



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

TÍTULO:

IMPLEMENTACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL AUTOMÁTICO Y
ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE
EFLUENTES VITIVINÍCOLAS

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

PRESENTA:

MARCELA DEL CARMEN ZAVALA MÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. JULIÁN CARRILLO REYES, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR

DR. EDSON BALTAZAR ESTRADA ARRIAGA, INSTITUTO MEXICANO DE
TECNOLOGÍA DEL AGUA

DR. ELÍAS RAZO FLORES, INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Dr. Alejandro Vargas Casillas

Secretario: Dr. Elías Razo Flores

Vocal 1: Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga

Vocal 2: Dra. Elizabeth León Becerril

Vocal 3: Dr. Julián Carrillo Reyes

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis
Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA).
Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de
México, Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, México.

TUTOR DE TESIS:

Julián Carrillo R

Dr. Julián Carrillo Reyes

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



Se agradece el financiamiento del presente trabajo de investigación al Fondo de Sustentabilidad Energética SENER-CONACYT, Clúster de Biocombustibles Gaseosos, 247006. Adicionalmente se agradece al proyecto PAPIIT IA100518 (DGAPA UNAM) y CONACYT CB 255537.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría durante el periodo del 2019-1 al 2020-2.

Se agradece el apoyo técnico de la Mtra. Gloria Moreno Rodríguez, al Mtro. Jaime Pérez Trevilla y Ángel A. Hernández Huerta para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Instituto de Ingeniería y al Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA), por permitir el desarrollo de este proyecto y darme la oportunidad de desarrollar mi crecimiento profesional en su equipo de trabajo.

Al Dr. Julián Carrillo Reyes, por haberme brindado su confianza y guiarme a lo largo de todo el posgrado, por haberme compartido sus conocimientos y consejos en el desarrollo del proyecto, por siempre otorgarme su disponibilidad de la mejor manera y siempre alentarme a seguir adelante.

Al Dr. Alejandro Vargas Casillas, por el apoyo otorgado siempre con paciencia y de la mejor manera en el desarrollo del proyecto, por sus observaciones y sus comentarios de aliento.

Al Dr. Elías Razo Flores, Dr. Edson B. Estrada Arriaga y a la Dra. Elizabeth León Becerril, por ser parte de mi comité tutor y siempre tener la disponibilidad de otorgarme sus observaciones para enriquecer el proyecto y sumar a mi retroalimentación.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, Dra. Diana Valdez Vazquez, Dr. Iván Moreno Andrade, Dr. Guillermo Quijano Govantes y Dr. Martín Barragán, por todos los conocimientos compartidos tanto en las clases como en los momentos de incertidumbre, por siempre brindarme una palabra de aliento.

A la Dra. Karla M. Muñoz Páez, por siempre escucharme y brindarme su apoyo en el desarrollo del proyecto, por compartirme sus conocimientos dentro y fuera del laboratorio.

A la Mtra. Gloria, Mtro. Jaime Pérez Trevilla, por todo el apoyo y la disposición brindada en el laboratorio, por los consejos y las pláticas que atenuaban la carga de trabajo.

Al Lic. Biotecnólogo Isaac Zahuantitla Razo, por llegar en el momento preciso, por aprender conmigo de las buenas y malas experiencias en el laboratorio y todas las enseñanzas que me brindaste, por las pláticas y siempre ayudarme a darle solución a las cosas, pero sobre todo gracias por tu amistad invaluable.

A Luis Vargas, por ser el hermano que siempre está para mí, por siempre buscar la manera para ayudarme aunque sean las 4 de la mañana.

Al Mtro. Julián O. Ovis Sánchez, por todos los conocimientos teóricos y prácticos bien impartidos en el laboratorio, por tu amistad, pláticas y consejos brindados. A Ricardo Rocher, por tu amistad invaluable y siempre enseñarme algo nuevo, por las risas, por compartir conmigo desvelos, pláticas, momentos buenos y malos, por siempre estar. A Lau, Gamaliel, Sigrid, Edith, Diego, Fer, Cinthya, por el compañerismo, por atenuar la presión de la maestría, por los desvelos y la complicidad en estos 2 años.

DEDICATORIA

A mis maestros de vida, mis padres:

Por siempre confiar y creer en mí, por demostrarme cuánto me aman y ser mi soporte de vida, por enseñarme a actuar desde el amor y siempre impulsarme a seguir mis sueños. Porque a pesar de la distancia, siempre estamos juntos en cada paso y ser la manifestación de Dios en mi vida.

A Litza, Julián y Sofi:

Por la confianza, por todo el cariño que me brindan y siempre hacerme sentir en casa, cuidarme y ver por mí.

A Luz:

Por ser mi cómplice desde el primer día, por tu cariño, porque sin ti no hubiera sido lo mismo, porque simple y sencillamente eres my person.

A Martha:

Por tu amor, tu cariño, por tu complicidad, por todas las vivencias que nos unieron y me permitieron encontrar una hermana mayor en ti.

A Jonathan:

Por caminar a mi lado todos los días, por tus enseñanzas, regaños y siempre recordarme que eres mi confidente.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ACRÓNIMOS	x
RESUMEN	1
1. MARCO TEÓRICO.....	2
1.1. La industria vitivinícola y la generación de efluentes	2
1.2. Producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura	3
1.2.1. Principales rutas de producción de hidrógeno en la fermentación oscura.....	3
1.3. Microorganismos productores de hidrógeno	4
1.4. Sistemas de producción de hidrógeno en continuo	5
1.4.1 Sistemas de biomasa fija	6
1.5. Estrategias de optimización	8
1.5.1. TRH como variable de operación en la estrategia de control.....	10
1.6. Escalamiento de sistemas para la producción de H ₂	10
2. JUSTIFICACIÓN.....	12
3. HIPÓTESIS.....	13
4. OBJETIVO	13
4.1. Objetivo general	13
4.2. Objetivos específicos	13
5. METODOLOGÍA.....	14
5.1. Inóculo y sustratos	14
5.2. Diseño de reactores.....	15
5.3. Operación del reactor filtro percolador a escala laboratorio	17
5.3.1. Estrategia experimental	17
5.3.2. Choques de carga programados a lazo abierto implementando lías y vinazas (etapa I).....	17
5.3.3. Implementación de la estrategia de control automático a lazo cerrado implementando vinazas sintéticas (etapa II).....	19
5.4. Operación de un reactor de lecho empacado a nivel piloto	21
5.5. Escalamiento de reactor filtro percolador.....	22
5.5.1. Arranque y operación de reactor tipo filtro percolador	22
5.5.2. Evaluación del tiempo de mezclado (T _{mix}).....	22

5.6.	Caracterización de la comunidad microbiana	23
5.7.	Métodos analíticos	23
6.	RESULTADOS	25
6.1.	Caracterización de los efluentes vitivinícolas	25
6.2.	Operación del reactor filtro percolador a escala laboratorio	25
6.2.1.	Choques de carga programados a lazo abierto implementando lías y vinazas (etapa I).....	26
6.2.2.	Implementación de la estrategia de control automático a lazo cerrado empleando vinazas sintéticas (etapa II)	28
6.2.3.	Balance de DQO de metabolitos	31
6.2.4.	Caracterización de la comunidad microbiana.....	34
6.3.	Operación de un reactor de lecho empacado (PBR) a nivel piloto.....	36
6.4.	Escalamiento de reactor filtro percolador.....	37
6.4.1.	Arranque y operación de reactor tipo filtro percolador	37
6.4.2.	Evaluación del tiempo de mezclado (Tmix).....	38
7.	CONCLUSIONES	42
8.	REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1 Esquema del reactor filtro percolador escala laboratorio.....	16
Figura 5.2 Esquema del reactor piloto PBR.....	16
Figura 5.3 Esquema del reactor filtro percolador escala piloto.....	17
Figura 5.4 Esquema de los choques de carga programados empleando lías	18
Figura 5.5 Esquema de los choques de carga programados empleando vinazas.	18
Figura 5.6 Comportamiento de la productividad ante choques de carga.	19
Figura 5.7 Acción del algoritmo	20
Figura 5.8 Programación del PLC.	21
Figura 5.9 Lecho estructurado de reactor PBR. a) Soportes, b) Lecho de soportes.....	21
Figura 5.10 Componentes de reactor filtro percolador piloto. a) Soportes.....	22
Figura 6.1 Productividad en evaluación previa empleando lías y vinazas.....	26
Figura 6.2 Choques de carga programados empleando lías a lazo abierto	27
Figura 6.3 Choques de carga programados empleando vinazas a lazo abierto.	27
Figura 6.4 Distribución de la productividad de H ₂ empleando lías como sustrato.....	28
Figura 6.5 Distribución de la productividad de H ₂ empleando vinazas como sustrato.....	28
Figura 6.6 Comportamiento de la productividad de H ₂ en tiempo real al implementar la estrategia de control automático FESC	29
Figura 6.7 Distribución de la productividad de H ₂ sin estrategia de control y con la estrategia de control automático FESC	30
Figura 6.8 Implementación de la estrategia de control en comparación con la literatura. ...	31
Figura 6.9 Balance de DQO empleando lías a lazo abierto.....	32
Figura 6.10 Balance de DQO empleando vinazas a lazo abierto.....	33
Figura. 6.11 Balance de DQO empleando vinazas sintéticas	34
Figura 6.12 Abundancia relativa por género y análisis de agrupamiento por distancia.....	35
Figura 6.13 Productividad de H ₂ en reactor PBR empleando sacarosa	37
Figura 6.14 Operación de reactor filtro percolador piloto con vinazas.	37
Figura 6.15 Balance de DQO de reactor filtro percolador piloto con vinazas.....	38
Figura 6.16 Grado de mezcla en reactores a escala laboratorio y piloto	39
Figura 6.17 Operación de reactor filtro percolador piloto con vinazas sintéticas.....	40
Figura 6.18 Balance de DQO de reactor filtro percolador piloto con vinazas sintéticas.....	40
Figura 6.19 Distribución de la productividad de H ₂ de reactores laboratorio y piloto al mismo T _{mix}	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Características de las lías vitivinícolas producidos en el estado de Querétaro.....	2
Tabla 1.2 Antecedentes de sistemas para la producción de H ₂ utilizando efluentes de la fermentación alcohólica.....	7
Tabla 1.3 Aplicación de estrategias de optimización en la producción de H ₂ en CSTR.....	9
Tabla 1.4 Antecedentes de sistemas empleados en la producción de H ₂ a escala piloto.....	11
Tabla 5.1 Composición de vinazas sintéticas	14
Tabla 5.2 Dimensiones de reactores.....	15
Tabla 5.3 Parámetros de operación con el algoritmo de control.....	20
Tabla 5.4 Parámetros de escalamiento	23
Tabla 6.1 Caracterización de las lías y vinazas crudas	25
Tabla 6.2 Criterios de escalamiento del reactor filtro percolador.....	39

ACRÓNIMOS

AFBR	Anaerobic fluidized bed reactor
AGV	Ácidos grasos volátiles
ASTBR	Anaerobic structured-bed reactor
BAA	Bacterias ácido acéticas
BAL	Bacterias ácido lácticas
BPH	Bacterias productoras de H ₂
CO ₂	Dióxido de carbono
CSTR	Continuous stirred tank reactor
DQO	Demanda química de oxígeno
EGSB	Expanded granular sludge bed
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
ESC	Extremum seeking control
FESC	Fast extremum seeking control
H ₂	Hidrógeno
MPC	Model predictive control
PBR	Packed bed reactor
PLC	Programmable logic controller
SSF	Sólidos suspendidos fijos
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
TCO	Tasas de carga orgánica
TPH	Tasa de producción de H ₂
TRH	Tiempo de retención hidráulica
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket

RESUMEN

El hidrógeno (H_2) es un combustible prometedor por poseer un alto rendimiento energético (141.9 J/kg), en comparación con otros combustibles, además de obtener agua como único residuo de su combustión (Wong *et al.* 2014). Una manera de obtener hidrógeno de forma sustentable es mediante la fermentación oscura, en donde los residuos orgánicos son convertidos en H_2 , dióxido de carbono (CO_2) y metabolitos solubles como los ácidos grasos volátiles (AGV) (Hallenbeck & Gosh., 2009; Trad *et al.* 2016). Sin embargo, la mayoría de los trabajos dedicados a la producción de H_2 se ha enfocado principalmente en la evaluación de parámetros operativos y por ello este trabajo se enfoca en optimizar el sistema, lo cual es posible con la aplicación de una estrategia de control automático. Actualmente las estrategias de control para la optimización de la producción de H_2 más prometedoras se han basado en la optimización en tiempo real, en donde a partir de variaciones en el tiempo de retención hidráulica (TRH) se ha logrado aumentar la productividad de H_2 . Sin embargo, dichas estrategias solo se han aplicado en reactores continuos de tanque agitado (CSTR por sus siglas en inglés “*Continuous stirred-tank reactor*”), alimentados con sustratos modelo. En este trabajo se implementó un sistema anaerobio de biomasa fija tipo filtro percolador, el cual fue sometido a choques de carga con la finalidad de conocer el comportamiento de la productividad con 2 sustratos (lías y vinazas vitivinícolas) y la posterior implementación de una estrategia de control automático retroalimentado, basado en la búsqueda rápida de extremos (FESC por sus siglas en inglés “*Fast extremum seeking control*”) propuesta por Ramírez-Carmona *et al.* (2018). Tal estrategia se basa en choques de carga, alternando 2 TRH; uno que se encuentre por debajo del valor óptimo donde se alcanza la máxima tasa de productividad y otro por arriba del valor que mantiene al sistema en condiciones estables. Adicionalmente a la optimización en línea del proceso, en este trabajo se evaluó el escalamiento de un sistema de producción de H_2 basado en un reactor tipo filtro percolador, utilizando como criterio de escalamiento el tiempo de mezclado con el fin de mantener la productividad de H_2 y evaluar su desempeño como aporte a una posterior aplicación a escala industrial. La implementación de choques de carga favoreció la producción de H_2 , utilizando lías y vinazas vitivinícolas como sustrato. La disminución del TRH de 5.5 a 3 h incrementó dicha productividad en un 238 % y 49 %, alcanzando promedios de 18.6 y 249.8 mL H_2 /L_{Reactor}-h al implementar lías y vinazas, respectivamente. La implementación de la estrategia de control logró la optimización de la productividad de H_2 utilizando vinazas como sustrato, la cual incrementó un 86% al compararlo con la operación a un TRH estable (5.5 h); alcanzando una productividad promedio de 174.4 mL H_2 /L_{Reactor}-h. Respecto al escalamiento del filtro percolador de producción de H_2 , el tiempo de mezcla no fue adecuado como criterio de escalamiento. En este sentido, la productividad fue 74% menor, en comparación con el reactor laboratorio. Otros criterios de importancia observados durante la operación fueron la carga orgánica específica a la concentración de biomasa, así como la eficiencia en la aspersión homogénea del sustrato en el lecho de biopelícula, los cuales pueden utilizarse en futuras evaluaciones de escalamiento.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. La industria vitivinícola y la generación de efluentes

Durante el 2018, la producción de vino alcanzó una producción de 28.2 mil millones de litros a nivel mundial, del cual se ha estimado para México una producción anual de 19.4 millones de litros, teniendo una tasa de incremento del 8% (OIV, 2018; Consejo Mexicano Vitivinícola, 2018). Se ha reportado que en el estado de Querétaro se obtiene una producción de 2 millones de litros de vino al año. Sin embargo durante la producción de un litro de vino, se llegan a generar 0.2-4 L de efluentes, resultando una producción estimada de 13 millones de litros por año de estos efluentes a nivel nacional, y 6 millones de litros de efluentes a nivel estatal (Asociación de Vitivinicultores de Querétaro, 2017; Vlyssides *et al.* 2005). Dichos efluentes son residuos generados en la sedimentación posterior al proceso de fermentación mejor conocidos como lías, que corresponden a una fracción sólida y líquida; la fracción sólida se compone por los restos precipitados que constituyen principalmente; biomasa, carbohidratos, compuestos fenólicos, proteínas y sales de ácidos orgánicos. La fracción líquida se conforma por el vino residual fermentado, rico en ácidos orgánicos y etanol (Pérez-Bibbins *et al.* 2015a; Pérez-Bibbins *et al.* 2015b). Por otro lado, las vinazas son conocidas como un subproducto conformado por una fracción líquida, la cual se obtiene a partir del proceso de destilación de las lías del vino que se lleva a cabo para la recuperación del etanol (Zacharof, 2017). En la tabla 1.1 se muestran las características típicas de las lías de industrias ubicadas en el estado de Querétaro.

Tabla 1.1 *Características de las lías vitivinícolas producidos en el estado de Querétaro*

Parámetro	Unidades	Albarrán-Contreras, (2017)	Mejía-Saucedo, (2018)
pH		3.5	3.4
Sólidos totales (ST)	g/L	57.5	154
Sólidos volátiles (SV)	g/L	51.1	24
Sólidos suspendidos totales (SST)	g/L	34.9	66
Sólidos suspendidos volátiles (SSV)	g/L	32.6	5
DQO Total	g/L	252.4	221
Carbohidratos totales	g/L	32.9	50
Carbono soluble	g/L	49.6	56
Nitrógeno soluble	g/L	4.9	1
Fósforo soluble	g/L	2.8	18
Sulfatos	mg/L	17.4	170
Cloruros	mg/L	10.1	28
Fosfatos	g/L	0.3	2
Sodio	mg/L	ND	21
Potasio	g/L	ND	1.48
Calcio	mg/L	ND	89
Magnesio	mg/L	ND	99
Hierro	µg/L	180	0.3
Cobre	µg/L	48	3
Zinc	µg/L	737	2
Etanol	g/L	60	105

*ND= No determinado, *DQO= Demanda química de oxígeno

Debido a las características presentadas anteriormente donde resalta una alta cantidad de sólidos, pH ácido, una concentración alta de carbohidratos, nutrientes y etanol, estos efluentes pueden ocasionar diversos impactos ambientales negativos si llegan a ser descargados directamente a cuerpos de agua, tal como disminuir los niveles de oxígeno, eutrofización, muerte de la fauna acuática, entre otros (Zacharof, 2017). Por otro lado, las mismas características hacen que estos efluentes puedan ser empleados como un sustrato adecuado para la producción de H_2 a través de la fermentación oscura. Dicha producción tiene como beneficios la obtención de un biocombustible con mayor potencial energético y, posteriormente a su valorización, es necesario el tratamiento de dicho efluente industrial debido a que todavía puede contener una DQO alta (Buitrón *et al.* 2020; Carrillo-Reyes *et al.* 2019).

1.2. Producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura

El H_2 es un combustible prometedor ya que se considera como un vector energético limpio, debido a que durante su combustión se obtiene agua como único residuo; además de poseer un alto rendimiento energético por unidad de peso (141.9 J/kg) en comparación con otros combustibles conocidos como el metano (55.7 J/kg), gas natural (50 J/kg), biodiesel (37 J/kg) y el etanol (29.9 J/kg) (Wong *et al.* 2014).

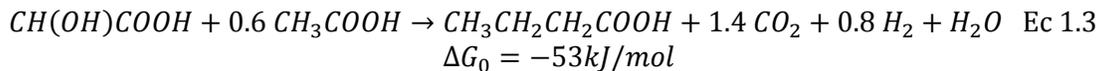
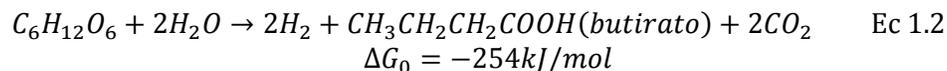
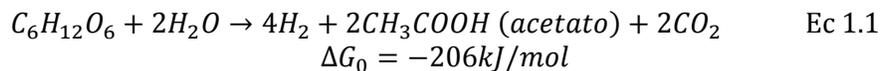
Una manera de obtener hidrógeno de forma sustentable es mediante la fermentación oscura, dado que es uno de los procesos biológicos por el que, a través de una serie de vías bioquímicas llevadas a cabo por microorganismos fermentativos, los sustratos orgánicos son convertidos en H_2 , CO_2 y AGV. En este sentido, la fermentación oscura constituye una alternativa a la implementación de métodos fisicoquímicos para el tratamiento de efluentes industriales, siendo un proceso aplicable para la valorización energética en regiones donde hay biomasa o residuos orgánicos disponibles que puedan ser empleados como sustratos e incluso compuestos orgánicos presentes en aguas residuales (Hallenbeck & Gosh., 2009; Trad *et al.* 2016; Wang & Wan, 2009).

1.2.1. Principales rutas de producción de hidrógeno en la fermentación oscura

En el proceso de la fermentación oscura, los carbohidratos son la fuente principal de carbono donde particularmente destaca la glucosa y se pueden obtener diferentes cantidades de H_2 por mol de glucosa, según la ruta metabólica y los metabolitos finales producidos. (Levin *et al.* (2004). En la práctica, la producción y los altos rendimientos de hidrógeno (4 moles H_2 /mol de glucosa consumida) disponible a partir de la glucosa está determinada por la relación de acetato/butirato. Cuando el ácido acético es el único AGV producido, se puede obtener un máximo teórico de 4 moles de H_2 por mol de glucosa consumida (Ec 1.1). Si el butirato es el producto final, el NADH es empleado para la oxidación del acetyl-CoA a butirato; por lo tanto, la producción teórica de H_2 será de 2 mol H_2 /mol de glucosa consumida (Ec 1.2). Sin embargo, los bajos rendimientos de H_2 (< 2 moles H_2 / mol de glucosa consumida), están asociados con la producción de metabolitos como propionato y otros productos finales reducidos, como alcoholes y el ácido láctico (Liu, 2008; Blanco & Rodríguez, 2012; Levin *et al.* 2004).

