las diferentes relaciones S_0/X_0 se mantuvo constante la concentración inicial de inóculo (12.5 gST L^{-1}) y se varió la concentración inicial de sustrato ($0.8, 2.0, 5.0, 7.0$ y 10.0 gCT L^{-1}). La variación en el sustrato se realizó por dilución.

En la Figura 3-1 se muestra la producción acumulada de hidrógeno (símbolos) y el ajuste con la ecuación modificada de Gompertz (líneas punteadas) para cada concentración de sustrato evaluada y en la Tabla 3-2 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos para cada condición.

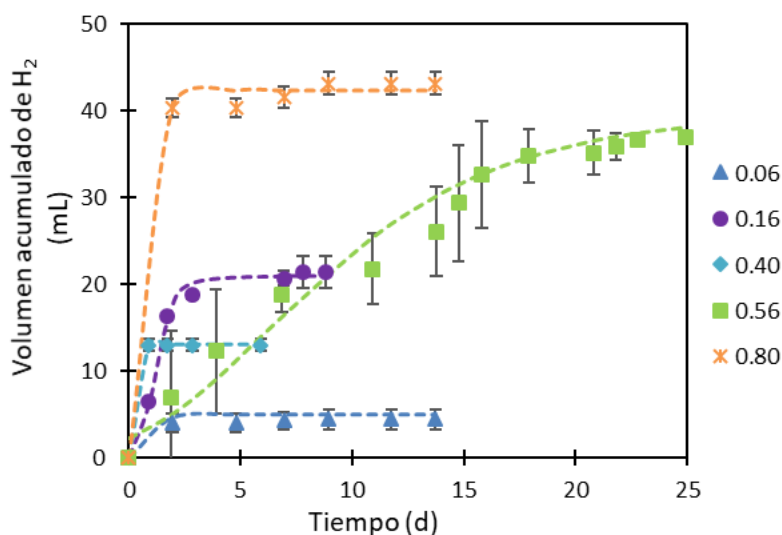


Figura 3-1 Producción acumulada de hidrógeno y ajuste con la ecuación modificada de Gompertz para cada relación sustrato-biomasa

Como se aprecia en todas las condiciones evaluadas la fase de latencia (λ) es menor a un día, esto nos indica que el inóculo se aclimató de una forma rápida a consumir las vinazas vitivinícolas, de acuerdo con los valores obtenidos de máxima producción de hidrógeno (H_{\max}) el incremento en la concentración de carbohidratos favorece la producción de hidrógeno.

Tabla 3-2 Parámetros cinéticos ajustados con la ecuación modificada de Gompertz

Concentración sustrato			S_0/X_0 (gCT gST ⁻¹)	H_{\max} (mL)		R_{\max} (mL d ⁻¹)		λ (d)	
%	gDQO L ⁻¹	gCT L ⁻¹		\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE
1.70	4.00	0.80	0.06	4.99	0.55	4.31	0.44	0.39	0.00
3.97	10.00	2.00	0.16	20.90	1.38	13.57	1.25	0.44	0.06
14.22	25.00	5.00	0.40	13.03	0.72	59.02	17.19	0.24	0.15
19.91	35.00	7.00	0.56	39.72	3.12	2.50	0.78	0.35	0.49
28.44	50.00	10.00	0.80	42.28	1.11	40.69	2.67	0.39	0.01

\bar{x} : promedio, DE: Desviación Estándar

Como se aprecia la producción acumulada de hidrógeno (H_{\max}) tiene una relación directa con la concentración inicial de carbohidratos totales, sin embargo, esto no se cumple con la máxima tasa de producción de hidrógeno (R_{\max}) y esto puede deberse a la relación S_0/X_0 , como se observa la relación de 0.56 presenta la menor R_{\max} , lo que nos indica que los microorganismos se pudieron ver afectados por la concentración de inhibidores en el sustrato (Liu et al., 1998; Moreno-Andrade y Buitrón, 2003).

En la Figura 3-2 se presenta la productividad y los rendimientos de hidrógeno obtenidos para cada relación S_0/X_0 evaluada, los rendimientos se calcularon con base a la DQO y carbohidratos totales alimentados.

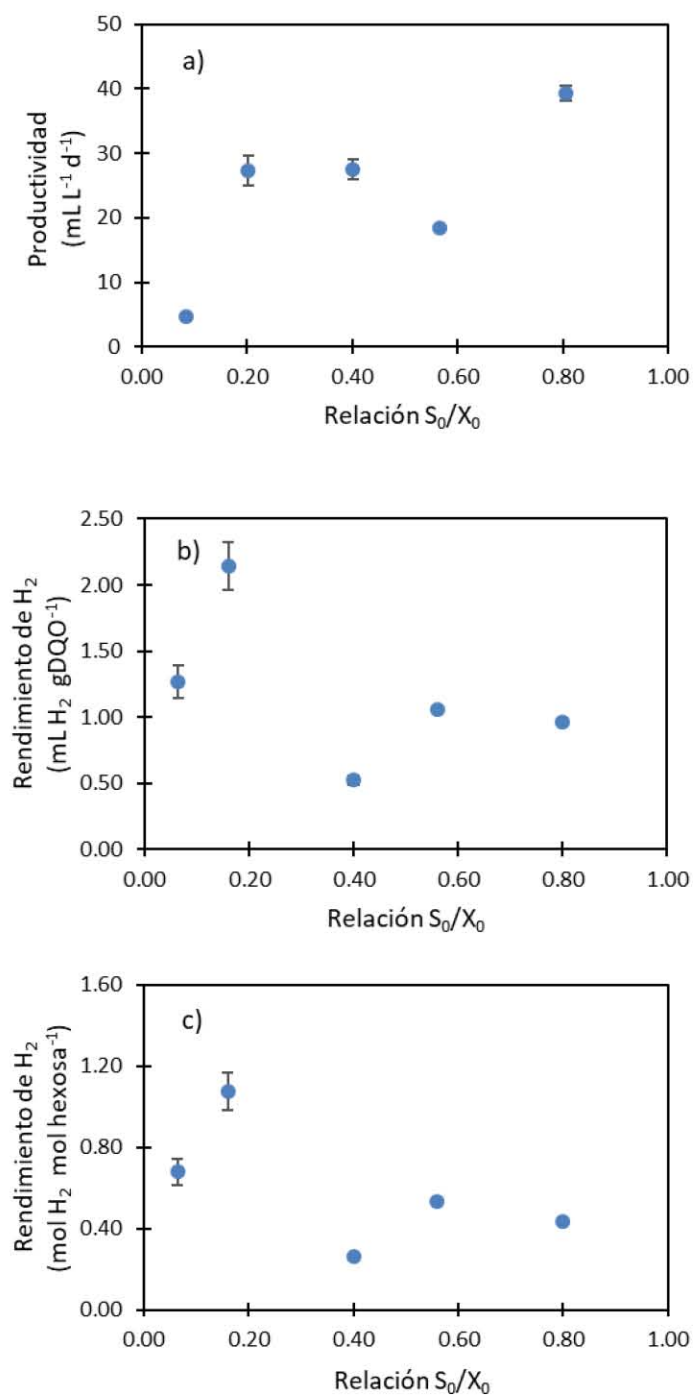


Figura 3-2 Productividad (a) y rendimientos (b, c) obtenidos en cada relación S_0/X_0

Se realizó esta comparación para determinar el efecto de la relación S_0/X_0 sobre la producción de hidrógeno, lo que se puede apreciar en primera instancia es que las relaciones bajas de S_0/X_0 favorecen el empleo de los carbohidratos disponibles para la producción de hidrógeno; esto nos indica que al ser un sustrato con alto contenido de polisacáridos requiere una alta concentración inicial de inóculo para poder llevar a cabo de manera eficiente la hidrólisis de estos y así generar los monosacáridos que son empleados por las bacterias fermentativas para la producción de hidrógeno (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).

