



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

**PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO ÁCIDO CON LA  
ADICIÓN DE SALES DE HIERRO (II) Y ACETATO**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN INGENIERÍA**

**PRESENTA:**

**DANIEL SEBASTIAN PEDRAZA FONSECA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ**  
**INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM.**

**COMITÉ TUTORAL**

**DRA. ELIZABETH LEÓN BECERRIL**  
**CIATEJ**

**DR. EDSON BALTAZAR ESTRADA ARRIAGA**  
**IMTA**

**Querétaro. Abril, 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Dra. Georgina Fernández Villagómez

**Secretario:** Dra. Idania Valdez Vázquez

**1<sup>er</sup> Vocal:** Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga

**2<sup>do</sup> Vocal:** Dra. Elizabeth León Becerril

**3<sup>er</sup> Vocal:** Dr. German Buitrón Méndez

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Investigación en procesos avanzados de tratamiento de aguas, Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería.

### **TUTOR DE TESIS:**

#### **NOMBRE**

Dr. German Buitrón Méndez



---

**FIRMA**

## Dedicatoria

Este trabajo va dirigido a Dios, quien siempre me acompaña y puso en mi camino la suerte de pertenecer a una gran institución como lo es la UNAM, cuyo escudo representa el orgullo y respeto de pertenecer a la tierra latinoamericana; a la gran nación Mexicana por acogerme con sus brazos generosos y volverme un mejor hombre, a mis padres Emilse Fonseca Ruiz y Antonio José Pedraza Jiménez que con lo que la vida les dio, sea mucho o poco, han tratado de brindarme siempre el mejor ejemplo; a mi pareja Danielita y mi hija Mariana Lucia, ambas representación de las nuevas alegrías, a mi hermana Valentina, bióloga y gran orgullo, a mi abuela Ana y la señora Marina que dejaron la huella propia de la integridad de otros tiempos, finalmente a Eder, Jonathan, Mauricio, Agustín, Enrique, Diego, Marisol y Jaime grandes guías y amigos.

*“Que sepan los nacidos y los que van a nacer,  
que nacimos para vencer y no para ser  
vencidos”*

*Anónimo*

## Agradecimientos

Los presentes agradecimientos van dirigidos a:

DGAPA – UNAM (proyecto PAPIIT IT 102522), Consejo estatal de ciencia y tecnología del estado de Querétaro (CONCYTEQ), Proyecto CACTI/ 90 /2022, Proyecto del instituto de ingeniería (GII No. 3406).

El Dr. German Buitrón por la asesoría suministrada en los asuntos teóricos y prácticos de la presente tesis.

Al Mtro. Jaime Pérez Trevilla por el acompañamiento y enseñanza en el manejo de las diferentes técnicas de laboratorio asociadas al presente trabajo.

Al Laboratorio de investigación en procesos avanzados en tratamiento de agua (LIPATA) y a su Jefa de Unidad la Mtra. Gloria Moreno Rodríguez por la acogida al presente autor y el desarrollo de este proyecto.

## Tabla de contenido

<b>1. Introducción</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Marco Teórico</b> .....	<b>11</b>
2.1 Producción de queso y generación del lactosuero.....	11
2.2 Caracterización típica del lactosuero ácido.....	12
2.3 Fermentación Oscura.....	13
2.4 Reacciones y vías metabólicas en la producción de H <sub>2</sub> a partir de lactosuero ácido.....	13
2.5 Parámetros que influyen en la producción de H <sub>2</sub> .....	15
2.5.1 pH.....	15
2.5.2 Tiempo de retención hidráulica (TRH).....	16
2.5.3 Carga orgánica.....	17
2.5.4 Temperatura.....	18
2.5.5 Inoculación.....	19
2.5.6 Configuración del reactor.....	20
2.5.7 Otros factores.....	21
2.6 Microorganismos involucrados en la producción de H <sub>2</sub> a partir de lactosuero ácido.....	24
2.6.1 <i>Clostridium</i> y <i>Megasphaera</i> .....	24
2.6.2 Bacterias ácido-lácticas (BAL).....	26
<b>3. Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>27</b>
3.1 Hipótesis.....	27
3.2 Objetivos.....	27
3.2.1 Objetivo General.....	27
3.2.2 Objetivos específicos.....	27
<b>4. Metodología</b> .....	<b>28</b>
4.1 Descripción del sistema.....	29
4.2 Etapa 1.....	30
4.3 Etapa 2.....	30
4.4 Etapa 3.....	31
4.5 Técnicas Analíticas.....	35
4.5.1 DQO <sub>total</sub> .....	35
4.5.2 DQO <sub>Soluble</sub> .....	35
4.5.3 Sólidos.....	35
4.5.4 Carbohidratos totales.....	35

4.5.5	Ácidos grasos volátiles .....	35
4.5.6	Flujo de biogás .....	36
4.5.7	Composición de biogás .....	36
4.5.8	Hierro .....	36
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>37</b>
5.1	Caracterización del lactosuero ácido.....	37
5.2	Aclimatación de lodo hidrogenogénico y composición del biogás.....	38
5.3	Consumo de los carbohidratos .....	40
5.4	Productividad de H <sub>2</sub> .....	41
5.5	Producción y consumo de metabolitos.....	43
5.6	Rendimientos y productividades para las relaciones Lactato / Acetato .....	47
5.7	Influencia de hierro (Fe <sup>2+</sup> ).....	49
<b>6.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>54</b>
<b>7.</b>	<b>Lista de congresos y o publicaciones derivadas de la tesis.....</b>	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>56</b>
	<b>Apéndice A.....</b>	<b>67</b>
	<b>Apéndice B.....</b>	<b>69</b>
	<b>Apéndice C.....</b>	<b>70</b>
	<b>Apéndice D.....</b>	<b>71</b>
	<b>Apéndice E.....</b>	<b>72</b>
	<b>Apéndice F.....</b>	<b>73</b>
	<b>Apéndice G.....</b>	<b>74</b>
	<b>Apéndice H.....</b>	<b>75</b>
	<b>Apéndice I.....</b>	<b>76</b>



## Lista de Tablas

<b>Tabla 2.1</b> Caracterización típica del lactosuero ácido.....	12
<b>Tabla 2.2</b> Reacciones presentes en la producción de H <sub>2</sub> desde lactosuero ácido.....	15
<b>Tabla 2.3</b> Relaciones lactato/acetato para diferentes tipos de sustrato. ....	22
<b>Tabla 2.4</b> Efecto del hierro en la producción de biohidrógeno.....	23
<b>Tabla 4.1</b> Resumen de las condiciones de operación del reactor UASB. ....	31
<b>Tabla 5.1</b> Caracterización de lactosuero ácido rico en carbohidratos, rico en lactato. ....	37
<b>Tabla 5.2</b> Parámetros asociados al modelo de Gompertz: relaciones Lactato /Acetato. ....	48
<b>Tabla 5.3</b> Parámetros asociados al modelo de Gompertz: 3 Lactato / Acetato + Fe <sup>2+</sup> . ....	51

## Lista de Figuras

<b>Figura. 2.1</b> Descripción del proceso convencional de la producción de queso y la generación de lactosuero (Salas-Vargas et al., 2021).....	11
<b>Figura. 4.1</b> Esquema explicativo del diseño metodológico empleado.....	28
<b>Figura. 4.2</b> Esquema ilustrativo e imagen del reactor UASB para la producción de H <sub>2</sub> a partir de lactosuero ácido. ....	29
<b>Figura. 5.1</b> Porcentajes de H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , y CH <sub>4</sub> en la etapa de adaptación.....	38
<b>Figura. 5.2</b> Concentración en el efluente y reducción en carbohidratos durante la operación. ...	40
<b>Figura. 5.3</b> Productividad de hidrogeno H <sub>2</sub> en las etapas de adaptación y operación. ....	42
<b>Figura. 5.4</b> Producción y consumo de metabolitos en la etapa de operación con lactosuero ácido.....	45
<b>Figura. 5.5</b> Rendimiento y productividad de los ensayos asociados a las relaciones lactato/acetato. ....	47
<b>Figura. 5.6</b> Rendimiento y productividad asociado a los ensayos con adición de hierro (Fe <sup>2+</sup> ) y la relación 3 lactato/acetato.....	50

## Resumen

La producción de biohidrógeno, como vector energético obtenido a partir de residuos, ha cobrado gran importancia en los últimos tiempos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la generación de éste biocombustible a partir de lactosuero ácido proveniente de la industria de fabricación de queso utilizando la vía del lactato-acetato. Se aclimató biomasa en un reactor anaerobio y se operó en continuo. Con la biomasa obtenida se evaluó la adición de hierro y acetato en diferentes concentraciones y relaciones en ensayos en lote.

La metodología consistió en operar el reactor UASB durante 69 días. Se aclimató biomasa metanogénica con glucosa manteniendo un pH de 4.5 y un tiempo de retención hidráulica de 5.5 h, para obtener lodo hidrogenogénico. Posteriormente, se introdujo dos tipos de lactosuero ácido 1) rico en carbohidratos ( $53 \text{ g glucosa} \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) y 2) rico en lactato ( $53 \text{ g lactato} \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). El reactor se operó a pH 4.7 y  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se analizó la productividad de hidrógeno y los metabolitos intermedios generados (acetato, butirato, propionato, valerato y caproato) para cada tipo de sustrato evaluado. Finalmente, se sometió el inóculo acondicionado en la etapa anterior a diferentes relaciones lactato/acetato (2, 3, 5, 8.5), y concentraciones de hierro en forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (25, 50, 100, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Se obtuvo una productividad máxima de hidrógeno de  $4.4 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ , cuando en el influente al reactor contiene el doble de concentración de lactato, que de carbohidratos, y una concentración de hierro de  $50 \text{ mg Fe}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ . Se concluye que tanto la adición de hierro como de acetato tienen un efecto positivo en el incremento de la productividad de hidrógeno ya que el hierro contribuye en el transporte de electrones o en la formación de las hidrogenasas, y el acetato participa en la vía metabólica lactato-acetato.

## Abstract

Biohydrogen production, an energy vector obtained from waste, has recently gained significant importance. This work aimed to study the generation of this biofuel from whey acid from the cheese manufacturing industry using the lactate-acetate route. Biomass was acclimatized in an anaerobic reactor and operated continuously. With the biomass obtained, the addition of iron and acetate was evaluated in different concentrations and ratios in batch trials.

A UASB reactor was used for hydrogen production. Methanogenic biomass was acclimated with glucose, maintaining a pH of 4.5 and a hydraulic retention time of 5.5 h, to obtain hydrogenogenic sludge. Subsequently, two types of acid whey were introduced: 1) rich in carbohydrates ( $53 \text{ g glucose} \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) and 2) rich in lactate ( $53 \text{ g lactate} \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). The reactor was operated at pH 4.7 and  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . The hydrogen productivity and the intermediate metabolites generated (acetate, butyrate, propionate, valerate, and caproate) were analyzed for each type of substrate evaluated. Finally, the inoculum conditioned in the previous stage was subjected to different lactate/acetate ratios (2, 3, 5, 8.5) and concentrations of iron in ferrous form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (25, 50, 100, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Maximum hydrogen productivity of  $4.4 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  was obtained when the reactor influent contained twice the lactate concentration than carbohydrates and an iron concentration of  $50 \text{ mg Fe}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ . It is concluded that both the addition of iron and acetate positively affect hydrogen productivity since iron contributes to the transport of electrons or the formation of hydrogenases, and acetate participates in the lactate-acetate metabolic pathway.

## 1. Introducción

Se espera un incremento en el consumo de productos lácteos. En la Unión Europea (UE), se estima que el acceso a los mismos per cápita aumentará de 25.7 a 26.7 kg, en comparación con un incremento de 12.8 a 14.1 kg en América Latina en el periodo 2016 - 2028, igualmente se espera un incremento anual de 1.4% a nivel mundial. Esta producción masiva conlleva un consumo energético considerable en procesos como: filtrado, pasteurizado, enfriado, homogenizado, batido, empacado al vacío y almacenado (OCDE-FAO, 2019). Se estima que su huella hídrica total es aproximadamente 790 L.kg<sup>-1</sup>, utilizados en la elaboración de queso, donde México destaca como el segundo mayor productor de la región con 569000 toneladas al año después de Brasil (Salas et al., 2021).

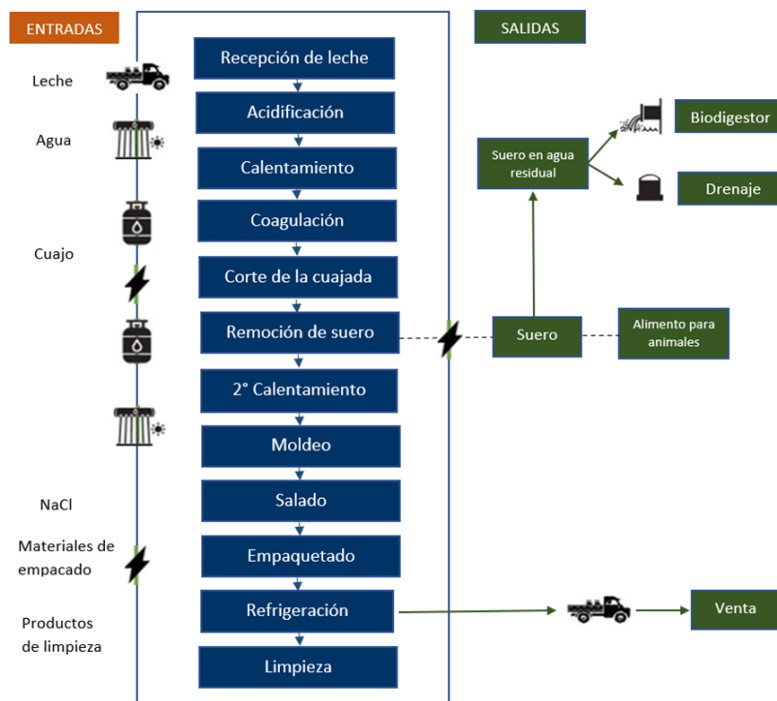
En 2020, la energía en la industria directamente relacionada con las emisiones de CO<sub>2</sub> comprometió el 29% de la energía global, en donde los procesos de enfriamiento y calentamiento consumieron más del 51%, y donde solamente el 16.1% del total fue suministrada por fuentes de energía renovable (REN21,2022). De ahí que la recuperación del recurso energético desde las aguas residuales provenientes de procesos industriales puede contribuir a mejorar el panorama y reducir considerablemente los costos de operación y mantenimiento (ONU,2017). Es así que este trabajo va dirigido a la generación de hidrógeno (H<sub>2</sub>), cuyo rendimiento de combustión es 2.75 veces más alto (122 kJ.g<sup>-1</sup>) que el de los combustibles basados en hidrocarburos (Cabrol et al., 2017), a partir de lactato principalmente, siendo este último uno de los metabolitos presentes en la fermentación oscura del lactosuero ácido, como residuo de la industria quesera, y que representa un factor clave para incrementar la productividad desde este sustrato (Santiago et al., 2019).

Se conoce el potencial del lactosuero en la generación de biohidrógeno. Sin embargo, los caminos metabólicos que inducen las bacterias a la formación del mismo pueden ser dos, ya sea por vía homoláctica o heteroláctica. Aquí, a partir del lactosuero, se lleva a la obtención de lactato en una primera fermentación (Asunis et al., 2019) y la producción simultánea de hidrógeno producido por las bacterias generadoras de H<sub>2</sub> como *Clostridium* desde los carbohidratos directamente. Por tal razón, se deben encontrar nuevas estrategias para aprovechar el lactato de esta primera fermentación, modificando variables como el contenido de metales, fundamentales en la formación de hidrogenasas (Fe<sup>2+</sup>) (Wang et al., 2019); o con el suministro de algún aditivo externo como el acetato (García-Depraect et al., 2020 a), para estimular la presencia de bacterias lacto-fermentadoras, generadoras de hidrógeno, y dirigir las vías metabólicas hacia la ruta posible lactato-acetato

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Producción de queso y generación del lactosuero

Como se puede apreciar en la **Fig. 2.1**, las etapas básicas que comprenden la producción de queso consisten en: acidificación, calentamiento, coagulación (formación de la cuajada), remoción del suero, moldeado, salado, empaquetamiento y refrigeración (Salas-Vargas *et al.*, 2021), donde se pueden llegar a generar 9 L de suero por kilogramo de queso producido (Palmieri *et al.*, 2017). Es así que la precipitación de la caseína puede llevar a la formación de dos tipos de suero: 1) dulce (pH 6-7), por la adición de enzimas proteolíticas como la quimosina, utilizado en gran medida como alimento para animales en forma de polvo, y 2) ácido (pH < 5), obtenido después de la formación de ácidos orgánicos, entre ellos el butírico, que le da un olor distinguible. El lactosuero ácido se caracteriza principalmente por su alto contenido de sal, ausencia de proteínas precipitadas, en su mayoría a un pH cercano a 4.6, lo cual reduce sus posibilidades de uso y lo dispone para ser mezclado con el agua residual proveniente del lavado de máquinas (Carvalho *et al.*, 2017).



**Figura. 2.1** Descripción del proceso convencional de la producción de queso y la generación de lactosuero (Salas-Vargas *et al.*, 2021)

## 2.2 Caracterización típica del lactosuero ácido

El lactosuero ácido posee diferentes características de acuerdo con el producto obtenido (yogurt, queso, mantequilla, leche, helado etc.), además del manejo del agua residual, tipo de operación, limpieza, clima, condición del animal del que proviene entre otras. Se distingue igualmente por tener una relación carbono, nitrógeno, fósforo cercano a  $C/N/P \approx 200 / 3.5 / 1$  que se podría considerar deficiente de nitrógeno para un tratamiento convencional aerobio o anaerobio (Prazers *et al.*, 2012).