Además de las rutas metabólicas ya antes mencionadas, existe evidencia sobre la producción de H_2 a partir del consumo de ácido láctico. García-Depraect *et al.* (2020)

evaluaron el proceso de tres etapas (producción de lactato, bioH₂ y metano) a partir de vinazas tequileras. En la primera etapa se mantuvo una producción constante de lactato a una concentración de 12.4 g/L, correspondiente al 89% con respecto al total de los ácidos producidos. En la segunda etapa se llevó a cabo el proceso de la fermentación oscura en un CSTR siendo el lactato la fuente principal de carbono, obteniendo una TPH de 12.3 L H₂/L_{Reactor}-d. En la tercera etapa el empleo del efluente producido en la etapa posterior para metanogénesis. Por otro lado Blanco *et al.* (2019) evaluaron el potencial de la producción de H₂ a partir de suero de leche sintético como sustrato en un reactor anaerobio de lecho estructurado (ASTBR por sus siglas en inglés “*Anaerobic structured-bed reactor*”), obteniendo una TPH de 1.6 L H₂/L_{Reactor}-d. El análisis cinético de este sistema indicó que la producción de H₂ a partir de lactato y acetato podría explicar el 74.5% del volumen total de H₂ producido y solamente un 25.5% está relacionado con la producción de H₂ a partir del consumo de carbohidratos, siendo butirato el principal metabolito producido (Ec 1.3). La energía libre Gibbs en las reacciones tiene un valor negativo (proceso exergónico) por lo tanto, la generación de productos es espontánea sin requerimientos energéticos externos.



1.3. Microorganismos productores de hidrógeno

La producción de hidrógeno fermentativo mediante cultivos puros plantea limitaciones en el uso de sustratos y además existen altos riesgos de contaminación por lo que demandan condiciones estériles (Elsharnouby *et al.* 2013). Por otro lado, el uso de cultivos mixtos se ha considerado favorable en el proceso de la fermentación oscura, ya que se tiene una mayor facilidad en el control y operación del proceso, lo cual reduce ciertos costos y el uso de sustratos no es limitado (Valdez-Vázquez *et al.* 2005). Estos consorcios pueden obtenerse de diversas fuentes, por ejemplo; lodos provenientes del tratamiento de aguas residuales, composta, estiércol, residuos municipales e incluso de los mismos efluentes residuales. Una manera de enriquecer un cultivo mixto puede lograrse con la fermentación natural de dichos efluentes, lo cual tiene como ventaja que selecciona las bacterias productoras de H₂ (BPH) mediante presión de selección (Dinesh *et al.* 2018; Fernandes *et al.* 2013). Por estas razones, se ha tenido preferencia en el uso de cultivos mixtos para la producción de H₂ utilizando sustratos complejos como lo son los efluentes de la industria vitivinícola (Cortez-Cervantes, 2019; Mejía-Saucedo, 2018).

El género *Clostridium* se ha considerado comúnmente como las BPH predominantes en procesos de producción de H₂, alcanzando rendimientos de 1.5 a 3 mol H₂/mol glucosa consumida. Sin embargo, la presencia de las diversas especies de *Clostridium* pueden referenciar diferentes patrones metabólicos y varían según el tipo de sustrato, condiciones de operación y configuración del reactor; otra característica es que pueden presentar inhibición a la presencia de otros microorganismos como las bacterias ácido lácticas al ser

empleado un cultivo mixto (Łukajtis *et al.* 2018; Bedoya 2007; Lee *et al.* 2010). Se ha reportado a *Clostridium pasteurianum* y *Clostridium beijerinckii* como especies predominantes en procesos de producción de H₂ empleando cultivos mixtos a partir de melaza condensada y residuos de levadura de cerveza. Por otro lado, *Clostridium acetobutylicum* ha sido reportado como productor de H₂ a través de la ruta metabólica acetato/butirato, sin embargo, puede pasar al metabolismo de la solventogénesis (producción de acetona y butanol) (Cabrol *et al.* 2017; Hsiao *et al.* 2009; Chang *et al.* 2008).

Las diversas especies de *Clostridium* y sus abundancias relativas varían según el tipo de sustrato, condiciones de operación y configuración del sistema, donde puede no ser el género productor de H₂ predominante, por lo que diversos microorganismos anaerobios no formadores de esporas en su mayoría pertenecientes al filo *Firmicutes* y *Bacteroidetes* se han identificado como BPH principales, permitiendo rendimientos alrededor de 2 moles H₂/mol de glucosa (Cabrol *et al.* 2017; Patel *et al.* 2012). Dentro del filo *Firmicutes* se encuentra *Megasphaera*, que ha sido reportada como BPH predominante en sistemas de producción de H₂ a partir del consumo de acetato y láctico empleando composta de residuos de hojarasca, residuos de ganado sin pretratamiento y vinazas de la caña de azúcar crudas, (Ohnishi *et al.* 2010; Ferraz *et al.* 2015). Del filo *Bacteroidetes*, *Prevotella sp.*, se ha reportado en sistemas productores de H₂, sin embargo, su función no se ha definido con exactitud ya que puede tener una contribución positiva degradando sustratos complejos o como negativa compitiendo por sustrato (Castelló *et al.* 2009).

La presencia de microorganismos anaerobios facultativos suele tener rendimientos por debajo de los 2 moles H₂/mol de glucosa, estos presentan resistencia a la presencia de oxígeno y por lo tanto consumen el oxígeno rápidamente en los biorreactores, garantizando un proceso anaerobio eficiente, teniendo como ventaja el innecesario pretratamiento del inóculo (Bedoya, 2007). Dentro de los principales géneros se encuentran *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* como principales BPH en el proceso de la fermentación oscura, además de producir sustancias poliméricas extracelulares (EPS) para mejorar la retención celular (Patel *et al.* 2014; Carrillo-Reyes *et al.* 2016). Santiago *et al.* 2019 reportaron que el TRH influye directamente en la abundancia relativa, en donde se demostró que *Enterobacter* predominó con un TRH de 8 a 24 h y *Clostridium* a un TRH de 48 h, empleando residuos de comida como sustrato. Por otro lado, se ha reportado que *Citrobacter spp.*, es capaz de coexistir con *Clostridium* para la producción de H₂ a partir de aguas residuales de melaza (Ren *et al.* 2007) y *Klebsiella* junto con *E. coli*, fueron reportados como géneros predominantes en la producción de H₂ a partir del jugo de caña de azúcar como sustrato (Pattrá *et al.* 2011). También Rafráfi *et al.* 2013 reportaron que la presencia de algunas especies como *E. coli* puede ayudar a aumentar el rendimiento de H₂ al desviar las rutas metabólicas a las rutas productoras de acetato y butirato.

1.4. Sistemas de producción de hidrógeno en continuo

Los sistemas utilizados para la producción de H₂ a través de la fermentación oscura pueden dividirse en sistemas en lote y en sistemas continuos, ya sea con biomasa fija o en suspensión (Ntaikou *et al.* 2010). Entre los sistemas que se ha demostrado pueden alcanzar altas tasas de producción de H₂ y son los más utilizados en investigaciones, se encuentran: los reactores tipo CSTR, reactor anaerobio de lecho fluidizado (AFBR, por sus siglas en

inglés “*Anaerobic fluidized bed reactor*”), reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés “*Upflow anaerobic sludge blanket*”), reactores de lecho empacado (PBR, por sus siglas en inglés “*Packed bed reactor*”), reactor granular de lecho expandido (EGSB, por sus siglas en inglés “*Expanded granular sludge bed*”), reactor filtro percolador (TBR, por sus siglas en inglés “*Trickle bed reactor*”) (Hallenbeck & Ghosh, 2009 ; Contreras, 2015). Un sistema en continuo suele ser más prometedor debido a las altas productividades de hidrógeno; una de las diferencias es que en los sistemas en lote no se puede garantizar condiciones de estado estacionario (Ntaikou *et al.* 2010; Bedoya *et al.* 2007).

1.4.1 Sistemas de biomasa fija

Algunos estudios han correlacionado la producción de hidrógeno con la población microbiana y una de las limitantes en el proceso de la fermentación oscura es la retención de la biomasa productora de H_2 dentro del reactor al operar a altas tasas de carga orgánica (Arriaga *et al.* 2011). Por lo tanto, se han investigado diferentes estrategias de retención celular, lo cual incluye a los sistemas granulares y de biopelícula (Ghimire *et al.* 2015).

Entre los sistemas en continuo de biomasa suspendida, los reactores CSTR son los más implementados para la producción de H_2 , ya que ofrecen una construcción simple, fácil operación y una mezcla homogénea. Sin embargo, al estar acoplado el TRH a la velocidad de dilución, los sistemas anteriormente mencionados al ser operados a valores bajos de TRH, puede ocasionar el lavado de la biomasa. En comparación a los sistemas de biomasa fija, que se caracterizan por la inmovilización celular, permitiendo la retención de una alta concentración de biomasa inclusive al ser operados a TRH bajos. También permiten el empleo de tasas de carga orgánica (TCO) elevadas, demandan bajos requerimientos de energía y son más resistentes a compuestos inhibitorios en comparación con los sistemas de biomasa suspendida (Hallenbeck & Ghosh, 2009; Jeon *et al.* 2008; Fernandes *et al.* 2013).

Dentro de los de biomasa fija, los reactores PBR tienen la ventaja de una construcción simple y ya se ha utilizado para el estudio de la producción de H_2 . Sin embargo, debido a su menor régimen de mezcla es necesario optar por la recirculación del flujo para incrementar la transferencia de masa y mantener rendimientos superiores a 2 moles de H_2 /mol de glucosa (Peixoto *et al.* 2011; Barca *et al.* 2015). Aunado a esto, otro factor importante en los PBR es la retención excesiva de biomasa, la cual afecta directamente a la TCO, pudiendo provocar escasez de sustrato y por consiguiente cambios en las rutas metabólicas, por lo que Fuess *et al.* (2016) señalan que se puede mantener constante la producción de H_2 aplicando estrategias para descargar la biomasa como la purga de biomasa planctónica.

En la mayoría de las aplicaciones de sistemas de biomasa fija en procesos de producción de H_2 han empleado glucosa como sustrato modelo, tal como lo reportan Kumar & Buitrón, (2017) y Carrillo-Reyes *et al.* (2016) empleando sistemas PBR, obteniendo TPH de 121 y 242.5 mL H_2 /L-h respectivamente. También Cisneros- Pérez *et al.* (2015) emplearon dos sistemas EGSB obteniendo TPH de 120.4 y 173.3 mL H_2 /L-h; sin embargo, Jo *et al.* (2008) configuraron una columna de lecho empacado, obteniendo una TPH de 300 mL H_2 /L-h. Por otro lado, también se han utilizado residuos orgánicos como sustrato, resaltando los efluentes agrícolas y de la industria alimenticia que poseen altas concentraciones de materia orgánica, carbohidratos y una fácil disponibilidad (Kapdan & Kargi, 2006; Yang *et al.*

2007; Buitrón & Carvajal, 2010). No obstante, se ha reportado el proceso de producción de H_2 a partir del consumo de ácidos orgánicos que, aparte, pueden estar presentes en altas concentraciones en dichos efluentes; por lo tanto, son considerados como sustratos complejos y un ejemplo de ellos son los ya mencionados efluentes de la industria vitivinícola (Albarrán-Contreras, 2017; Mejía-Saucedo, 2018), al igual que algunos efluentes similares resultado de la fermentación alcohólica, como las vinazas tequileras y vinazas de caña de azúcar. Estos últimos ya han sido utilizados para la producción de H_2 como sustratos reales en sistemas de biomasa fija, tal como se presenta en la Tabla 1.2 en donde se puede observar que, en comparación a los trabajos reportados con efluentes vitivinícolas, estos se han implementado en cargas orgánicas más altas (hasta de 523 gDQO/L-d) y se han obtenido mayores TPH (hasta de 141.9 mL H_2 /L_{Reactor}-h).

Tabla 1.2 *Antecedentes de sistemas para la producción de H_2 utilizando efluentes de la fermentación alcohólica*

Sustrato	Tipo de reactor	Inóculo	TCO		Referencia
			Operacional (gDQO/L-d)	TPH (mL H_2 /L _{Reactor} -h)	
Vinazas tequileras	PBR	Lodo anaerobio granular	2	72.0	Buitrón <i>et al.</i> (2014)
Vinazas de caña de azúcar	UASB	Lodo anaerobio granular	79	13.4	González & Durán, (2014)
Vinazas de caña de azúcar	PBR	Endógeno de los efluentes de las vinazas de caña de azúcar	36	21.2	Júnior <i>et al.</i> (2015)
Lías vitivinícolas	Reactor de lecho empacado estructurado (RLEE)	Lodo anaerobio granular	523	56.2	Mejía-Saucedo, (2018)
Lías vitivinícolas	UASB	Lodo anaerobio granular	218	44.0	Albarrán-Contreras, (2017)
Lías vitivinícolas	Reactor de filtro percolador	Endógeno de los efluentes vitivinícolas	505	141.9	Cortez-Cervantes, (2019)
Lías vitivinícolas	UASB	Lodo anaerobio granular	505	78.3	Cortez-Cervantes, (2019)
Vinazas tequileras	CSTR	Consorcio ATCC PTA-124566*	13	517	(García-Depraect <i>et al.</i> 2020a)
Vinazas tequileras	CSTR	Consorcio ATCC PTA-124566*	7	487.5	(García-Depraect <i>et al.</i> 2020b)

*Compuesto principalmente por bacterias ácido lácticas (BAL) de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*, bacterias ácido acéticas (BAA) como *Acetobacter* y BPH del género *Clostridium*.

Los reactores tipo filtro percolador constituyen un sistema donde los microorganismos se adhieren a un material de soporte formando una biopelícula, la cual se encuentra rodeada por una fase gaseosa que permite una fácil liberación de H_2 y una operación a altas tasas de carga orgánica con bajos TRH sin un lavado de biomasa (Arriaga *et al.* 2011; Arreola-Vargas *et al.* 2014). A pesar de las ventajas de dicho sistema, se han reportado escasos informes sobre el uso de los filtros percoladores en la producción de H_2 . Por ejemplo Arriaga *et al.* (2011) obtuvieron una tasa máxima de producción de 75 mL H_2 /L-h, utilizando hidrolizado de paja de avena; por otro lado, Arreola-Vargas *et al.* (2015) obtuvieron una TPH de 20 L H_2 /L-d utilizando glucosa como sustrato. Sin embargo, de acuerdo a los datos presentados en la Tabla 1.2, es posible obtener altas tasas de producción como fue el caso de Cortez-Cervantes, (2019) utilizando efluentes de la industria vitivinícola.

1.5. Estrategias de optimización

Una vez que se ha desarrollado un proceso para la producción H_2 , el sistema debe operarse en condiciones óptimas; donde una de las opciones para maximizar la eficiencia del proceso es implementar un sistema de control, dependiendo principalmente de las variables de operación. El control automático se emplea para garantizar un funcionamiento deseado en los procesos a pesar de perturbaciones externas, teniendo como objetivos: garantizar una operación segura, compensar fallas de cualquier tipo, maximizar el rendimiento y la calidad del producto, brindar un ambiente óptimo para el crecimiento de los microorganismos y su productividad, acortar el tiempo y esfuerzo empleado en la operación, todo ello con base en la medición continua de variables de proceso y la manipulación oportuna de variables de entrada. Un objetivo de la implementación de estrategias de control en procesos anaerobios es su operación estable a su máxima productividad (Vargas *et al.* 2016; Stanke-M, 2019). La acción de control más simple para un bioproceso es un control a lazo abierto en donde la acción de control, es decir, un cambio en una variable manipulada, se realiza siguiendo una trayectoria predefinida (Ferrero *et al.* 2012). A diferencia de un sistema de control a lazo abierto, en un sistema de control a lazo cerrado, la variable de entrada es ajustada por el controlador para minimizar el error entre la variable de salida y su punto de ajuste, es decir, el enfoque consiste en agregar una retroalimentación (Stanke-M, 2019).

Algunos de los objetivos del control automático pueden lograrse con el apoyo de algoritmos de control para volumen, caudal, temperatura, pH, oxígeno disuelto, y su medición en línea, los cuales constituyen señales útiles para la implementación de las estrategias de optimización en tiempo real. Dichas estrategias abarcan una familia de métodos de optimización que incorporan mediciones de proceso para impulsar un proceso real a un rendimiento óptimo (Marchetti *et al.* 2016). Algunas estrategias de optimización aplicadas para maximizar la producción de H_2 se presentan en la Tabla 1.3. Una estrategia que ha sido propuesta para sistemas anaerobios es el control predictivo basado en modelo (MPC por sus siglas en inglés, “*model predictive control*”), que se refiere a un algoritmo complejo que calcula el comportamiento requerido de la variable manipulada (por ejemplo, el TRH) con base en una predicción hecha a través de un modelo matemático de la dinámica del proceso (considerando cinéticas de crecimiento y consumo). Para ello es necesaria la medición de las variables de estado, que usualmente no pueden medirse en

tiempo real (concentración de biomasa, carbohidratos, concentración de AGV), lo que dificulta su implementación práctica y además requiere un esfuerzo computacional considerable (Hess & Bernard, 2009). Un ejemplo de ello es el propuesto por Aceves-Lara *et al.* (2010) para el control óptimo de la producción de H₂, sometiendo a un CSTR a perturbaciones donde el MPC variaba el flujo de entrada cuando estimaba una tasa de flujo “óptima” para la concentración de entrada. Sin embargo, esta propuesta fue probada empleando glucosa como sustrato y también mediante simulaciones numéricas.

Por otro lado, los avances tecnológicos en la instrumentación permiten un monitoreo en línea (en tiempo real) de algunos parámetros operacionales, logrando una detección rápida de las perturbaciones. Estos instrumentos mandan una señal de alerta a los algoritmos de control y promueven una respuesta inmediata para estabilizar al sistema (Nguyen *et al.* 2015).

Otro algoritmo de optimización en tiempo real es la estrategia de control por búsqueda de extremos (ESC por sus siglas en inglés, “*Extremum Seeking Control*”), que únicamente requiere la medición en tiempo real de la variable que se busca optimizar y no necesita un modelo matemático explícito de la dinámica del proceso. El ESC tiene la desventaja de que el objetivo se alcanza muy lentamente, ya que requiere operar cerca de estados estacionarios, es decir, aquellos valores que alcanzan las variables después de operar por un periodo largo sin perturbaciones (Ramírez-Morales *et al.* 2015; Ramírez-Carmona *et al.* 2018). Sin embargo, Ramírez-Carmona *et al.* (2018) proponen una estrategia de tipo ESC, que tampoco requiere un modelo matemático explícito y se basa en una técnica de perturbaciones con dos valores en la variable de entrada, lo cual lleva al sistema a no asumir ningún estado estacionario y le permite alcanzar su punto de operación máximo en periodos cortos y de una manera más rápida. Esta estrategia ha sido denominada como control de búsqueda rápida de extremos (FESC). Sin embargo, la estrategia no ha sido probada experimentalmente y está basada en un modelo matemático muy simplificado de un biorreactor.

Tabla 1.3 *Aplicación de estrategias de optimización en la producción de H₂ en CSTR.*

Sustrato	pH	Temperatura °C	TRH (h)	TPH	Estrategia	Referencia
				(mL H ₂ / L _{Reactor} -h)		
Melaza	5.5	37	6	638	MCP	Aceves-Lara <i>et al.</i> (2008)
Melaza	5.5	37	3-6	De 283 a 496	MCP	Aceves-Lara <i>et al.</i> (2010)
Glucosa	5.5	37	10, 5 y 3	De 311 a 442	Optimización en tiempo real	Monroy <i>et al.</i> (2018)
Glucosa	5.5	35	6-12	De 371 a 1058	ESC	Ramírez-Morales <i>et al.</i> (2015)

1.5.1. TRH como variable de operación en la estrategia de control

Para optimizar la eficiencia de la producción de H_2 , debe considerarse una estrategia de control apropiada con base en las variables de operación. Generalmente, el valor óptimo de TRH con el que se alcanza la máxima producción de hidrógeno es cercano al valor máximo de la TCO con la que se pueden operar los sistemas de biomasa fija (Torres Zuñiga *et al.* 2018). Por lo tanto, operar con un TRH por debajo del valor óptimo podría sobrecargar el sistema, pero únicamente si se opera a esas condiciones por un periodo suficientemente largo (Vargas & Moreno, 2015). En cambio, se ha logrado predecir con base a un análisis del modelo matemático del proceso (es decir, las ecuaciones que definen el proceso), que si se opera con un TRH bajo por un periodo corto, lo que constituye un choque de concentración de sustrato, provoca un aumento significativo en la productividad de hidrógeno, con una posterior disminución de dicha productividad (Ramírez-Carmona *et al.* 2018; Monroy *et al.* 2018). Este fenómeno ha sido aprovechado para realizar un control retroalimentado que decida automáticamente cuándo realizar los cambios de TRH. Lo hace en cuanto se detecte un valor máximo en la TPH y el sistema regrese a una operación estable, evitando su sobrecarga. Sin embargo, con respecto a las referencias presentadas en la Tabla 1.3 esto solamente ha sido implementado en reactores con configuración CSTR y con el uso de sustratos modelo o muy similares a dicha composición.