El máximo rendimiento molar se obtuvo con la relación S_0/X_0 de 0.16 ($1.08 \text{ mol mol}_{\text{hexosa}}^{-1}$), siendo similar al reportado para vinazas tequileras ($1.3 \text{ mol H}_2 \text{ mol}_{\text{hexosa}}^{-1}$) (Buitrón et al., 2014b) y cercano a la mitad del obtenido con glucosa ($2.5, 2.67, 2.9 \text{ mol H}_2 \text{ mol}_{\text{hexosa}}^{-1}$) (Laurent et al., 2012).

En la Figura 3-3 se presentan los ácidos grasos volátiles generados por gramo de DQO alimentada en cada relación S_0/X_0 , esta gráfica nos indica qué porcentaje de la DQO alimentada es transformada a metabolitos solubles, se aprecia que las relaciones con mayor conversión de DQO son las de 0.06 y 0.16, además en la relación de 0.16 se obtuvo la mayor concentración de propionato lo que nos indica que se presentó el consumo de hidrógeno y por ende una disminución en la producción de hidrógeno (Zumar Bundhoo y Mohee, 2016).

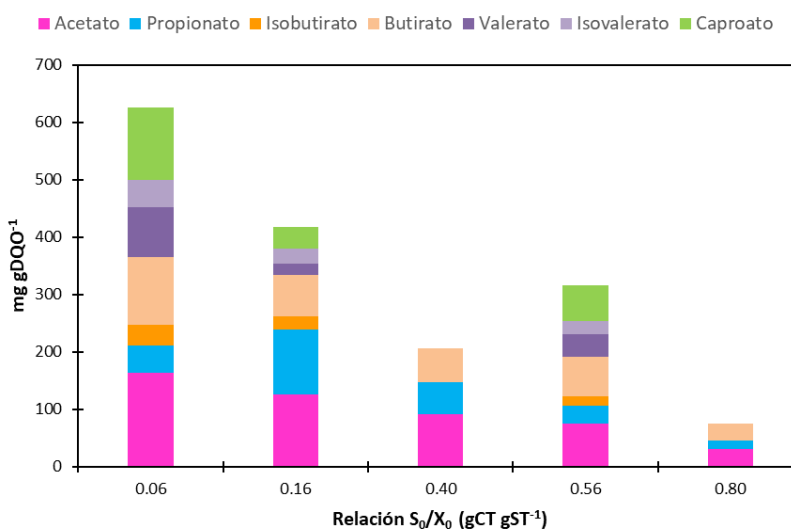
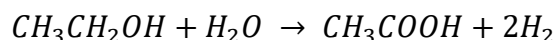


Figura 3-3 Ácidos grasos volátiles generados en cada relación S_0/X_0

Para obtener el mayor rendimiento de hidrógeno se busca que predomine la producción de ácido acético y butírico (Hallenbeck y Benemann, 2002; Levin et al., 2004) en los metabolitos solubles; en todas las concentraciones estudiadas la combinación de estos ácidos se encuentra entre un 48% y un 82% del total, por lo tanto, se puede decir que la producción de hidrógeno se realizó por las vías con que se obtienen los máximos teóricos.

Lo anterior contrasta con los rendimientos obtenidos, una explicación es que las bacterias acetogénicas hayan ocupado el etanol para la producción de acetato e hidrógeno (Refai et al., 2014) como se aprecia en la ecuación 3-1, por tal razón a pesar de tener acetato y butirato el rendimiento máximo teórico sería de 2 moles de hidrógeno por mol de glucosa, esto se refuerza con el hecho de que en todas las condiciones se presentó un consumo de etanol mayor al 40% como se observa en la Figura 3-4.



Ecuación 3-1 Producción de acetato a partir de etanol

Fuente: Refai et al. (2014)

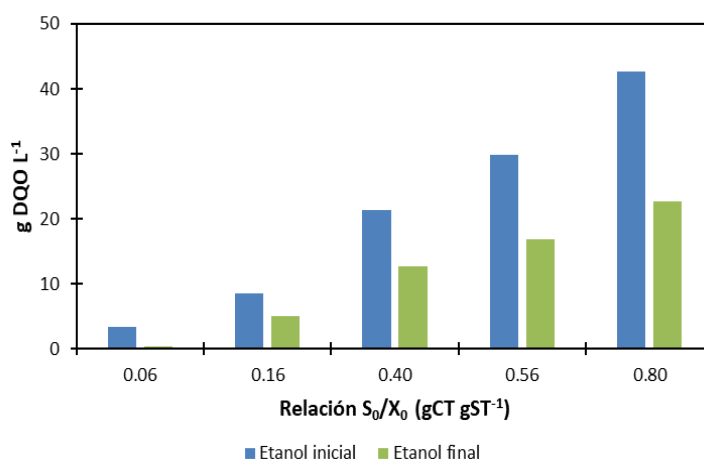


Figura 3-4 Concentración inicial y final de etanol en cada relación S_0/X_0

Tomando en cuenta todos los resultados obtenidos, se eligió como relación S_0/X_0 idónea la de 0.16, dado que es con la que se obtienen los rendimientos más altos, una tasa de producción alta y una conversión de sustrato alta.

3.3. Determinación de la concentración de sustrato idónea para producción de hidrógeno

Una vez que se determinó el efecto de la relación S_0/X_0 sobre la producción de hidrógeno se procedió a evaluar el efecto de la concentración de sustrato, para lo cual se empleó una relación S_0/X_0 constante de 0.2, por fines prácticos se redondeó la relación de 0.16; las condiciones evaluadas se muestran en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3 Concentraciones de sustrato evaluadas

Porcentaje vinazas	DQO	CT	Concentración inóculo
(%)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(gST L ⁻¹)
94	194.38	5.04	25.18
80	165.92	4.30	21.50
60	124.44	3.22	16.12
40	82.96	2.15	10.75
20	41.48	1.07	5.37

En la Figura 3-5 se muestra la producción acumulada de hidrógeno (símbolos) y el ajuste con la ecuación modificada de Gompertz (líneas punteadas) para los dos porcentajes de sustrato en los que se tuvo producción de hidrógeno; la máxima producción de hidrógeno (H_{max}) y máxima tasa de producción de hidrógeno (R_{max}) se obtuvieron con un porcentaje de vinazas de 20 % con valores de 115 mL H₂ y 6 mL H₂ h⁻¹, respectivamente.

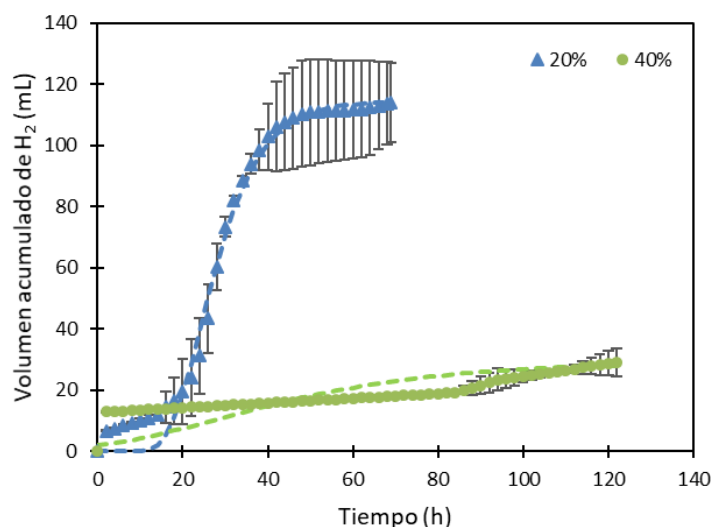


Figura 3-5 Producción acumulada de hidrógeno y ajuste con la ecuación modificada de Gompertz para los porcentajes de sustrato en los que se tuvo producción de hidrógeno

En la Figura 3-6 se muestran el volumen acumulado, la productividad, los rendimientos por gramo de DQO y carbohidratos totales alimentado y las remociones de DQO y carbohidratos totales obtenidas para cada concentración de sustrato evaluada, como se aprecia la producción de hidrógeno cae con un porcentaje de vinazas mayor al 40%, esto se atribuye a la concentración de etanol, puesto que se ha reportado que la adición de etanol en una concentración de 200 mmol L⁻¹ a un cultivo puro causa una disminución en la productividad de la biomasa del 16.2%, disminuye la eficiencia de degradación de glucosa en un 32% y causa un cambio en las rutas metabólicas (Tang et al., 2012; Zumar Bundhoo y Mohee, 2016).