**Tabla 2.1** Caracterización típica del lactosuero ácido.

Parámetro	Unidad	<sup>a</sup> Val máx.	<sup>b</sup> Val mín.	Referencia
<b>DQO</b>	mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	102000	8997	(Prazeres, <i>et al.</i> , 2012), (Guerreiro, <i>et al.</i> , 2020)
<b>DQO<sub>s</sub></b>	mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	71000	48000	(Farizoglu, <i>et al.</i> , 2004),(Kassongo, <i>et al.</i> , 2020)
<b>COT</b>	mg. L <sup>-1</sup>	42070	20820	(De Almeida Pires <i>et al.</i> , 2021),(Dessi, <i>et al.</i> , 2020)
<b>DBO<sub>5</sub></b>	mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	60000	4200	(Prazeres, <i>et al.</i> , 2012),(Mansor, <i>et al.</i> , 2021)
<b>DBO<sub>5</sub>/DQO</b>		0.6	0.4	(Prazeres, <i>et al.</i> , 2012),(Mansor, <i>et al.</i> , 2021)
<b>ST</b>	mg. L <sup>-1</sup>	69980	2770	(Dessi, <i>et al.</i> , 2020),(De Almeida Pires <i>et al.</i> , 2021)
<b>SV</b>	mg. L <sup>-1</sup>	64040	2700	(Dessi, <i>et al.</i> , 2020),(De Almeida Pires <i>et al.</i> , 2021)
<b>SST</b>	mg. L <sup>-1</sup>	22000	1180	(Farizoglu, <i>et al.</i> , 2004),(Dessi, <i>et al.</i> , 2020)
<b>SSV</b>	mg. L <sup>-1</sup>	8500	1170	(Farizoglu, <i>et al.</i> , 2004),(Dessi, <i>et al.</i> , 2020)
<b>Carbohidratostotales</b>	mg. L <sup>-1</sup>	52800	35040	(Antonopoulou, <i>et al.</i> , 2021),(Claudio <i>et al.</i> , 2020)
<b>Proteínas</b>	mg. L <sup>-1</sup>	9063	2300	(Yang, <i>et al.</i> , 2003), (Dessi, <i>et al.</i> , 2020)
<b>pH</b>	—	6.5	3.5	(Tehrani, <i>et al.</i> , 2015),(De Almeida Pires <i>et al.</i> , 2021)
<b>NT</b>	mg. L <sup>-1</sup>	2016	105	(De Almeida Pires <i>et al.</i> , 2021),(Mansor, <i>et al.</i> , 2021),
<b>NTK</b>	mg. L <sup>-1</sup>	1613	20	(Yang, <i>et al.</i> , 2003),(Tehrani, <i>et al.</i> , 2015)
<b>PT</b>	mg. L <sup>-1</sup>	540	85	(Farizoglu, <i>et al.</i> , 2004),(Mansor, <i>et al.</i> , 2021)
<b>P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup></b>	mg. L <sup>-1</sup>	1632	188	(Yang, <i>et al.</i> , 2003),(Dessi, <i>et al.</i> , 2020)
<b>Fe<sub>Total</sub></b>	mg. L <sup>-1</sup>	2	0.2	(De Almeida Pires <i>et al.</i> , 2021),(Tirado, <i>et al.</i> , 2018)
<b>Ácido Acético</b>	mg. L <sup>-1</sup>	530	262	(Contreras, <i>et al.</i> , 2019),(Dessi, <i>et al.</i> , 2020)
<b>Ácido Propiónico</b>	mg. L <sup>-1</sup>	83	10	(Dessi, <i>et al.</i> , 2020),(Contreras, <i>et al.</i> , 2019)
<b>Ácido Láctico</b>	mg. L <sup>-1</sup>	29340	926	(Contreras, <i>et al.</i> , 2019),(Dessi, <i>et al.</i> , 2020)
<b>Ácido Butírico</b>	mg. L <sup>-1</sup>	140	22	(Contreras, <i>et al.</i> , 2019),(Rivera, <i>et al.</i> , 2017).
<b>Grasas y Aceites</b>	mg. L <sup>-1</sup>	34217	370	(Guerreiro, <i>et al.</i> , 2020),(Mansor, <i>et al.</i> , 2021),
<b>Conductividad</b>	ms.cm <sup>-1</sup>	16	3.4	(Tirado, <i>et al.</i> , 2018),(De Almeida Pires <i>et al.</i> , 2021)
<b>Alcalinidad</b>	mg. L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	1123	400	(Guerreiro, <i>et al.</i> , 2020),(Tehrani, <i>et al.</i> , 2015)
<b>Turbidez</b>	UTN	6978	588	(Tirado, <i>et al.</i> , 2018),(Guerreiro, <i>et al.</i> , 2020)

<sup>a</sup> Valor máximo encontrado en la bibliografía; <sup>b</sup> Valor mínimo encontrado en la bibliografía.

Dentro de los rangos de los parámetros que caracterizan este tipo de agua residual se encuentran: sólidos suspendidos totales SST ( 0.1- 22 g.L<sup>-1</sup>), pH (3.3 – 9), fósforo total PT (0.006 – 0.5 g.L<sup>-1</sup>), nitrógeno total Kjeldahl NTK ( 0.01- 1.7 g.L<sup>-1</sup> ), amplio índice de biodegradabilidad DBO<sub>5</sub>/DQO ( 0.4 – 0.8 ), demanda química de oxígeno DQO ( 0.1 – 100 g. L<sup>-1</sup>

), un gran contenido de materia orgánica biodegradable, casi en un 99%, causado por: lactosa ( 0.18 - 60 g.L<sup>-1</sup> ), proteínas (1.4 – 33.5 g.L<sup>-1</sup> ) y grasas ( 0.1 - 10.6 g.L<sup>-1</sup> ) (Prazeres *et al.*, 2012).

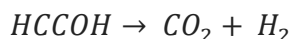
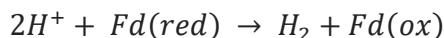
### 2.3 Fermentación Oscura

La fermentación oscura es un proceso donde bacterias anaerobias consumen carbohidratos en un ambiente privado de luz. Estas bacterias pueden ser cultivos puros o consorcios mixtos, los últimos caracterizados por su flexibilidad, una mejor tolerancia al estrés metabólico, y una mayor productividad de H<sub>2</sub>. (Zumar y Mohee, 2016).

Dentro de las diferentes biotecnologías asociadas a la producción de H<sub>2</sub>, este tipo de fermentación se caracteriza por sus altas tasas de producción para un rango amplio de sustratos (Bando *et al.*, 2013). Sin embargo, no se han podido conseguir los rendimientos deseados, debido a la cogeneración de productos como ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes que consumen gran parte de la energía almacenada en el sustrato. Por tal razón, se ha tratado de complementar con sistemas como la fotofermentación, celdas microbianas de combustible y celdas microbianas de electrohidrogenésis, además de aplicar modificaciones en variables propias del proceso: temperatura, pH, carga orgánica, tiempo de retención hidráulica (TRH), presión parcial del H<sub>2</sub>, aplicaciones con biomasa suspendida e inmovilizada, entre otras (Sivagurunathan *et al.*, 2013).

### 2.4 Reacciones y vías metabólicas en la producción de H<sub>2</sub> a partir de lactosuero ácido

A través del metabolismo de las bacterias presentes en los sistemas anaerobios, los polímeros naturales, tales como los carbohidratos, son hidrolizados a glucosa, seguido el piruvato es producido por la vía glucolítica para generar adenosín trifosfato (ATP), viéndose envuelto en dos reacciones bioquímicas que llevan a la formación de H<sub>2</sub> (Buhoo y Mohee, 2016).





Las bacterias ácido-lácticas catabolizan los azúcares produciendo, por fermentación homoláctica, 2 moles de lactato como el único producto final por la vía Embden-Meyerhof-Parnas (en la cual 2 moles de piruvato son producidos por glucolisis generando 2 moles de lactato), por su parte en la fermentación heteroláctica 1 mol de piruvato es convertida a 1 mol de lactato, generando como subproductos etanol, acetato y CO<sub>2</sub>. Es de resaltar que el rendimiento teórico de producción desde lactosa es de aproximadamente 4 mol lactato/mol de lactosa (Martínez *et al.*, 2013).

La producción de hidrógeno desde lactato se da entonces a través de dos caminos; el del acrilato, donde el lactato se usa como única fuente de carbono y energía, produciendo butirato o acetato como metabolitos líquidos, y el del piruvato-ferredoxina oxidorreductasa dependiente de la [Fe-Fe] hidrogenasa y de la [Ni-Fe] hidrogenasa, capaces de re-oxidar la ferredoxina (Cabrol *et al.*, 2017). Esta segunda vía es la más ampliamente utilizada por *Clostridium*, donde el lactato y acetato son utilizados como fuente de carbono y energía (Wang y Yin., 2017). Aquí el lactato actúa como donador de electrones en presencia de acetato que sirve como agente oxidante siendo esencial y evitando la inhibición en la generación de H<sub>2</sub>, produciendo ácido butírico (HBu), CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e H<sub>2</sub> (Tao *et al.*, 2016). En este camino, el rendimiento en la generación de H<sub>2</sub> es más bajo que el encontrado en la fermentación de la glucosa, puesto que la actividad de la hidrogenasa es dos veces menor (Diez-Gonzalez *et al.*, 2017).

En la oxidación del lactato participa la bifurcación de electrones basada en la flavina, este mecanismo se basa en reacciones exergónica y endergónicas acopladas, donde la transferencia de electrones genera una reacción exergónica neta, con un cambio mínimo en la energía libre de Gibbs y máxima conservación de esta. La oxidación de lactato a piruvato requiere la actividad de FAD-dependiente lactato dehidrogenasa LDH/electrón transfiriendo flavoproteínas complejas (EtfAB) que catalizan la reducción-ferredoxina dependiente del NAD por lactato (Detman *et al.*, 2019):



**Tabla 2.2** Reacciones presentes en la producción de H<sub>2</sub> desde lactosuero ácido.

<b>Reacciones favorables en la producción de H<sub>2</sub>.</b>		
<b>A partir de hexosa.</b>		
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$	(4)	(Wang <i>et al.</i> , 2021)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	(5)	(Wang <i>et al.</i> , 2021)
<b>A partir de lactato (Piruvato ferredoxina – oxidorreductasa).</b>		
$CH_3CH(OH)COOH + (0.4 - 0.5) CH_3COOH \rightarrow (0.7 - 0.83) CH_3CH_2CH_2COOH + (0.75 - 1) CO_2 + (0.5 - 0.6) H_2 + (0.4 - 0.83) H_2O$	(6)	(Wu <i>et al.</i> , 2012)
$CH_3CH(OH)COOH + 0.4 CH_3COOH \rightarrow 0.7 CH_3CH_2CH_2COOH + 0.6 H_2 + CO_2$	(7)	(García-Depraect <i>et al.</i> , 2020 a)
$CH_3CH(OH)COOH + 0.5 CH_3COOH \rightarrow 0.75 CH_3CH_2CH_2COOH + 0.5 H_2 + CO_2 + 0.5H_2O$	(8)	(Matsumoto <i>et al.</i> , 2007)
<b>A partir de lactato (Acrilato).</b>		
$CH_3CH(OH)COOH \rightarrow 0.5 CH_3CH_2CH_2COOH + H_2 + CO_2 + 0.5H_2O$	(9)	(Tholozan <i>et al.</i> , 1992)
$CH_3CH(OH)COOH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 2H_2$	(10)	(Gomez <i>et al.</i> , 2017)
<b>Reacciones desfavorables H<sub>2</sub>.</b>		
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	(11)	(Wang <i>et al.</i> , 2021)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$	(12)	(Wang <i>et al.</i> , 2021)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2CH_2OH + 2CO_2 + 2H_2O$	(13)	(Wang <i>et al.</i> , 2021)
$CH_3CH(OH)COOH + H_2 \rightarrow CH_3CH_2COOH + H_2O$	(14)	(García-Depraect <i>et al.</i> , 2019 a)
$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH^- + 2H_2O$	(15)	(Saady <i>et al.</i> , 2013)

## 2.5 Parámetros que influyen en la producción de H<sub>2</sub>

### 2.5.1 pH

Este parámetro es determinante en la producción de H<sub>2</sub> en el proceso de fermentación oscura, ya que junto con el tiempo de retención hidráulica (TRH), gobierna los rendimientos de generación de productos líquidos y gaseosos, interviniendo en: el incremento de la actividad

enzimática de la biomasa (condiciones de pH elevado), la hidrólisis del sustrato, las rutas metabólicas, el grado de nutrientes transportados a las células microbianas y la reducción en el rendimiento de utilización de la energía (pH bajos), causada por ácidos no disociados cruzando la membrana celular, ocasionando un incremento en el uso de la misma para excretar el exceso de protones dentro de la célula (Asunis *et al.*, 2019).

En lo referido a los carbohidratos, su degradación disminuye a pH bajo, encontrándose un valor óptimo de 6, el cual favorece la producción de H<sub>2</sub> durante la fermentación secundaria del lactato, y la vía homoláctica en la primera fermentación (Asunis *et al.*, 2019). A partir de lactato se han probado valores entre 3.8 - 7.5 encontrándose la mayoría de los casos entre 5.5 - 6.0, este último rango favorece la actividad de las bacterias lacto-fermentadoras generadoras de hidrógeno (LF-HPB), principalmente porque permite catalizar la formación de enzimas como las hidrogenásas (García-Depraect *et al.*, 2020 a).

Claudio *et al.*, (2020) demostraron que la mayoría de la producción de AGV se consigue a  $\text{pH} \geq 7$ , mientras que gran parte de la remoción de DQO se consiguió en condiciones ácidas, en general Jankowska *et al.*, (2017) consideran que valores de pH neutro favorecen la formación de AGV, para valores entre 5 y 6 la producción de ácido acético y propiónico se ve favorecida, por otro lado un pH más bajo promueve la generación de ácido propiónico y valérico (Calero *et al.*, 2018).

Otro aspecto a destacar es la influencia del pH en diferentes reactores. En sistemas continuos la fase de arranque parece prolongarse más a pH 5.5 comparado con valores de entre 6 y 6.5 (García-Depraect *et al.*, 2020 b). En sistemas discontinuos el pH decrece naturalmente cuando el lactato se acumula principalmente por la transformación de los carbohidratos, y crece cuando se consume para producir H<sub>2</sub> (Blanco *et al.*, 2019). Finalmente, las variaciones de  $\text{pH} > 0.1$  pueden cambiar el género dominante en el medio de *Clostridium* hacia las bacterias ácido lácticas (BAL) con rapidez (Moon *et al.*, 2019), mostrando claramente la sensibilidad de los sistemas a este factor.

### **2.5.2 Tiempo de retención hidráulica (TRH)**

En general se ha reportado inestabilidad en la producción de H<sub>2</sub> atribuido a prolongados TRH (Blanco *et al.*, 2019). García-Depraect *et al.*, (2019 b) notaron la aparición de una biomasa

más diversa al incrementar este parámetro acompañado de la generación de arqueas metanogénicas (Santiago et al., 2019).

Monroy *et al.*, (2018) encontraron que el reactor continuo operado con un TRH cercano a las 6 h mostró una mayor productividad ( $17.3 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), comparado con el operado a 10 h ( $12.4 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), de igual forma Ramírez *et al.*, (2015) lograron una productividad de  $23.4 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  con un TRH de 6 h para el mismo tipo de reactor; en ambos casos se utilizó glucosa como sustrato. En otra experiencia Park *et al.*, (2015) alcanzaron una productividad de  $11.8 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  con un TRH de 8 h (rango de 8-12 h), utilizando galactosa como sustrato, concluyendo que TRH muy cortos pueden causar la pérdida de actividad biológica importante para la formación de  $\text{H}_2$ .

Este parámetro es principalmente utilizado como estrategia de selección de microorganismos, donde valores bajos de TRH con cargas orgánicas altas promueven el crecimiento de bacterias lacto-fermentadoras productoras de hidrógeno (LF-HPB) (García-Depraect *et al.*, 2019 c). Como sugieren Ribeiro *et al.*, (2022), al utilizar sustrato real (suero de leche) en un reactor UASB, obteniendo  $2.4 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  con un TRH cercano a 4.6 h. Santiago *et al.*, (2019) afirman que la aparición de bacterias ácido lácticas (BAL) se ve favorecida por  $\text{TRH} < 6 \text{ h}$ , mientras que a  $\text{TRH} > 6 \text{ h}$  y cercanos a 14 h se ve con notoriedad la presencia de *Clostridium*, además de un aumento en la generación de ácido acético, butírico e  $\text{H}_2$ . De manera similar García-Depraect *et al.*, (2021 a) destacan un rango optimo entre 6 y 12 h alcanzando una productividad de  $11.7 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  favorecida por la vía metabólica lactato- acetato. Polletini *et al.*, (2022) utilizaron suero de leche sintético como sustrato en un reactor (CSTR) alcanzando la máxima productividad ( $4.9 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) en un TRH de 6 h.

García-Depraect *et al.*, (2020 a) explican que en la práctica se han utilizado  $\text{TRH} < 6 \text{ h}$  en reactores de biomasa fija para modificar la carga, notando la aparición de microorganismos perjudiciales para la producción de  $\text{H}_2$ , por tal razón se deben buscar estrategias de selección diferentes a la modificación única de esta variable.