1.6. Escalamiento de sistemas para la producción de H_2

Además del desarrollo de procesos de producción estable para la producción de H_2 , y la aplicación de sistemas de control automático que permitan su optimización en línea, es de interés evaluar la escalabilidad del proceso para una futura aplicación. En este sentido, a escala laboratorio la probabilidad de perturbaciones operativas tiende a ser baja debido a las menores escalas de trabajo, lo cual facilita un mejor control de las variables de proceso. Sin embargo, cuando un proceso a escala laboratorio es logrado con éxito, generalmente se procede a llevarlo a cabo en una serie de reactores de escala creciente (por lo general a volumen en escala 1:10) y la optimización del proceso se realiza a escala piloto (volúmenes de reactor de 50 a 300 L) en donde las perturbaciones pueden ser notables, lo cual representa un desafío en la operación, tal como lo reportan Krupp & Widmann (2009). En este último trabajo citado se implementaron tres reactores tipo CSTR con un volumen de trabajo de 30 L, alimentados con glucosa, en donde presentaron dificultades como bombeo, mezcla o el suministro de un flujo de entrada constante; tales aspectos están escasamente abordados en la literatura.

Para llevar a cabo el escalamiento de un proceso, las condiciones operacionales deben ser similares y para ello debe determinarse un criterio de escalamiento (Shin *et al.* 2013). En los procesos de fermentación, la transferencia de masa de oxígeno entre la fase gas-líquido es el factor más importante para el escalamiento, en donde se busca mantener constante el coeficiente de transferencia de oxígeno (kLa) (Xing *et al.* 2009). Su importancia se basa en el efecto del kLa sobre la TPH, rendimientos, la distribución de las rutas metabólicas y la diversidad de las comunidades microbianas (Palomo-Briones *et al.* 2019). El tiempo de mezclado (T_{mix}) es un parámetro que está fuertemente relacionado con el kLa y es clave en el estudio de biorreactores, ya que puede intensificar la transferencia de masa y calor, afectando las reacciones biológicas. Un mezclado insuficiente puede resultar en problemas asociados con la limitación de nutrientes, gradientes de pH y tasas de transferencia de

oxígeno insuficientes, especialmente el caso a gran escala cuando los tiempos de mezcla son del orden de minutos (Ordaz *et al.* 2018; Gabelle *et al.* 2011). Así mismo, el T_{mix} se define como el tiempo necesario para lograr un grado específico de homogeneidad en el líquido y se basa en mediciones físicas como el pH, utilizando una reacción ácido/base en presencia de dos indicadores de pH (Shin *et al.* 2013 M. Zlokarnik *et al.* 2003).

Algunos estudios relevantes para la producción de H_2 realizados a nivel piloto se presentan en la Tabla 1.4, en donde Ren *et al.* (2006), operando un sistema continuo, no observaron producción de H_2 al operar a un TRH de 10.5 h, sin embargo, al disminuir el TRH a 4 h la productividad incrementó a 200 mL H_2 /L- h. Por otro lado (Lin *et al.* 2011) evaluaron el cambio de TRH (12 h, 8 h y 4 h) variando también la concentración de sustrato, donde obtuvieron la mayor tasa de producción de H_2 empleando una concentración de sacarosa de 30 g DQO/L a un TRH de 6 h. También Lu *et al.* (2019) variaron el TRH (48 h, 24 h y 12 h) en un fermentador de 3 m³ que consta de tres cámaras secuenciales de 1 m³ cada una, reportando una TRH óptima de 24 h a una concentración de glucosa de 30 gDQO/L, en la que lograron una mezcla suficiente del medio y los tiempos de fermentación para todas las cámaras, obteniendo una tasa máxima de 92 mL H_2 /L-h. Sin embargo, a pesar de que los criterios de escalamiento a nivel piloto de fermentación convencionales pueden aplicarse en procesos de fermentación oscura, estos han sido escasamente abordados en la producción de H_2 .

Tabla 1.4 *Antecedentes de sistemas empleados en la producción de H_2 a escala piloto.*

Reactor	Sustrato	Volumen de reactor (L)	TPH (mL H_2 /L- h)	Referencia
CSTR	Glucosa	3,000	93.5	Lu <i>et al.</i> (2019)
CSTR	Sacarosa	400	594	Lin <i>et al.</i> (2011)
Lote secuencial	Efluentes destilados	10,000	2.1	Vatsala <i>et al.</i> (2008)
CSTR	Melaza fermentada	1,500	200	Ren <i>et al.</i> (2006)

2. JUSTIFICACIÓN

Los efluentes vitivinícolas poseen características como la alta concentración de materia orgánica, sólidos suspendidos, pH ácido, carbohidratos y nutrientes, que los convierte en un sustrato que puede ser aprovechado para su valorización en la generación de biocombustibles, como lo es la producción de H_2 a través de la fermentación oscura (Mejía-Saucedo, 2018; Cortez-Cervantes, 2019).

Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se ha enfocado principalmente en la evaluación de parámetros operativos como pH, temperatura, carga orgánica, tiempos de retención hidráulica (TRH), fuente de inóculo, con el fin de obtener altas TPH y estabilidad en los sistemas (Albarrán *et al.* 2017; Mejía-Saucedo, 2018; Cortez-Cervantes, 2019). Acorde a esto, este trabajo se enfoca en maximizar la TPH, lo cual es posible con la aplicación de una estrategia de control automático en tiempo real, lo que facilita el control del proceso y constituye una herramienta útil para la implementación de estos sistemas a escala real. Actualmente las estrategias de control para la optimización de la producción de H_2 más prometedoras se han basado en la optimización en tiempo real, en donde a partir de variaciones en el TRH se ha logrado aumentar la productividad de H_2 hasta 1058 mL H_2 /L-h. (Ramírez-Morales *et al.* 2015); sin embargo, dichas estrategias solo se han aplicado en reactores con configuración CSTR alimentados con sustratos modelo, por lo que su evaluación en reactores de biomasa fija alimentados con sustratos reales es de interés para la aplicación a escala real del proceso de fermentación oscura.

Con base a los valores de producción estables obtenidos por Cortez-Cervantes (2019), en este trabajo se dará seguimiento al proceso de producción continua de H_2 en un sistema anaerobio de biomasa fija tipo filtro percolador con la aplicación de una estrategia de control automático retroalimentado tipo FESC propuesta por Ramírez-Carmona *et al.* (2018). Se espera que al someter al sistema a perturbaciones alternando dos TRH; uno que se encuentre por debajo del valor óptimo, lo que significaría un choque de carga orgánica, y otro que se encuentre por arriba de este valor, se obtenga una TPH óptima utilizando efluentes de la industria vitivinícola como sustrato real. La estrategia de control retroalimentado FESC ha sido diseñada basada en un modelo matemático y comprobado mediante simulaciones numéricas, pero no ha sido aún probada en condiciones experimentales reales.

Adicionalmente a la optimización en línea del proceso, otro hito en la factibilidad del proceso de la producción de hidrógeno es el escalamiento del proceso. Si bien existen evidencias de sistemas de producción de hidrógeno a escala piloto (Ren *et al.* 2006; Lin *et al.* 2011; Lu *et al.* 2019), no se han determinado criterios de escalamiento que permitan realizar este proceso de manera sistemática. En este trabajo se propone el escalamiento de un sistema de producción de H_2 basado en un reactor tipo filtro percolador, utilizando como criterio de escalamiento el tiempo de mezclado con el fin de mantener la productividad de H_2 y evaluar su desempeño como aporte a una posterior aplicación a escala industrial.

3. HIPÓTESIS

Mediante la aplicación de una estrategia de control automático en línea basado en choques de carga orgánica es posible optimizar la producción de H_2 en sistemas de biomasa fija empleando efluentes vitivinícolas como sustrato. El tiempo de mezclado como criterio de escalamiento permite mantener la productividad de hidrógeno en un reactor piloto tipo filtro percolador.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de implementar una estrategia de control automático tipo FESC en la producción de hidrógeno, y su posterior escalamiento empleando efluentes vitivinícolas en reactores tipo filtro percolador.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de aplicar choques de carga en la producción de hidrógeno utilizando lías y vinazas vitivinícolas para la producción de biohidrógeno.
- Evaluar la implementación de la estrategia de control tipo FESC para optimizar la producción de H_2 , basada en choques de carga a diferentes TRH.
- Determinar el efecto de la estrategia de control automático en la diversidad de las comunidades microbianas productoras de H_2 .
- Evaluar el escalamiento de la producción de H_2 en un reactor tipo filtro percolador a nivel piloto.

5. METODOLOGÍA

5.1. Inóculo y sustratos

Para la inoculación de los reactores se siguió la metodología modificada reportada por Fernandes *et al.* (2013), en donde los microorganismos se obtuvieron de la fermentación natural del sustrato. Para el reactor a escala laboratorio se utilizaron 500 mL de lías y 500 mL de vinazas. Se ajustó el pH a 7.0 con solución de NaOH 10N; ambos sustratos se mantuvieron a temperatura ambiente (aprox. 25°C) por 72 horas en recipientes abiertos para favorecer el proceso de fermentación.

En el caso del reactor piloto se siguió la misma metodología. Para la evaluación preliminar se emplearon 10.5 L de sustrato modelo (sacarosa grado alimenticio 20 g/L) y para su posterior evaluación en el escalamiento como reactor filtro percolador se emplearon 10.5 L de vinazas.

Se utilizaron inicialmente dos efluentes típicos de la industria vitivinícola: lías y vinazas. Estos efluentes se obtuvieron de una bodega ubicada en el municipio de Ezequiel Montes, Querétaro, México y con la finalidad de conocer la composición de ambos sustratos, se llevó a cabo la caracterización de dichos efluentes. Sin embargo, debido a la limitación en la disponibilidad de las vinazas, se preparó un sustrato sintético emulando la concentración de sus componentes principales, utilizando glicerol grado alimenticio (99%, “La Corona”), ácido láctico (88%, “Golden Bell reactivos”), ácido acético (99%, “Golden Bell reactivos”) y como carbohidratos se empleó sacarosa grado alimenticio, dichas concentraciones se presentan en la Tabla 5.1.

Las lías se acondicionaron filtrándolas por medio de tela gasa de algodón (no estéril) para después tamizarlas a través de mallas 0.5, 0.4, 0.3 y 0.2 mm, en serie, con el fin de eliminar la mayor parte de los sólidos; en el caso de las vinazas, debido a su bajo contenido de sólidos (Tabla 6.1), no se filtraron para su uso. Los sustratos se ajustaron a una dilución 1:2 con agua de la llave, esto con respecto a lo reportado por Cortez-Cervantes (2019) donde se determinó la carga orgánica máxima posible para las lías a esa dilución. Así mismo, se ajustó el pH a 5.5 antes de alimentar los reactores, tal como recomiendan Mejía-Saucedo (2018) y Cortez-Cervantes, (2019).

Tabla 5.1 *Composición de vinazas sintéticas*

		Componente (gDQO/L)			
		Ácido acético	Ácido láctico	Glicerol	Carbohidratos solubles
Laboratorio	Vinaza lote 1	5.8	5.5	11.2	3.6
	Vinaza sintética lote 1				
Piloto	Vinaza lote 2	2.5	8.5	4.4	1.3
	Vinaza sintética lote 2				

Para la evaluación preliminar del reactor piloto se empleó sacarosa como sustrato modelo con una concentración de 20 g DQO/L, como fuente de nutrientes y medio buffer se preparó una solución modificada descrita por Mizuno *et al.* (2000), en donde la concentración de la alimentación contenía: 42 g CH₄N₂O, 29 g K₂HPO₄, 3.6 g MgCl₂·6H₂O, 1 g FeSO₄·7H₂O, 72 mg CoCl₂·6H₂O, 72 mg MnCl₂·4H₂O, 72 mg KI, 14.4 mg NiCl₂·6H₂O, 14.4 mg ZnCl₂.

5.2. Diseño de reactores

En la Tabla 5.2 se presentan las dimensiones específicas de diseño de los reactores escala laboratorio y piloto, tomando como criterios de dimensionamiento el área de soporte específica y la relación volumen de soporte/ volumen de trabajo. Así mismo, se determinó el TRH en función del volumen de trabajo en ambas configuraciones. Como soportes de la biomasa se utilizaron anillos de polietileno de alta densidad (HDPE) (2H, BCN 009 plus, Alemania), con dimensiones de largo, alto y ancho aproximadas de 1 cm, 1 cm, 0.7 mm, respectivamente, con una densidad de 0.92 g/cm³ y una relación área/volumen (A/V) de 68.7 cm²/cm³.

Tabla 5.2 Dimensiones de reactores

Característica	Filtro percolador		Lecho empacado
	Reactor laboratorio	Reactor piloto	Reactor piloto
Material de construcción	Acrílico	Acero inoxidable	Acero inoxidable
Altura	36.5 cm	1.16 m	1.16 m
Diámetro	9 cm	24 cm	24 cm
Vol. Trabajo*	1 L	21 L	37 L
Vol. Líquido	500 ml	12 L	37 L
Vol. Total	2 L	42 L	42 L

*Volumen ocupado por empaques

En la configuración del reactor tipo filtro percolador a escala laboratorio (Figura 5.1) se emplearon bombas peristálticas para la alimentación y recirculación en flujo descendente. Ambos flujos ingresaron al reactor a través de un micro-aspersor (MS7PC9D, Toro, Estados Unidos) con diámetro de orificio de boquilla de 0.6 mm, el cual cuenta con un deflector giratorio retráctil que permite una aspersión uniforme del influente; mientras que el efluente se retiró mediante un sifón en la parte inferior del reactor. El flujo de biogás se midió utilizando un medidor de flujo volumétrico (µflor, Bioprocess Control, Suecia), y la temperatura se controló mediante un criotermostato de circulación (RT4, Vivo Itherm, Alemania). En el caso del reactor a escala laboratorio, el sistema estaba conectado a un controlador lógico programable (PLC, INVT, Shenzhen China) a través de un sistema de control y adquisición de datos (SCADA) el cual registró lecturas del flujo y volumen de biogás cada segundo.

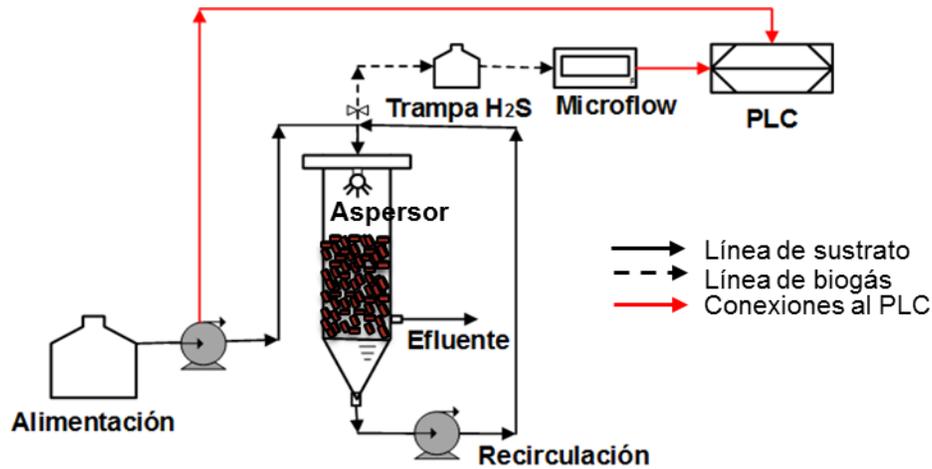


Figura 5.1 Esquema del reactor filtro percolador escala laboratorio

El reactor piloto cuenta con un sensor de temperatura tipo RTD, salida para medidor de gas con válvula para cápsula de toma de muestras y entrada superior de 2" (válvula de bola) para alimentación de reactivos u otros materiales, alimentación 110 VAC. Está controlado por un PLC y operado por medio de una PC con el software Infilink para control supervisorio con capacidad para manejar hasta 128 variables, con gráficos dinámicos, registro de eventos y alarmas, gráficas de históricos y en tiempo real, tal como se muestra en las Figuras 5.2 y 5.3.

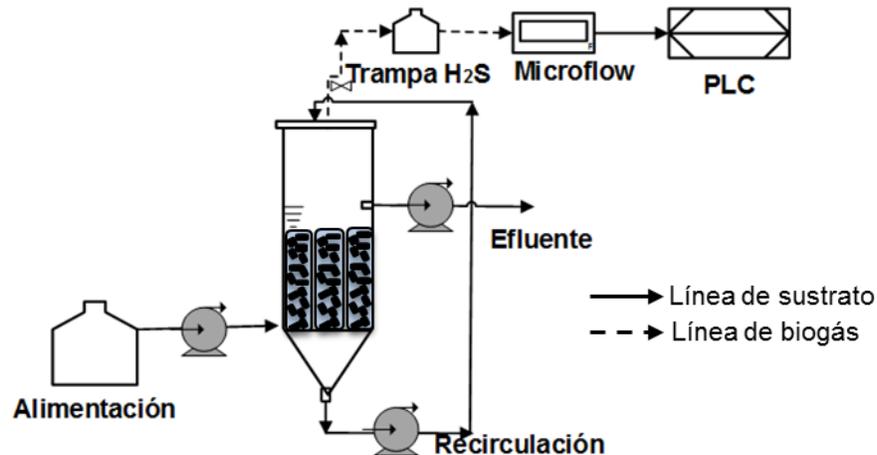


Figura 5.2 Esquema del reactor piloto PBR

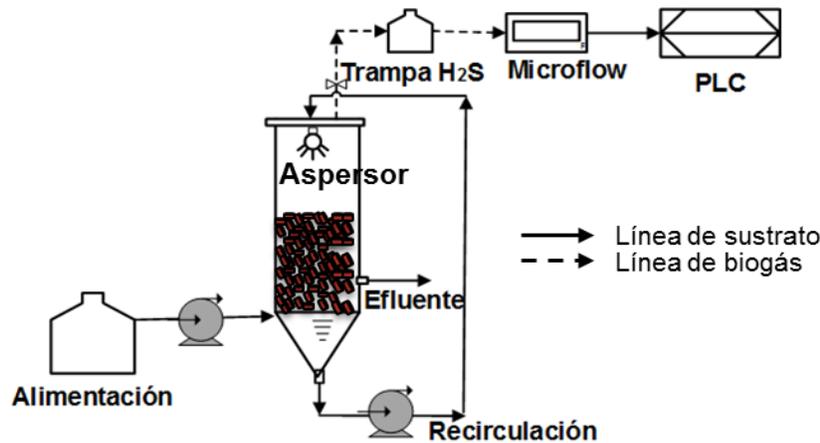


Figura 5.3 Esquema del reactor filtro percolador escala piloto

5.3. Operación del reactor filtro percolador a escala laboratorio

El proceso de inoculación del reactor filtro percolador se basó en colocar 1080 soportes (1 L de volumen de trabajo) dentro del reactor. Posteriormente, se colonizaron los soportes recirculando el inóculo fermentado (velocidad ascensional de 2 m/h) a través del reactor durante tres días para asegurar la adhesión de la biomasa en los soportes.

El arranque del reactor constó en un periodo de 30 días a una carga de 467 g DQO/L-d y un TRH de 5.5 h empleando lías, en donde se evaluó la estabilidad del sistema previamente a realizar la implementación de la estrategia de control. Posteriormente, cuando se realizó el cambio de sustrato a vinazas, se realizó nuevamente una operación previa de 7 días a una carga de 181 g DQO/L-d a TRH de 5.5 h. En ambas etapas se realizaron análisis de composición de biogás, metabolitos y se tomaron muestras de ADN para el posterior análisis de las comunidades microbianas. Durante el arranque y etapas posteriores la temperatura del reactor se mantuvo a 37 °C.

5.3.1. Estrategia experimental

La implementación de la estrategia de control se dividió en dos etapas, como se describe en el siguiente apartado, siendo la primera una evaluación del sistema sin control automático, es decir, con la implementación de choques de carga programados a dos TRH (a lazo abierto). Posteriormente se evaluó la implementación de la estrategia de control automático en la optimización de la producción de H₂ (a lazo cerrado).

5.3.2. Choques de carga programados a lazo abierto implementando lías y vinazas (etapa I)

En la primera etapa, se evaluó la producción de H₂, fijando dos TRH, 5.5 y 3 h, correspondiente a una condición estable y a un choque de carga, respectivamente. El TRH estable se determinó previamente en un reactor filtro percolador a 505 g DQO/L-d con lías vitivinícolas (Cortez-Cervantes, 2019); el TRH de 3 h se estableció como choque de carga, en el cual en menos de 24 h de operación continua, la producción de H₂ cesa (pruebas experimentales previas). Las cargas orgánicas fueron de 467 y 856 gDQO/L-d,

con una duración de 18 y 6 h, respectivamente, empleando lías como sustrato, tal como se muestra en la Figura 5.4.