Los mejores resultados se obtuvieron con un porcentaje de vinazas de 20%, es decir, con una dilución de 1 a 5 de las vinazas; la productividad obtenida con esta condición fue de $110 \pm 13 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, los rendimientos obtenidos fueron de $3 \pm 0.3 \text{ mL H}_2 \text{ gDQO}^{-1}$ y de $0.86 \pm 0.10 \text{ mol H}_2 \text{ mol}_{\text{hexosa}}^{-1}$, en comparación con los resultados obtenidos con una concentración de 4% y una relación S_0/X_0 de 0.16 son superiores en los primeros dos rubros y el rendimiento molar es similar.

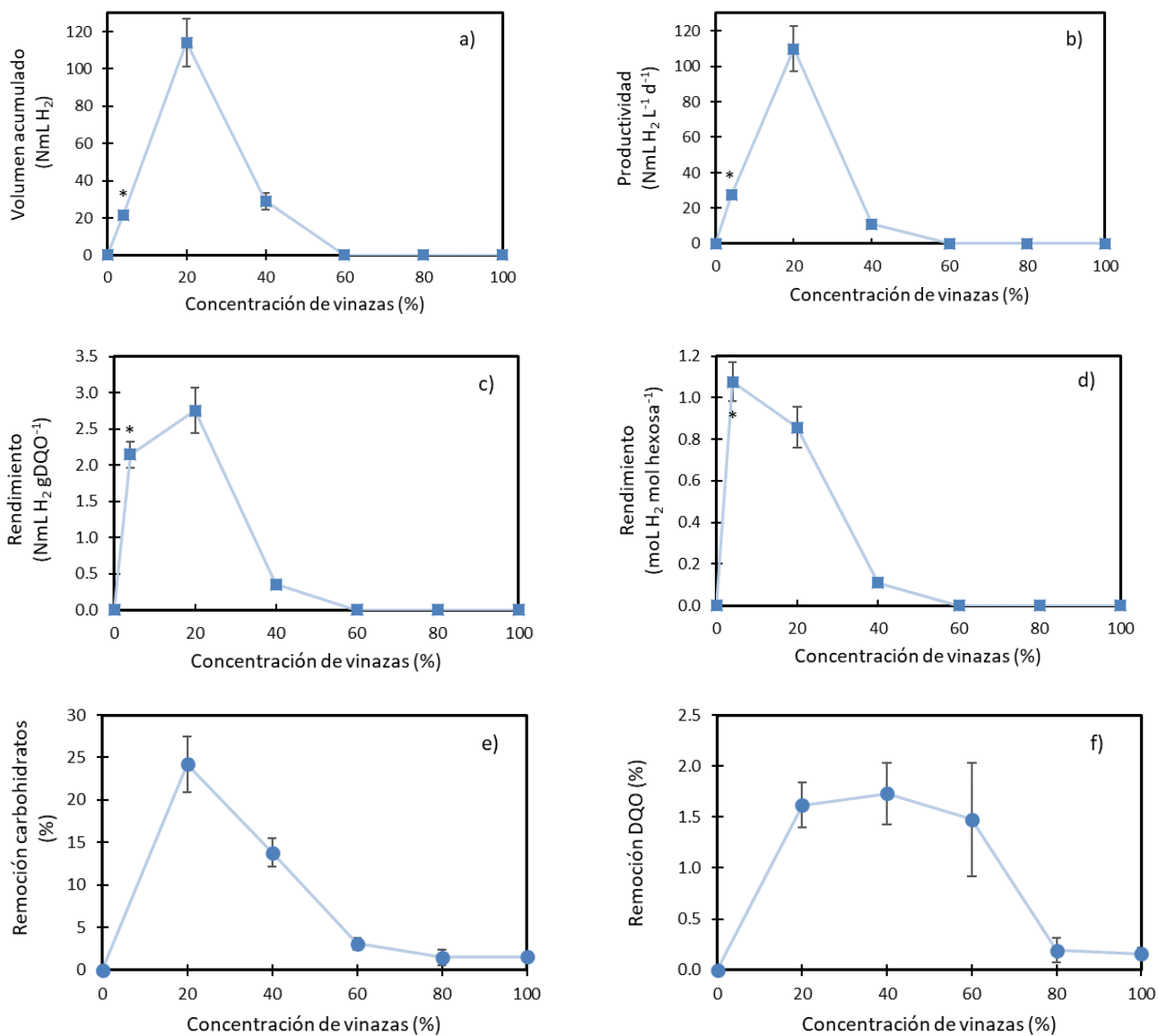


Figura 3-6 Volumen acumulado (a), productividad (b), rendimientos (c, d) y remociones (e, f) obtenidas en cada concentración de sustrato evaluada

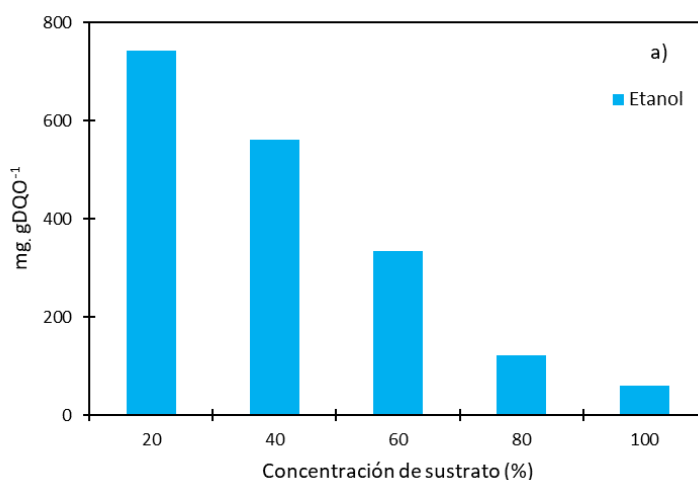
*: Concentración de 3.97% y relación S_0/X_0 de 0.16, evaluada en el experimento anterior

El lote de vinazas sin diluir empleado para este experimento tuvo una concentración de etanol de 116.70 gDQO L⁻¹ y equivale al 56 % de la DQO soluble, esta concentración es superior a los 19.23 gDQO L⁻¹ reportados por Tang et al., (2012) como concentración inhibitoria para un cultivo puro de *Ethanoligenens harabinese* B49. Tomando en cuenta lo anterior se sugiere que es necesario hacer una dilución de las vinazas vitivinícolas mayores

al 40% para evitar que se presente la inhibición del inóculo por concentración de etanol, esto se rectifica al tomar en cuenta que los mejores resultados se obtuvieron a una concentración inicial de etanol de 23.34 gDQO L⁻¹ (20 % de vinazas) y que la remoción de carbohidratos cae más del 90% en las concentraciones mayores a 46.68 gDQO L⁻¹ (40 % de vinazas).

En la Figura 3-7 se muestran los ácidos grasos volátiles y solventes generados por gramo de DQO alimentada en cada concentración de sustrato evaluada, como se aprecia en la concentración de 20 % se presenta la mayor conversión del sustrato inicial a metabolitos solubles (852.69 mg gDQO⁻¹), de estos 87% corresponde a etanol, 5% a ácido butírico, 3% a ácido acético, 3% a ácido láctico y el restante 2% a ácido propiónico, valérico e isovalérico.

La diferencia de la concentración final menos la concentración inicial fue positiva para todos los metabolitos solubles analizados y en todas las condiciones evaluadas, indicando que en todos los casos se tuvo producción; en el caso del etanol este fue el metabolito que se generó en mayor cantidad lo que indica que el inóculo se adaptó de mejor manera a la producción de etanol; sin embargo, esta ruta por sí sola no genera hidrógeno. Por lo tanto para tener una producción de hidrógeno este debe ser un metabolito de la fermentación del tipo acético-butírico o del tipo etanol, esta última fermentación se caracteriza por una alta eficiencia de producción de hidrógeno y tener como metabolitos solubles dominantes al etanol y al ácido acético (Guo et al., 2008; Tang et al., 2012).