### 2.5.3 Carga orgánica

Determina la disponibilidad del sustrato para los microorganismos, se incrementa disminuyendo los TRH o aumentando las concentraciones del sustrato (García-Depraect *et al.*,

2020 a). Las cargas orgánicas altas incentivan la producción de H<sub>2</sub> con el aumento en el flujo de electrones, pero también pueden sobrecargar el sistema (Wu *et al.*, 2012). Respecto a la producción de AGV, las cargas bajas favorecen la producción de ácido propiónico y valérico, mientras que las altas de ácido butírico (Claudio *et al.*, 2020). Dentro de las productividades encontradas, Ramirez *et al.*, (2015) evaluaron un reactor continuo de mezcla completa (CSTR) con una carga de 100 g DQO. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> utilizando glucosa como sustrato, y consiguiendo 25 L H<sub>2</sub>. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; por su parte Monroy *et al.*, (2018) obtuvieron una producción máxima de 17 L H<sub>2</sub>. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, sometiendo dos reactores (CSTR) a choques de carga, denotando que valores entre 90-120 g DQO. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> promovían la producción de H<sub>2</sub>, mientras que cargas mayores la inhibían.

Para la producción de H<sub>2</sub> desde lactato, partiendo de distintas fuentes de este metabolito, se manejan rangos de 40 - 600 g DQO. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con valores típicos de entre 100 y 200 g DQO. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (García-Depraect *et al.*, 2020 a). Elevadas cargas orgánicas, combinadas con TRH cortos, permiten un mejor balance entre las bacterias ácido-lácticas (BAL) y las lacto-fermentadoras productoras de hidrógeno (LF-HPB) (de Jesús *et al.*, 2020).

#### 2.5.4 Temperatura

Para la fermentación oscura y la producción de H<sub>2</sub> se usan en su mayoría bacterias del género *Clostridium*, en condiciones mesofílicas (Wang *et al.*, 2019). Hay evidencia de que la generación en condiciones termofílicas consigue una mayor productividad y rendimiento mejorando la degradación de sustratos complejos, con una calidad superior del biogás, comparado con los sistemas mesofílicos (Kim *et al.*, 2016). Sin embargo, varios estudios han demostrado que las condiciones termofílicas llevan a una menor diversidad en la comunidad microbiana (Dareioti *et al.*, 2014). Por otra parte, en condiciones mesofílicas no se promueve la formación de metano (CH<sub>4</sub>), Hernandez y Buitrón., (2014) trabajaron a 35 C° para suprimir la actividad metanogénica y lograr un arranque correcto de un reactor UASB, alimentado con glucosa. Dicho esto, la mayoría de las bacterias lacto fermentadoras productoras de hidrógeno (LF-HPB) del género *Clostridium* (*C.butyricum*, *C.tyrobutyricum*, *C. beijerinckii*) son mesófilas (30°C – 37°C) al igual que otras bacterias de este género, metabolizando diferentes sustratos, por tal razón gran parte de los estudios se han llevado a cabo en estas condiciones (Detman *et al.*, 2021).

### 2.5.5 Inoculación

Dentro de los tratamientos de inoculación destaca el choque térmico, ya que garantiza la eliminación de ciertas bacterias, mientras selecciona otras que pueden soportarlo por esporulación, como algunas productoras de hidrógeno (Sivagurunathan *et al.*, 2020). Entre las experiencias que destacan para este tipo de tratamiento: Lovato *et al.*, (2021) utilizó 100 mL de inóculo, proveniente de un reactor UASB, que trataba vinaza de caña con un contenido de SSV  $16.26 \text{ g.L}^{-1}$  consiguiendo como estrategia más efectiva el someter este mismo a  $30^{\circ}\text{C}$ , con incrementos de  $5^{\circ}\text{C}$  al día, hasta alcanzar  $55^{\circ}\text{C}$  e incrementos en la carga de  $1 \text{ g DQO. L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  hasta  $15 \text{ g DQO. L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ , alcanzando un pico en la productividad de  $3.37 \text{ L H}_2 \text{ L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

Utilizando como sustrato suero de queso, Lovato *et al.*, (2017) emplearon como fuente de inóculo lodo proveniente de un sistema UASB de la industria de los rastros de aves de corral, con un contenido de SSV de 51 y  $62 \text{ g.L}^{-1}$ , al cual aplicó un tratamiento de choque térmico sometiéndolo a  $90^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, logrando una productividad máxima de  $2.89 \text{ L H}_2 \text{ L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  en la co-digestión de suero de queso y glicerina.

Andreani *et al.*, (2019) emplearon una fuente de lactato y acetato inmediata, como lo es el almidón de yuca fermentada, sometiéndola a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos en un reactor batch anaerobio secuencial, alcanzando una productividad máxima de  $2.4 \text{ L H}_2 \text{ L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  para aguas residuales de esta misma industria con alto contenido de almidón y ácido láctico. Con el objetivo de lograr la producción de  $\text{H}_2$  desde lactato.

Asunis *et al.*, (2019) trabajaron con un inóculo nativo proveniente del suero de queso de oveja este fue sometido a congelación ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) y derretimiento  $25^{\circ}\text{C}$  sin afectar la cantidad de microorganismos presentes, logrando una productividad máxima de  $5.2 \text{ L H}_2 \text{ L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

A pesar que el tratamiento por choque térmico es ampliamente utilizado, no permite el crecimiento de microorganismos propios del inóculo que podrían contribuir a los procesos de generación de  $\text{H}_2$ , por tal razón se han probado otras estrategias menos invasivas como lo muestran Hernandez y Buitrón., (2014), inoculando con gránulos anaerobios de reactor UASB para tratar de eliminar la actividad metanogénica, con una estrategia de reducción de pH (4.5) y disminución en el TRH a 5.5 h, encontrando que en el día 14 se había suprimido toda actividad de este tipo, logrando una productividad máxima de  $1.7 \text{ L H}_2 \text{ L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ , utilizando glucosa como

sustrato. En otra experiencia Buitrón *et al.*, (2020) establecieron una estrategia similar al utilizar lodo metanogénico anaerobio granular, de la industria cervecera, con un contenido de sólidos de 7.3 g SV. L<sup>-1</sup> sometándolo a control biocinético a pH de 4.5, TRH de 5.5 h y cargas orgánicas de 158 y 218 g DQO L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

### 2.5.6 Configuración del reactor

Para la producción de H<sub>2</sub> se emplean medios inmovilizados, ya que pueden mantener concentraciones altas de biomasa. Dentro de las técnicas de inmovilización destacan la biopelícula adherida a la superficie y el atrapado dentro de la matriz, este último presenta inconvenientes relacionados a la transferencia de masa, pero garantiza un ambiente apropiado para el crecimiento de las bacterias.

Otro factor a tener en cuenta es el tamaño de la partícula del soporte, que puede estar entre 2 y 8 mm con un óptimo de 6 mm, si la densidad de partículas de soporte es elevada se puede causar un crecimiento excesivo de biofilm, presentando dificultades en la transferencia de masa y la recuperación de biogás (Gokfiliz y Karapinar., 2017). Dentro de los estudios que se distinguen en el uso de biomasa inmovilizada se encuentran: Rai *et al.*, (2012) quienes estudiaron la producción de hidrógeno desde la fermentación oscura del suero de queso, con biomasa suspendida e inmovilizada, donde consiguieron 2.04 mol H<sub>2</sub>. mol<sup>-1</sup> de lactosa y 3.5 mol. H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> de lactosa respectivamente, mostrando las ventajas de la biomasa inmovilizada; en otra investigación Sivagurunathan *et al.*, (2015) obtuvieron una de las productividades volumétricas más altas conseguidas hasta ahora (55 L H<sub>2</sub>. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), con agua residual de la industria de las bebidas cuya carga orgánica fue de 320 g DQO. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

Gran parte de los estudios con fermentación oscura para la producción de H<sub>2</sub>, con biomasa inmovilizada, fueron llevados a cabo en reactores continuos, ya que pueden operar a TRH cortos sin lavar la biomasa (Gokfiliz y Karapinar., 2017). De las mejores producciones obtenidas en reactores continuos de mezcla completa (CSTR) destacan 33.7 L H<sub>2</sub>. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con una carga de 138.6 g lactosa. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y TRH de 6 horas (Davila-Vasquez *et al.*, 2009).

Se han empleado otros tipos de tecnología como: de lecho empacado acidogénicos (APBR) que permiten TRH más cortos respecto a los reactores sin biomasa inmovilizada, no obstante, con TRH prolongados acumulan una excesiva cantidad de la misma, saturándose, la

nueva configuración de este tipo de reactores tiene una porosidad mayor reduciendo la acumulación excesiva (Anzola-Rojas *et al.*, 2016). Por otro lado, los reactores de lecho empacado (PBR) son una buena alternativa para la producción de H<sub>2</sub>, al caracterizarse por su fácil construcción, ausencia de agitación continua, incremento en el tiempo de retención celular, y una matriz de soporte que puede provenir de materiales reciclados, y que también puede ser utilizada para seleccionar las poblaciones microbianas (Perna *et al.*, 2013).

Dentro de las tecnologías más utilizadas, que no involucran biomasa inmovilizada, se encuentra el reactor anaerobio con manto de lodos y flujo ascendente (UASBR), distinguido por ser un proceso estable y eficiente en la producción de H<sub>2</sub>, por la formación de gránulos con buenas propiedades de sedimentabilidad y retención a bajos TRH y altas cargas orgánicas, este sistema presenta tiempos largos de arranque que pueden llegar a ser de varios meses (Sivagurunathan *et al.*, 2017). Por último, las condiciones de mezcla del reactor y la capacidad de transferencia (gas – líquido) son factores selectivos de presión que pueden determinar la comunidad microbiana presente y afectar al mismo tiempo la generación de H<sub>2</sub> (Buitrón *et al.*, 2020).

### 2.5.7 Otros factores

**Potencial de oxido reducción.** En general para tener un ambiente de reducción favorable y conseguir la producción optima de H<sub>2</sub> desde lactato, el rango de este parámetro debe oscilar entre -200 y -500 mV (García-Depraect *et al.*, 2020 a), donde potenciales redox entre -300 y – 250 mV conducen a la fermentación ácido butírica del lactato por las bacterias lactofementadoras generadoras de hidrógeno (LF- HPB) como *C.butiricum* (Chen *et al.*, 2015). En otro estudio Cheng *et al.*, (2016) reportaron un rango entre - 297 mV a - 467 mV, con un promedio de - 360 ± 45 mV, para la producción de hidrógeno desde lactato utilizando como sustrato el bagazo de la fermentación de bioetanol.

**Relación Lactato/Acetato.** Vale la pena aclarar que esta relación ha sido estudiada pocas veces de manera específica, puesto que las concentraciones para estos dos metabolitos varían de acuerdo al acuerdo con el sustrato como se puede observar en la Tabla 2.3.

Dentro de estas experiencias destacan Wu *et al.*, (2012) quienes utilizaron como sustrato agua enriquecida con lactato y acetato, empleando un inóculo proveniente del tratamiento del agua residual de la generación de bioetanol. Esta experiencia mostró que la relación mantiene un



valor óptimo cercano a 3.3, encontrando la mayor producción de H<sub>2</sub> con concentraciones de lactato y acetato de entre 30/9 g.L<sup>-1</sup> y un TRH cercano a las 18 h, cuando este parámetro disminuyó a 1.96 h, manteniendo las concentraciones previamente mencionadas, la producción de H<sub>2</sub> fue inhibida. Una vez el lactato se consumió, el crecimiento de la biomasa, la formación de butirato, y la producción de biogás también cesaron a pesar de la existencia de acetato.

Igualmente destacan estudios recientes como el de Fuentes-Santiago *et al.*, (2023), quienes obtuvieron la mayor productividad utilizando la relación propia lactato/acetato (5.1) del suero de queso fermentado, en comparación a la obtenida con la relación molar de 0.28, reportada como ideal para la producción de hidrógeno desde ácido láctico. Por su parte Ordoñez-Frías *et al.*, (2023) establecieron una relación de 8.25 para el mismo tipo de sustrato, resaltando la baja concentración de carbohidratos propia del mismo (5% de la DQO total).

**Tabla 2.3** Relaciones lactato/acetato para diferentes tipos de sustrato.

Sustrato	Configuración	Productividad NLH <sub>2</sub> . LR <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Temperatura °C	pH	Relación lactato/acetato	Referencia
Vinaza de Tequila	Batch	3.8	35	5.8	0.47	García-Depraect <i>et al.</i> , 2018
Vinaza de caña de azúcar	AnPBR,	1.1	55	5.3	1.25	Fuess <i>et al.</i> , 2018
Vinaza de caña de azúcar	AnSTBR,	2.1	55	5.2	1.83	Fuess <i>et al.</i> , 2019
Suero de leche sintético	AnSTBR,	1.6	25	5.1	2.9	Blanco <i>et al.</i> , 2019
Melaza de caña de azúcar	EGSB	13.9	30	4.7	1.3	Freitas <i>et al.</i> , 2020
AR. Sintética rica en Lactato y Acetato	CSTR	5.1	35	6	3.3	Wu <i>et al.</i> , 2012
Suero de queso	Batch	2.9	37	6	5.1	Fuentes-Santiago <i>et al.</i> , 2023
Suero de queso fermentado	Batch	3.2	37	5	8.25	Ordoñez-Frías <i>et al.</i> , 2023

Aunque el camino de producción de acetato es el más favorable en la obtención de H<sub>2</sub>, los estudios han demostrado que el camino del butirato es esencial para una generación eficiente, al competir con la aparición de metabolitos como el etanol (Yu *et al.*, 2013).

**Hierro (Fe) y otros metales presentes.** Tanto Hierro (Fe) como Níquel (Ni) son fundamentales en la formación de [Fe-Fe] Hidrogenasa y [Ni-Fe] Hidrogenasa esenciales en la

generación de H<sub>2</sub>, siendo la primera 100 veces más activa que la segunda (Cieciura-Włoch *et al.*, 2020) como producto de la formación de clústeres en el núcleo de la enzima: Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> – Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> (Ahmed y Dey *et al.*, 2019), que sirven para transferir electrones entre las asociaciones de hidrógeno y los transportadores como el NADH. Estas propiedades se le atribuyen especialmente al hierro en su forma ferrosa (Fe<sup>2+</sup>), puesto que muestra un efecto de estimulación en los genes de expresión funcional (Yin y Wang., 2019).

Adicionalmente, se ha visto que el hierro (Fe<sup>2+</sup>) participa en la síntesis de la ferredoxina (Zhao et al., 2017), haciendo parte de las proteínas hierro – sulfuro, claves en la transferencia de electrones que actúan como transportadores en la oxidación del piruvato a Acetil - Coa y CO<sub>2</sub> mientras los protones H<sup>+</sup> son reducidos a H<sub>2</sub> (Yang y Wang., 2018).

**Tabla 2.4** Efecto del hierro en la producción de biohidrógeno.

Fuente	Sustrato	Configuración, Temperatura °C, pH	Rango de concentración mg. L <sup>-1</sup>	<sup>c</sup> C. Optima mg. L <sup>-1</sup>	<sup>d</sup> Rend %	Referencia
FeSO <sub>4</sub>	Glucosa	Batch, 37°C 6.8	0 - 200	200	32	Zhang <i>et al.</i> ,2017
FeSO <sub>4</sub>	Glucosa	Batch, 35°C, 5.5	150 - 450	300	30.3	Chong <i>et al.</i> ,2009
FeSO <sub>4</sub>	Glucosa	Batch, 35°C, 5.5	0 - 50	50	7	Taherdanak <i>et al.</i> ,2016
FeSO <sub>4</sub>	Glucosa	Batch, 35°C, 5.2	0 - 1500	350	58.3	Wang <i>et al.</i> ,2017
FeCl <sub>2</sub>	Glucosa	ACSTR, 37°C, 5	0.5 - 100	50	71	Karadag <i>et al.</i> ,2010
FeCl <sub>2</sub>	Glucosa	Batch, 37°C, 6.8	25 - 500	50	23.4	Dhar <i>et al.</i> ,2012
FeCl <sub>2</sub>	Bagazo de Caña	Batch, 30°C, 5	50 - 400	200	62.1	Reddy <i>et al.</i> ,2017
FeCl <sub>2</sub>	<sup>a</sup> A.R Sintética	Batch, 30°C, 7.2	25 - 200	100	19	Srikanth <i>et al.</i> ,2012
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Almidón de Yuca	Batch, 37°C, 6	0 - 400	200	63	Lin <i>et al.</i> ,2016
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Glucosa	Batch, 60°C, 5.5	0 - 500	50	34.4	Engliman <i>et al.</i> ,2017
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<sup>b</sup> A.R Destilería	Batch, 37°C, 5.5	0 - 400	50	44	Gadhe <i>et al.</i> ,2015
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Sacarosa	Batch, 35°C, 6	0- 1600	200	66	Han <i>et al.</i> ,2011

<sup>a</sup> Agua residual sintética; <sup>b</sup> agua residual de destilería; <sup>c</sup> concentración de hierro optima; <sup>d</sup> porcentaje de mejora en el rendimiento.

Por su parte, los óxidos donde el hierro se presenta en forma férrica (Fe<sup>3+</sup>), tienen un efecto cinético más que metabólico, manteniendo los rendimientos e incrementando las productividades sustancialmente al acelerar las reacciones de oxido – reducción (Beckers et al., 2013), y en un menor grado favoreciendo la actividad de la ferredoxina oxidorreductasa (Ren et al., 2021). Otros iones de importancia son Ca<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup>, que a altas concentraciones inhiben la producción de H<sub>2</sub>, ya que modifican las cargas en la superficie de la bacteria, el Mg<sup>2+</sup>, a su vez,

estimula las moléculas para entrar en los caminos metabólicos en el proceso acidogénico, finalmente,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^0$  y  $\text{Mg}^{2+}$  participan en formación de la estructura de la pared celular, el transporte de electrones, proteínas complejas y ATP (Sekoaj y Daramola., 2018).