Posteriormente, se evaluaron los choques de carga utilizando vinazas como sustrato, con cargas orgánicas de 181 y 332 g DQO/L-d, variando la duración del TRH estable (5.5 h) a 4 h, con la finalidad de reducir el tiempo de estabilidad del reactor, tal como se observa en la figura 5.5. Las diferentes TCO evaluadas utilizando lías y vinazas se debe a la diferencia en la concentración orgánica de cada efluente (Tabla 6.1).

Se tomaron mediciones del flujo de biogás cada 30 segundos a través del PLC, esto con el fin de verificar los picos de productividad al alternar los TRH. También se tomaron muestras para composición de biogás, muestras para análisis de metabolitos dos veces por día correspondiente a cada TRH para su posterior análisis de composición por cromatografía de gases y muestras para análisis de la comunidad microbiana productora de H₂.

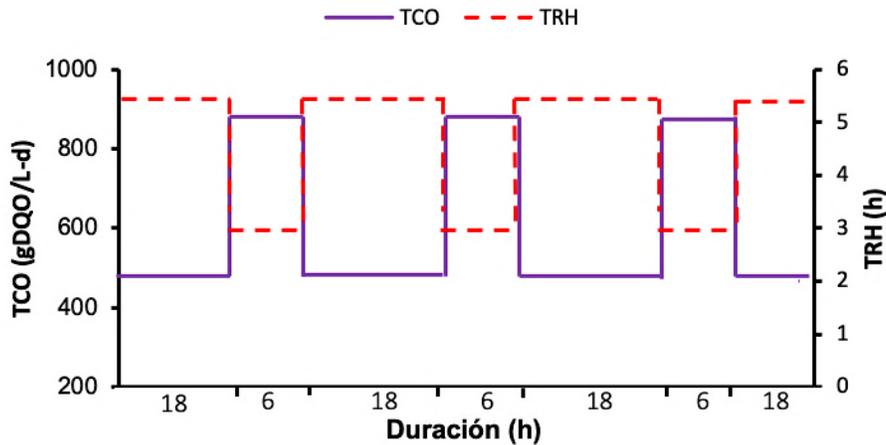


Figura 5.4 Esquema de los choques de carga programados empleando lías

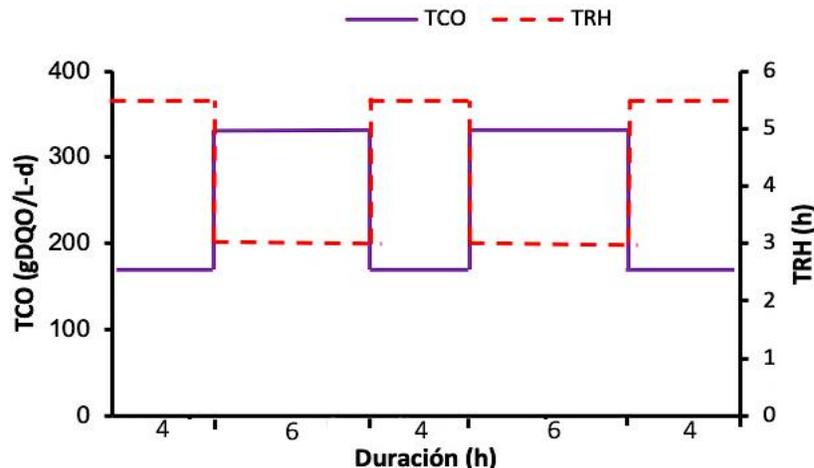


Figura 5.5 Esquema de los choques de carga programados empleando vinazas.

5.3.3. Implementación de la estrategia de control automático a lazo cerrado implementando vinazas sintéticas (etapa II)

De acuerdo con los picos de productividad de hidrógeno y tiempos de operación observados a lazo abierto durante la etapa I ($\text{mL H}_2/\text{L}_{\text{Reactor}}\text{-h}$), cuando el sistema es sometido a un choque de carga con la disminución del TRH a 3 h, se definieron los tiempos de operación del algoritmo de control a lazo cerrado. Este algoritmo de control se basó en lo propuesto por Ramírez-Carmona (2018), en donde se puede apreciar que el comportamiento al realizar el cambio de TRH consiste en primeramente un decrecimiento en la productividad seguido de un incremento de esta, alcanzando primero un mínimo, seguido de un máximo. Este máximo se explica por la productividad máxima debido al incremento de carga orgánica a un TRH bajo, con el posterior decremento debido a la sobrecarga del sistema; mientras que después de este decremento, el mínimo corresponde a menor productividad y posterior recuperación al cambiar el TRH al valor de estabilidad como puede observarse en la Figura 5.6. El diseño de la acción del algoritmo de control, y su posterior programación se realizó con el apoyo del equipo de trabajo dedicado a modelado y control de procesos de la Unidad Académica Juriquilla.



Figura 5.6 Comportamiento de la productividad ante choques de carga.

La acción del algoritmo se presenta en la Figura 5.7. Cuando se realiza un cambio de TRH, el algoritmo inicia un contador de tiempo T_c (un temporizador). Si se detecta un mínimo antes de que T_c sea mayor a un tiempo preestablecido T_{min} , inicia la búsqueda del máximo. Si el mínimo no es detectado antes de T_{min} , de fuerza al cambio para la búsqueda del máximo. De manera similar, si se detecta un máximo en la productividad, cambia el valor de TRH, pero si el temporizador alcanza el valor de T_{max} antes de la detección del máximo, se fuerza el cambio de TRH. El mismo algoritmo opera con cualquier TRH y la definición de T_{min} y T_{max} asegura que el TRH no cambiará antes de T_{min} y seguramente cambiará con T_{max} . Los algoritmos para la detección del mínimo y del máximo han sido descritos previamente (Bustillo-Castillo, 2020), los cuales dependen de hacer comparaciones con los valores históricos de la señal de productividad que está siendo almacenada.

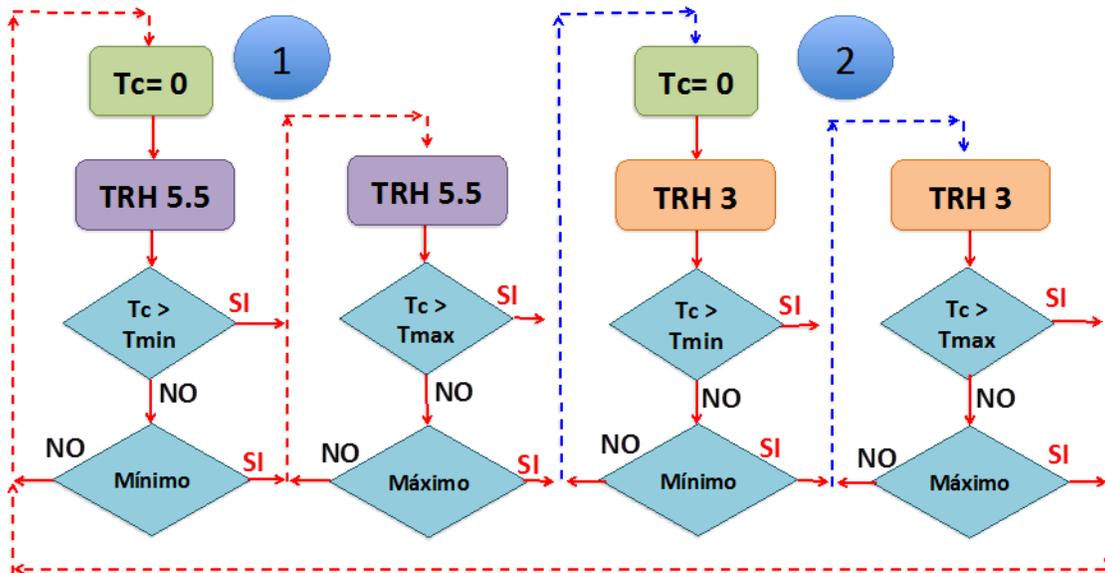


Figura 5.7 Acción del algoritmo. En donde: T_c , contador de tiempo; T_{min} , tiempo mínimo de operación para encontrar un mínimo (4 h); T_{max} tiempo máximo de operación para encontrar un máximo (6 h); TRH 5.5, TRH estable; TRH 3, TRH choque de carga.

En esta etapa se empleó como sustrato las vinazas sintéticas del lote 1 mencionado anteriormente en la Tabla 5.1. De esta manera durante la implementación de la estrategia de control a lazo cerrado se operó a cargas orgánicas de 121 y 221 g DQO/L-d, correspondientes a TRH de 5.5 y 3 h, respectivamente.

Posteriormente, se determinaron los T_{min} y T_{max} , así como los caudales respectivos para cada TRH (Tabla 5.3) y se prosiguió a la implementación y programación del algoritmo en el PLC, una de cuyas pantallas para el usuario se muestra en la Figura 5.8. La operación del reactor con la implementación de la estrategia de control se llevó a cabo por un periodo de 10 días consecutivos, en donde se evaluó la TPH, composición y análisis de metabolitos.

Tabla 5.3 Parámetros de operación con el algoritmo de control

Parámetro	TRH (h)	
	5.5	3
Caudal (L/h)	0.18	0.33
T_{min} (h)		4
T_{max} (h)		6

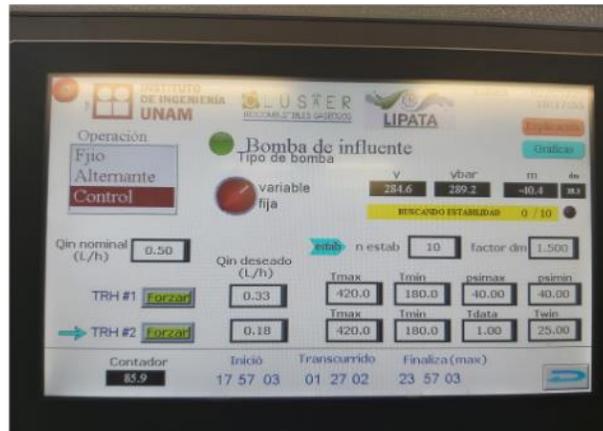


Figura 5.8 Programación del PLC.

5.4. Operación de un reactor de lecho empacado a nivel piloto

Con el fin de evaluar el desempeño y el buen funcionamiento del reactor piloto antes de llevar a cabo el escalamiento, se determinó la productividad de hidrógeno utilizando sustrato modelo en una configuración tipo lecho empacado. La inoculación del sistema se realizó utilizando el sustrato fermentado de manera natural y recirculando como se describió para la configuración del filtro percolador.

Se implementó una carga orgánica de 20 g DQO/L-d y un TRH de 5.5 h. Los empaques (3.15 kg), se dividieron en tres soportes de malla con forma cilíndrica (65 cm de largo y diámetro de 12 cm). Cada uno constó con un volumen de 7 L de empaques, los cuales fueron colocados dentro del reactor para conformar el lecho, tal como se muestra en la Figura 5.9. Esta configuración se ha definido como lecho empacado estructurado, con antecedentes de uso para vinazas de caña de azúcar y lías vitivinícolas (Fuess *et al.* 2016 & de Mejía-Saucedo, 2018). La operación se llevó a cabo durante una semana en donde se evaluó la producción de H_2 (velocidad volumétrica y composición) así como la producción de metabolitos.

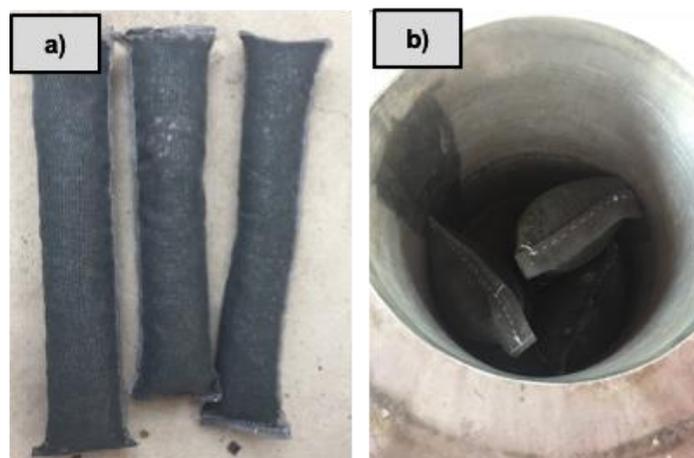


Figura 5.9 Lecho estructurado de reactor PBR. a) Soportes, b) Lecho de soportes

5.5. Escalamiento de reactor filtro percolador

5.5.1. Arranque y operación de reactor tipo filtro percolador

Una vez corroborada la operación del sistema piloto tipo lecho empacado, se realizó el cambio de la configuración del reactor a un filtro percolador, con un volumen de trabajo de 21 L donde los empaques se encontraban dispersos dentro del reactor además de añadir el micro-aspersor, tal como se observa en la Figura 5.10. La inoculación del sistema se realizó con vinazas fermentadas, tal como se describió para el reactor a escala laboratorio.

Se emplearon vinazas como sustrato a una carga orgánica de 104 g DQO/L-d con un TRH de 5.5 h. La operación del reactor se realizó en una semana con la finalidad de valorar el desempeño del reactor, en donde se evaluó la TPH, composición y análisis de metabolitos.

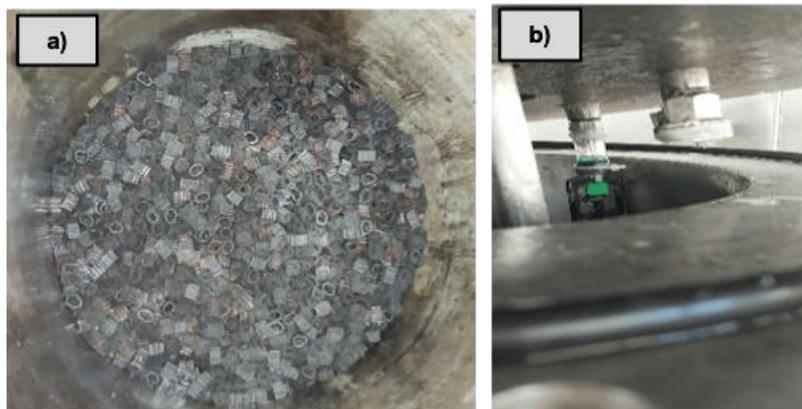


Figura 5.10 Componentes de reactor filtro percolador piloto. a) Soportes dispersos, b) Aspersor

5.5.2. Evaluación del tiempo de mezclado (T_{mix})

Durante el escalamiento se optó por tomar como parámetro de escalamiento el tiempo de mezclado (T_{mix}), de acuerdo con lo sugerido anteriormente por Xing *et al.* (2009). El T_{mix} se determinó para el reactor filtro percolador a escala laboratorio y a escala piloto, con base en una estrategia de choques de pH. Para ello se colocó un electrodo de pH en la recirculación de los reactores el cual se encontraba conectado a un controlador de pH LabQuest Mini (Vernier, USA) para la obtención de datos en tiempo real. Posteriormente se añadieron 3 y 63 mL de HCl 5N en la parte superior del reactor a escala laboratorio y piloto, respectivamente. Se recopilaban datos cada 20 segundos hasta que se reportaran mediciones estables en los valores de pH; esto se repitió por duplicado. Con los datos obtenidos en las mediciones se determinó el tiempo de mezclado mediante la Ecuación 5.1, en donde el T_{mix} se considera cuando el grado de mezcla es de $100 \pm 5.0 \%$ (Ordaz *et al.* 2018). Finalmente se igualaron los T_{mix} a ambas escalas, incrementando la velocidad de recirculación del reactor piloto. Aunado a esto, también se mantuvieron constantes las relaciones presentadas en la Tabla 5.4.

$$\% = \left(\frac{pH_t - pH_o}{pH_\infty - pH_o} \right) * 100 \quad \text{Ec 5.1.}$$

dónde: %, grado de mezcla; pH_t , valor de pH instantáneo; pH_o , valor de pH inicial; pH_∞ , valor de pH final.

Tabla 5.4 *Parámetros de escalamiento*

Reactor	Vol. Trabajo (L)	Área de soporte específica ($m^2/L_{Vol. Trabajo}$)	Relación Vol. Soporte / Vol. Trabajo
Laboratorio	1	3.4	0.5
Piloto	21	3.4	0.5

Se continuó la operación del reactor posteriormente a igualar los T_{mix} por 15 días consecutivos, empleando vinazas sintéticas del lote 2 con la composición presentada anteriormente en la Tabla 5.1, correspondiente a una carga orgánica de 77 g DQO/L-d con un TRH de 5.5.

5.6. Caracterización de la comunidad microbiana

Para caracterizar la composición del consorcio microbiano y conocer la dinámica bacteriana en los reactores, se retiraron muestras de biomasa y se conservaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis. El ADN genómico se extrajo de las muestras de biomasa utilizando el kit ADN PowerSoil® (QIAGEN, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN se cuantificó por espectrofotometría utilizando un NANODrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.). El ADN se envió al Laboratorio de Investigación y Pruebas (RTL, Lubbock, EE. UU.) para la secuenciación de Illumina MiSeq, utilizando los cebadores para bacterias 28F (GAGTTTGATCNTGGCTCAG) y 388R (TGCTGCCTCCCGTAGGAGT) de 16s rADN gen (Barragán-Trinidad *et al.* 2017). El filtrado y análisis de las secuencias se realizó en el software RStudio (v.1.0.153), utilizando el algoritmo DADA2, siguiendo las recomendaciones del desarrollador (Callahan *et al.* 2016).

5.7. Métodos analíticos

Se determinó la DQO total y soluble con el método Hach 435, mientras que los carbohidratos totales y solubles se determinaron de acuerdo con el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). Dichos análisis se realizaron en cada TRH cuando se realizó la estrategia experimental para el reactor a escala laboratorio y 2 veces por semana en periodos estables, tanto para el reactor piloto como para el reactor a escala laboratorio. Los SST, SSF y SSV se determinaron por método estándar (APHA, 2012) en cada TRH (soportes y efluentes) para el reactor a escala laboratorio y cada 10 días para el reactor piloto, así como también se determinaron para los sustratos y biomasa adherida a los soportes en los procesos de inoculación en ambos reactores.

El biogás fue medido a través de un medidor de flujo, mencionado anteriormente, el cual se compone de una cámara de medición ocupada con agua destilada. Se instaló al PLC de acuerdo con el manual de uso otorgado por el fabricante y automáticamente el medidor compensa la temperatura y presión en tiempo real para la normalización del caudal de gas y la medición de volumen a 0 grados Celsius y 1 atmósfera estándar. La composición del gas (H_2 y CO_2) se analizó tomando una muestra 2 veces al día de 5 mL del reactor con ayuda de

una jeringa, succionando y desplazando el biogás tres veces para asegurar la homogeneidad. La muestra se analizó en un cromatógrafo de gases (SRI 8610C, Torrance, CA, USA) el cual se encuentra equipado con un detector de conductividad térmica, dos columnas de acero inoxidable ambas de 6 pies x 1/8 pulgadas (una de tamiz molecular 13x y la otra rellena de gel de sílice), el gas acarreador es nitrógeno con una pureza de 99.99% a una velocidad de 20 mL/min, la temperatura del inyector y del detector se mantuvieron en 100 °C y 150 °C. La temperatura inicial del horno se mantuvo a 40 °C por 4 minutos e incrementando a una temperatura final de 110 °C a una velocidad de 20 °C /min, manteniéndola por 1.5 minutos.

La concentración de AGV y solventes se determinó en cada TRH cuando se realizó la estrategia experimental para el reactor a escala laboratorio y 2 veces por semana en periodos estables, para ambos reactores, tomando una muestra del reactor y se acidificaron a un pH menor a 2 con HCl (para su preservación), se centrifugaron por 10 minutos a 3500 rpm, posteriormente se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis. Para su respectivo análisis se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (1260, Agilent Technologies, CA, USA) equipado con un detector de matriz de diodos de índice de refracción (RID), a una temperatura de 55 °C y acoplado a una columna AMINEX HPX-87 H. Se utilizó una solución 5 mM de H₂SO₄ como eluyente con un flujo de 0.6 mL/min.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización de los efluentes vitivinícolas

Se realizó la caracterización correspondiente a las lías y vinazas empleadas, la cual se describe en la Tabla 6.1 con la finalidad de conocer la composición de ambos sustratos, en donde se puede observar que las lías presentan una concentración elevada principalmente de DQO, SST y etanol, siendo similares a los rangos de caracterizaciones de efluentes de vino tinto y vino blanco; 221-439 g DQO/L, 8-199 g SST/L, 125-210 g DQO_{E_qetanol}/L reportados por Vital-Jacome *et al.* (2020). Por otro lado, las vinazas presentan una composición con concentraciones casi nulas de SST y etanol, y una concentración de DQO menor en comparación con las lías. Sin embargo, esta DQO aún es elevada en comparación con otros sustratos similares provenientes de la fermentación alcohólica como las vinazas tequileras (38 g DQO/L) reportado por Buitrón *et al.* (2014) y de las vinazas de la caña de azúcar (22-45 g DQO/L) reportado por Lázaro *et al.* (2014). A pesar de las variaciones en la composición, tanto las lías como las vinazas poseen altas concentraciones de otros compuestos como ácido acético, ácido láctico y glicerol (presente en las vinazas), los cuales pueden ser aprovechados por las bacterias productoras de hidrógeno como fuente de carbono.