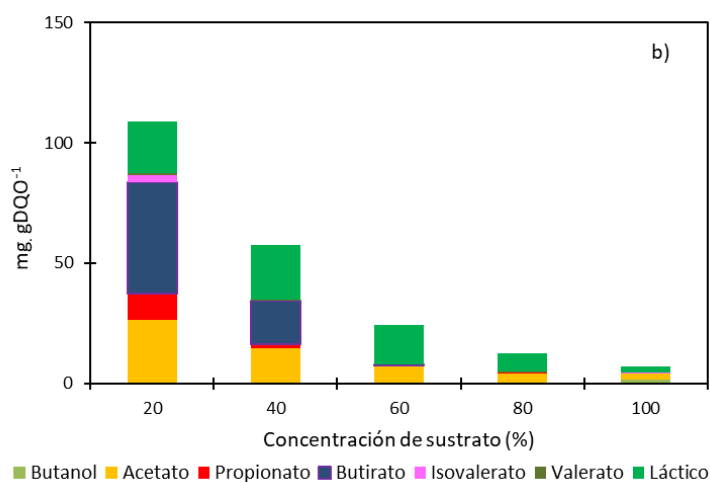


Figura 3-7 Etanol (a) y otros metabolitos solubles (b) producidos por cada concentración de sustrato evaluada

Tomando en cuenta todos los resultados obtenidos, se eligió como concentración de sustrato idónea una dilución al 20 % de las vinazas o una dilución de 1 a 5, dado que es con la que se obtiene los rendimientos más altos, una tasa de producción alta y una conversión de sustrato alta.

Capítulo 4. Producción continua de hidrógeno en un reactor UASB

4.1. Aclimatación del inóculo

La aclimatación del inóculo se realizó en dos etapas para evitar cualquier posible inhibición en el inóculo por el sustrato, así que se decidió bajar 6 % la concentración de sustrato idónea, por tal razón los primeros 15 días de operación el reactor se alimentó con una concentración de vinazas a 14% (35 gDQO L⁻¹) de vinazas, posteriormente los siguientes 10 días el reactor se alimentó con una concentración de sustrato a 20 % (50 gDQO L⁻¹).

En la Figura 4-1 se muestra la composición del biogás en la etapa de aclimatación, como se aprecia durante el tiempo de operación los únicos constituyentes del biogás fueron dióxido de carbono e hidrógeno, el no detectar metano indica que las condiciones de operación empleadas fueron efectivas para suprimir la actividad de las arqueas metanogénicas. El periodo estable de operación se alcanzó entre los días 21 y 25, en este periodo se obtuvo una concentración de $46 \pm 4\%$ de hidrógeno en el biogás, esto representa un incremento de 2.54 veces la concentración obtenida al inicio de operación. En los primeros 10 días de operación se tuvo problemas de fugas de biogás, por tal razón faltan datos en cuanto a la tasa específica de producción de hidrógeno y composición de biogás.

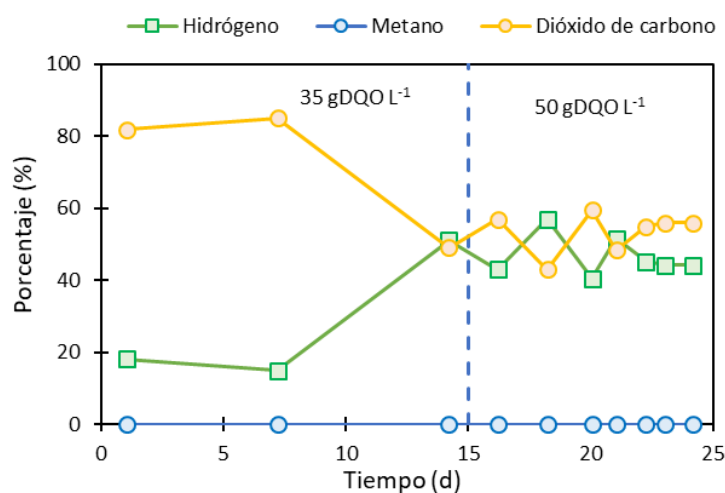


Figura 4-1 Composición de biogás durante la etapa de aclimatación

En la Figura 4-2 se muestra el promedio por cada tres horas de la tasa específica de producción de hidrógeno en la etapa de aclimatación, como se aprecia, al realizar el cambio en la concentración de sustrato se presenta una inestabilidad en la producción de hidrógeno que se debe a la adaptación del inóculo a la nueva concentración de carbohidratos. Durante el periodo estable se obtuvo una tasa de producción promedio de $51 \pm 3 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, los rendimientos obtenidos en este periodo fueron $6 \text{ mL H}_2 \text{ gDQO}^{-1}$ y $1.11 \text{ mol H}_2 \text{ mol}_{\text{hexosa}}^{-1}$, estos rendimientos se calcularon con base en las concentraciones iniciales de las vinazas alimentadas.

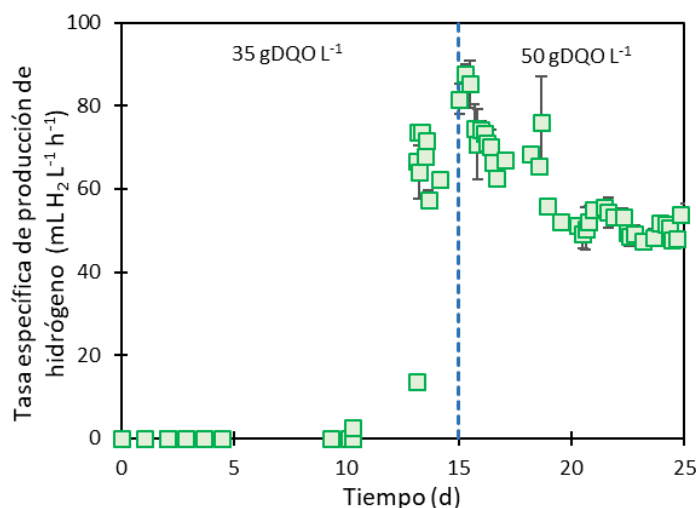


Figura 4-2 Tasa específica de producción de hidrógeno durante la etapa de aclimatación

En la Figura 4-3 se muestra la remoción de carbohidratos y de DQO en la etapa de aclimatación, como se aprecia en ambos aspectos se presenta una tendencia a incrementar al momento de realizar el cambio de concentración de sustrato, además de que se observa que el sistema es capaz de recuperarse a una baja en la temperatura debido a que el baño de agua no funcionó el día 18; en el periodo estable se obtuvo una remoción promedio de carbohidratos de $84 \pm 8 \%$ y de DQO de $12 \pm 0.5 \%$.

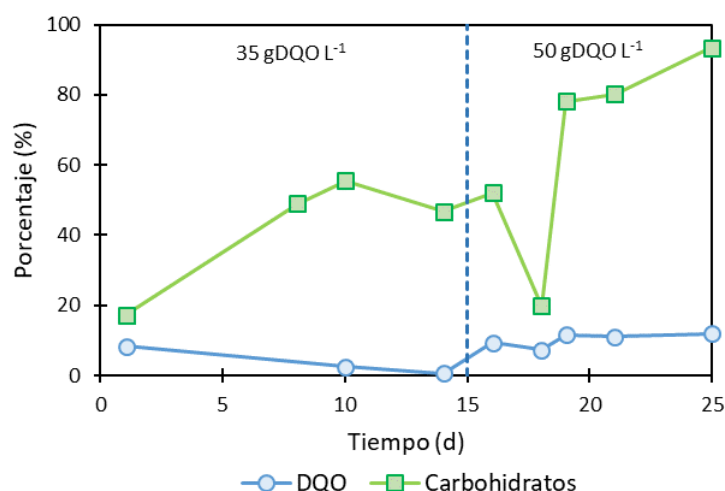


Figura 4-3 Remoción de carbohidratos y DQO durante la etapa de aclimatación

Los principales metabolitos identificados durante el periodo estable de producción en la fase líquida fueron ácido acético y butírico con 561.52 y 1264.64 mgDQO L⁻¹, respectivamente, esto indica que la principal ruta de producción de hidrógeno fue la de acetato-butirato, siendo esta una de las vías más importantes para producción de hidrógeno vía fermentación oscura (Tapia-Venegas et al., 2013).