**Oxígeno disuelto.** La mayoría de *Clostridium* son anaerobios estrictos, especialmente para la enzima clave Hidrogenasa, que cataliza la producción de  $\text{H}_2$  y es muy sensible a este metabolito, un ejemplo claro es la [Fe-Fe] Hidrogenasa cuya inactivación en presencia de oxígeno es irreversible, a diferencia de la [Ni-Fe] Hidrogenasa (Wang y Yin., 2021) que tolera valores más elevados.

**Presión parcial del  $\text{H}_2$ .** Una presión parcial elevada superior a  $10^{-3}$  atm, que se estima mediante un manómetro experimentalmente y que no fue considerada en el presente estudio, puede inhibir el proceso al incrementar la concentración de  $\text{H}_2$  en la fase líquida y disminuir su presencia en la fase gaseosa (Yang *et al.*, 2021), puesto que en estas condiciones la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) adquiere valores  $> 0$  para las diferentes reacciones, lo que hace termodinámicamente desfavorable la reducción de protones  $\text{H}^+$  llevada a cabo por las hidrogenásas NADH [Fe-Fe] y NADH-Fdred- [Fe-Fe] (Ferredoxina reductasa), mediante las cuales se produce la mayoría del  $\text{H}_2$ , además se promueve la reducción de  $\text{Fd}_{\text{ox}}$  favoreciendo la oxidación del  $\text{H}_2$  a protones, disminuyendo directamente la productividad del sistema (Bundhoo y Mohee., 2016).

Algunos autores, consideran que una elevada presión parcial del  $\text{H}_2$  puede inhibir el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga a acetato e  $\text{H}_2$ , además de direccionarlo hacia productos como propionato, lactato, etanol, acetona y butanol a expensas del  $\text{H}_2$  presente en el sistema (Cabrol *et al.*, 2016).

## **2.6 Microorganismos involucrados en la producción de $\text{H}_2$ a partir de lactosuero ácido**

### **2.6.1 *Clostridium* y *Megasphaera***

Las bacterias del género *Clostridium* se caracterizan por ser Gram positivas, anaerobias estrictas, con un rendimiento relativamente alto en la producción de  $\text{H}_2$ , para un rango amplio de sustratos dentro de los que destacan: glicerol, hexosa, pentosa, fructosa, lactosa, almidón, maltosa, celulosa y xilosa entre otros (Wang y Yin., 2017). Este género es igualmente reportado

por su dominancia en cultivos mixtos, ya que presenta alta resistencia a las condiciones adversas de pretratamientos como: aireación, choques de calor, choques ácidos, y radiación ionizante, logrando repoblarse entre un 50 y 90% para estos dos últimos (Yang *et al.*, 2019).

Dentro de las especies del género previamente mencionado, que se caracterizan por metabolizar lactato para producir H<sub>2</sub>, por la vía del piruvato-ferredoxina oxidoreductasa, donde 1 mol de lactato es utilizado como fuente de energía y 0.4 – 0.5 mol de acetato sirven como aceptor de electrones (Diez-Gonzalez *et al.*, 1995), destacan los géneros como *Clostridium butyricum*, que ha sido ampliamente utilizada y detectada en cultivos puros y mixtos de sistemas de fermentación, debido a su alta eficiencia en la producción de H<sub>2</sub> (0.23 - 3.57 mol H<sub>2</sub>. mol hexosa<sup>-1</sup>) en un amplio rango de degradación de sustratos como glucosa, fructosa, lactosa, almidón y glicerol, además de ser tolerante a medios alcalinos (Junghare *et al.*, 2012) y fenol (Tai *et al.*, 2010). Igualmente destaca *Clostridium acetobutylicum* (Detman *et al.*, 2019) produciendo acetona, butanol, etanol e H<sub>2</sub>, mostrando una gran actividad a la amilasa, lo cual facilita su aplicación en sistemas de fermentación con almidón como sustrato. Diez-Gonzalez *et al.*, (1995) resaltan su capacidad para metabolizar lactato en presencia de acetato, sus rendimientos oscilan entre 0.60 - 2.97 mol H<sub>2</sub>. mol hexosa<sup>-1</sup> (Wang y Yin., 2021).

Por otro lado, *Clostridium beinjerinckii*, (García-Depraect *et al.*, 2020 a) puede metabolizar varias fuentes de carbohidratos como glucosa, sacarosa, xilosa, glicerol, y peptona, con un rango de rendimiento de entre 0.06 - 3.58 mol H<sub>2</sub>. mol hexosa<sup>-1</sup>, también la distinguen su aclimatación a los cambios de pH, resistencia a varios inhibidores (Yang *et al.*, 2018) e intolerancia a la luz (540 W/m<sup>2</sup>), con un decrecimiento en la producción de H<sub>2</sub> de hasta un 83%, lo que la hace ideal para el proceso de fermentación oscura (Zagrodnik y Laniecki., 2016).

En el género *Megasphaera* destaca *Megasphaera elsdenii* en la producción de H<sub>2</sub> desde lactato (Ohnishi *et al.*, 2021), que se caracteriza principalmente por lograr cooperar con bacterias ácido-lácticas. Este microorganismo no esporula, por tanto, es sensible al tipo de pretratamiento térmico (Ohnishi *et al.*, 2010). De igual forma es incapaz de transformar los azúcares directamente, como si lo hacen algunas bacterias del género *Clostridium*, sin embargo, logra metabolizar xilosa y celobiosa en presencia de lactato, siendo estos azúcares los mayores componentes de la biomasa lignocelulótica, que es la más abundante en la naturaleza. Al estar en presencia de lactato se le atribuyen rendimientos cercanos a 0.82 mol H<sub>2</sub>. mol lactato<sup>-1</sup> generando

propionato, acetato, valerato, butirato, formato e iso-butirato, reduciendo las ferredoxinas para producir H<sub>2</sub> desde valerato principalmente.

### 2.6.2 Bacterias ácido-lácticas (BAL)

El estudio de este tipo de microorganismos promete expandir la fuente de sustrato para las bacterias lacto-fermentadoras productoras de hidrógeno LF-(HPB) como *Clostridium*, al metabolizar algunos compuestos orgánicos complejos y convertirlos en lactato, empleándolos en la producción de H<sub>2</sub>. (García-Depraect *et al.*, 2021). Sin embargo, también se les atribuye un efecto negativo directo en este tipo de producción, especialmente en sistemas de fermentación oscura (Łukajtis *et al.*, 2018). Lo anterior asociado a cuatro causas principales: la competencia por el sustrato, la excreción de péptidos antimicrobianos, la sobre acidificación del medio de cultivo (Gomes *et al.*, 2016) y a una velocidad de duplicación promedio superior (0.25 - 0.4 h<sup>-1</sup>) en relación a las lacto-fermentadoras productoras de hidrógeno LF-(HPB) (0.172 h<sup>-1</sup>) (Santiago *et al.*, 2019).

Dentro de los géneros característicos se destacan *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y *Enterobacter*, siendo endógenos del inóculo o de sustratos (Kawagoshi *et al.*, 2005) como el suero de queso, y en el caso de *Lactobacillus*, teniendo la capacidad de esporular ante condiciones de estrés (Setlow *et al.*, 2003). Al género *Enterobacter* se le atribuyen rendimientos en la producción de hidrógeno entre 0.9 - 1.8 mol de H<sub>2</sub>. mol glucosa<sup>-1</sup> en cultivo suspendido y 2.56 mol de H<sub>2</sub>. mol de glucosa<sup>-1</sup> con biomasa inmovilizada. Dentro de sus características establece cierta relación simbiótica con *Clostridium*, ayudando a mantener la anaerobiosis del sistema (Santiago *et al.*, 2019).

### **3. Hipótesis y Objetivos**

#### **3.1 Hipótesis**

Se podrá incrementar la producción de biohidrógeno por la vía lactato-acetato a partir de lactosuero ácido y con un inóculo adaptado al aplicar la relación lactato/acetato y concentración de hierro (II) adecuadas.

#### **3.2 Objetivos**

##### **3.2.1 Objetivo General**

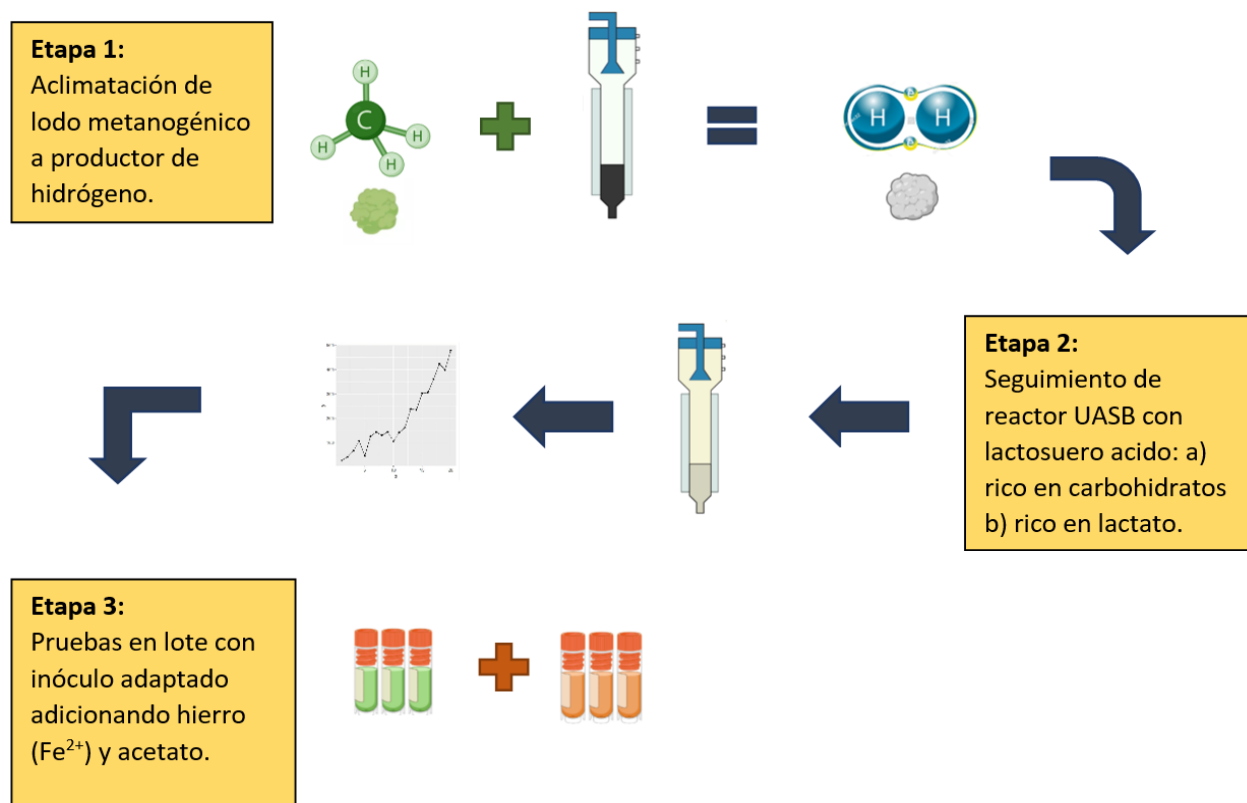
Evaluar la generación de hidrógeno a partir de lactosuero ácido bajo diferentes relaciones lactato/acetato con adición de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por la vía de lactato-acetato.

##### **3.2.2 Objetivos específicos**

- Desarrollar un inóculo capaz de producir hidrógeno a partir de lodo metanogénico
- Evaluar el funcionamiento de un reactor (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) UASB para la producción de hidrógeno desde lactosuero ácido .
- Determinar el efecto de la relación lactato/acetato y la adición de hierro  $\text{Fe}^{2+}$  para el incremento de la producción de hidrógeno, a partir de lactosuero ácido en sistemas en lote.

#### 4. Metodología

La metodología se desarrolló en 3 etapas como se observa en la **Figura 4.1**. La primera consistió en el acondicionamiento de aproximadamente 400 ml lodo metanogénico granular, proveniente de la industria harinera, en lodo productor de hidrógeno en un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés) en modo continuo.



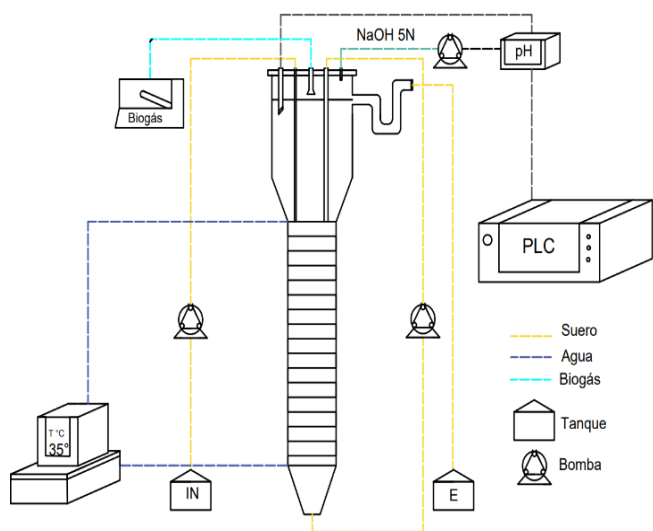
**Figura. 4.1** Esquema explicativo del diseño metodológico empleado.

En la segunda etapa se operó el reactor bajo cargas orgánicas definidas equivalentes en DQO a  $87.13 \text{ g DQO} \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  y  $117.96 \text{ g DQO} \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ , atribuidas principalmente a lactosuero ácido rico en carbohidratos y lactosuero ácido rico en lactato respectivamente, provenientes de la industria quesera. El cambio en el sustrato se realizó hasta que el coeficiente de variación (CV) en la productividad no superó el 10% para tres mediciones consecutivas.

Como tercera etapa se evaluaron diferentes relaciones lactato-acetato, estableciendo pruebas en lote, seguido de la adición de hierro en su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), utilizando (Cloruro de hierro tetrahidratado)  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  como reactivo en diferentes concentraciones, basado en el mejor rendimiento de la relación lactato/acetato previamente encontrado.

#### 4.1 Descripción del sistema

El reactor UASB de 2 L de volumen de trabajo y un espacio de cabeza de 400 mL, cuyo esquema e imagen se pueden observar en la **Figura 4.2**, se operó en modo continuo con velocidad ascensional cercana a los  $3 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ , y un caudal de recirculación aproximado de  $1467 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . El mismo fue rodeado con una chaqueta de calor, adecuada en manguera de silicón, donde circulaba agua destilada en contacto con un termostato de inmersión (Polyscience mx-ca11b) a  $40^\circ\text{C}$ , teniendo en cuenta las pérdidas de calor para establecer condiciones mesofílicas en el interior ( $35^\circ\text{C}$ ).



**Figura. 4.2** Esquema ilustrativo e imagen del reactor UASB para la producción de  $\text{H}_2$  a partir de lactosuero ácido.

De igual forma el pH se reguló con un potenciómetro conectado a un transmisor (Cold-Palmer 350), asociado a su vez con un controlador PLC y una bomba peristáltica (Cold-Palmer C/L  $2\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1} - 50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) que adicionaba hidróxido de sodio (NaOH 5N) o ácido clorhídrico (HCL 5N) según fuera necesario de manera automática.



La recirculación para mantener la transferencia de masa, condiciones homogéneas en el sustrato y velocidad ascensional deseada, se realizó con una bomba peristáltica (Cold-Palmer 6-600 rpm) calibrada a 150 rpm y cabezal (Masterflex - easy load II) con manguera de la misma marca tamaño 16. En cuanto al proceso de alimentación, fue empleada la bomba peristáltica (Masterflex - easy load III 0-100 rpm) para manejar los caudales y suministrar las cargas orgánicas de las etapas 1 y 2.

El gas fue extraído con manguera de polipropileno hacia un filtro con sílica de gel y limadura de hierro para eliminar humedad y ácido clorhídrico (HCl) gaseoso, con el fin de ser medido en tiempo, volumen y flujo en el equipo  $\mu$  Flow (Bioprocess control). El efluente líquido se depositó en bidones de 20 L, al igual que la alimentación, esta última siendo almacenada a 4°C para mantener sus propiedades.

#### **4.2 Etapa 1**

Se aplicó la estrategia de adecuación basada en control de pH y TRH empleada por (Hernández y Buitrón., 2013), donde se logró transformar lodo metanogénico de la industria harinera a productor de hidrógeno ( $H_2$ ), utilizando glucosa como sustrato en un reactor UASB bajo las siguientes condiciones: Carga orgánica 5 g  $C_6H_{12}O_6$ ,  $L_R^{-1}d^{-1}$ , concentración en el influente 1.1 g  $C_6H_{12}O_6$ .  $L^{-1}$ , TRH en continuo 5h, pH 4.5 regulado con NaOH 5 N, temperatura 35 °C, y flujo de alimentación de 6.5 ml.  $min^{-1}$ . Todo hasta conseguir en la evaluación periódica del biogás, por cromatografía de gases, la inhibición total en la producción de metano.