Tabla 6.1 Caracterización de las lías y vinazas crudas

Parámetro	Unidades	Lías	Vinazas
pH	-	3.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1
SST	g/L	52.1 ± 0.5	0.5 ± 1.5
SSV	g/L	42.2 ± 2.7	0.4 ± 1.7
SSF	g/L	9.6 ± 1.3	0.1 ± 3.3
Carbohidratos Totales	g/L	24.3 ± 0.2	4.4 ± 1.5
Carbohidratos Solubles	g/L	7.14 ± 0.6	3.6 ± 1.0
DQO Total	g/L	236 ± 1.0	77 ± 8.0
DQO Soluble	g/L	214 ± 1.8	77 ± 6.0
Ácido acético	g/L	8.4 ± 0.2	9.0 ± 1.0
Ácido propiónico	g/L	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.3
Ácido butírico	g/L	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2
Ácido láctico	g/L	7.2 ± 0.3	10.2 ± 3.4
Ácido succínico	g/L	1.2 ± 0.5	0
Etanol	g/L	46 ± 2.7	0.4 ± 0.2
Glicerol	g/L	ND	7.4 ± 5.3

*ND= No Determinado

6.2. Operación del reactor filtro percolador a escala laboratorio

En la Figura 6.1 se presenta la operación del reactor con ambos sustratos, donde el periodo de arranque del reactor constó de una evaluación por 30 días en el cual se obtuvo una TPH de 11 mL H₂/L_{Reactor}-h. Así también, en la operación al realizar el cambio de sustrato a vinazas, se alcanzó una productividad promedio de 70.1 mL H₂/L_{Reactor}-h y es posible observar que incluso al ser un sustrato con menores concentraciones de compuestos influye de manera positiva en la productividad. Esta influencia positiva en el incremento de la productividad al cambiar el sustrato puede atribuirse a que en las vinazas no se encuentra presente el etanol, el cual ya ha sido reportado como un compuesto inhibidor en la producción de H₂ cuando se encuentra en altas concentraciones. Mejía-Saucedo, (2018)

empleando lías vitivinícolas como sustrato, observó que la TPH disminuyó hasta un 69% a una concentración de 21 g/L de etanol. Así también, Cortez-Cervantes, (2019) evaluó el efecto del etanol en la producción de H₂ empleando glucosa como sustrato. Resultando una disminución de 48% del H₂ en la TPH a una concentración de 33 g/L.

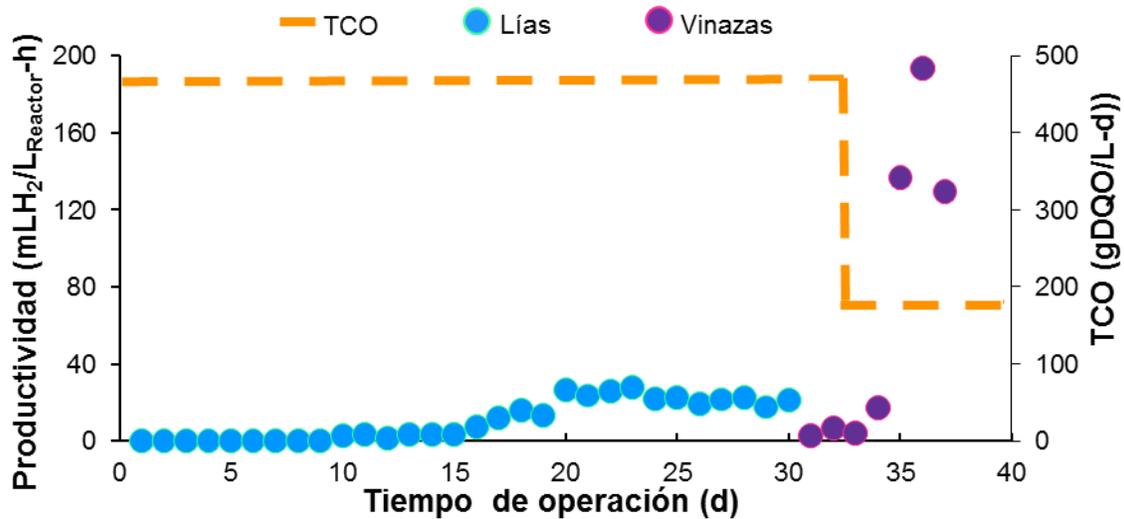


Figura 6.1 Productividad en evaluación previa empleando lías y vinazas.

6.2.1. Choques de carga programados a lazo abierto implementando lías y vinazas (etapa I)

En la Figura 6.2 se presenta el comportamiento de la productividad con la implementación de los choques de carga programados a lazo abierto empleando lías como sustrato, en donde se corrobora el comportamiento decreciente y posterior incremento en la producción de H₂. Sin embargo, puede apreciarse que después de las 40 h de operación (TRH 5.5 h) la producción decrece por completo y posteriormente incrementa, lo cual puede atribuirse al periodo de adaptación del sistema al ser sometido a choques de carga. Así mismo, en la Figura 6.3 se presentan los choques de carga utilizando como sustrato a vinazas, mostrando una influencia positiva en el incremento de la productividad y donde se puede observar un poco más a detalle el comportamiento esperado. Con base en estos datos obtenidos se diseñó e implementó la acción del algoritmo descrito anteriormente en la Figura 5.6.

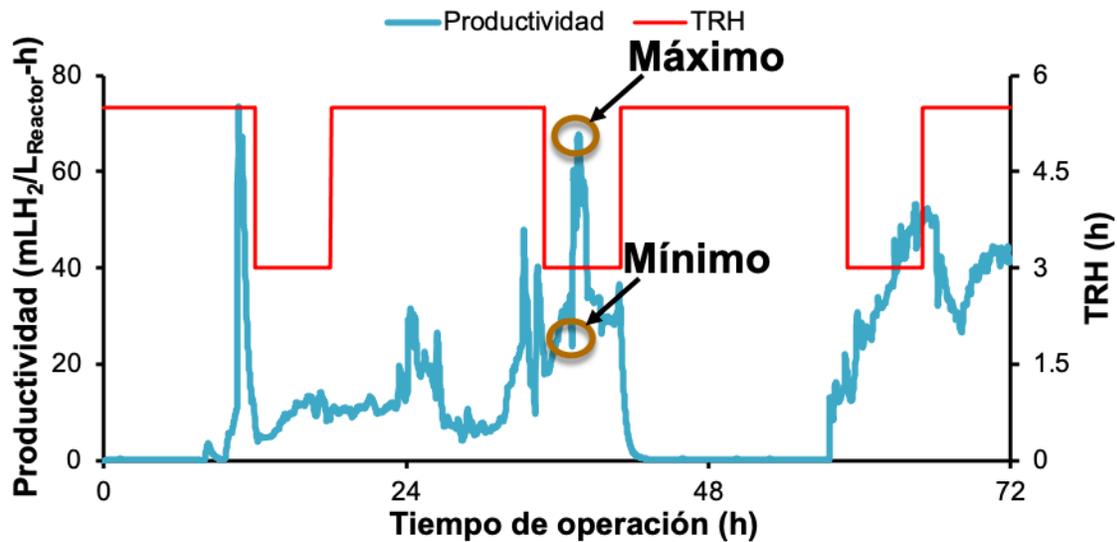


Figura 6.2 Choques de carga programados empleando lías a lazo abierto

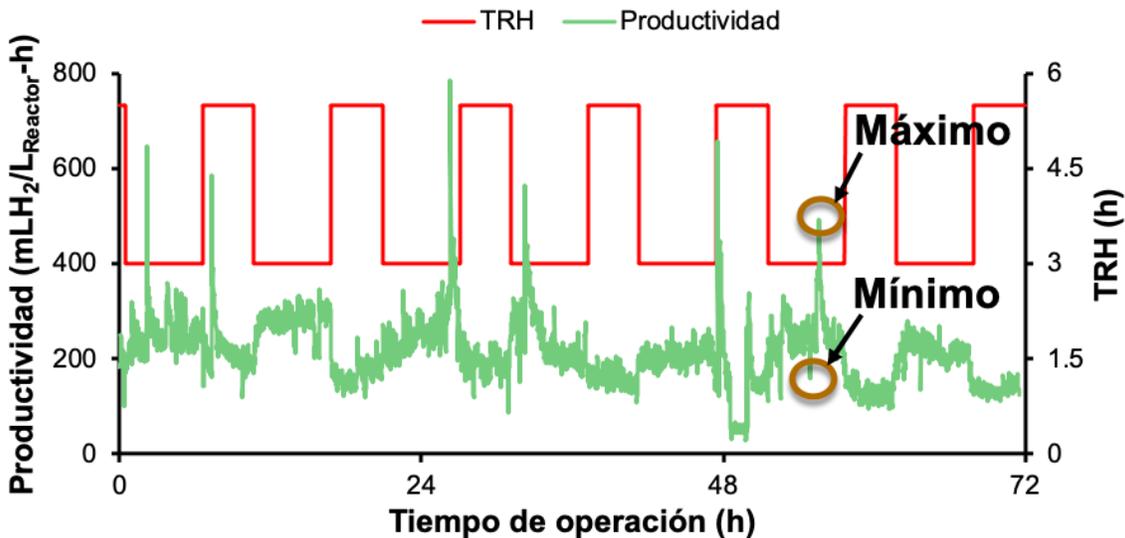


Figura 6.3 Choques de carga programados empleando vinazas a lazo abierto.

En las Figuras 6.4 y 6.5 se observa la distribución de los datos de productividad obtenidos por mediciones tomadas cada segundo del PLC, tomando en cuenta ambos periodos donde se emplearon lías y vinazas, respectivamente. Se puede observar que para la evaluación con lías, la productividad promedio al disminuir el TRH de 5.5 a 3 h incrementó de 5.5 ± 4.6 a 18.6 ± 13 mL $H_2/L_{Reactor-h}$, así como la composición de hidrógeno en el gas también incrementó de 11 a 29 %. En la evaluación con vinazas puede apreciarse la influencia positiva del sustrato aunado a la implementación de los choques de carga, en donde el incremento en la productividad promedio fue de 168.2 ± 55 a 249.8 ± 50 mL $H_2/L_{Reactor-h}$, y el incremento en la composición de H_2 en el biogás fue de 37 a 42 %.

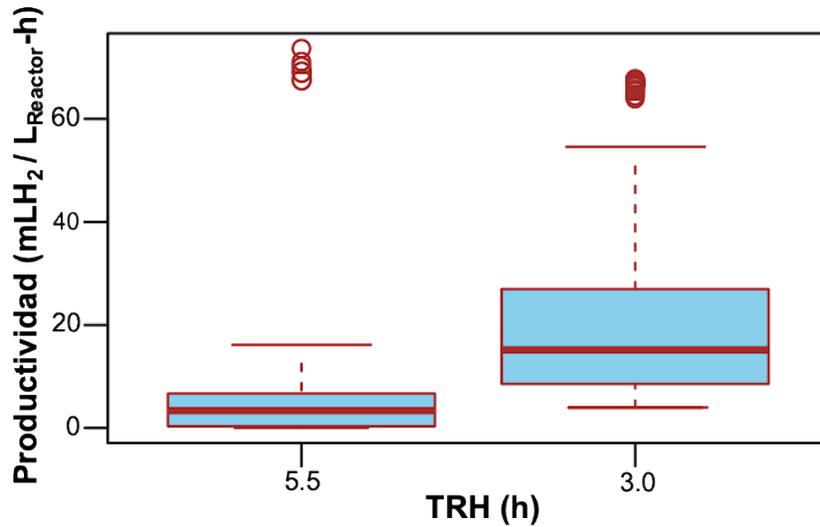


Figura 6.4 Distribución de la productividad de H_2 empleando lías como sustrato. Los cuadros representan el percentil 25–75%, y valor promedio, círculos presentan valores extremos.

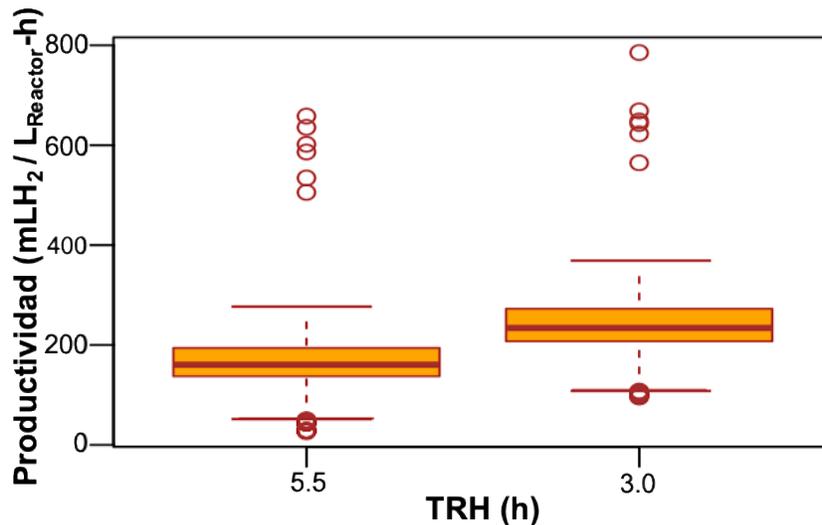


Figura 6.5 Distribución de la productividad de H_2 empleando vinazas como sustrato. Los cuadros representan el percentil 25–75%, y valor promedio, círculos presentan valores extremos.

6.2.2. Implementación de la estrategia de control automático a lazo cerrado empleando vinazas sintéticas (etapa II)

En la Figura 6.6 se presenta el comportamiento de la productividad de H_2 con la implementación de la estrategia de control automático, en donde se corrobora la viabilidad de la acción del algoritmo. Se observa que al operar a un caudal de 0.33 L/h correspondiente a un TRH de 3 h, primeramente el algoritmo detectaba un valor de productividad máximo y posteriormente regresaba al sistema a condiciones estables. Así mismo se puede apreciar que la implementación de una estrategia de control automático basada en someter al sistema a choques de carga con la disminución del TRH por periodos cortos tiene un efecto benéfico en el incremento de la productividad en el tiempo, ya que se

observa que, a partir de las 120 h de operación, la TPH promedio incrementó desde 123 ± 60 hasta 174 ± 36 mL H₂/L_{Reactor}-h.

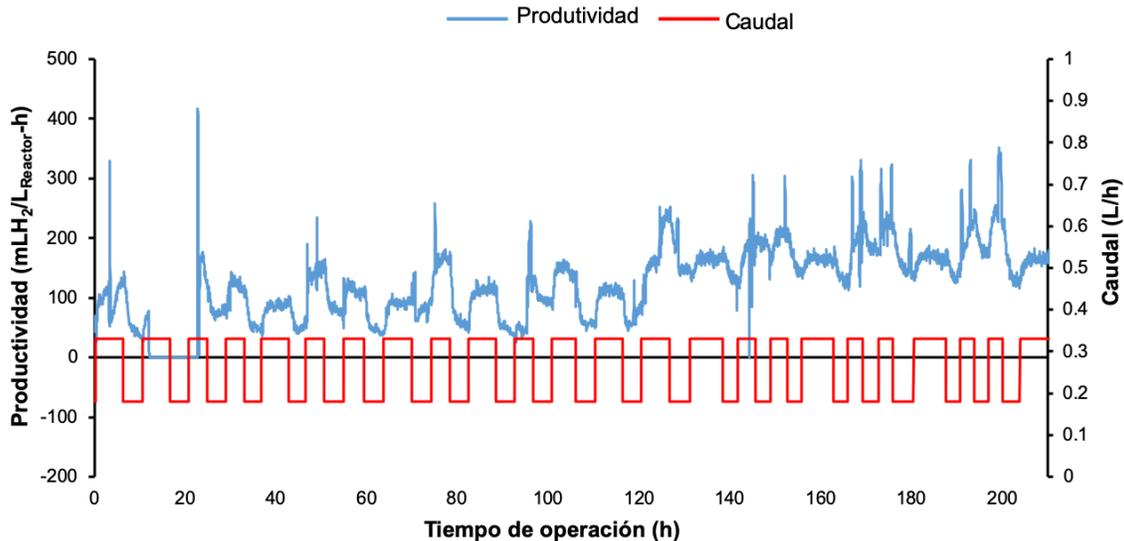


Figura 6.6 Comportamiento de la productividad de H₂ en tiempo real al implementar la estrategia de control automático FESC cambiando de manera automática el caudal.

En la Figura 6.7 se puede apreciar la distribución de la productividad al operar el reactor en condiciones estables (TRH de 5 h) y con la implementación de la estrategia de control a lazo cerrado. La operación con la estrategia de control (Figura 6.6, 120-200 h) incrementó la TPH 86% respecto a la operación sin estrategia (de 93 a 174.4 mL H₂/L_{Reactor}-h), lo que resultó en una diferencia significativa ($p = <0.05$). En la Figura 6.8 se presenta la comparación de la optimización obtenida en este trabajo con las principales estrategias reportadas en la literatura, enfocadas en la optimización de la TPH, en donde se presentan efectos diferentes. Por ejemplo Aceves *et al.* (2010) obtuvieron un incremento en la TPH de 283 a 496 mL H₂/L_{Reactor}-h, correspondiente a un 11% menor a lo obtenido en este trabajo, implementando una estrategia MPC a lazo cerrado y el uso de un observador asintótico para la medición de las variables de estado en el influente y dentro del reactor, operando en un rango de TRH similar a lo evaluado (3 y 6 h) y siendo el caudal de entrada la variable de control. Por otro lado, Ramírez-Morales *et al.* (2015) obtuvieron un incremento en la TPH de 371 a 1058 mL H₂/L_{Reactor}-h, correspondiente a un 99% superior a lo obtenido en este trabajo a una carga orgánica de 100 gDQO/L-d correspondiente a un TRH de 4 h. Sin embargo, es necesario destacar que la operación del sistema abarcó un periodo de 140 días, basada en una relación entre la TCO y la TPH, en donde los cambios en la TCO se realizaron hasta la obtención de una TPH estable definida por una desviación estándar de 0.25. En el caso de Monroy *et al.* (2018) se evaluó el efecto de implementar choques de carga y en una operación de 18 días obtuvieron un incremento en la TPH de 311 a 442 mL H₂/L_{Reactor}-h, correspondiente a un 44% menor a lo obtenido en este trabajo; cabe resaltar que tanto la carga orgánica estable (51.4 gDQO/L-d) correspondiente a un TRH de 10 h y las TCO evaluadas en la estrategia de optimización (100 y 171 gDQO/L-d) correspondiente a TRH de 5 y 3 h respectivamente, fueron menores a las implementadas en este trabajo (121 y 221 gDQO/L-d).

Así mismo, con base en las mediciones de caudal obtenidos del PLC en la implementación de la estrategia de control, se determinó un TRH promedio de 3.7 h, el cual se considera el valor óptimo para operar sin provocar la sobrecarga del sistema. La aplicación de la estrategia de control tipo FESC implicó como principales ventajas operacionales la reducción de tiempo empleado en el seguimiento manual de la productividad para realizar los cambios de TRH. Así también, con la obtención del comportamiento en línea del sistema se reducen los riesgos operacionales, permitiendo intervenir a tiempo si llegara a ocurrir algún problema técnico. Por otro lado, en comparación con las estrategias basadas en MPC, se presenta una principal ventaja de lograr la optimización del sistema de manera rápida sin la limitación de requerir la medición de variables que no pueden medirse en línea y que también puede demandar tiempo operacional o implicar la necesidad de parar la operación del reactor. Aunado a esto, la obtención del TRH óptimo (3.7 h) se logró de manera automática y más rápida, siendo a partir de las 120 h de operación, en comparación a la implementación de una estrategia tipo ESC; tal es el caso de Ramírez-Morales *et al.* (2015) en donde la evaluación de los diferentes TRH dependía de la estabilidad en la producción, lo cual extendió un periodo de operación de 140 días para lograr la máxima TPH y conocer el TRH óptimo. Por otro lado, es pertinente destacar que la estrategia de control se implementó en un PLC comercial con capacidades estándar, sin requerir una computadora personal adicional como en el caso de Ramírez-Morales *et al.* (2015) o de Aceves-Lara *et al.* (2010); esto simplificaría el escalamiento de la estrategia y además lo dotaría de robustez adicional.

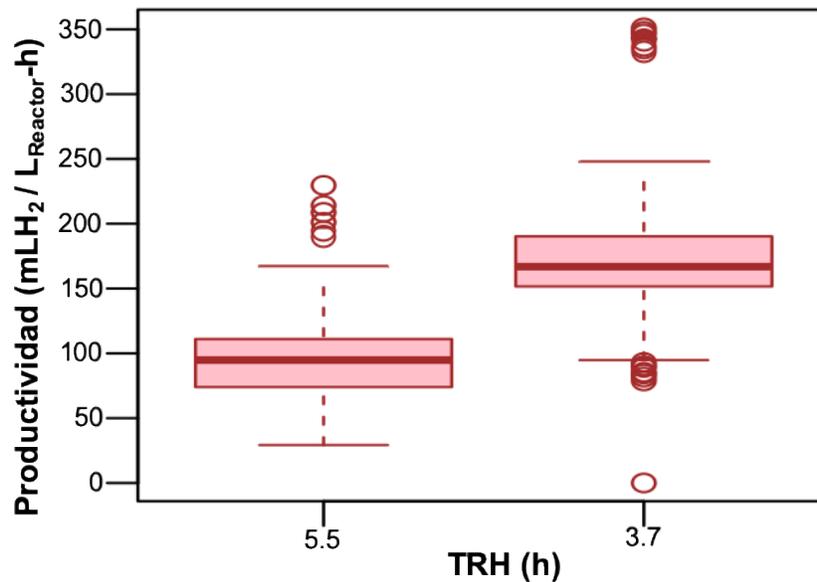


Figura 6.7 Distribución de la productividad de H_2 sin estrategia de control (TRH 5.5 h) y con la estrategia de control automático FESC (TRH 3.7 h). Los cuadros representan el percentil 25–75%, y valor promedio, círculos presentan valores extremos.