Se realizó el cálculo del diámetro medio de Sauter del lodo granular, para lo cual se midió el diámetro de 160 gránulos al inicio y al final de la etapa de aclimatación con apoyo de un estereoscopio, de acuerdo a los resultados se tuvo una reducción en el diámetro de 10.40 % pasando de 1.73 a 1.55 mm, además se presentó un cambio en su coloración pasando de un tono negro a uno café claro como se observa en la Figura 4-4. Estos cambios en el lodo granular concuerdan con lo reportado por Hernández-Mendoza y Buitrón (2014), en donde la reducción de diámetro se debe a la selección de los microorganismos productores de hidrógeno y el cambio de coloración puede atribuirse a la supresión de la actividad de las bacterias sulfato reductoras.

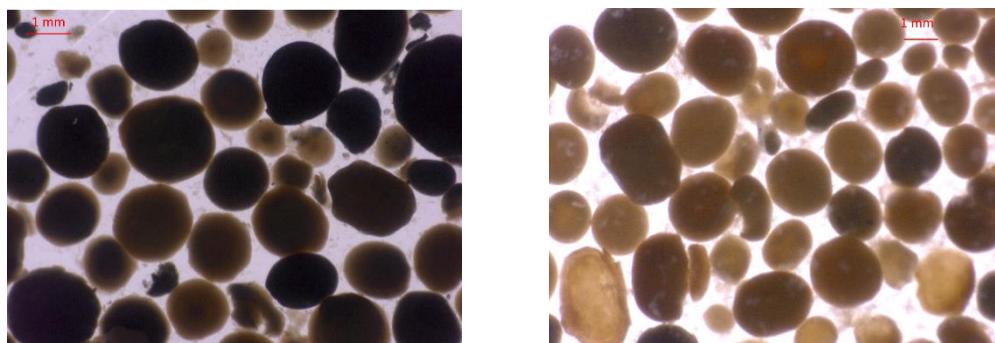


Figura 4-4 Fotografías de lodo granular al inicio (izquierda) y al término (derecha) de la etapa de aclimatación

Después de 25 días de operación fue posible la obtención de un lodo granular productor de hidrógeno que emplea como sustrato vinazas vitivinícolas de vino blanco por medio de la selección continua del lodo granular anaerobio metanogénico causada por las condiciones operacionales del reactor.

4.2. Efecto de la velocidad superficial del gas

Se ha observado que la recirculación de líquido no es suficiente para evitar la sobre acumulación del hidrógeno disuelto en el medio, debido a la limitada transferencia de masa de la fase líquida a la gaseosa, esto conlleva a que el hidrógeno sea empleado como sustrato por diversos microorganismos (Bakonyi et al., 2017; Tapia-Venegas et al., 2013; Zhang et al., 2012). Para disminuir la sobre acumulación del hidrógeno disuelto en el medio se propuso la recirculación del biogás dentro del reactor de esta manera el biogás obtenido no requiere purificación como cuando se emplean gases inertes; con esta estrategia se busca aumentar la velocidad de transferencia del hidrógeno de la fase líquida a la gaseosa debido a que se provoca un aumento en la agitación del medio, en el tiempo de contacto y en el área interfaz de las fases líquido-gas (Frigon y Guiot, 1995; Tapia-Venegas et al., 2013).

Después de la aclimatación del inóculo, los únicos constituyentes del biogás fueron hidrógeno y dióxido de carbono; en esta etapa se evaluaron seis condiciones en total, la uno, tres y cinco corresponden a los periodos de operación con recirculación de líquido a una velocidad ascensional de 0.5 m h^{-1} , mientras que la dos, cuatro y seis corresponden a los periodos con recirculación de biogás con flujos de 36, 106 y 66 mL min^{-1} , respectivamente, estos flujos de recirculación de biogás corresponden a velocidades superficiales del gas (V_g) de 9.7, 28.6 y 17.8 m d^{-1} . La velocidad superficial del biogás recirculado se calculó de acuerdo a la ecuación 4-1.

$$V_g = \frac{V}{A_t}$$

Ecuación 4-1 Velocidad superficial del biogás

Donde, V_g : velocidad superficial del gas (m d^{-1}), V : flujo volumétrico del biogás ($\text{m}^3 \text{ d}^{-1}$), A_t : área transversal del reactor (m^2).

En la Figura 4-5 se muestra el promedio de la tasa específica de producción de hidrógeno obtenida en las diferentes condiciones evaluadas, como se aprecia la recirculación de líquido (12 m d^{-1}) y la V_g más baja (9.7 m d^{-1}) no son suficientes para mantener una producción de hidrógeno continúa a lo largo del tiempo, puesto que la tasa de producción cae sistemáticamente en las condiciones uno, dos y tres; el que se haya presentado el mismo fenómeno entre estas condiciones tiene que ver con que no existió un cambio significativo en las velocidades superficiales aplicadas. Como en las condiciones cuatro y seis se probaron velocidades superficiales mayores a la alcanzada con la recirculación de líquido (28.6 y 17.8 m d^{-1}) se logró tener una producción de hidrógeno continua sin caídas drásticas como en las condiciones señaladas anteriormente, además de que estas velocidades fueron suficientes para recuperar el sistema puesto que en la condición tres casi cesa la producción de hidrógeno.

Se espera que al comenzar con la recirculación de biogás en el sistema se presente una liberación del hidrógeno disuelto que se acumuló durante los periodos de recirculación de líquido (Frigon y Guiot, 1995), estos picos en la tasa específica de producción de hidrógeno se presentaron los días 33 y 41 que corresponden al inicio de las condiciones dos y cuatro con recirculación de biogás, es importante señalar que en la condición seis ya no se presentó éste fenómeno y es atribuible a que se había alcanzado la velocidad en que se ve favorecida la transferencia del hidrógeno entre las fases (Zhang et al., 2012).

Respecto a la concentración de hidrógeno en el biogás, esta fue incrementando conforme se probaron las diferentes condiciones, en la condición uno se obtuvo $38 \pm 1 \%$, en la condición dos se obtuvo $36 \pm 2 \%$, en la condición cuatro se obtuvo $42 \pm 2 \%$ y en la condición seis se obtuvo $48 \pm 4 \%$, entre las condiciones cuatro y seis no hubo diferencia significativa en la concentración de hidrógeno y la tasa específica de producción de hidrógeno.

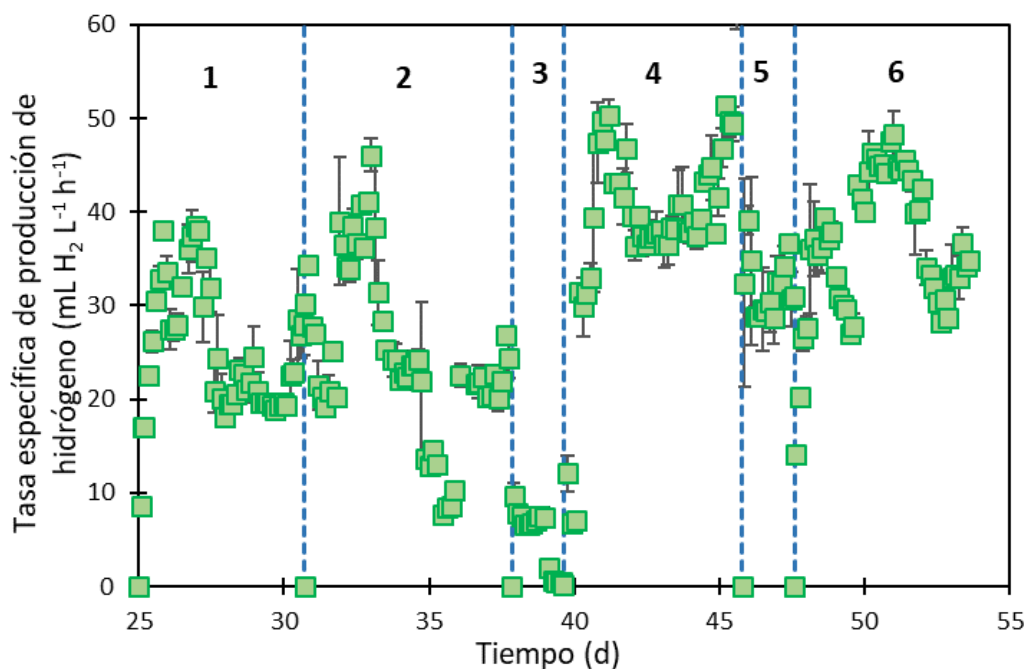


Figura 4-5 Tasa específica de producción de hidrógeno en las diferentes condiciones de operación