#### **4.3 Etapa 2**

Se sustituyó la glucosa, al ingresar lactosuero rico en carbohidratos caracterizado en sus diferentes parámetros (DQO Total, DQO Soluble, pH, carbohidratos totales, carbohidratos solubles, lactato, acetato, propionato, butirato, SST, SSV, Fe, Mg, Ca, Ni) y conservado en refrigeración a 4°C, estableciendo una carga orgánica, en el reactor, aproximada de 53 g  $C_6H_{12}O_6$ .  $L_R^{-1} d^{-1}$  equivalente a 56.53 g DQO.  $L_R^{-1} d^{-1}$ , (valor óptimo de carga alcanzado por Contreras (2019) para la producción máxima de hidrógeno, con este tipo de sustrato, evaluado en un sistema UASB, logrando una productividad máxima de 7.84 L  $H_2$ .  $L_R^{-1} d^{-1}$ ). De esta manera se establecieron las demás condiciones operativas como fueron: concentración en el influente de 10 g  $C_6H_{12}O_6$ .  $L^{-1}$  (10.6 g DQO.  $L^{-1}$ ), TRH de 4.5 h, flujo de alimentación 7.36 ml. $min^{-1}$  y pH entre 4.5 y 4.7 hasta lograr la estabilización en la producción de  $H_2$  (CV < 10%).

Finalmente, se realizó una segunda sustitución del sustrato con el ingreso de lactosuero rico en lactato, replicando la caracterización llevada a cabo en el lactosuero ácido rico en carbohidratos, manteniendo la carga anterior en forma de DQO ( $56.53 \text{ g DQO} \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), esta vez basada en lactato  $53.33 \text{ g lactato} \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ , con una concentración en el influente  $10 \text{ g lactato} \cdot \text{L}^{-1}$ , TRH de 4.5 h, pH entre 4.5 y 4.7 y un flujo de alimentación de  $7.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  hasta lograr la estabilización en la producción de  $\text{H}_2$  ( $\text{CV} < 10\%$ ). Las variables que se dieron a evaluar, además del contenido y productividad de hidrógeno (**Ecuación 17**) en la presente etapa, correspondieron a carbohidratos y metabolitos como: acetato, propionato, butirato, valerato, caproato y lactato con atención especial en este último. La **Tabla 4.1** permite resumir las condiciones de operación del reactor en sus etapas 1 y 2. Adicionalmente se desarrollaron los coeficientes estequiométricos de las reacciones generales del periodo de operación, producto del balance de electrones, para el análisis de los metabolitos en estas mismas etapas, respaldado en las reacciones medias del **Apéndice F**.

**Tabla 4.1** Resumen de las condiciones de operación del reactor UASB.

<b>Etapa</b>	<b><sup>a</sup> 1</b>	<b><sup>b</sup> 2a</b>	<b><sup>c</sup> 2b</b>
<b>Concentración (g glucosa. <math>\text{L}^{-1}</math>)</b>	1	10	6.6
<b>Concentración (g lactato. <math>\text{L}^{-1}</math>)</b>	0	3.4	10
<b>Carga en carbohidratos (g glucosa. <math>\text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}</math>)</b>	5	53	35
<b>Carga en lactato (g lactato. <math>\text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}</math>)</b>	0	18	53
<b>pH</b>	4.5	4.7	4.7
<b>TRH (h)</b>	5.5	4.5	4.5
<b>Temperatura <math>^{\circ}\text{C}</math></b>	35	35	35

<sup>a</sup> Aclimatación del lodo metanogénico a productor de hidrógeno; <sup>b</sup> Ingreso de lactosuero ácido rico en carbohidratos; <sup>c</sup> Ingreso de lactosuero ácido rico en lactato.

#### 4.4 Etapa 3

Previamente a la ejecución de los ensayos en lote se realizó el análisis de sólidos pertinente al inóculo para conocer la relación (sólidos volátiles (SV) /sólido húmedo), lo cual, basado en la relación sustrato / inóculo (F/M) de 2.7 recomendada por el protocolo de potencial de biohidrógeno de Carrillo *et al.*, (2020), permitió determinar la cantidad de lodo empleado en

los diferentes análisis teniendo en cuenta un valor  $F = \text{DQO}$  de  $3 \text{ g.L}^{-1}$ , representado en su mayoría por lactato y acetato. Todo esto con excepción de la prueba realizada ejemplificando las condiciones dentro del reactor, cuyo cálculo se puede observar en el **Apéndice A**, y cuya relación (F/M) determinada y basada en la alimentación real diaria del reactor ( $112 \text{ g}_{\text{eq}} \text{ DQO.d}^{-1}$ ) para el ingreso de lactosuero ácido rico en lactato, y el contenido de SV propio del volumen de lodo hidrogenogénico ( $0.118 \pm 0.003 \text{ g SV / g sólido húmedo}$ ) en el sistema continuo correspondió a 2.5.

Se evaluaron así distintas relaciones lactato/acetato por duplicado (2, 3, 5, 8.5), ajustadas al valor de F/M previamente mencionado (2.7), llevando a cabo pruebas en lote ejecutadas en AMPTS con agitación intermitente (1 min encendido – 2 min apagado) a  $60 \text{ rpm.min}^{-1}$  y  $37^\circ\text{C}$ , con un volumen de llenado en las botellas de 400 ml y un espacio de cabeza de 200 ml, también se tuvo en cuenta un ensayo con lactato y acetato por separado. La fuente de lactato, para todos los ensayos, correspondió a lactosuero ácido rico en lactato y la de acético en ácido acético grado reactivo al 97% Golden Bell.

Con el mejor rendimiento (**Ecuación 18**) en la producción de hidrógeno para las diferentes relaciones lactato/acetato, se estudiaron cuatro concentraciones por duplicado de hierro en su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), adicionando cloruro férrico tetrahidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) como reactivo correspondientes a (25, 50, 100, 200)  $\text{mg.L}^{-1}$  (relación F/M (2.7)), de igual manera, se evaluaron estas concentraciones en presencia de lactato únicamente (sin acetato adicionado), para establecer un punto de comparación en los rendimientos encontrados.

La medición de hidrógeno de los ensayos en lote se llevó a cabo en el equipo Gas Endeavour (Bioprocess Control), con un paso previo del biogás por la solución absorbente de  $\text{CO}_2$  (timolftaleína +  $\text{NaOH}$  3N). Por último, los datos experimentales fueron ajustados al modelo de Gompertz modificado (Guevara y Buitrón., 2015), para hallar las constantes correspondientes que describen y comparan las experiencias como en el caso de  $R_{\text{max}}$ , que al ser dividido en el volumen de sustrato empleado en el ensayo de AMPTS, permite obtener la productividad del mismo. Los resultados de los ensayos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA (análisis de varianza de una sola vía), con un nivel de significancia del 5% para conocer si existía diferencia significativa entre por lo menos dos de las experiencias,

respaldados por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para resaltar los tratamientos que cumplían esta condición.

$$H(t) = H_{max} * \exp \left[ - \exp \left[ \frac{2.71828 * R_{max}}{H_{max}} (\lambda + t) + 1 \right] \right] \quad (16)$$

**H<sub>max</sub>**: Volumen máximo acumulado de hidrógeno (mL)

**λ**: Duración de la fase de latencia (s, min, h)

**R<sub>max</sub>**: Tasa máxima de producción de hidrógeno (mL.min<sup>-1</sup> o mL.h<sup>-1</sup>)

Los metabolitos al inicio y final de cada prueba en forma de DQO<sub>eq</sub> fueron resumidos en el **Apéndice E**. De manera similar, y producto de un balance de electrones para cada experiencia, se buscó detallar los coeficientes estequiométricos de las reacciones generales que describen cada uno de los ensayos basado en las reacciones medias.

$$Productividad_{H_2} : \frac{V_{biogás} * \% H_2}{V_R * T} \quad (17)$$

**V<sub>biogás</sub>**: Volumen de biogás generado en el periodo T (L)

**% H<sub>2</sub>**: Porcentaje de hidrógeno en el biogás

**V<sub>R</sub>**: Volumen del reactor (L)

**T**: Periodo de medición del volumen de biogás generado (días)

$$Rendimiento_{H_2} : \frac{(V_{biogás} * \% H_2) / 22.4}{n} \quad (18)$$

**V<sub>biogás</sub>**: Volumen de biogás generado en el periodo T (L)

**% H<sub>2</sub>**: Porcentaje de hidrógeno en el biogás

**n**: Moles del sustrato de interés

## 4.5 Técnicas Analíticas

### 4.5.1 DQO<sub>total</sub>

Standard Methods SM 5220 D correspondiente al método colorimétrico de reflujo cerrado a 150°C de reactivos preparados Hatch. La lectura fue realizada por un espectrofotómetro, de la misma marca, a una longitud de onda de 620 nm.

### 4.5.2 DQO<sub>soluble</sub>

Standard Methods SM 5220 D donde se replicó el método colorimétrico de reflujo cerrado, esta vez con un filtrado previo de la muestra a través de fibra de vidrio de 25 µm.

### 4.5.3 Sólidos

Standar Methods 2540 D (Sólidos suspendidos totales), 2540 E (Sólidos suspendidos fijos y volátiles), 2540 G (Sólidos totales y volátiles para muestras solidadas y semisólidas). Los dos primeros, empleados en la caracterización del sustrato (lactosuero ácido rico en carbohidratos, lactosuero ácido rico en lactato), y el último para la determinación de sólidos tanto en el lodo metanogénico como en el hidrogenogénico.

### 4.5.4 Carbohidratos totales

Método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956), que utiliza ácido sulfúrico concentrado y fenol al 5%. El agente patrón corresponde a glucosa determinando posteriormente la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro.

### 4.5.5 Ácidos grasos volátiles

Los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico fueron medidos en g.L<sup>-1</sup> por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), en el modelo 1260 Infinity de Agilent Technologies, equipado con un detector de índice de refracción (RID) y detector de arreglo de diodos (DAD), columna Aminex HPX-87H (tamaño de partícula 9 µm, 300 x 7.8 mm). Como fase móvil se utilizó una solución 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El volumen de inyección de muestra correspondió a 10 µL y se trabajó con un flujo de 0.6 mL.min<sup>-1</sup>, la temperatura de columna de 50 °C con longitud de onda de 210 nm.

#### 4.5.6 Flujo de biogás

Este parámetro fue estimado con el equipo *μflow Bioprocess Control* el cual es un medidor volumétrico de flujo de gas normalizado a condiciones estándar (0 °C, 1 atm).

#### 4.5.7 Composición de biogás

La composición de (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>) se determinó con un cromatógrafo de gases SRI 8610 C, equipado con un detector de conductividad térmica, y una columna Carboxen 1010 de 30 m x 0.53 mm ID, utilizando nitrógeno como gas acarreador (4 mL.min<sup>-1</sup>), con temperaturas del inyector y detector de 90 y 155°C respectivamente. La temperatura inicial del horno correspondió a 40 °C por 4 min, con una rampa de calentamiento en incrementos de 20 °C hasta 110 °C, manteniendo esta temperatura por 1.5 min.

#### 4.5.8 Hierro

La muestra fue filtrada previamente a través de nitrocelulosa (45 μm) y acidificada a pH 2 con HCl, antes de pasar por el equipo de absorción atómica GBC HG 3000, empleando el standard methods (3111 A) correspondiente al método de espectrometría de absorción atómica por flama, en el cual la muestra es atomizada dentro de una flama donde incide un haz de luz dependiendo del metal que se desea medir en un monocromador y encima de un detector, que estima la cantidad de luz absorbida. La cantidad de energía absorbida a una determinada longitud de onda en la flama, es proporcional a la concentración del elemento. En el caso del hierro la longitud de onda aconsejable para su medición es de 248.3 nm, con un rango de concentración óptima de entre 0.3 – 10 mg. L<sup>-1</sup>.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Caracterización del lactosuero ácido

El lote, proveniente de la industria quesera, constó de aproximadamente 500 L de lactosuero ácido rico en carbohidratos ( $\text{pH} < 5$ ), del cual se dejó fermentar el 30% a condiciones ambiente para enriquecerlo en lactato. En la **Tabla 5.1**, se puede observar la diferencia en el contenido de lactato y carbohidratos (65 % y 34%), así como la relación de uno respecto al otro (0.34 y 1.5) para los dos tipos de lactosuero. Destaca también la concentración baja de hierro ( $\text{Fe}_{\text{Total}}$ ) propia del sustrato que se encuentra entre  $3 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$  y  $8 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$  y la ausencia de níquel, ambos participantes en la formación de hidrogenasas.

**Tabla 5.1** Caracterización de lactosuero ácido rico en carbohidratos, rico en lactato.

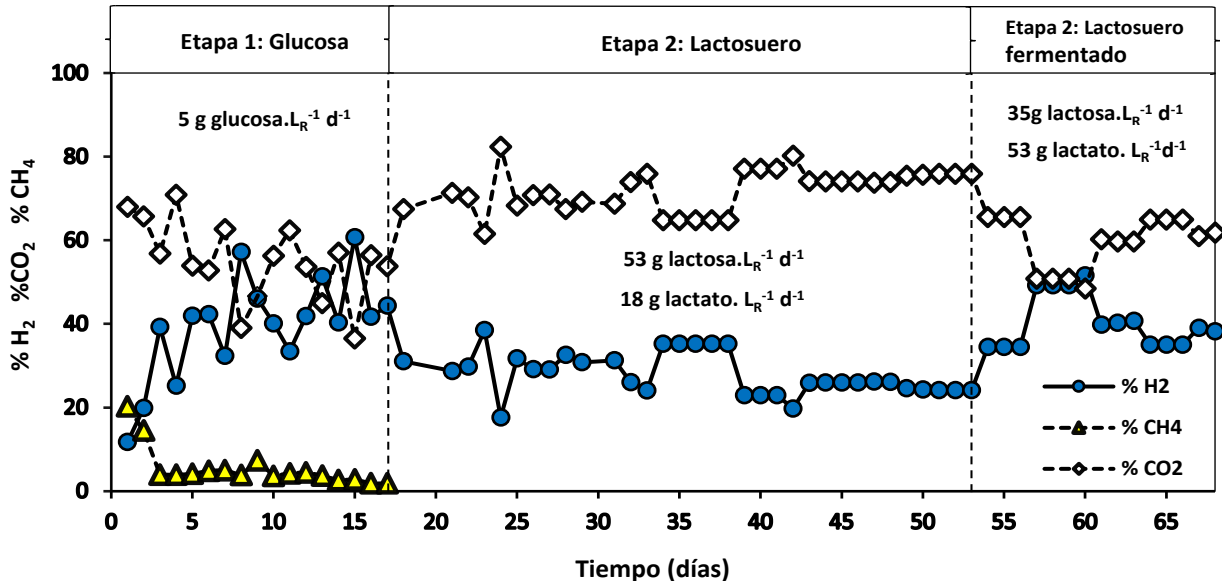
Parámetro	Unidades	Lactosuero	Lactosuero fermentado
DQO total	$\text{g.L}^{-1}$	65.85	60.15
DQO Soluble	$\text{g.L}^{-1}$	52.5	57.32
pH		4.04	3.84
Carbohidratos Totales	$\text{g.L}^{-1}$	39.72	17.92
Carbohidratos Solubles	$\text{g.L}^{-1}$	38.22	16.81
Lactato	$\text{g.L}^{-1}$	13.58	27.17
Acetato	$\text{g.L}^{-1}$	0.36	0.55
Propionato	$\text{g.L}^{-1}$	0.19	0.05
Butirato	$\text{g.L}^{-1}$	1.04	
Caproato	$\text{g.L}^{-1}$		
SST	$\text{g.L}^{-1}$	5.35	2.22
SSV	$\text{g.L}^{-1}$	5.10	1.59
$\text{Fe}_{\text{Total}}$	$\text{g.L}^{-1}$	0.0003	0.0008
Mg	$\text{g.L}^{-1}$	0.095	0.065
Ca	$\text{g.L}^{-1}$	0.77	1.32



En cuanto a los ácidos grasos volátiles presentes, se muestra al lactato como el de mayor concentración, situación esperada y dentro del rango de valores presentes en las caracterizaciones realizadas por Dessi, *et al.*, (2020), y Contreras, *et al.*, (2019) al igual que las trazas de acetato, propionato y butirato encontradas por los mismos autores y Rivera, *et al.*, (2017).

## 5.2 Aclimatación de lodo hidrogenogénico y composición del biogás.

En los primeros 17 días se ejecutó la estrategia de aclimatación basada en la reducción de pH y TRH propuesta por Hernández y Buitrón., (2013), operando el reactor UASB en configuración continua, consiguiendo la eliminación total de metano, probando su efectividad como se observa en la **Figura 5.1**. Esto debido a la inhibición de los metanógenos hidrogenotróficos a pH ácido (4 – 6), aplicado usualmente en la producción de biohidrógeno y que se tuvo en cuenta en el presente estudio (4.5 - 4.7), incluso sin un incremento en la carga en esta etapa como recomiendan Spagni, *et al.*, (2010).



**Figura. 5.1** Porcentajes de H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, y CH<sub>4</sub> en la etapa de adaptación.

También se observa en la **Figura 5.1** el contraste en los porcentajes de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> del primer día (11.74% y 67.98 %) respecto al día 17 de operación (44.3% y 53.79 %), donde se

incrementa notablemente el contenido de  $H_2$  en el biogás aproximadamente en 32.6%, corroborando la efectividad de la aclimatación en condiciones ácidas, incluso por encima de pretratamientos dentro de los que están: la adición de base, 2-bromoetanosulfonato, cloroformo, aireación y su ventaja económica sobre otros de usual aplicación como los choques de calor (Chang *et al.*, 2011).