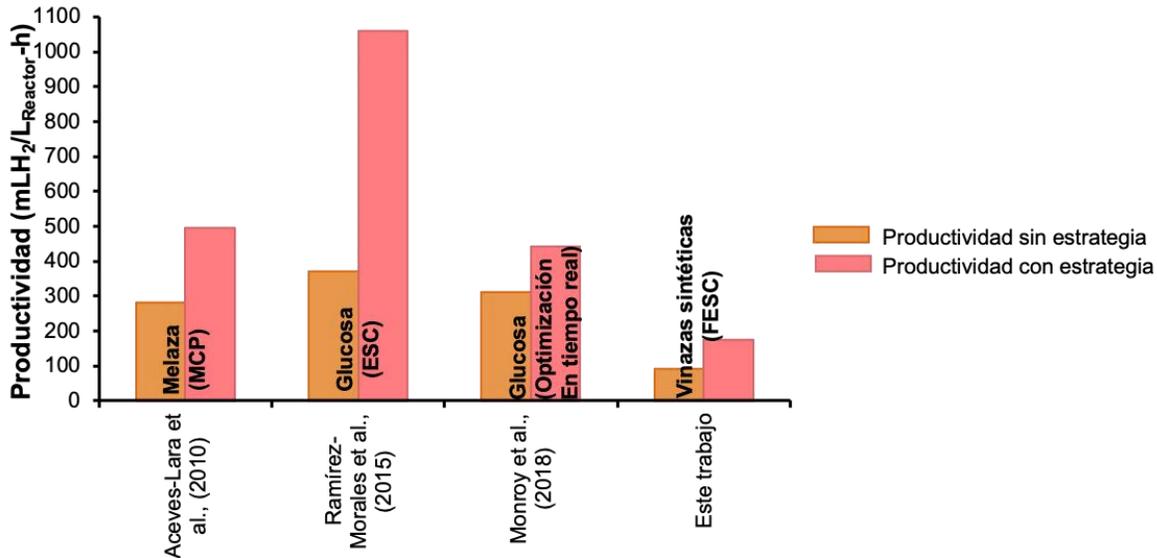


Figura 6.8 Implementación de la estrategia de control en comparación con la literatura.

6.2.3. Balance de DQO de metabolitos

En la evaluación de los choques de carga, tanto para la operación con lías y vinazas con 104 y 38.9 g DQO total, respectivamente, se observó el consumo de ácidos láctico y acético con ambos TRH (5.5 y 3 h), seguido de un ligero consumo de carbohidratos, tal como se puede apreciar en las Figuras 6.9 y 6.10, teniendo como metabolito principalmente el butírico. Esto se puede atribuir a que la producción de H₂ se favoreció a partir del consumo del ácido láctico y acético y no a las rutas metabólicas convencionales a partir del consumo de carbohidratos, lo cual ya ha sido reportado como posible (Mejía-Saucedo, 2018; Cortez-Cervantes, 2019). También, García-Depraect & León-Becerril, (2018) operaron un reactor CSTR empleando vinazas tequileras como sustrato y observaron que el consumo de láctico y acético y un mínimo consumo de carbohidratos está fuertemente relacionado con la producción de H₂ acompañada de la producción de butírico. Así mismo, García-Depraect *et al.* (2017) operaron un reactor CSTR en modo discontinuo, evaluaron los efectos de diferentes proporciones de vinaza / nejayote (agua residual de la nixtamalización) sobre la producción de H₂, asociándola con altos niveles de producción de butirato (de 2.85 a 0.7g) y consumo de lactato y acetato (7.98 a 2.07 g)

Por otro lado, debido a la ausencia del etanol en las vinazas, puede observarse que además del consumo de láctico y acético, existe un consumo mayormente de glicerol, a lo que se atribuye una interacción de rutas metabólicas, lo cual tuvo como atribución el incremento en la TPH. Dicha interacción no se puede apreciar en la evaluación con lías debido a la alta concentración de etanol presente. Las rutas de fermentación del glicerol aún no se han esclarecido en la literatura, pero se ha demostrado que se producen ácido acético, fórmico y etanol, así como H₂ (Murarka *et al.* 2008). También Trchounian & Trchounian, (2015) describen la ruta de fermentación de glucosa y glicerol, obteniendo como subproductos: succínico, acético, etanol, H₂ y CO₂. Así también, se puede apreciar un alto porcentaje de ND, lo cual puede estar relacionado a compuestos que no fueron posibles a determinar.

Es importante resaltar que las rutas metabólicas presentes en las evaluaciones tanto con lías como con vinazas no se ven influenciadas por la implementación de los choques de carga, debido a que con ambos TRH las composiciones son muy similares.

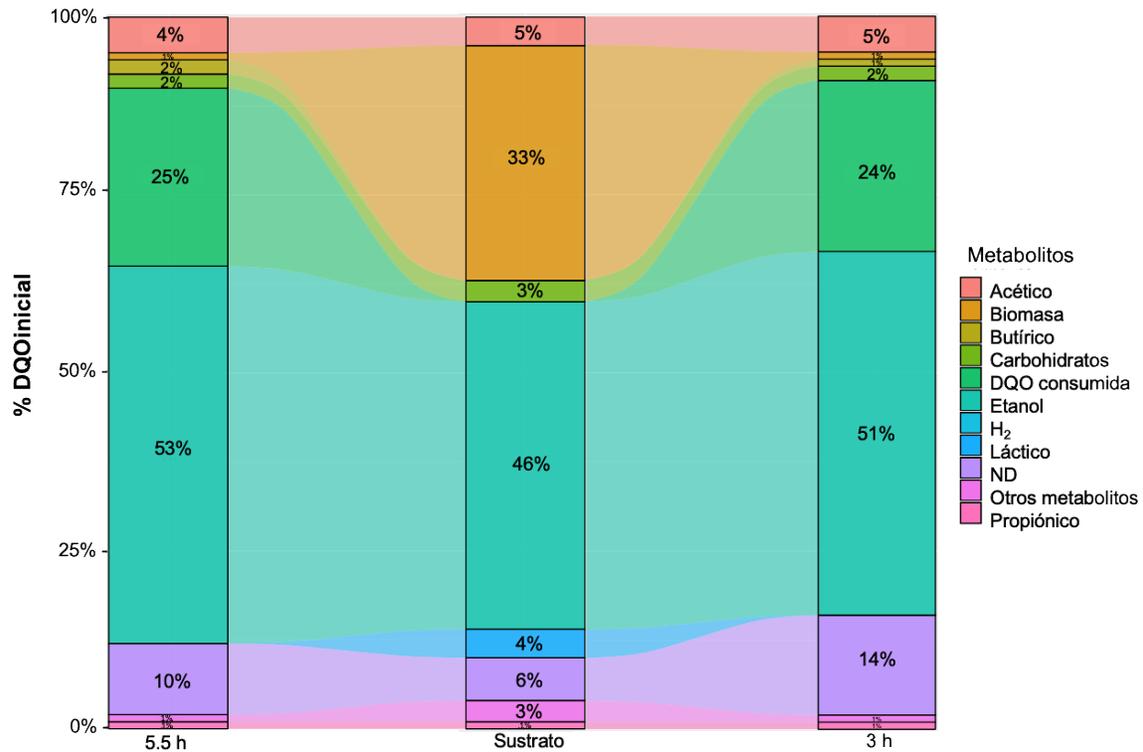


Figura 6.9 Balance de DQO empleando lías a lazo abierto a los diferentes TRH evaluados (izquierda y derecha). El valor central representa la composición inicial del sustrato

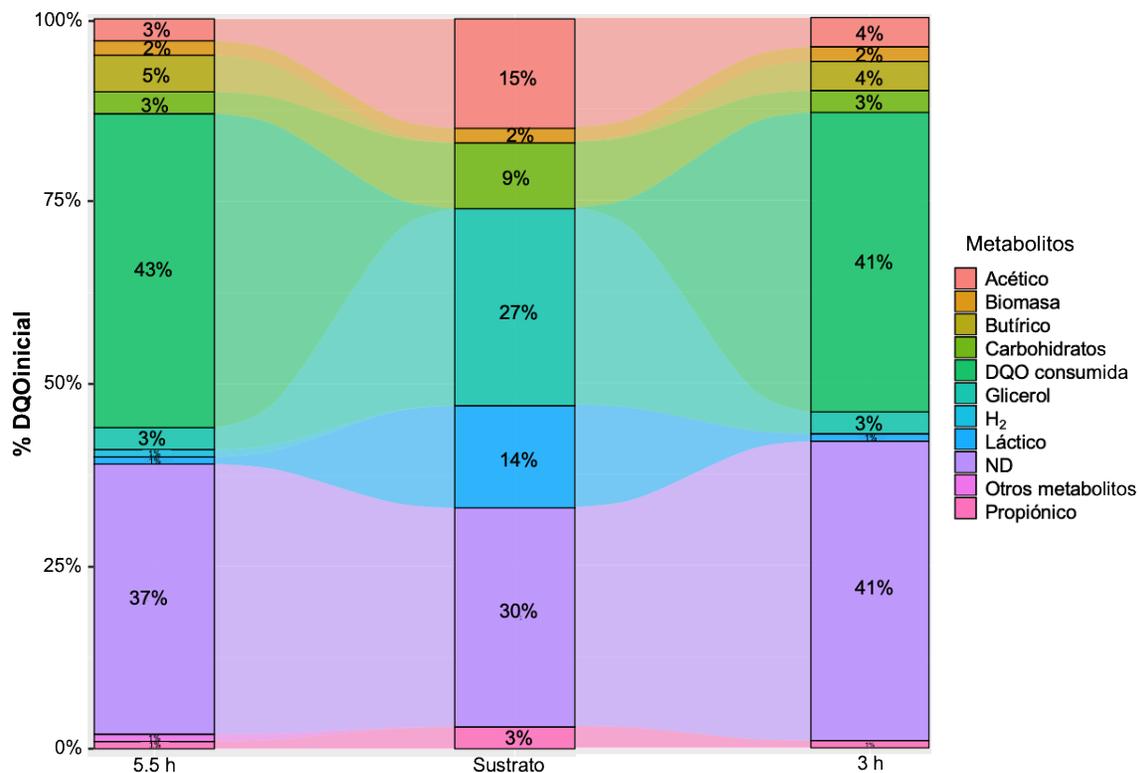


Figura 6.10 Balance de DQO empleando vinazas a lazo abierto a los diferentes TRH evaluados (izquierda y derecha). El valor central representa la composición inicial del sustrato.

El balance de DQO durante la implementación de la estrategia de control automático (etapa II) con vinazas sintéticas con 28 gDQO total se presenta en la Figura 6.11, donde se aprecia que el consumo de metabolitos fue principalmente de glicerol, láctico, acético y ligeramente de carbohidratos con ambos TRH, siendo similar al periodo evaluado con vinazas en la etapa I, mencionado anteriormente. También se obtuvo como metabolito principal producido el butírico, lo cual está relacionado a la ruta metabólica del consumo de láctico y acético. La presencia de acético también puede atribuirse a la ruta metabólica del consumo de glicerol y carbohidratos. También se puede apreciar una producción de valérico, su formación puede atribuirse a un elongamiento de cadena entre ácidos primarios como el acético (C2) y butírico (C3) y un donante de electrones como puede ser el etanol, láctico o metanol formando como productos intermediarios: butírico (C4) o valérico (C5) para cadenas pares e impares, respectivamente (Veras *et al.* 2020).

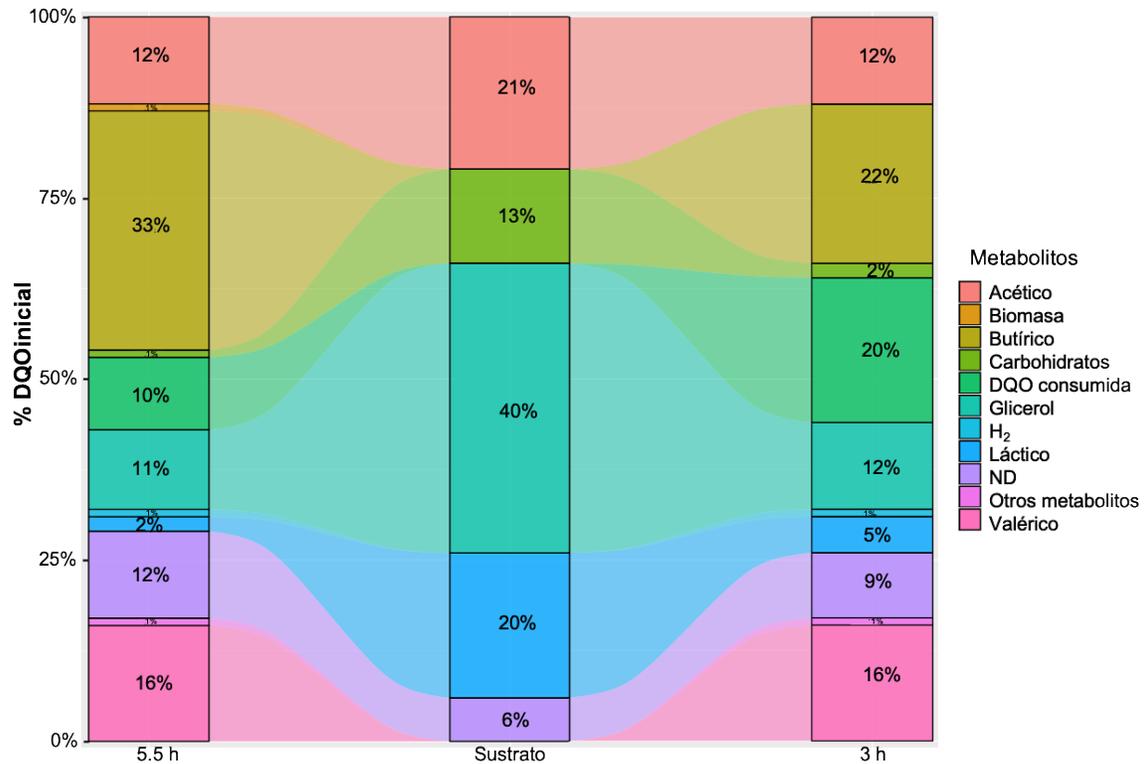


Figura. 6.11 Balance de DQO empleando vinazas sintéticas, implementando la estrategia de control FESC a los diferentes TRH evaluados (izquierda y derecha). El valor central representa la composición inicial del sustrato.

6.2.4. Caracterización de la comunidad microbiana

Los resultados obtenidos de la caracterización de las comunidades microbianas se presentan en la Figura 6.12, donde se observó la diferencia en la abundancia con respecto a los géneros presentes en las muestras analizadas. También se realizó el análisis de distancia de las comunidades por agrupamiento.

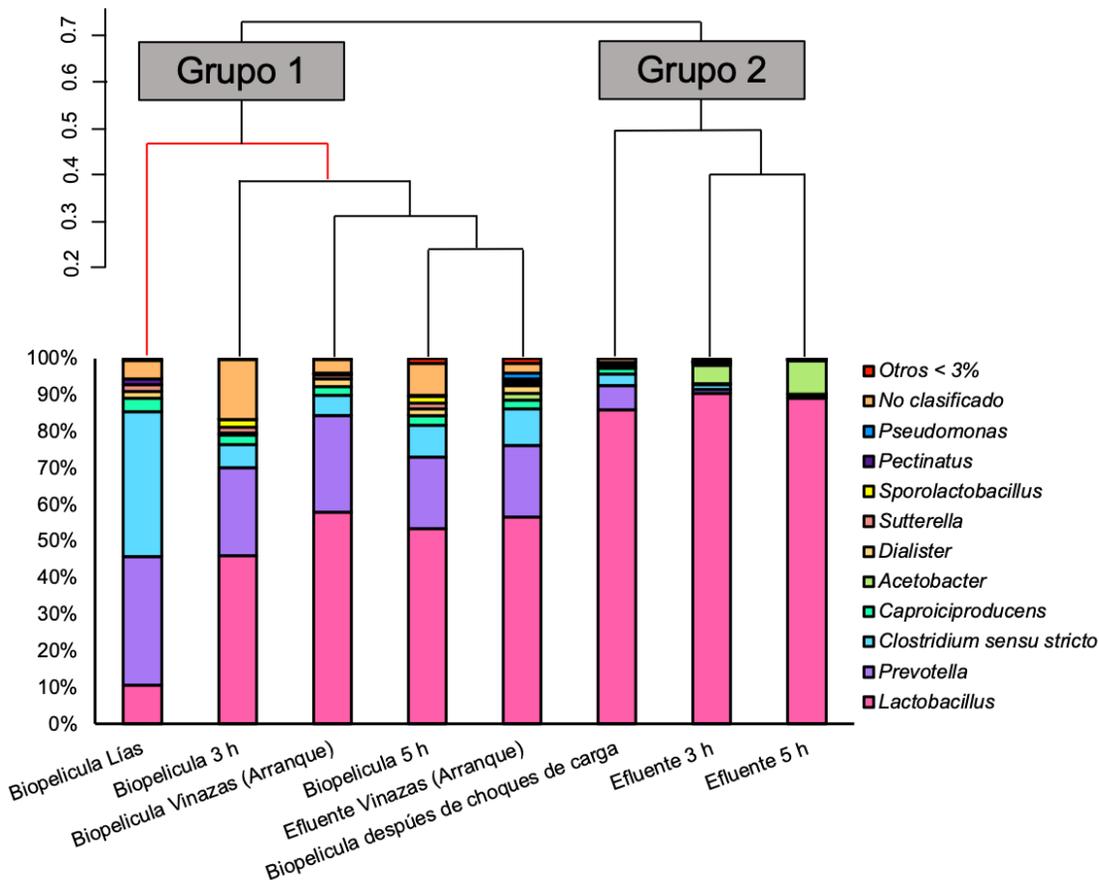


Figura 6.12 Abundancia relativa por género y análisis de agrupamiento por distancia.

En la muestra analizada con respecto a la biopelícula formada en la operación con lías se puede observar una abundancia principalmente conformada por *Clostridium*, seguido de *Prevotella*, ambos géneros determinados como BPH y un menor porcentaje de *Lactobacillus* que es una bacteria BAL. Dicha comunidad ubicada en la biopelícula se seleccionó al cambiar el sustrato a vinazas, siendo *Lactobacillus* el género dominante, seguido de *Prevotella* y *Clostridium*, la cual se mantuvo incluso en el efluente en el periodo de arranque. A la presencia de *Lactobacillus* como género dominante se le puede atribuir la alta concentración de láctico presente en el sustrato; dicho género son bacterias fermentativas, mas no productoras de H_2 y su presencia ya ha sido reportada en sistemas de producción de H_2 a partir de sustratos complejos, ya que forman parte de la microbiota endógena (Castelló *et al.* 2009), tal como lo reporta Cortez-Cervantes, (2019) a partir de la caracterización del inóculo endógeno de efluentes vitivinícolas donde casi el 100% de la comunidad está conformadas por el género *Lactobacillus*.

Se ha reportado que algunas especies de *Lactobacillus* pueden coexistir con especies del género *Clostridium* BPH, pero esto podría tener un efecto adverso en la producción de H_2 (Kawagoshi *et al.* 2005). Sin embargo, en este trabajo se demuestra que al realizar el cambio de sustrato de lías a vinazas se obtuvo un efecto benéfico en la productividad, presentando cambios significativos en las abundancias de los géneros dominantes. También García-Depraect *et al.* (2020) evaluaron el rendimiento y las comunidades microbianas de un reactor continuo CSTR expuesto a perturbaciones basadas en el cambio de sustrato con

dos tipos de vinazas tequileras, demostrando que especies del género *Clostridium* como *Clostridium spp.* y *C. pasteurianum* en conjunto con BAL determinaron la funcionalidad de la comunidad y permitieron un estado de equilibrio estable en el reactor después de las perturbaciones. Así mismo, Fuess *et al.* (2018) han reportado la producción de H₂ a partir del consumo de láctico como una estrategia microbiana eficaz que permite que las BPH que consumen láctico obtengan energía en condiciones de baja disponibilidad de carbohidratos.

Se puede observar que al implementar los choques de carga, en la biopelícula de ambos TRH (5.5 y 3 h) la comunidad no se ve influenciada (Fig 6.11 grupo 1), por otro lado, se observa el grupo 2 conformado por las comunidades de los efluentes debido al desprendimiento de *Lactobacillus* del reactor presente en el ambos TRH. Se infiere que *Prevotella* es la principal BPH, y dicho género tiene la habilidad de crecer en una gran variedad de carbohidratos; se ha reportado en sistemas productores de H₂ proporcionando una contribución positiva degradando sustratos complejos (Castelló *et al.* 2009). Dos Reis *et al.* (2015) reportaron *Prevotella* como género dominante (55 %) en un reactor anaerobio de lecho fluidizado alimentado con vinazas de la caña de azúcar.