En la Tabla 4-1 se muestran los días de operación, la productividad y los rendimientos con base en la concentración inicial de DQO y carbohidratos totales obtenidos en cada condición; como ya se había señalado y se aprecia, el aplicar la recirculación de biogás provoca un incremento en la productividad de hidrógeno; sin embargo, el proceso solo fue estable a partir de una V_g de 17.8 m d^{-1} . Los mejores resultados se obtuvieron con una V_g de 17.8 m d^{-1} , en esta condición se obtuvo una productividad de $44 \pm 2 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y rendimientos de $5 \pm 0.4 \text{ mL H}_2 \text{ gDQO}^{-1}$ y $0.97 \pm 0.1 \text{ mol mol}_{\text{hexosa}}^{-1}$, que es 2.14 veces mayor a lo obtenido en la condición uno sin recirculación de biogás.

La productividad máxima obtenida es menor a las alcanzadas con vinazas tequileras en reactores de tipo AnSBR ($56.3 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), SBR ($61.4 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y de lecho fijo ($81 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Buitrón et al., 2014a, 2014b; Buitrón y Carvajal, 2010), sin embargo, en estos experimentos se emplearon cargas orgánicas bajas entre 6 y $62.4 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para disminuir el efecto inhibitorio de los fenoles, mientras que en el presente estudio la carga orgánica empleada fue más de tres veces mayor.



Tabla 4-1 Días de operación, productividad y rendimiento en el periodo estable de cada condición evaluada

Condición	V	Vg	Días operación	Productividad (mL H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)		Rendimiento (mL H ₂ gDQO ⁻¹)		Rendimiento (mol H ₂ mol _{hex.} ⁻¹)	
	m ³ d ⁻¹	m d ⁻¹		\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE
1	-	-	6	20.53	1.82	2.33	0.29	0.45	0.06
2	0.05	9.7	7	22.26	1.95	2.52	0.31	0.49	0.06
3	-	-	2	7.15	0.50	0.81	0.08	0.16	0.02
4	0.15	28.6	6	38.14	1.34	4.32	0.22	0.84	0.04
5	-	-	2	30.96	2.31	3.51	0.37	0.68	0.07
6	0.10	17.8	6	43.99	2.39	4.99	0.38	0.97	0.08

\bar{x} : promedio, DE: Desviación Estándar, Vg: velocidad superficial del biogás, V: flujo volumétrico del biogás

En la tabla 4-2 se engloban los resultados que se han obtenido con diversas técnicas empleadas para incrementar la productividad de hidrógeno, como se aprecia la mayoría de los estudios se han realizado con un sustrato modelo como la glucosa, el incremento obtenido en el presente estudio es comparable con el obtenido trabajando con presión reducida, sin tener que emplear bombas de vacío que aumentan los gastos por la electricidad consumida. Lo anterior indica que la recirculación de biogás dentro de un reactor UASB productor de hidrógeno a partir de vinazas vitivinícolas es una opción viable para incrementar la productividad de hidrógeno.



Tabla 4-2 Resultados de diversas técnicas empleadas para reducir la sobresaturación de hidrógeno

Técnica	Sustrato	Gas empleado	Resultados	Referencia
			Productividad	
Separación y recirculación del biogás	Glucosa	Fracción rica en CO ₂	1.29 veces mayor	Bakonyi et al., (2017)
		Fracción rica en H ₂	2.5 veces menos	
Separación del biogás del medio	Glucosa		Rendimiento 1.15 veces mayor	Liang et al., (2002)
Burbujeo de gas	Glucosa	Nitrógeno	Rendimiento 1.6 veces mayor	Mizuno et al., (2000)
Burbujeo de gas	Glucosa	Dióxido de carbono	Rendimiento 1.4 veces mayor	Kraemer y Bagley, (2006)
Presión reducida (380 mm Hg)	Medio MYG		Rendimiento 2.05 veces mayor	Mandal y Nath, (2006)
Recirculación del biogás	Vinazas vitivinícolas	Biogás	Productividad y rendimiento 2.14 veces mayor	El presente estudio

En la Figura 4-6 se muestran las concentraciones de metabolitos solubles (mg de DQO equivalente) por gramo de DQO alimentada para cada condición evaluada, como se aprecia el etanol es el metabolito predominante en la fermentación oscura, los siguientes metabolitos producidos fueron el ácido butírico y el ácido acético, esto nos indica que el

inóculo se adaptó de mejor manera a la producción de etanol y por tal razón se obtuvieron rendimientos de hidrógeno bajos; en la condición dos se detectó ácido propiónico el cual tiene una relación directa con la concentración de hidrógeno disuelto (Frigon y Guiot, 1995), esto nos indica que la velocidad aplicada en dicha condición no fue suficiente para evitar la sobresaturación de hidrógeno y por tal motivo este fue consumido por las bacterias propionato reductoras.

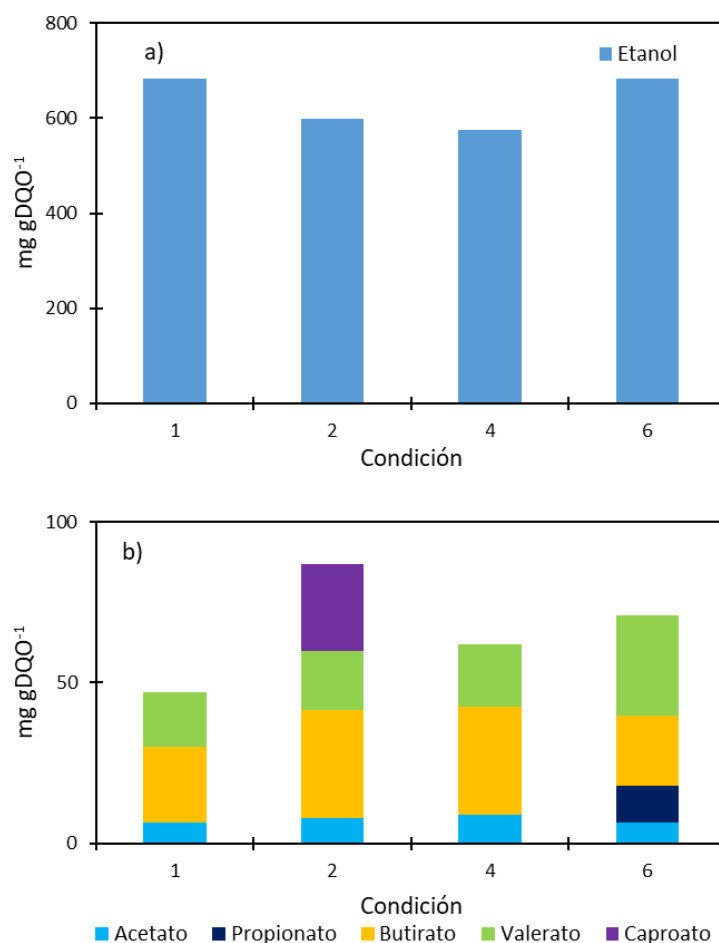


Figura 4-6 Etanol (a) y metabolitos solubles (b) generados durante las diferentes condiciones de operación

De acuerdo a los resultados obtenidos la mejora en la tasa de producción de hidrógeno se puede atribuir al incremento en la transferencia del hidrógeno de la fase líquida a la gaseosa más que a un incremento en la producción de hidrógeno.