Durante el tiempo restante de operación correspondiente a la etapa 2, y con el ingreso de lactosuero ácido rico en carbohidratos, se encontraron composiciones máximas de 38 y 82% en el contenido de  $H_2$  y  $CO_2$  en el biogás, y mínimos de 17 y 61 % con valores promedio de 24 y 76 % para los últimos cinco datos con  $CV < 10\%$  (3, 1) %, donde el porcentaje de hidrógeno se asemejó en gran medida al máximo encontrado por Kovalev, *et al.*, (2023) (32.8%) en un reactor UASB con sustrato real (32 g DQO.  $L_R^{-1}d^{-1}$ ), y Ramos y Silva., (2017) (23.6 %) para la máxima productividad alcanzada (5.52  $NLH_2.L_R^{-1}d^{-1}$ ), con una carga de 88 g  $C_{12}H_{22}O_{11}. L_R^{-1}d^{-1}$  en forma de carbohidratos totales, utilizando suero de leche en polvo como sustrato en un reactor EGSB en modo continuo.

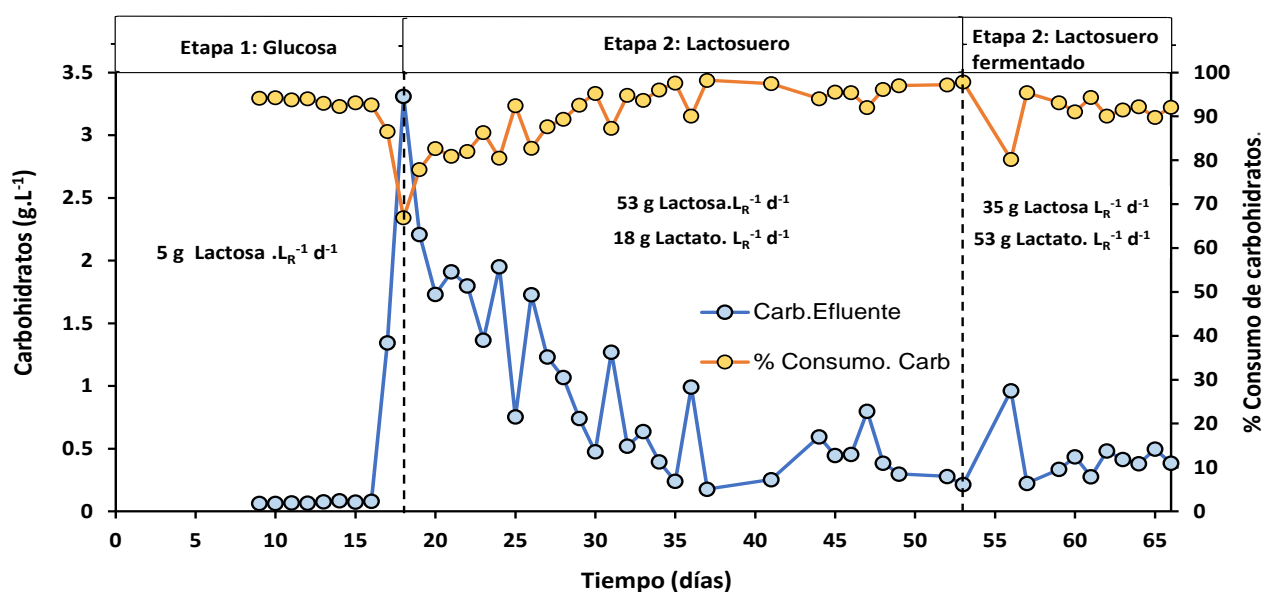
Al llevarse a cabo el cambio de sustrato con el ingreso de lactosuero ácido rico en lactato, los porcentajes de  $H_2$  y  $CO_2$  máximos correspondieron a 52 y 76 %, oscilando hacia valores mínimos de 24 y 48 %, con promedios de 36 y 63% para los últimos cinco datos con  $CV < 10\%$  (5, 3) %, mostrando una mejora en la composición del biogás atribuida a la vía lactato – acetato, mencionada por autores como Asunis, *et al.*, (2019), donde la existencia de los carbohidratos contribuye a la aparición de este segundo metabolito, producto de una primera producción de hidrógeno.

Finalmente, se observa la pérdida de tamaño en los gránulos al final de la operación mostrada en el **Apéndice B**, desde el lodo metanogénico hasta el lodo hidrógenogénico ( $0.401 \pm 0.010 - 0.118 \pm 0.003$  g SV / g sólido húmedo), derivando en la estructura porosa de este último que favorece la transferencia de masa y salida del biogás, producto de las condiciones de operación del reactor y la distribución de los polisacáridos (Hernández y Buitrón., 2013).

### 5.3 Consumo de los carbohidratos

Con una concentración de 1 g glucosa. L<sup>-1</sup> en el influente, la medición de carbohidratos a la salida del reactor muestra un valor estable promedio en la etapa de aclimatación, cercano a 0.072 g C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>.L<sup>-1</sup>. De manera consecuente, en el día 18, al iniciar la alimentación con lactosuero ácido rico en carbohidratos, cuya concentración correspondió a 10 g glucosa. L<sup>-1</sup>, se halla un pico en el efluente que alcanza los 3.30 g glucosa. L<sup>-1</sup>, y que al transcurrir este periodo hasta el día 52 finaliza con un valor de 0.27 g glucosa. L<sup>-1</sup>, mostrándose como indicador probable de la aclimatación del lodo a este tipo de sustrato.

Al realizar la última sustitución en la alimentación por lactosuero ácido rico en lactato, con concentración 6.59 g glucosa. L<sup>-1</sup>, se observa un pico inicial de 0.96 g glucosa. L<sup>-1</sup> en el día 56 a la salida, seguido de un periodo de estabilidad con CV cercano al 12% para los últimos cinco datos registrados, y un valor promedio de 0.43 ± 0.05 g glucosa. L<sup>-1</sup>.



**Figura. 5.2** Concentración en el efluente y reducción en carbohidratos durante la operación.

Por su parte, se puede observar en la **Figura 5.2** una reducción promedio en los carbohidratos en la etapa de aclimatación, cercana al 94% que desciende al 67% para el día 18, correspondiente al ingreso de lactosuero ácido rico en carbohidratos, de allí en adelante se presenta un incremento en el consumo hasta alcanzar el 97%, valor similar al presentado por

Rosa, *et al.*, (2014) de 95 %, con una carga en carbohidratos hasta tres veces menor de la empleada en el presente trabajo (53 g glucosa.  $L_R^{-1}d^{-1}$ ) de 19 g glucosa.  $L_R^{-1}d^{-1}$  en forma de lactosa en su mayoría, y una productividad de  $0.55 \text{ NL H}_2.L_R^{-1}d^{-1}$  en un sistema anaerobio de lecho fluidizado o AFBRs por sus siglas en inglés.

De igual manera, es posible comparar este porcentaje en la reducción con el alcanzado por Ramos, *et al.*, (2020), quien con una carga de 120 g glucosa.  $L_R^{-1}d^{-1}$ , aportada por el suero de queso, consiguió transformar entre el 91 y 95% de los carbohidratos para TRH entre 8 – 1 h en un reactor granular expandido o (EGSB), con una productividad de  $1.9 \text{ NLH}_2.L_R^{-1}d^{-1}$ .

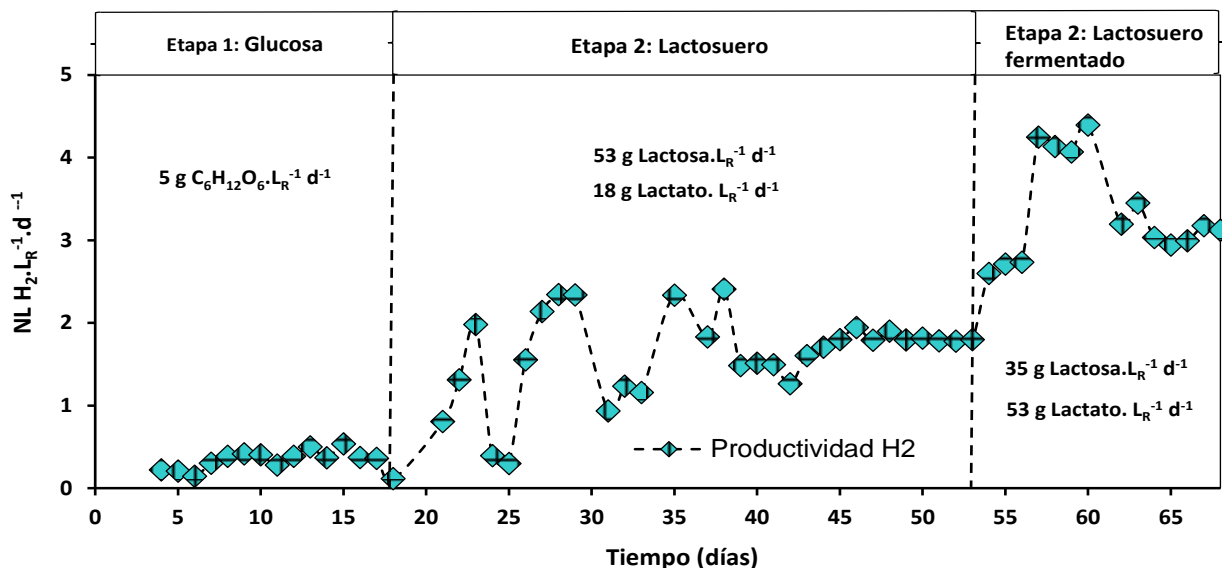
Todo esto antes del ingreso del lactosuero ácido rico en lactato en el día 53, donde se halló un valor promedio para los últimos cinco datos de 91.13%, teniendo en cuenta que la carga de alimentación en carbohidratos disminuye de 53 g glucosa.  $L_R^{-1}d^{-1}$  a 35 g glucosa.  $L_R^{-1}d^{-1}$  al variar el sustrato, donde el principal metabolito presente corresponde a lactato ya generado por vía homoláctica o heteroláctica desde la lactosa.

#### 5.4 Productividad de $H_2$

En la etapa de aclimatación del lodo hidrogenogénico, se encuentran valores de productividad en el rango de  $0.14 \text{ NL H}_2.L_R^{-1}d^{-1}$  a  $0.5 \text{ NL H}_2.L_R^{-1}d^{-1}$ , poco comparables a los alcanzados con el ingreso del sustrato objetivo (lactosuero ácido), puesto que la carga de carbohidratos en esta fase es aproximadamente 10 y 7 veces menor respecto a los dos tipos de lactosuero utilizados posteriormente, y no se presenta alimentación en forma de lactosa o de lactato.

Al introducir el lactosuero ácido rico en carbohidratos se presenta inestabilidad desde el día 18 al día 39, como se puede observar en la **Figura 5.3**, puesto que ningún grupo de mínimo 5 puntos muestra un  $CV < 10\%$ , encontrándose como pico sobresaliente para esta etapa el de  $2.40 \text{ NL H}_2.L_R^{-1}d^{-1}$  (día 38), 26% menor al alcanzado por Carrillo, *et al.*, (2012) ( $3.25 \text{ NL H}_2.L_R^{-1}d^{-1}$ ) en un reactor UASB sin sustrato real (lactosa soluble), teniendo esta investigación un promedio  $0.36 \text{ NL H}_2.L_R^{-1}d^{-1}$  inferior a los últimos cinco datos (49 – 53) de la presente experiencia donde el sistema se estabiliza, observándose una productividad promedio de  $1.79 \text{ NL H}_2.L_R^{-1}d^{-1}$  y un  $CV$  de 0.76 %. De igual forma, se puede comparar con la productividad máxima alcanzada por

Colombo, *et al.*, (2019) ( $3.47 \text{ NL H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 30 % superior y obtenida con un efluente real, proveniente de la producción de queso ricota, en un reactor continuo de mezcla completa (CSTR) con una carga aproximada de  $15.2 \text{ g glucosa} \cdot \text{L}_R^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , que puede sugerir una sobrecarga del sistema en el presente trabajo con este tipo de suero, al ser 3.5 veces mayor ( $53.2 \text{ g glucosa} \cdot \text{L}_R^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) que la ya mencionada.



**Figura. 5.3** Productividad de hidrogeno H<sub>2</sub> en las etapas de adaptación y operación.

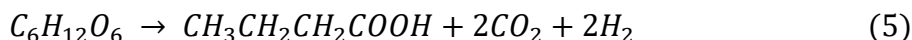
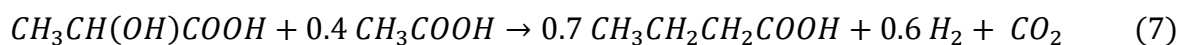
Con una carga de  $30 \text{ g DQO} \cdot \text{L}_R^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , representada igualmente en efluente real, tres veces menor a la utilizada en la alimentación con lactosuero ácido rico en carbohidratos ( $87.13 \text{ g DQO} \cdot \text{L}_R^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), Castello, *et al.*, (2018) alcanzaron su máxima productividad en  $0.9 \text{ NL H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  en un sistema CSTR, 62 % más baja a la conseguida en el presente trabajo, atribuida a los mecanismos de inhibición propios de las bacterias ácido-lácticas del sustrato.

Al iniciar la alimentación con lactosuero ácido rico en lactato (días 53 – 68), se presenta inestabilidad en el sistema hasta el día 63, con un pico de  $4.4 \text{ NLH}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (día 60), que vale resaltar, fue el más alto en el tiempo de operación completo del reactor, seguido de cinco puntos de estabilidad, hasta finalizar la operación con un promedio de  $3.05 \text{ NLH}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  y CV de 3.07%. Así mismo sobresale que, a pesar de no haber conseguido las productividades alcanzadas por Contreras (2019) ( $7.84 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) o Muños, *et al.*, (2023) ( $7.1 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) en sistemas

similares, la presente experiencia corrobora la importancia de la vía lactato-acetato en la producción de hidrógeno desde cualquier tipo de lactosuero ácido, ya sea rico en carbohidratos o lactato, siendo éste último el caso de estudio de Ordoñez-Frias, *et al.*, (2023), quienes consiguieron una productividad máxima de  $3.2 \text{ NLH}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  utilizando lactosuero ácido en un sistema EGSB, con una carga de  $91 \text{ g DQO} \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  representada, en su mayoría, por lactato en una proporción 13 veces superior a los carbohidratos presentes en el sustrato.

### 5.5 Producción y consumo de metabolitos

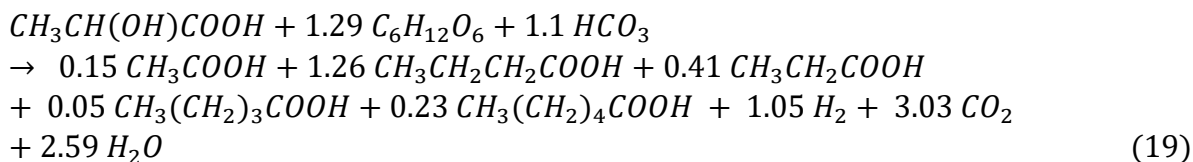
Es importante mencionar que, en la etapa de ingreso de lactosuero ácido rico en carbohidratos, de los días 27 a 39, existe producción neta de lactato, que se pudo dar por vía homoláctica o heteroláctica desde los carbohidratos ya mencionados, encontrándose un valor máximo de  $7.37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  para el día 29 con un incremento del 53 % respecto a la concentración en el ingreso ( $3.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), y coincidiendo con una fase de inestabilidad en la producción de hidrógeno dentro del reactor (**Figura 5.4**). En los días 41 a 48 se empieza a ver el consumo total de lactato y la producción estable de butirato, con un promedio de  $3.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \pm 0.08$ , que pudo ser generado desde la vía lactato – acetato (García-Depraect *et al.*, 2020 a) o desde los carbohidratos de manera directa (Dong *et al.*, 2009), como se observa en las **Ecuaciones 7 y 5**, resaltando el consumo de estos últimos entre un 92 y 97 % lo cual se aprecia en la **Figura 5.2**.