6.3. Operación de un reactor de lecho empacado (PBR) a nivel piloto

En la Figura 6.13 se observa el desempeño del reactor piloto con configuración de lecho empacado, empleando sacarosa como sustrato, comparado con otras investigaciones. En este trabajo se obtuvo una productividad máxima de 417 mLH₂/L_{Reactor}-h que corresponde al 70% de lo obtenido por Lin *et al.* (2011) y siendo casi 5 veces mayor a lo reportado por Lu *et al.* (2019). En ambos trabajos se evaluó la producción de H₂ en reactores piloto con sustratos similares (sacarosa y glucosa, respectivamente) empleando lodo granular anaerobio pretratado térmicamente como inóculo. La productividad obtenida en este trabajo se logró empleando un inóculo endógeno de la fermentación natural del sustrato y siendo incluso mayor a lo reportado por Carrillo-Reyes *et al.* (2016) donde evaluaron el desempeño de cultivos mixtos en la producción de H₂ en dos reactores PBR, obteniendo una TPH 243 mL H₂/L_{Reactor}-h. Estos resultados sugieren que un cultivo endógeno incluso empleando sustratos modelo, es una opción viable para la inoculación de sistemas pilotos, sin invertir costos y energía en la implementación de pretratamientos.

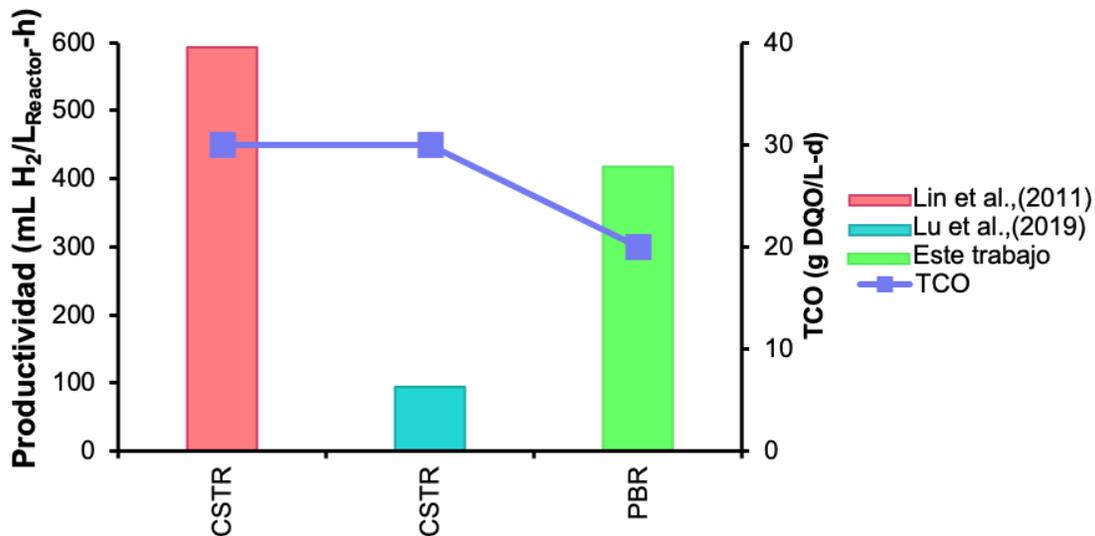


Figura 6.13 Productividad de H₂ en reactor PBR empleando sacarosa en comparación con evaluaciones a nivel piloto reportadas en la literatura.

6.4. Escalamiento de reactor filtro percolador

6.4.1. Arranque y operación de reactor tipo filtro percolador

En la figura 6.14 se presenta la operación del reactor filtro percolador a nivel piloto previo a la evaluación del Tmix, en donde se puede observar que la productividad incrementa a partir del tercer día, obteniendo una productividad máxima de 15 mL H₂/L_{Reactor}-h con una composición de 23 % H₂ y un rendimiento máximo por gramo de DQO inicial (gDQO_i) de 3.5 mL H₂/gDQO_i.

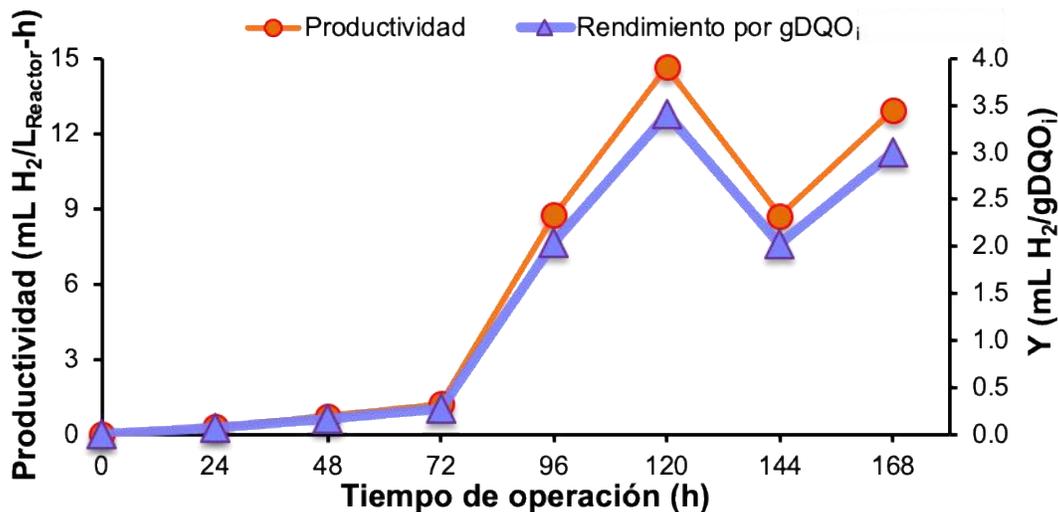


Figura 6.14 Operación de reactor filtro percolador piloto con vinazas.

Así mismo, en la Figura 6.15 se presenta el balance de DQO correspondiente a 24 gDQO total, en donde el consumo principalmente de láctico, glicerol y carbohidratos indica que se mantuvo la interacción de las rutas metabólicas observadas en el reactor a escala laboratorio, teniendo como metabolito principal el butírico. Sin embargo, en esta operación

también se presenta una producción del 5% de propiónico, lo cual se atribuye a que también se llevó a cabo la fermentación propiónica, utilizando láctico como sustrato, lo cual ya se ha reportado que, en sistemas productores de H_2 , es un metabolito que como consecuencia de su presencia causa el decrecimiento en la productividad (Castelló *et al.* 2020).

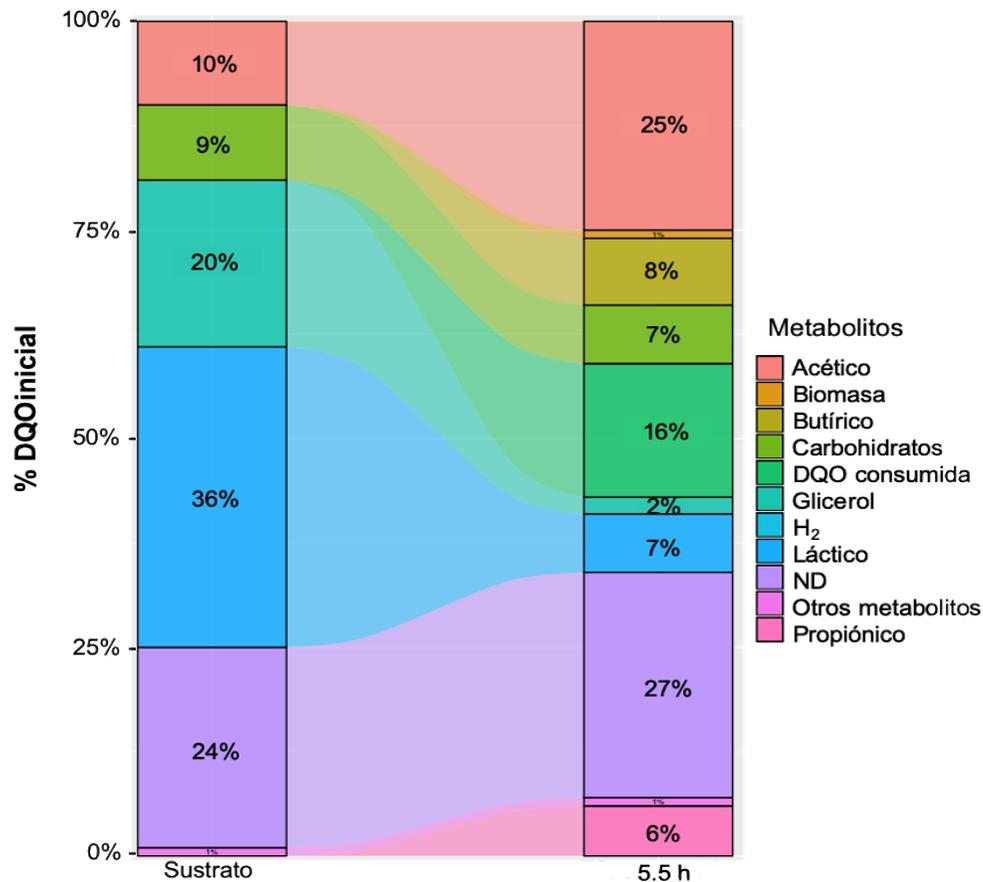


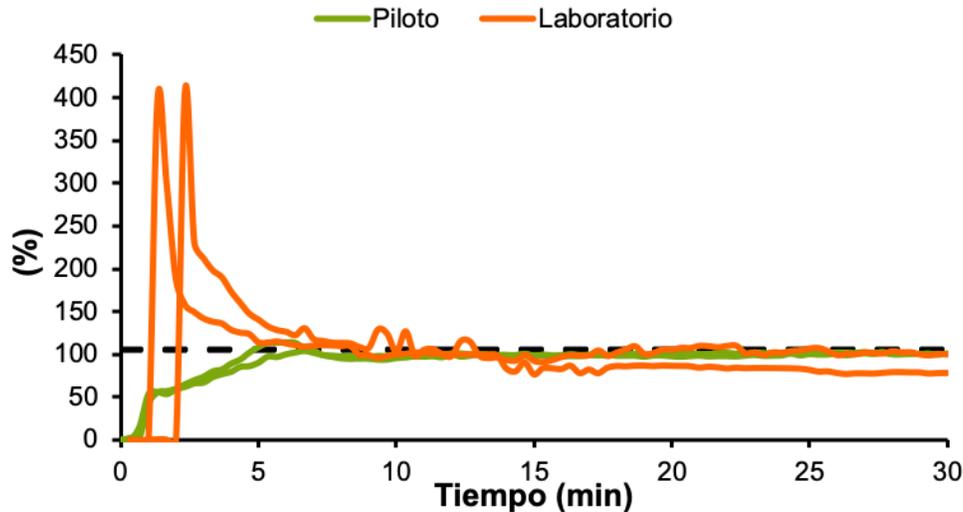
Figura 6.15 Balance de DQO de reactor filtro percolador piloto con vinazas a TRH de 5.5 h.

6.4.2. Evaluación del tiempo de mezclado (T_{mix})

En la Tabla 6.2 se presentan los parámetros de escalamiento completos que fueron determinados para implementar el filtro percolador a nivel piloto. Así mismo, en la Figura 6.16 se presentan los resultados de las pruebas de mezclado realizadas en ambos reactores, donde se puede observar un pico inicial en el reactor a escala laboratorio que se relaciona a la existencia de un flujo preferencial dentro del reactor, lo que indica que primeramente existe un mezclado rápido y posteriormente vuelve a mezclarse hasta alcanzar la mezcla completa de la fase líquida. Por otro lado, en el piloto puede apreciarse un mezclado más homogéneo y lento, lo cual puede implicar que tanto el consumo del sustrato y las reacciones dentro del sistema sean más lentas, provocando rendimientos menores en la transferencia de masa y por ende en la eficiencia del sistema (Ordaz *et al.* 2018). Sin embargo, a pesar del diverso comportamiento de mezclado, ambos reactores alcanzan la mezcla homogénea en tiempos similares.

Tabla 6.2 *Criterios de escalamiento del reactor filtro percolador*

Reactor	Vol. Trabajo (L)	Área de soporte específica ($m^2/L_{Vol. Trabajo}$)	Relación Vol. Soporte / Vol. Trabajo	Tmix (min)
Laboratorio	1	3.4	0.5	11.1±0.18
Piloto	21	3.4	0.5	11.5±0.7


 Figura 6.16 *Grado de mezcla en reactores a escala laboratorio y piloto*

Una vez igualado el tiempo de mezclado del reactor piloto, este fue operado con vinazas sintéticas por 15 días (Figura 6.17). Se puede observar que la productividad incrementó en un 133 % en comparación con la operación con vinazas reales, obteniendo una productividad máxima de $35 \text{ mL H}_2/L_{\text{Reactor-h}}$ correspondiente a un rendimiento de $11 \text{ mL H}_2/g\text{DQO}_i$. Este incremento en la productividad puede corresponder a que las rutas metabólicas mayormente favorecidas fueron las de consumos de glicerol (de 23 a 15%), láctico (de 44 a 32%), acético (de 13 a 8%) y por último un ligerante de carbohidratos (1%), las cuales se presentan en la Figura 6.18 lo cual corresponde a 24 gDQO total , en donde el metabolito principalmente producido fue el butírico (10%). Aunado a esto, también puede observarse la ausencia de propiónico, favoreciendo la productividad y siendo similar a la del reactor a escala laboratorio con vinazas sintéticas. Sin embargo, el decrecimiento en la productividad a partir del día 8 (192 h) puede atribuirse a un lavado de la biomasa, corroborando la baja concentración observada en los soportes colocados dentro del sistema ($11 \text{ gSV}/L_{\text{Vol. Trabajo}}$) ya que, en comparación con el sistema laboratorio (26 g SV/L), la alimentación con vinazas reales aportan biomasa endógena del mismo sustrato favoreciendo su retención dentro del reactor y que en las vinazas sintéticas no puede obtenerse.

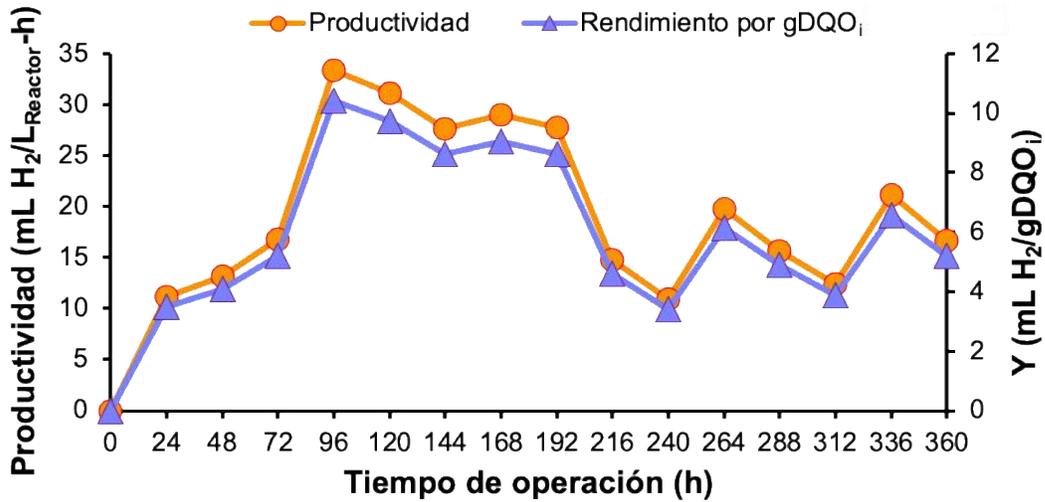


Figura 6.17 Operación de reactor filtro percolador piloto con vinazas sintéticas al igualar el T_{mix} con el reactor escala laboratorio.

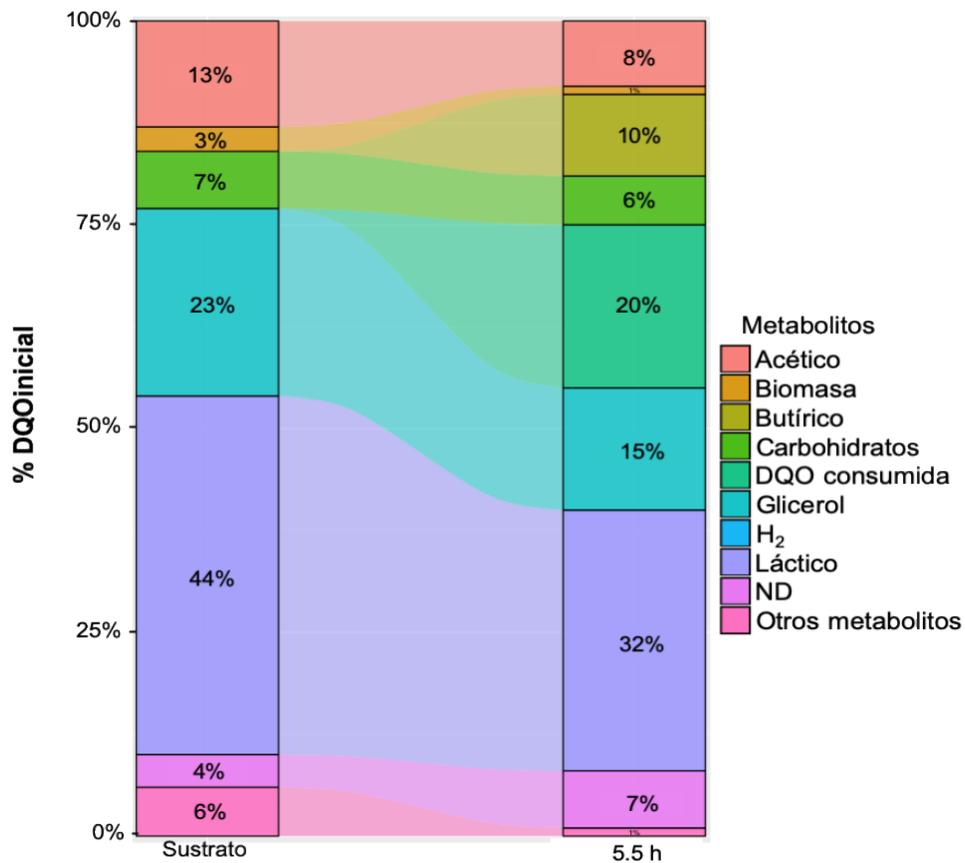


Figura 6.18 Balance de DQO de reactor filtro percolador piloto con vinazas sintéticas a TRH 5.5 h.

En la Figura 6.19 se presenta la distribución de la productividad en ambos reactores (laboratorio y piloto) al igualar los tiempos de mezclado, donde puede apreciarse que el escalamiento no fue satisfactorio, ya que la productividad promedio del piloto es de 22 ± 7.8 mL H₂/L_{Reactor}-h siendo 74 % menor a la del reactor a escala laboratorio. Esto podría atribuirse a que por limitaciones de sustrato la carga operacional en el piloto fue 28 % menor en comparación al reactor a escala laboratorio; sin embargo, esta disminución no es proporcional. Esta baja productividad se puede atribuir a la baja concentración de biomasa que pudo observarse en los soportes del reactor piloto, lo cual corresponde al 42 % de la biomasa por litro de volumen de trabajo presentada en el reactor a escala laboratorio, a pesar de que se mantuvieron las mismas concentraciones de inóculo endógeno y tiempo de recirculación para la formación de la biopelícula que en el reactor escala laboratorio, así como la posible falta de aspersión homogénea del sustrato.

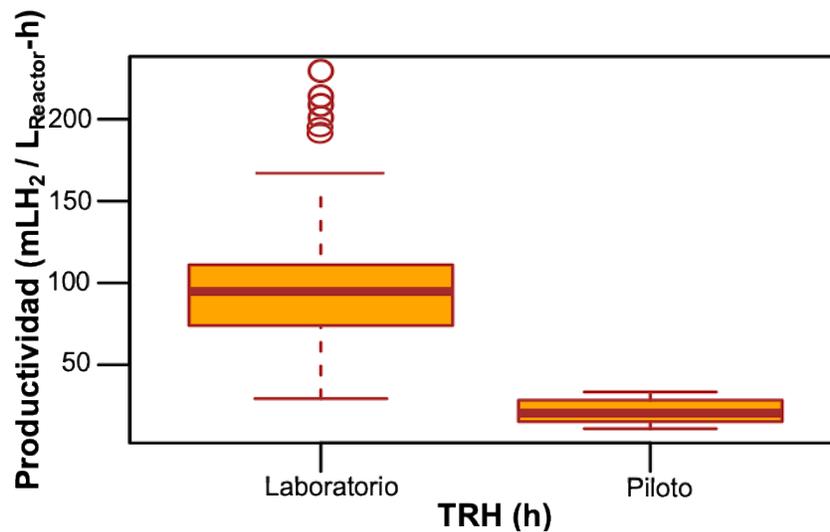


Figura 6.19 Distribución de la productividad de H₂ de reactores laboratorio y piloto al mismo T_{mix} . Los cuadros representan el percentil 25–75%, y valor promedio, círculos presentan valores extremos.