Capítulo 5. Conclusiones

- ✓ Se logró caracterizar fisicoquímicamente las vinazas vitivinícolas de vino blanco y se determinó que el principal constituyente de éstas es el etanol (46 % de la DQO total) y en segundo lugar se encuentran los carbohidratos totales (14 % de la DQO total), esta composición las hace factibles a ser empleadas en un tratamiento biológico.
- ✓ Al ser las vinazas vitivinícolas un sustrato complejo la relación sustrato-biomasa debe mantenerse baja para que los microorganismos puedan hidrolizar los azúcares complejos y no se vean inhibidos por la concentración de compuestos como el etanol, en nuestra investigación la relación que presentó la mayor producción de hidrógeno fue la de 0.16.
- ✓ La concentración de etanol presente en las vinazas vitivinícolas no permite que se empleen de manera directa en un proceso de fermentación oscura, por tal razón es recomendable hacer una dilución de por lo menos 1 a 5 para que se pueda producir hidrógeno.
- ✓ La recirculación del biogás producido dentro del reactor granular mostró ser una opción adecuada para mejorar la producción de hidrógeno por fermentación oscura, ya que al emplear una velocidad superficial del biogás de 17.8 m d^{-1} se propició la máxima tasa específica de producción de hidrógeno ($44 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y los máximos rendimientos ($4.99 \text{ mL H}_2 \text{ gDQO}^{-1}$ y $0.97 \text{ mol mol}_{\text{hexosa}}^{-1}$), los cuales son 2.14 veces mayor a lo obtenido sin recirculación de biogás; este incremento es atribuible a la mejora en la velocidad de transferencia del hidrógeno de la fase líquida a la gaseosa.
- ✓ Este trabajo de investigación demostró que es posible producir hidrógeno vía fermentación oscura empleando como sustrato vinazas vitivinícolas, sin embargo, esto debe verse como una etapa de un tren de tratamiento y no como único tratamiento.



Capítulo 6. Recomendaciones

- ✓ Se deben estudiar nuevas diluciones de las vinazas vitivinícolas para determinar si existe una concentración de sustrato con la que se obtengan mejores resultados al emplear una relación sustrato-biomasa de 0.2.
- ✓ Se sugiere probar nuevas velocidades de recirculación de biogás y no aplicar un periodo de recirculación de líquido entre estas, porque eso puede provocar una disminución en la actividad del inóculo.
- ✓ Se sugiere probar diferentes tipos de pretratamiento con la finalidad de reducir la concentración de etanol de las vinazas vitivinícolas antes de ingresar al proceso de fermentación oscura y así poder obtener una mayor producción de hidrógeno.
- ✓ Se puede analizar el empleo de biomasa suspendida en un reactor del tipo SBR o CSTR para evitar la disgregación de los gránulos a lo largo del tiempo por la concentración de sales de las vinazas vitivinícolas.

Productividad del trabajo

Publicaciones en Congresos Internacionales

- ✓ Albarrán-Contreras B. A., Buitrón G. (2017). Influence of the gas recycling rate on hydrogen production from wine vinasses. 15th IWA World Conference on Anaerobic Digestion. Poster presentation. October 17-20, 2017. Beijing, China.
- ✓ Albarrán-Contreras B. A., Carrillo-Reyes J., Buitrón G. (2016). Biohydrogen production from wine vinasses by dark fermentation: effect of substrate concentration and pH. XVI International Congress of the Hydrogen Mexican Society 2016. Poster presentation. November 9-11, 2016. Querétaro, Querétaro, México.

Publicaciones en Congresos Nacionales

- ✓ Albarrán-Contreras B. A., Monroy-Hermosillo O. A., Buitrón G. (2017). Efecto de la velocidad de recirculación de biogás sobre la producción de hidrógeno con vinazas vitivinícolas. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. *Presentación oral*. 25-30 de junio de 2017. Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- ✓ Albarrán-Contreras B. A., Carrillo-Reyes J., Buitrón G. (2017). Effect of initial concentration of wine vinasses on hydrogen production. IWA-México 5th Young Water Professionals Conference. *Presentación de cartel*. 24-26 de mayo de 2017. Morelia, Michoacán, México.
- ✓ Albarrán-Contreras B. A., Carrillo-Resyes J., Buitrón G. (2016). Aclimatación en continuo de lodo granular anaerobio con vinazas vitivinícolas. Congreso Regional de Energías Renovables. *Presentación de cartel*. 9-11 de noviembre de 2016. Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- ✓ Albarrán-Contreras B. A., Carrillo-Resyes J., Buitrón G. (2016). Efecto de la concentración de sustrato en la producción de biohidrógeno a partir de vinazas vitivinícolas. III Reunión Nacional de la Red Temática de Bioenergía y XII Reunión Nacional de la Red Mexicana de Bioenergía. *Presentación de cartel*. 19-21 de octubre de 2016. Morelia, Michoacán, México.

Referencias

- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A., Domínguez-Espinosa, R., 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* **(22)**, 477–485.
- APHA, AWWA, WEF, 1999. Standard methods for the examination of water and wastewater 20th Edition.
- Arreola-Vargas, J., Jaramillo-Gante, N.E., Celis, L.B., Corona-González, R.I., González-Álvarez, V., Méndez-Acosta, H.O., 2016. Biogas production in an anaerobic sequencing batch reactor by using tequila vinasses: Effect of pH and temperature. *Water Sci. Technol.* **(73)**, 550–556.
- Asociación de Vitivinicultores de Querétaro, 2017. AVQ [WWW Document]. URL <http://www.avq.com.mx/>
- Bakonyi, P., Buitrón, G., Valdez-Vazquez, I., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2017. A novel gas separation integrated membrane bioreactor to evaluate the impact of self-generated biogas recycling on continuous hydrogen fermentation. *Appl. Energy* **(190)**, 813–823.
- Beckers, L., Masset, J., Hamilton, C., Delvigne, F., Toye, D., Crine, M., Thonart, P., Hiligsmann, S., 2015. Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by the pure strain *Clostridium butyricum* CWBI 1009. *Biochem. Eng. J.* **(98)**, 18–28.
- Bhunia, P., Ghangrekar, M.M., 2008. Influence of biogas-induced mixing on granulation in UASB reactors. *Biochem. Eng. J.* **(41)**, 136–141.
- Buelow, M.C., Steenwerth, K., Silva, L.C.R., Parikh, S.J., 2015. Characterization of Winery Wastewater for Reuse in California. *Am. J. Enol. Vitic.* **(66)**, 302–310.
- Buitrón, G., Carvajal, C., 2010. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresour. Technol.* **(101)**, 9071–9077.
- Buitrón, G., Kumar, G., Martinez-Arce, A., Moreno, G., 2014a. Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H_2 -SBR + CH_4 -UASB) using tequila vinasses.

- Int. J. Hydrogen Energy* (39), 19249–19255.
- Buitrón, G., Prato-Garcia, D., Zhang, A., 2014b. Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. *Water Sci. Technol.* (70), 1919–1925.
- Bundhoo, M.A.Z., Mohee, R., Hassan, M.A., 2015. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *J. Environ. Manage.* (157), 20–48.
- Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M.D., Pe, A., Pe, M.D., 2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manag.* (28), 372–380.
- Bustamante, M.A., Paredes, C., Moral, R., Moreno-Caselles, J., Pérez-Espinosa, A., Pérez-Murcia, M.D., 2005. Uses of winery and distillery effluents in agriculture: characterisation of nutrient and hazardous components. *Water Sci. Technol.* (51), 145–151.
- Cavalcante de Amorim, E.L., Takano Sader, L., Luiz Silva, E., 2012. Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (166), 1248–1263.
- Chu, C.-Y., Tung, L., Lin, C.-Y., 2013. Effect of substrate concentration and pH on biohydrogen production kinetics from food industry wastewater by mixed culture. *Int. J. Hydrogen Energy* (38), 15849–15855.
- Consejo Mexicano Vitivinícola, 2017. CMV [WWW Document]. URL <http://uvayvino.org.mx/>
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J.L., Barral, M.T., Cruz, J.M., Moldes, A.B., 2011. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Manag.* (31), 2327–2335.
- dos Reis, C.M., Carosia, M.F., Sakamoto, I.K., Amâncio Varesche, M.B., Silva, E.L., 2015. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* (40), 8498–8509.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, Pa., Smith, F., 1956. Colorimetric method