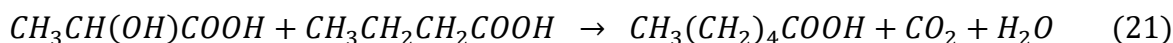
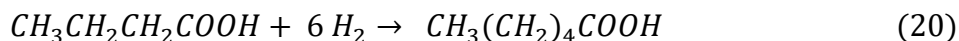
Perteneciendo el día 48 a la etapa más estable ( $\text{CV} < 10\%$ ) para la producción de hidrógeno desde lactosuero ácido rico en carbohidratos (días 48 – 52), se tiene que, según el balance de electrones, la totalidad de los compuestos medidos representan el 73% de los electrones aportados, tanto por el lactato como por los carbohidratos, siendo el butirato el metabolito que más sobresale, abarcando un 42.7 % de esta fracción, así mismo el hidrógeno se ve representado en un 3.6 %. Los demás compuestos considerados mostraron porcentajes de: caproato 12.6 %, propionato 9.8 %, valerato 2.5 % y acetato 2.1 %. Al desarrollar la ecuación

general que representa los metabolitos estimados, basado en los coeficientes estequiométricos del **Apéndice G**, se tiene entonces:

Día de operación 48

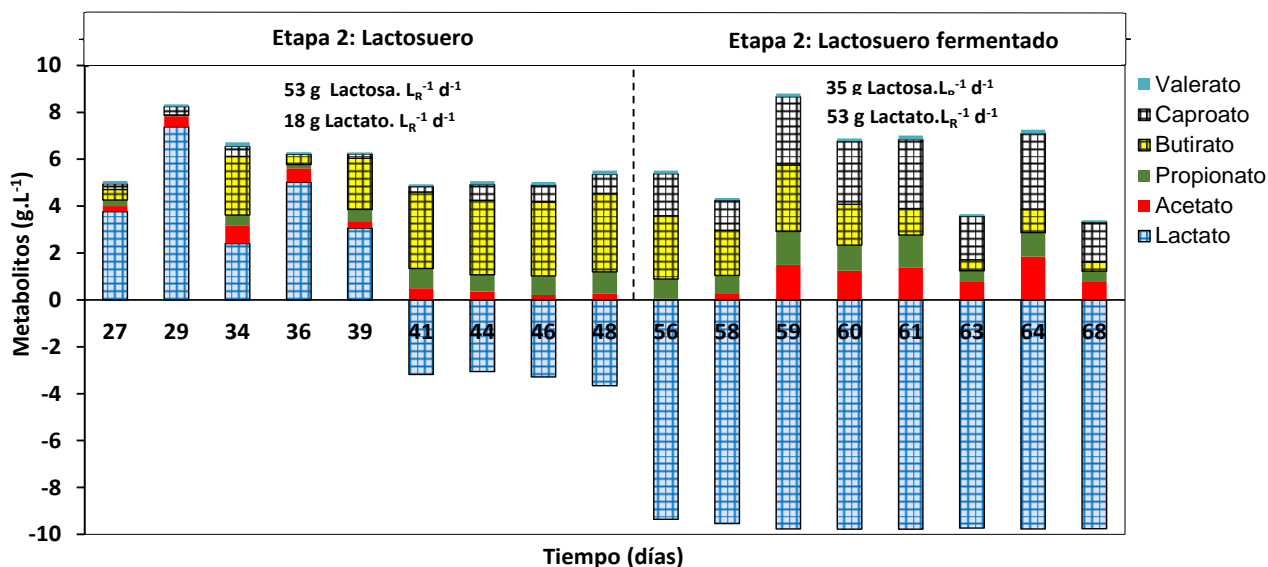


De los días 56 a 68, donde ingresó previamente el lactosuero ácido rico en lactato (día 53), se ve un consumo claro de este metabolito cercano al 100 %, respecto a la concentración en el influente (10 g.L<sup>-1</sup>), disminuyendo los carbohidratos presentes entre un 80 y un 95 %. En este periodo es notorio el incremento en la aparición de caproato, como se puede ver en la Figura 5.4, y que puede ser producto, principalmente, de dos reacciones de elongación de cadena desde butirato por el camino de la β-oxidación inversa (Ordoñez-Frias, et al.,2023), siendo las dos desfavorables en la producción de hidrógeno, la primera al requerir de este como donador de electrones y la segunda al consumir el lactato presente.



El balance de electrones llevado a cabo para el día 60, siendo este el de mayor productividad de H<sub>2</sub> a lo largo de la operación del reactor, mostró que los metabolitos analizados como posibles productos (acetato, butirato, propionato, valerato caproato e H<sub>2</sub>) representaron el 80 % de la totalidad de los metabolitos generados desde el lactato y los carbohidratos presentes, donde el caproato abarcó el 35 %, convirtiéndose en el más notorio, remitiendo su aparición a las **Ecuaciones 20 y 21**. Por su parte, el hidrógeno destacó entre todos los días de operación con un 7 %, los demás compuestos mostraron porcentajes de: butirato 18.8 %, propionato 9.8%, acetato 7.9 % y valerato 1.4 %. Al realizar un análisis similar para uno de los días de mayor estabilidad

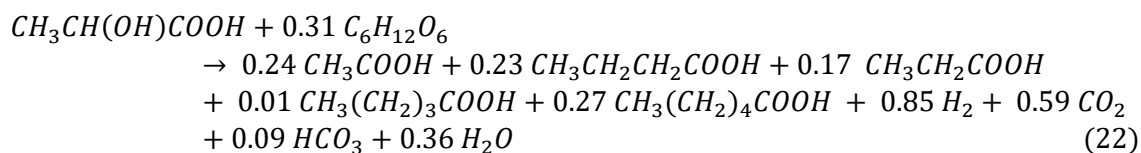
(CV < 10%) en la producción de hidrógeno desde lactosuero ácido rico en lactato (día 64), se obtuvo que los metabolitos analizados como posibles productos, representaron el 80 % de la totalidad de compuestos generados desde los denominados donadores (lactato y carbohidratos), siendo el caproato el de mayor presencia con un 42.17 %, el hidrógeno a su vez se expresó en un 4.8 %, los demás compuestos mostraron porcentajes de: acetato 11.7 %, butirato 10.6 %, propionato 9.14 %, valerato 1.9 %.



**Figura. 5.4** Producción y consumo de metabolitos en la etapa de operación con lactosuero ácido.

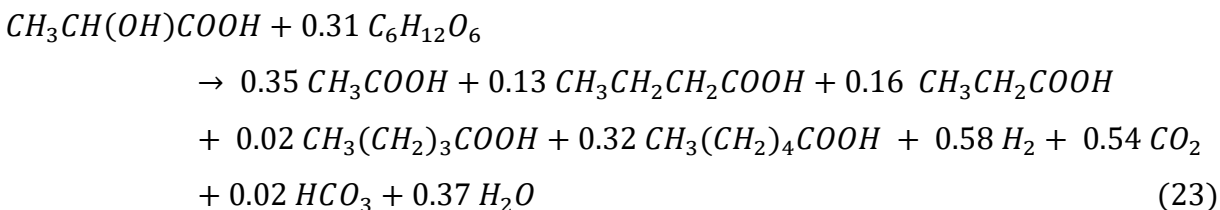
Basado en los coeficientes estequiométricos, desarrollados en el **Apéndice G**, se construyeron las siguientes ecuaciones generales para los días de operación 60 y 64:

Día de operación 60





Día de operación 64

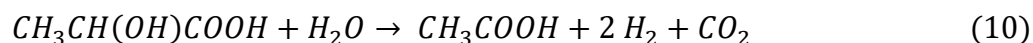


En general fue posible detectar la aparición de propionato a lo largo del periodo de operación del reactor, presentándose en mayor concentración en los días 59, 60 y 61, producto ya sea de los carbohidratos (Wang *et al.*, 2021) o del lactato (García-Depraect *et al.*, 2019 a), reacciones que pueden ser vistas en la **Tabla 2.2**, descritas como desfavorables puesto que presentan consumo de: sustrato (lactato y carbohidratos), NADH en su formación por la vía del acrilato desde lactato, e H<sub>2</sub> directamente como donador de electrones. A su vez, el propionato, se destaca como precursor del valerato en la **Ecuación 24**, cuya presencia se observó con menor notoriedad al resto de los metabolitos (Rafeira *et al.*, 2018).



Por último, el acetato se manifiesta basado en reacciones de consumo en la vía lactato-acetato para la generación de hidrógeno, apreciada en la **Ecuación 7**, y de producción desde los carbohidratos principalmente, o desde el lactato en la vía del acrilato (Gómez - Flores *et al.*, 2017) como se puede observar en las **Ecuaciones 4 y 10** de la **Tabla 2.2**, donde también es posible obtener hidrógeno.

Ahora bien, el proceso de homoacetogénesis (**Ecuación 15**) se pudo ver favorecido por condiciones anaerobias a bajo pH y presión parcial del hidrógeno P<sub>H<sub>2</sub></sub> (> 500 Pa) (no estimada en el presente trabajo), donde resalta de manera similar el género *Clostridium*, caracterizado por su alta resistencia a distintos escenarios (Saady *et al.*, 2013).

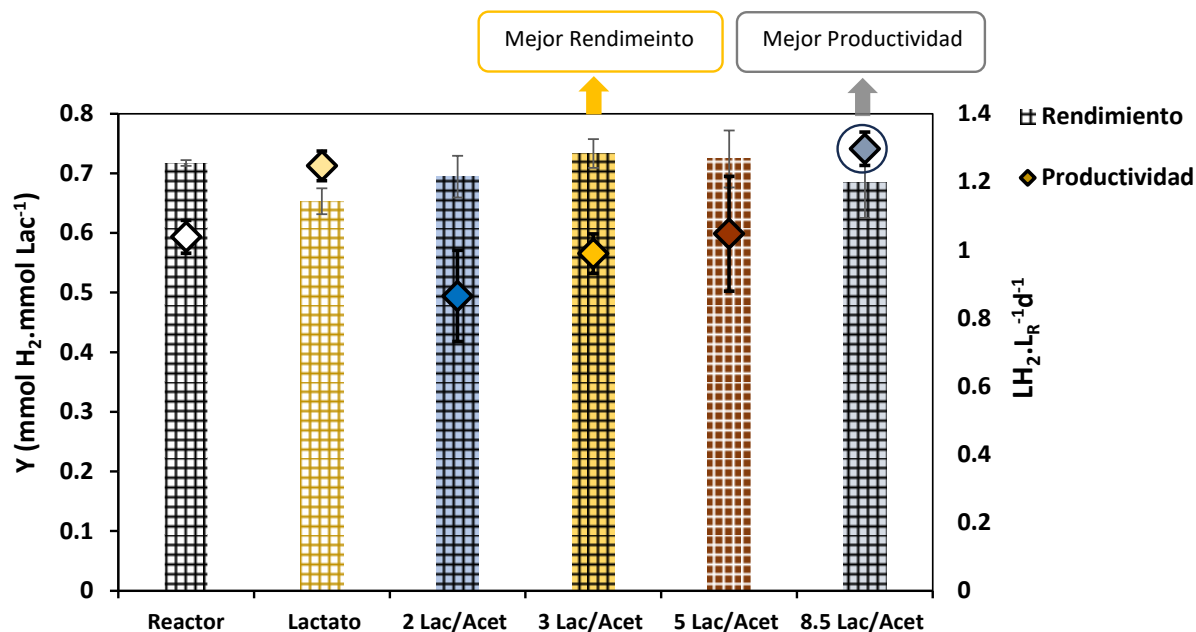




### 5.6 Rendimientos y productividades para las relaciones Lactato / Acetato

Se realizaron cinéticas de producción de hidrógeno en lote para las diferentes relaciones lactato/acetato. El **Apéndice C** presenta las figuras correspondientes a los resultados experimentales (**Exp**) y el ajuste al modelo de Gompertz (**Teo**).

Con el análisis de datos obtenido en las pruebas en lote referidos a la **Tabla 5.2** y la **Figura 5.5**, se logra observar que la relación lactato/acetato con el mejor rendimiento corresponde a 3 ( $0.73 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{mmol lactato}^{-1}$ ), que no muestra diferencia significativa respecto al rendimiento teórico ( $0.71 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{mmol lactato}^{-1}$ ) del ensayo que ejemplifica la relación F/M (2.5), calculada en el **Apéndice 1** para el reactor, lo cual sucede igualmente con la prueba sin adición de acetato externo (Lactato) y el resto de los tratamientos ( $0.69, 0.72, 0.68$ )  $\text{mmol H}_2 \cdot \text{mmol lactato}^{-1}$ , afirmación corroborada mediante un análisis ANOVA y la prueba de Tukey.



**Figura. 5.5** Rendimiento y productividad de los ensayos asociados a las relaciones lactato/acetato.

En cuanto a la productividad, la relación lactato/acetato de 8.5, muestra el valor que más sobresale ( $1.29 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), superando al alcanzado por el reactor ( $1.04 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), con un valor de relación muy similar al registrado por Ordoñez-Frias, *et al.*, (2023), para la máxima productividad encontrada en ensayos en lote ( $0.603 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), con lactosuero casi en su totalidad fermentado (ausente de carbohidratos). Es de resaltar que, basado en el análisis ANOVA, existe diferencia significativa entre por lo menos dos de los tratamientos que mediante una prueba de Tukey corresponden a las relaciones de 2 y 8.5, con una mejora del 33.3 % del uno respecto al otro, observándose un comportamiento ascendente para esta misma relación, exceptuando al ensayo asociado con el reactor, cuya ratio lactato/acetato propio corresponde a 55:1, y a la ausente de adición externa de acetato (Lactato) de 60:1.

**Tabla 5.2** Parámetros asociados al modelo de Gompertz: relaciones Lactato /Acetato.

Parámetro	<sup>a</sup> Rend.	<sup>b</sup> Produc.	H max (Exp)	H max (Teo)	R max	$\lambda$	R <sup>2</sup>
Unidades	mmol H <sub>2</sub> . mmol Lac <sup>-1</sup>	L H <sub>2</sub> L <sub>R</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	mL H <sub>2</sub>	mL H <sub>2</sub>	mL.min <sup>-1</sup>	min	
<b>Condiciones</b>							
<b>Reactor</b>	0.71 ± 0.004	1.04 ± 0.05	177 ± 1.2	181 ± 1.95	0.28 ± 0.01	0	0.99
<b>Lactato</b>	0.65 ± 0.02	1.24 ± 0.04	184 ± 6.2	190 ± 7.3	0.34 ± 0.01	0	0.99
<b>2 Lac /Acet</b>	0.69 ± 0.03	0.86 ± 0.1	130 ± 6.6	136 ± 9.8	0.24 ± 0.01	0	0.99
<b>3 Lac /Acet</b>	0.73 ± 0.02	0.98 ± 0.05	155 ± 5.1	161 ± 7.6	0.27 ± 0.02	0	0.99
<b>5 Lac /Acet</b>	0.72 ± 0.05	1.05 ± 0.2	170 ± 11.4	180 ± 19.3	0.29 ± 0.05	0	0.99
<b>8.5 Lac /Acet</b>	0.68 ± 0.06	1.29 ± 0.08	172 ± 14.2	177 ± 17.1	0.34 ± 0.03	0	0.99

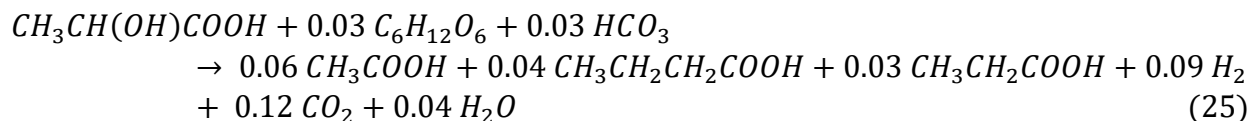
<sup>a</sup> Rendimiento; <sup>b</sup> productividad.

El porcentaje en el consumo de carbohidratos oscila entre 81.6 (5 Lac/Acet) y 86.6 (3 Lac/Acet) %, como se puede observar en el **Apéndice E**, sin presentarse diferencia significativa entre las distintas relaciones, incluyendo la titulada Lactato. Sucede de igual forma con la proporción de H<sub>2</sub> en la composición de biogás, puesto que no existe diferencia significativa entre dichos porcentajes, que varían entre 32.9 (2 Lac/Acet) y 36.4 (8.5 Lac/Acet) %. Lo cual sugiere que el ingreso externo de acetato podría no tener influencia en esta última variable.

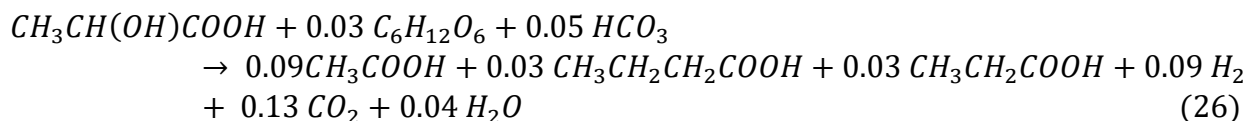
Al llevar a cabo el balance de electrones, basado en las reacciones medias del **Apéndice F**, se establecen análisis estequiométricos cuyos coeficientes se pueden observar en el **Apéndice H** para cada una de las experiencias, asumiendo al lactato y los carbohidratos como principales

donadores. Tales reacciones para las relaciones lactato/acetato de 3 (mejor rendimiento) con orden porcentual en los metabolitos analizados: butirato 13.7%, acetato 8.5%, propionato 8.3% e H<sub>2</sub> 3.2% y 8.5 (mejor productividad): acetato 12.8 %, butirato 9%, propionato 6.7%, e H<sub>2</sub> 3% son las siguientes:

Relación Lactato/ Acetato: 3



Relación Lactato/ Acetato: 8.5

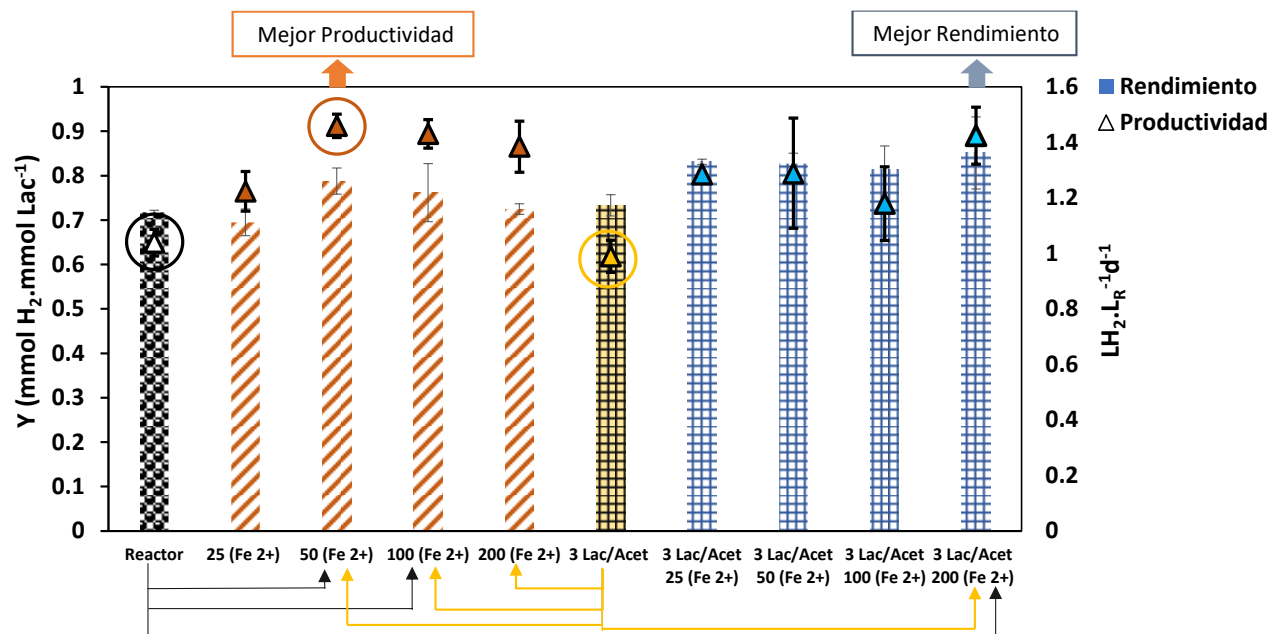


Es importante resaltar que los posibles aceptores de electrones evaluados, tratando de distinguir las vías metabólicas correspondientes a carbohidratos (**Ecuaciones 4,5**) y lactato – acetato (**Ecuaciones 7 - 10**) de la **Tabla 2.2**, para la producción de hidrógeno (acetato, butirato, propionato e H<sub>2</sub>), que representan entre un 31.8 (8.5 Lac/Acet) y 36 (5 Lac/Acet) % del total de productos generados a partir de los electrones donados, donde el porcentaje de H<sub>2</sub> abarca entre un 2.9 (Lactato) y 3.3 (5 Lac/Acet) % para las distintas relaciones, como se puede ver **en el apéndice G**.