7. CONCLUSIONES

La implementación de choques de carga favoreció la producción de H_2 , utilizando lías y vinazas vitivinícolas como sustrato. La disminución del TRH de 5.5 a 3 h incrementó dicha productividad en un 238% y 49%, alcanzando promedios de 18.6 y 249.8 mL H_2 /L_{Reactor}-h al implementar lías y vinazas, respectivamente. La baja productividad utilizando lías se atribuye a la presencia de etanol, mientras que las vinazas tienen una composición más favorable para la producción de H_2 , con alta concentración de ácido láctico, glicerol y carbohidratos.

La implementación de la estrategia de control FESC logró incrementar 86 % la productividad de H_2 utilizando vinazas como sustrato, al compararlo con la operación a un TRH estable (5.5 h); se alcanzó así una productividad promedio de 174.4 mL H_2 /L_{Reactor}-h. Así mismo se determinó un TRH promedio de 3.7 h, considerado el valor óptimo sin el riesgo de sobrecarga orgánica.

La implementación de la estrategia de control a lazo abierto provocó una selección diferencial de las bacterias fermentativas. Los géneros *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Clostridium* fueron los principales representantes de la biopelícula. Sin embargo, probablemente debido a su alta abundancia, el género *Lactobacillus* fue el que se desprendió del reactor durante los choques de carga, de acuerdo a la caracterización de la biomasa suspendida. De la presencia de dichos géneros se puede suponer un papel fermentativo de *Lactobacillus* para la generación de ácido láctico, y *Prevotella* y *Clostridium* responsable del consumo de este ácido, y otros sustratos como glicerol y carbohidratos para la producción de hidrógeno.

El tiempo de mezcla utilizado como criterio de escalamiento utilizando no fue satisfactorio para mantener la productividad de hidrógeno en el filtro percolador al reportado a nivel piloto. En este sentido, a pesar de la limitación por sustrato, en donde a nivel piloto se usó una carga 28% menor, la productividad fue 74% menor, en comparación con el reactor laboratorio. Otros criterios de importancia observados durante la operación fueron la carga orgánica específica a la concentración de biomasa, así como la eficiencia en la aspersión homogénea del sustrato en el lecho de biopelícula, los cuales pueden utilizarse en futuras evaluaciones de escalamiento.

8. REFERENCIAS

- Aceves-Lara, C. A., Latrille, E., & Steyer, J. P. (2010). Optimal control of hydrogen production in a continuous anaerobic fermentation bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10710-10718.
- Aceves-Lara, C. A., Latrille, E., Bernet, N., Buffière, P., & Steyer, J. P. (2008). A pseudo-stoichiometric dynamic model of anaerobic hydrogen production from molasses. *Water research*, 42(10-11), 2539-2550.
- Albarrán, B. 2017. Efecto de la velocidad superficial del gas sobre la producción de hidrógeno con vinazas vitivinícolas. (Tesis de maestría) Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.
- APHA/AWWA/WEF. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Standard Methods, 541. <https://doi.org/ISBN 9780875532356>.
- Arreola- Vargas, J., Alatraste- Mondragón, F., Celis, L. B., Razo- Flores, E., López- López, A., & Méndez- Acosta, H. O. (2015). Continuous hydrogen production in a trickling bed reactor by using triticale silage as inoculum: effect of simple and complex substrates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(6), 1062-1069.
- Arriaga, S., Rosas, I., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2011). Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(5), 3442-3449.
- Asociación de Vitivinicultores de Querétaro, 2017. AVQ [WWW Document]. URL <http://www.avq.com.mx/>
- Barca, C., Soric, A., Ranava, D., Giudici-Orticoni, M. T., & Ferrasse, J. H. (2015). Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: a review. *Bioresource Technology*, 185, 386-398.
- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., & Buitrón, G. (2017). Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. *Bioresource technology*, 244, 100-107.
- Bedoya, A., Ramírez, J. E., Vásquez, J. E., Castrillón, J. C., & Arias, M. (2007). Aproximación Al Estado Del Arte Biological Production of Hydrogen : a Literature Survey. *Dyna*, 154(3), 137-157.
- Blanco Londoño, S. A., & Rodríguez Chaparro, T. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 20(3), 398-411.
- Blanco, V. M. C., Oliveira, G. H. D., & Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. *Renewable energy*, 139, 1310-1319.
- Buitrón, G., & Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101(23), 9071-9077.
- Buitrón, G., Kumar, G., Martínez-Arce, A., & Moreno, G. (2014). Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H₂-SBR+ CH₄-UASB) using tequila vinasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(33), 19249-19255.
- Buitrón, G., Muñoz- Páez, K. M., Quijano, G., Carrillo- Reyes, J., & Albarrán- Contreras, B. A. (2020). Biohydrogen production from winery effluents: control of the

- homoacetogenesis through the headspace gas recirculation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(3), 544-552.
- Buitrón, G., Prato-Garcia, D., & Zhang, A. (2014). Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. *Water Science and Technology*, 70(12), 1919-1925.
- Bustillo-Castillo Y.D. (2020). Propuesta de control automático para maximizar la producción de biogás en un digestor anaerobio. (Tesis de maestría). Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS microbiology reviews*, 41(2), 158-181.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581.
- Carrillo-Reyes, J., Albarrán-Contreras, B. A., & Buitrón, G. (2019). Influence of added nutrients and substrate concentration in biohydrogen production from winery wastewaters coupled to methane production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187(1), 140-151.
- Carrillo-Reyes, J., Cortés-Carmona, M. A., Bárcenas-Ruiz, C. D., & Razo-Flores, E. (2016). Cell washout enrichment increases the stability and performance of biohydrogen producing packed-bed reactors and the community transition along the operation time. *Renewable Energy*, 97, 266-273.
- Castelló, E., Ferraz-Junior, A. D. N., Andreani, C., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., ... & Palomo-Briones, R. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109602.
- Castelló, E., y Santos, C. G., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(14), 5674-5682.
- Chang, J. J., Chou, C. H., Ho, C. Y., Chen, W. E., Lay, J. J., & Huang, C. C. (2008). Syntrophic co-culture of aerobic Bacillus and anaerobic Clostridium for biofuels and bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 5137-5146.
- Cisneros-Pérez, C., Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., Etchebere, C., & Razo-Flores, E. (2015). Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(19), 6329-6339.
- Contreras Dávila, C. A. (2015). *Producción de hidrógeno en sistemas continuos a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de Agave tequilana Weber* (Tesis de maestría) Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cortez-Cervantes J. (2018). Producción de hidrógeno a partir de efluentes de la industria vitivinícola. (Tesis de maestría) Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Consejo Mexicano Vitivinícola, (2018). CMV[WWW Document]. URL <http://uvayvino.org.mx/>
- Čuček, L., Klemeš, J. J., & Kravanja, Z. (2012). Carbon and nitrogen trade-offs in biomass energy production. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 14(3), 389-3
- Demirbas, A. (2009). Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy conversion and management*, 50(9), 2239-2249.
- Dinesh, G. K., Chauhan, R., & Chakma, S. (2018). Influence and strategies for enhanced biohydrogen production from food waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 807-822.
- Dos Reis, C. M., Carosia, M. F., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2015). Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(27), 8498-8509.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Elsharnouby, O., Hafez, H., Nakhla, G., & El Naggar, M. H. (2013). A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12), 4945-4966.
- Fernandes, B. S., Saavedra, N. K., Maintinguer, S. I., Sette, L. D., Oliveira, V. D., Varesche, M. B. A., & Zaiat, M. (2013). The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an up flow anaerobic packed-bed bioreactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(6), 1348-1366
- Ferrero, G., Rodríguez-Roda, I., & Comas, J. (2012). Automatic control systems for submerged membrane bioreactors: A state-of-the-art review. *Water research*, 46(11), 3421-3433.
- Fuess, L. T., Júnior, A. D. N. F., Machado, C. B., & Zaiat, M. (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: the key role of lactate. *Bioresource technology*, 247, 426-433.
- Fuess, L. T., Kiyuna, L. S. M., Garcia, M. L., & Zaiat, M. (2016). Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(19), 8132-8145.
- Gabelle, J. C., Augier, F., Carvalho, A., Rousset, R., & Morchain, J. (2011). Effect of tank size on kLa and mixing time in aerated stirred reactors with non-newtonian fluids. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 89(5), 1139-1153.
- García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2018). Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway: Operational performance, kinetic analysis and microbial ecology. *Fuel*, 234, 151-160.
- García-Depraect, O., Diaz-Cruces, V. F., Rene, E. R., & León-Becerril, E. (2020a). Changes in performance and bacterial communities in a continuous biohydrogen-producing reactor subjected to substrate-and pH-induced perturbations. *Bioresource Technology*, 295, 122182.
- García-Depraect, O., Diaz-Cruces, V. F., Rene, E. R., & León-Becerril, E. (2020). Changes in performance and bacterial communities in a continuous biohydrogen-producing

- reactor subjected to substrate-and pH-induced perturbations. *Bioresource Technology*, 295, 122182.
- García-Depraect, O., Gómez-Romero, J., León-Becerril, E., & López-López, A. (2017). A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(9), 5820-5831.
- García-Depraect, O., Muñoz, R., van Lier, J. B., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., & Becerril, E. L. (2020b). Three-stage process for tequila vinasse valorization through sequential lactate, biohydrogen and methane production. *Bioresource Technology*, 123160.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73-95
- González-Ugalde, C., & Durán-Herrera, J. E. (2014). Producción de hidrógeno a partir del tratamiento anaerobio de vinazas en un reactor UASB. *Revista Tecnología en Marcha*, 27(3), ág-3.
- Grape and Wine research and development corporation. (2011). Operational Guidelines. Winery Wastewater Management & Recycling. Grape and Wine research and development corporation.
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward. *Trends in biotechnology*, 27(5), 287-297.
- Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *International journal of hydrogen energy*, 27(11-12), 1339-1347.
- Hess, J., & Bernard, O. (2009). Advanced dynamical risk analysis for monitoring anaerobic digestion process. *Biotechnology Progress*, 25(3), 643-653.
- Höök, M., & Tang, X. (2013). Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change—A review. *Energy Policy*, 52, 797-809.
- Hsiao, C. L., Chang, J. J., Wu, J. H., Chin, W. C., Wen, F. S., Huang, C. C., ... & Lin, C. Y. (2009). Clostridium strain co-cultures for biohydrogen production enhancement from condensed molasses fermentation soluble. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7173-7181.
- Jeon, B. S., Um, Y. S., Lee, S. M., Lee, S. Y., Kim, H. J., Kim, Y. H., ... & Sang, B. I. (2007). Performance analysis of a proton exchange membrane fuel cell (PEMFC) integrated with a trickling bed bioreactor for biological high-rate hydrogen production. *Energy & Fuels*, 22(1), 83-86.
- Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of Clostridium tyrobutyricum JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology*, 99(14), 6666-6672.
- Júnior, A. D. N. F., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2015). Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasses as substrate: Influence of support materials. *Anaerobe*, 34, 94-105.
- Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 569-582.
- Kawagoshi, Y., Hino, N., Fujimoto, A., Nakao, M., Fujita, Y., Sugimura, S., & Furukawa, K. (2005). Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect

- on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(5), 524-530.
- Kim, J. K., Oh, B. R., Chun, Y. N., & Kim, S. W. (2006). Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. *Journal of Bioscience and bioengineering*, 102(4), 328-332.
- Krupp, M., & Widmann, R. (2009). Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4509-4516.
- Kumar, G., & Buitrón, G. (2017). Fermentative biohydrogen production in fixed bed reactors using ceramic and polyethylene carriers as supporting material. *Energy Procedia*, 142, 743-748.
- 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. *international journal of hydrogen energy*, 39(12), 6407-6418.
- Lee, Z. K., Li, S. L., Kuo, P. C., Chen, I. C., Tien, Y. M., Huang, Y. J., ... & Cheng, S. S. (2010). Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste. *international journal of hydrogen energy*, 35(24), 13458-13466.
- Levin, D. B., Pitt, L., & Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), 173-185.
- Lin, C. Y., Lay, C. H., Sen, B., Chu, C. Y., Kumar, G., Chen, C. C., & Chang, J. S. (2012). Fermentative hydrogen production from wastewaters: a review and prognosis. *International journal of hydrogen energy*, 37(20), 15632-15642.
- Lin, C. Y., Wu, S. Y., Lin, P. J., Chang, J. S., Hung, C. H., Lee, K. S., ... & Wu, J. H. (2011). A pilot-scale high-rate biohydrogen production system with mixed microflora. *international journal of hydrogen energy*, 36(14), 8758-8764.
- Liu, D., Angelidaki, I., Zeng, R. J., & Min, B. (2008). *Bio-hydrogen production by dark fermentation from organic wastes and residues*. DTU Environment.
- Lu, C., Wang, Y., Lee, D. J., Zhang, Q., Zhang, H., Tahir, N., ... & Zhang, K. (2019). Biohydrogen production in pilot-scale fermenter: Effects of hydraulic retention time and substrate concentration. *Journal of Cleaner Production*, 229, 751-760.
- Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 665-694.
- Marchetti, A. G., François, G., Faulwasser, T., & Bonvin, D. (2016). Modifier adaptation for real-time optimization—methods and applications. *Processes*, 4(4), 55.
- Mejía-Saucedo, C. (2018). Producción continua de hidrógeno a partir de vinazas vitivinícolas en reactores de biopelícula con lecho estructurado. (Tesis de maestría) Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., & Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*, 73(1), 59-65.
- Monroy, I., Bakonyi, P., & Buitrón, G. (2018). Temporary feeding shocks increase the productivity in a continuous biohydrogen-producing reactor. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(7), 1581-1588.

- Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2008). Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(4), 1124-1135.
- Nguyen, D., Gadhamshetty, V., Nitayavardhana, S., & Khanal, S. K. (2015). Automatic process control in anaerobic digestion technology: A critical review. *Bioresource Technology*, 193, 513-522.
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), 21-39.
- Ohnishi, A., Bando, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2010). Development of a simple biohydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *International journal of hydrogen energy*, 35(16), 8544-8553.
- Patel, S. K., Kumar, P., Mehariya, S., Purohit, H. J., Lee, J. K., & Kalia, V. C. (2014). Enhancement in hydrogen production by co-cultures of *Bacillus* and *Enterobacter*. *International journal of hydrogen energy*, 39(27), 14663-14668.
- Ordaz, A., Figueroa- González, I., San- Valero, P., Gabaldón, C., & Quijano, G. (2018). Effect of the height- to- diameter ratio on the mass transfer and mixing performance of a biotrickling filter. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(1), 121-126.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2017. OIV <http://www.oiv.int/es/statistiques/>
- Pakarinen, O., Kaparaju, P., & Rintala, J. (2011). The effect of organic loading rate and retention time on hydrogen production from a methanogenic CSTR. *Bioresource technology*, 102(19), 8952-8957.
- Palomo-Briones, R., Celis, L. B., Méndez-Acosta, H. O., Bernet, N., Trabaly, E., & Razo-Flores, E. (2019). Enhancement of mass transfer conditions to increase the productivity and efficiency of dark fermentation in continuous reactors. *Fuel*, 254, 115648.
- Patel, S. K., Kumar, P., Mehariya, S., Purohit, H. J., Lee, J. K., & Kalia, V. C. (2014). Enhancement in hydrogen production by co-cultures of *Bacillus* and *Enterobacter*. *International journal of hydrogen energy*, 39(27), 14663-14668.
- Patra, S., Lay, C. H., Lin, C. Y., Sompong, O., & Reungsang, A. (2011). Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum*. *international journal of hydrogen energy*, 36(14), 8697-8703.
- Peixoto, G., Saavedra, N. K., Varesche, M. B. A., & Zaiat, M. (2011). Hydrogen production from soft-drink wastewater in an up flow anaerobic packed-bed reactor. *international journal of hydrogen energy*, 36(15), 8953-8966.
- Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J. M., de Souza Oliveira, R. P., & Domínguez, J. M. (2015b). Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste management*, 40, 72-81.
- Pérez- Bibbins, B., Torrado- Agrasar, A., Pérez- Rodríguez, N., Aguilar- Uscanga, M. G., & Domínguez, J. M. (2015a). Evaluation of the liquid, solid and total fractions of beer, cider and wine lees as economic nutrient for xylitol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(6), 1027-1039.

- Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., ... & Steyer, J. P. (2013). Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International journal of hydrogen energy*, 38(12), 4975- 4985.
- Ramírez-Carmona, U., Moreno, J. A., & Vargas, A. (2018, July). Fast Extremum Seeking for Bioreactors using a Variable Structure Control Approach. In *2018 15th International Workshop on Variable Structure Systems (VSS)* (pp. 337-342). IEEE.
- Ramírez-Morales, J. E., Zúniga, I. T., & Buitrón, G. (2015). On-line heuristic optimization strategy to maximize the hydrogen production rate in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochemistry*, 50(6), 893-900.
- Ren, N., Li, J., Li, B., Wang, Y., & Liu, S. (2006). Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(15), 2147-2157.
- Ren, N., Xing, D., Rittman, B. E., Zhao, L., Xie, T., & Zhao, X. (2007). Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio- hydrogen production. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1112-1125.
- Santiago, S. G., Trably, E., Latrille, E., Buitrón, G., & Moreno- Andrade, I. (2019). The hydraulic retention time influences the abundance of Enterobacter, Clostridium and Lactobacillus during the hydrogen production from food waste. *Letters in applied microbiology*, 69(3), 138-147.
- Shin, W. S., Lee, D., Kim, S., Jeong, Y. S., & Chun, G. T. (2013). Application of scale-up criterion of constant oxygen mass transfer coefficient (kLa) for production of itaconic acid in a 50 L pilot-scale fermentor by fungal cells of *Aspergillus terreus*. *J Microbiol Biotechnology*, 23(10), 1445-1453.
- Show, K. Y., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource technology*, 102(18), 8524-8533.
- Stanke, M. (2019). Process analytical technology in food biotechnology. Institute of Food Science and Biotechnology, University of Hohenheim, Stuttgart Germany.
- Tissot, S., Farhat, M., Hacker, D. L., Anderlei, T., Kühner, M., Comminellis, C., & Wurm, F. (2010). Determination of a scale-up factor from mixing time studies in orbitally shaken bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 52(2-3), 181-186.
- Trad, Z., Fontaine, J. P., Larroche, C., & Vial, C. (2016). Multiscale mixing analysis and modeling of biohydrogen production by dark fermentation. *Renewable energy*, 98, 264-282.
- Trchounian, K., & Trchounian, A. (2015). Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: an overview and perspectives. *Applied Energy*, 156, 174-184.
- Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparza-Garcia, F., Cecchi, F., & Poggi-Varaldo, H. M. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(13-14), 1383-1391.
- Vargas, A., & Moreno, J. A. (2015). On-line maximization of biogas production in an anaerobic reactor using a pseudo-super-twisting controller. *IFAC-PapersOnLine*, 48(8), 14-19.
- Vargas, G., Vargas, A., & Donoso-Bravo, A. (2016). Propuesta de una estrategia de control para la aplicación de pulsos en un digestor de lodos. *XII Taller y Simposio Latinoamericano en Digestión Anaerobia (XII DAAL)*, (págs. 23-26). Cusco, Perú.

- Vatsala, T. M., Raj, S. M., & Manimaran, A. (2008). A pilot-scale study of biohydrogen production from distillery effluent using defined bacterial co-culture. *International journal of hydrogen energy*, 33(20), 5404-5415.
- Veras, S. T. S., Cavalcante, W. A., Gehring, T. A., Ribeiro, A. R., Ferreira, T. J. T., Kato, M. T., ... & Leitão, R. C. (2020). Anaerobic production of valeric acid from crude glycerol via chain elongation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(3), 1847-1858
- Vital-Jacome, M., Cazares-Granillo, M., Carrillo-Reyes, J., & Buitrón, G. (2020). Characterization and anaerobic digestion of highly concentrated Mexican wine by-products and effluents. *Water Science and Technology*, 81(1), 190-198.
- Vlyssides, A. G., Barampouti, E. M., & Mai, S. (2005). Wastewater characteristics from Greek wineries and distilleries. *Water Science and Technology*, 51(1), 53-60.
- Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *International journal of hydrogen energy*, 34(2), 799-811.
- Wong, Y. M., Wu, T. Y., & Juan, J. C. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 471-482.
- Xing, Z., Kenty, B. M., Li, Z. J., & Lee, S. S. (2009). Scale- up analysis for a CHO cell culture process in large- scale bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 103(4), 733-746.
- Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J. A., & Benemann, J. R. (2007). Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(18), 4761-4771.
- Zacharof, M. P. (2017). Grape winery waste as feedstock for bioconversions: applying the biorefinery concept. *Waste and biomass valorization*, 8(4), 1011-1025.
- Zhang, Z. P., Show, K. Y., Tay, J. H., Liang, D. T., & Lee, D. J. (2008). Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors—A comparison of biofilm-based and granule-based systems. *International journal of hydrogen energy*, 33(5), 1559-1569.
- Zlokarnik, M. (2003). Scale- up und Miniplants. *Chemie Ingenieur Technik*, 75(4), 370-375.
- Zúñiga, I. T., Villa-Leyva, A., Vargas, A., & Buitrón, G. (2018). Experimental validation of online monitoring and optimization strategies applied to a biohydrogen production dark fermenter. *Chemical Engineering Science*, 190, 48-59.