- for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **(28)**, 350–356.
- Espana-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernandez-Zarate, G., Alzate-Gaviria, L., 2011. Vinasses: characterization and treatments. *Waste Manag. Res.* **(29)**, 1235–1250.
- Espinoza-Escalante, F.M., Pelayo-Ortíz, C., Navarro-Corona, J., González-García, Y., Bories, A., Gutiérrez-Pulido, H., 2009. Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. *Biomass and Bioenergy* **(33)**, 14–20.
- Frigon, J.-C., Guiot, S.R., 1995. Impact of liquid-to-gas hydrogen mass transfer on substrate conversion efficiency of an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Enzyme Microb. Technol.* **(17)**, 1080–1086.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., Esposito, G., 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl. Energy* **(144)**, 73–95.
- Guo, W.Q., Ren, N.Q., Wang, X.J., Xiang, W.S., Meng, Z.H., Ding, J., Qu, Y.Y., Zhang, L.S., 2008. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* **(33)**, 4981–4988.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrre, H., Steyer, J.-P., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* **(35)**, 10660–10673.
- Hallenbeck, P.C., 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *Int. J. Hydrogen Energy* **(34)**, 7379–7389.
- Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R., 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy* **(27)**, 1185–1193.
- Hallenbeck, P.C., Ghosh, D., 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends Biotechnol.* **(27)**, 287–297.
- HAProWINE, L., 2011. Generación y Gestión de Residuos del Sector Vinícola.

- Hernández-Mendoza, C.E., Buitrón, G., 2014. Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **(89)**, 143–149.
- Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* **(38)**, 569–582.
- Kisielewska, M., Dębowski, M., Zieliński, M., 2015. Improvement of biohydrogen production using a reduced pressure fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **(38)**, 1925–1933.
- Kraemer, J.T., Bagley, D.M., 2006. Supersaturation of dissolved H₂ and CO₂ during fermentative hydrogen production with N₂ sparging. *Biotechnol. Lett.* **(28)**, 1485–1491.
- Kyzas, G.Z., Symeonidou, M.P., Matis, K.A., 2016. Technologies of winery wastewater treatment: a critical approach. *Desalin. Water Treat.* **(57)**, 3372–3386.
- Laurent, B., Serge, H., Julien, M., Christopher, H., Philippe, T., 2012. Effects of Hydrogen Partial Pressure on Fermentative Biohydrogen Production by a Chemotropic Clostridium Bacterium in a New Horizontal Rotating Cylinder Reactor. *Energy Procedia* **(29)**, 34–41.
- Lazaro, C.Z., Perna, V., Etchebehere, C., Varesche, M.B.A., 2014. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *Int. J. Hydrogen Energy* **(39)**, 6407–6418.
- Levin, D.B., Pitt, L., Love, M., 2004. Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy* **(29)**, 173–185.
- Liang, T.-M., Cheng, S.-S., Wu, K.-L., 2002. Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *Int. J. Hydrogen Energy* **(27)**, 1157–1165.
- Liu, Y., Chen, G.-H., Paul, E., 1998. Effect of the So/Xo ratio on energy uncoupling in substrate-sufficient batch culture of activated sludge. *Water Res.* **(32)**, 2883–2888.
- Lofrano, G., Meric, S., 2016. A comprehensive approach to winery wastewater treatment: a review of the state-of the-art. *Desalin. Water Treat.* **(57)**, 3011–3028.
- Logan, B.E., Oh, S.-E., Kim, I.S., Van Ginkel, S., 2002. Biological Hydrogen Production

- Measured in Batch Anaerobic Respirometers. *Environ. Sci. Technol.* **(36)**, 2530–2535.
- Mandal, B., Nath, K., 2006. Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Lett.* **(28)**, 831–835.
- Marino-Marmolejo, E.N., Corbalá-Robles, L., Cortez-Aguilar, R.C., Contreras-Ramos, S.M., Bolaños-Rosales, R.E., Davila-Vazquez, G., 2015. Tequila vinasses acidogenesis in a UASB reactor with *Clostridium* predominance. *Springerplus* **(4)**, 419.
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Noike, T., 2000. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour. Technol.* **(73)**, 59–65.
- Moletta, R., 2005. Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* **(51)**, 137–144.
- Moreno-Andrade, I., Buitrón, G., 2003. Influence of the initial substrate to microorganisms concentration ratio on the methanogenic inhibition test. *Water Sci. Technol.* **(48)**, 17–22.
- Moreno-Andrade, I., Moreno, G., Kumar, G., Buitrón, G., 2015. Biohydrogen production from industrial wastewaters. *Water Sci. Technol.* **(71)**, 105–110.
- Mu, Y., Wang, G., Yu, H.Q., 2006. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresour. Technol.* **(97)**, 1302–1307.
- Mu, Y., Yu, H.-Q., 2006. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: Physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules. *Biotechnol. Bioeng.* **(94)**, 980–987.
- Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C., Heijnen, S.J., 2000. Particle-based biofilm reactor technology. *Trends Biotechnol.* **(18)**, 312–20.
- Nunes Ferraz Júnior, A.D., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* **(39)**, 16852–16862.
- Oliveira, M., Duarte, E., 2016. Integrated approach to winery waste: waste generation and data consolidation. *Front. Environ. Sci. Eng.* **(10)**, 168–176.
- Organización Internacional de la Vid y el Vino, 2017. OIV [WWW Document]. URL

<http://www.oiv.int/es/>

- Pauss, A., Andre, G., Perrier, M., Guiot, S.R., 1990. Liquid-to-Gas mass transfer in anaerobic processes: Inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. *Appl. Environ. Microbiol.* **(56)**, 1636–1644.
- Ramírez-Morales, J.E., Torres Zúñiga, I., Buitrón, G., 2015. On-line heuristic optimization strategy to maximize the hydrogen production rate in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochem.* **(50)**, 893–900.
- Ramos, C., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Chamy, R., 2012. Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. *Int. J. Hydrogen Energy* **(37)**, 13288–13295.
- Redwood, M.D., Paterson-Beedle, M., Macaskie, L.E., 2009. Integrating dark and light bio-hydrogen production strategies: towards the hydrogen economy. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* **(8)**, 149–185.
- Refai, S., Wassmann, K., Deppenmeier, U., 2014. Short-term effect of acetate and ethanol on methane formation in biogas sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(98)**, 7271–7280.
- Saadý Cata, N.M., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy* **(38)**, 13172–13191.
- Show, K.Y., Zhang, Z.P., Lee, D.J., 2008. Design of bioreactors for biohydrogen production. *J. Sci. Ind. Res.* **(67)**, 941–949.
- Sinha, P., Pandey, A., 2011. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* **(36)**, 7460–7478.
- Stewart, P.S., 2003. Diffusion in Biofilms. *J. Bacteriol.* **(185)**, 1485–1491.
- Tai, J., Adav, S.S., Su, A., Lee, D., 2010. Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. *Int. J. Hydrogen Energy* **(35)**, 13345–13349.
- Tang, J., Yuan, Y., Guo, W.-Q., Ren, N.-Q., 2012. Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of *Ethanoligenens harbinense* B49. *Int. J. Hydrogen Energy* **(37)**, 741–747.
- Tapia-Venegas, E., Esteban Ramirez, J., Donoso-Bravo, A., Jorquera, L., Steyer, J.-P., Ruiz-



- Filippi, G., 2013. Bio-hydrogen production during acidogenic fermentation in a multistage stirred tank reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* **(38)**, 2185–2190.
- Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H.M., 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **(13)**, 1000–1013.
- Zhang, F., Zhang, Y., Chen, M., Zeng, R.J., 2012. Hydrogen supersaturation in thermophilic mixed culture fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* **(37)**, 17809–17816.
- Zhang, Y., Zhang, F., Chen, M., Chu, P.N., Ding, J., Zeng, R.J., 2013. Hydrogen supersaturation in extreme-thermophilic (70°C) mixed culture fermentation. *Appl. Energy* **(109)**, 213–219.
- Zumar Bundhoo, M.A., Mohee, R., 2016. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* **(41)**, 6713–6733.