### 5.7 Influencia de hierro (Fe<sup>2+</sup>)

Utilizando la mejor relación lactato/acetato de 3, basada en el rendimiento, se evaluó el efecto de la adición de hierro (Fe<sup>2+</sup>), como se muestra en la **Tabla 5.3**. Se observó que existe diferencia significativa por lo menos en un par de tratamientos, según el análisis ANOVA que correspondieron a 3 Lac/Acet 200 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup> (0.85 mmol H<sub>2</sub>. mmol lactato<sup>-1</sup>) y 25 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup> (0.69 mmol H<sub>2</sub>. mmol lactato<sup>-1</sup>), siendo el primero el mayor valor alcanzado entre las experiencias. Sin existir diferencia significativa entre el resto de los ensayos es posible observar

una tendencia a alcanzar valores más altos de rendimiento entre aquellos con adición externa, tanto de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), como de acetato, respecto a aquellos que no presentan la adición de este último.



**Figura. 5.6** Rendimiento y productividad asociado a los ensayos con adición de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y la relación 3 lactato/acetato.

Al realizar el ANOVA, basado en las diferentes productividades, se encontró que entre por lo menos uno de los pares existía diferencia significativa, por tal razón fue necesario aplicar una prueba de Tukey, donde las concentraciones de Lac – 50 mg  $\text{Fe}^{2+}$  · L<sup>-1</sup> (1.46 L H<sub>2</sub> · L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) y Lac – 100 mg  $\text{Fe}^{2+}$  · L<sup>-1</sup> (1.43 L H<sub>2</sub> · L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) sin la adición de acetato externa, presentaron diferencia significativa respecto al reactor (1.04 L H<sub>2</sub> · L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), al igual que una única prueba con adición de acetato externa correspondiente a 3 Lac/Acet – 200 mg  $\text{Fe}^{2+}$  · L<sup>-1</sup> (1.41 L H<sub>2</sub> · L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), como se puede observar en la **Figura 5.6** (flechas negras parte inferior de la figura) con incrementos del 29, 27 y 26 % respectivamente, lo cual las convierte en concentraciones prometedoras para un proceso continuo, sobresaliendo la primera como la más recomendada al requerir una menor adición de reactivos externa y mostrar la mayor productividad.

Los resultados de las pruebas estadísticas previamente mencionadas se analizaron igualmente considerando la mejor relación 3 Lac/Acet (0.98 L H<sub>2</sub> · L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), sin adición de hierro

(Fe<sup>2+</sup>) determinada en la experiencia anterior, correspondiente al **Apartado 5.6** del presente trabajo, coincidiendo en que existe diferencia significativa (flechas amarillas de la Fig) en los mismos ensayos que la obtuvieron respecto al reactor: Lac – 50 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup> (1.46 L H<sub>2</sub>. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), Lac – 100 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup> (1.43 L H<sub>2</sub>. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), 3 Lac/Acet – 200 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup> (1.41 L H<sub>2</sub>. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), esta vez sumándose el ensayo de Lac – 200 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup> (1.38 L H<sub>2</sub>. L<sub>R</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) con mejoras en el rendimiento respectivas de 33, 31, 30 y 29 %, exponiendo que la adición de hierro (Fe<sup>2+</sup>) favorece la producción de hidrógeno desde lactosuero ácido rico en lactato, ya sea con la adición de acetato o sin ella bajo determinadas concentraciones.

**Tabla 5.3** Parámetros asociados al modelo de Gompertz: 3 Lactato / Acetato + Fe<sup>2+</sup>.

Parámetro	<sup>a</sup> Rend.	<sup>b</sup> Produc.	H max (Exp)	H max (Teo)	R max	κ	R <sup>2</sup>
Unidades	mmol H <sub>2</sub> mmol Lac <sup>-1</sup>	L H <sub>2</sub> L <sub>R</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	mL H <sub>2</sub>	mL H <sub>2</sub>	mL.min <sup>-1</sup>	min	
<b>Condiciones</b>							
<b>Reactor</b>	0.71 ± 0.004	1.04 ± 0.05	177 ± 1.20	181 ± 1.95	0.28 ± 0.01	0	0.99
<b>Lac – 25 Fe<sup>2+</sup></b>	0.69 ± 0.03	1.22 ± 0.07	146. ± 6.36	148 ± 6.51	0.33 ± 0.01	0	0.99
<b>Lac – 50 Fe<sup>2+</sup></b>	0.78 ± 0.03	1.46 ± 0.04	166 ± 6.22	168 ± 6.44	0.4 ± 0.01	0	0.99
<b>Lac – 100 Fe<sup>2+</sup></b>	0.76 ± 0.07	1.43 ± 0.05	151	152 ± 0.54	0.39 ± 0.01	0	0.99
<b>Lac – 200 Fe<sup>2+</sup></b>	0.72 ± 0.01	1.38 ± 0.09	153 ± 2.54	154 ± 2.52	0.38 ± 0.03	0	0.99
<b>3 Lac /Acet</b>	0.73 ± 0.02	0.98 ± 0.05	155 ± 5.1	161 ± 7.6	0.27 ± 0.02	0	0.00
<b>3 Lac/Acet – 25 Fe<sup>2+</sup></b>	0.83 ± 0.01	1.28 ± 0.01	176 ± 1.27	182 ± 1.11	0.35 ± 0.03	0	0.99
<b>3 Lac/Acet – 50 Fe<sup>2+</sup></b>	0.82 ± 0.02	1.28 ± 0.19	175 ± 4.94	182 ± 1.72	0.35 ± 0.06	0	0.99
<b>3 Lac/Acet – 100 Fe<sup>2+</sup></b>	0.81 ± 0.05	1.17 ± 0.13	172 ± 11.10	180 ± 17.33	0.32 ± 0.04	0	0.99
<b>3 Lac/Acet – 200 Fe<sup>2+</sup></b>	0.85 ± 0.08	1.41 ± 0.10	180 ± 17.11	185 ± 20.94	0.39 ± 0.02	0	0.99

<sup>a</sup> Rendimiento; <sup>b</sup> productividad.

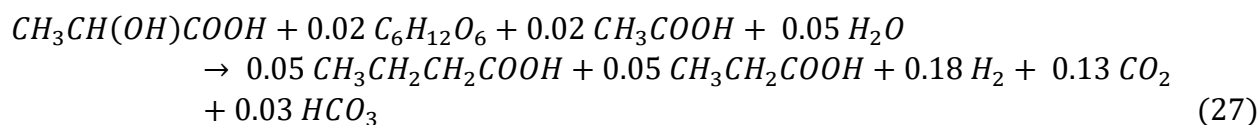
El porcentaje en el consumo de carbohidratos para los ensayos con adición externa de hierro (Lac – Fe<sup>2+</sup>) y sin adición externa de acetato, se mantuvo en el rango de 92.8 (Lac – 200 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>) a 97 (Lac – 50 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>) %, perteneciendo esta última cifra a la prueba que, vale la pena resaltar, alcanzó la máxima productividad entre todos los ensayos, como se mencionó anteriormente. En las pruebas donde se mantuvo la relación lactato/acetato de 3 con adición externa de hierro (Fe<sup>2+</sup>), el consumo permaneció en el rango de 81.7 (3 Lac/Acet – 200 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>) a 83.5 (3 Lac/Acet – 50 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>) %. Se expone así el hecho de que, basado en las pruebas estadísticas (ANOVA y Tukey), existe diferencia significativa entre todas las experiencias con adición externa de acetato (3 Lac/Acet – Fe<sup>2+</sup>), respecto a las que no la tuvieron (Lac – Fe<sup>2+</sup>), presentando estas últimas un consumo de carbohidratos notablemente mayor con

una relación lactato/acetato de 56:1, lo cual podría sugerir que la relación (lactato/acetato) seleccionada (3), pudo favorecer la vía lactato – acetato por encima de la de los carbohidratos para la producción de hidrógeno.

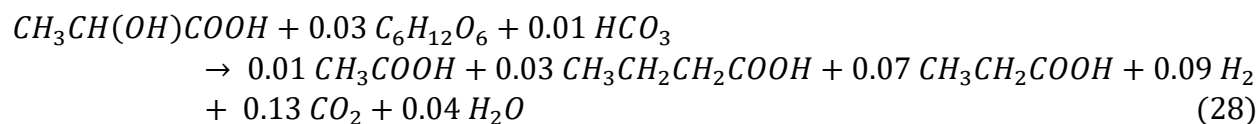
Al abordar la composición de H<sub>2</sub> en el biogás, los ensayos sin adición externa de acetato (Lac – Fe<sup>2+</sup>) oscilaron entre valores de 28.1 (Lac – 25 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>) y 31.1 (Lac – 200 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>) %, estos porcentajes fueron semejantes para las experiencias donde se mantuvo la relación 3 lactato/acetato con adición externa de hierro 28.7 (3 Lac/Acet – 50 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>) y 31 (3 Lac/Acet – 100 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>) %, sin existir diferencia significativa entre ninguno de los ensayos previamente mencionados.

El balance de electrones arrojó los coeficientes estequiométricos correspondientes a los ensayos ya mencionados y los metabolitos analizados detallados en el **Apéndice H**, donde destacan las reacciones generales para 3 Lac/Acet – 200 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup> (mejor rendimiento) y Lac – 50 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup> (mejor productividad):

Relación Lac/Acet 3 – 200 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>



Lac – 50 mg Fe<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>



Los metabolitos analizados como posibles productos o aceptores (acetato, butirato, propionato e H<sub>2</sub>) representan del 13 al 37 % del total de electrones aportados por el lactato y los carbohidratos en las pruebas sin adición externa de acetato (Lac – Fe<sup>2+</sup>), hallándose el porcentaje de electrones empleados para la producción de H<sub>2</sub> entre el 3 y 3.4%. Aquellas donde se mantuvo la relación 3 lactato/acetato, mostraron un rango entre el 19 al 37 % para la formación de productos, donde los electrones dirigidos a la generación de H<sub>2</sub> se establecieron entre un 3.7 y

3.8%. El porcentaje restante de electrones no dirigidos a la aparición de los metabolitos estudiados corresponde, presuntamente, a AGV como caproato, valerato, isovalerato u otros metabolitos como el etanol, así como a la formación de biomasa.

Es importante mencionar que se buscó operar el reactor UASB empleando la mejor condición encontrada en los ensayos en lote ( $\text{Lac} - 50 \text{ mg Fe}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ ) durante 17 días (días 69 – 85 de operación), de los cuales 13 correspondieron a un periodo de reaclimatación (sin ingreso de hierro  $\text{Fe}^{2+}$ ) del inóculo con un nuevo lote de lactosuero ácido rico en lactato, el cual carecía casi en su totalidad de la presencia de carbohidratos (lactosuero fermentado lote 2), todo esto hasta encontrar un  $\text{CV} < 10 \%$ , para tres valores consecutivos en la productividad ( $2.3 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) con una composición de  $\text{H}_2$  promedio de  $29.9 \pm 0.9 \%$ .

Con el ingreso del hierro  $\text{Fe}^{2+}$  ( $50 \text{ mg Fe}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (día 81 de operación) al cumplirse el criterio de estabilidad previamente mencionado con  $\text{CV} = 6.2\%$ , se alcanzó una productividad máxima de ( $3.1 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) para el día 15 (día 83 de operación), que disminuyó hasta ( $2.5 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) para el día 17 (día 85 de operación), con una composición de  $\text{H}_2$  promedio de  $33.8 \pm 0.9 \%$ , presentándose entonces una caída total en la generación de biogás que se asocia a condiciones operativas sin alcanzarse un  $\text{CV} < 10\%$ . Por tal razón los resultados no fueron concluyentes hacia el objetivo de probar el efecto de la adición de hierro ( $50 \text{ mg Fe}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ ) en un sistema continuo. Sin embargo, la caracterización del lactosuero ácido rico en lactato, los metabolitos desarrollados, la composición del biogás y la productividad durante este periodo fueron registrados en el **Apéndice I**.



## 6. Conclusiones

- Se logró observar, que tanto la adición de acetato como de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) promueven la obtención de hidrógeno, mediante la vía lactato-acetato, recayendo su efecto en mejoras en la productividad, que para ambos casos son cercanas al 33% agregando cada aditivo de manera individual y 29 % de manera combinada.
- La estrategia de aclimatación basada en el control de pH y TRH resultó ser efectiva al lograr transformar inóculo metanogénico a hidrogenogénico en aproximadamente 17 días, sin detectarse metano.
- La operación del reactor anaerobio de flujo ascendente alcanzó productividades estables ( $3.1 \pm 0.09 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) con picos de hasta  $4.4 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$  donde el hidrógeno recibió hasta el 7% de los electrones provenientes del lactato y los carbohidratos.
- La generación de butirato, ya sea desde los carbohidratos o la vía lactato – acetato, contribuye notablemente a la aparición de caproato, especialmente desde lactosuero ácido rico en lactato, mostrándose como posible nuevo indicador de esta segunda vía metabólica (lactato – acetato), bajo las condiciones de operación seleccionadas para el reactor en el presente estudio, y como consumidor de sustrato e hidrógeno de manera antagónica a la producción de este último.
- La adición externa de acetato tiene un efecto más pronunciado en la productividad que en el rendimiento, donde se encontró diferencia significativa entre por lo menos dos de las relaciones (2 y 8.5) siendo esta última la más favorable.
- El adicionar hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), ya sea en presencia o no de acetato externo, contribuye a mejorar la productividad de hidrógeno. En el presente estudio, la condición de Lac –  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ , mostró un incremento significativo de 29 % respecto al control, lo cual la convierte en una concentración prometedora para realizar pruebas en un sistema continuo utilizado sustrato fermentado ausente de carbohidratos

## 7. Lista de congresos y o publicaciones derivadas de la tesis.

- Pedraza, D; Buitrón, G; Moreno, G. (Mayo, 2023). *Hydrogen production from cheese whey through the carbohydrates and lactate-acetate pathway* [Poster]. 4th International Conference for Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability. Riva del Garda, Italia. Int'l Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability (elsevier.com).
- Pedraza, D; Buitrón, G; Moreno, G. (Octubre, 2023). *Biohydrogen production from acidic cheese whey: Reactor performance and effect of addition of iron and acetate* [Presentacion oral corta]. Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion (DAAL XIV). Querétaro, México. <https://www.daal14.mx/>.

:

## 8. Bibliografía

Ahmed, M. E., & Dey, A. (2019). Recent developments in bioinspired modelling of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Current Opinion in Electrochemistry*, *15*, 155-164.

Andreani, C. L., Tonello, T. U., Mari, A. G., Leite, L. C., Campaña, H. D., Lopes, D. D., ... & Gomes, S. D. (2019). Impact of operational conditions on development of the hydrogen-producing microbial consortium in an AnSBBR from cassava wastewater rich in lactic acid. *International Journal of Hydrogen Energy*, *44*(3), 1474-1482.

Antonopoulou, G., Ntaikou, I., Bebelis, S., & Lyberatos, G. (2021). On the evaluation of filtered and pretreated cheese whey as an electron donor in a single chamber microbial fuel cell. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *11*(2), 633-643. (Antonopoulou *et al.*, 2021)

Anzola-Rojas, M. D. P., & Zaiat, M. (2016). A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H<sub>2</sub> energy production from wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *91*(5), 1551-1561

Asunis, F., De Gioannis, G., Isipato, M., Muntoni, A., Poletini, A., Pomi, R., ... & Spiga, D. (2019). Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. *Bioresource technology*, *289*, 121722.

Asunis, F., De Gioannis, G., Dessì, P., Isipato, M., Lens, P. N., Muntoni, A., ... & Spiga, D. (2020). The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation. *Journal of Environmental Management*, *276*, 111240.

Bando, Y., Fujimoto, N., Suzuki, M., & Ohnishi, A. (2013). A microbiological study of biohydrogen production from beer lees. *International journal of hydrogen energy*, *38*(6), 2709-2718.

Beckers, L., Hilgsmann, S., Lambert, S. D., Heinrichs, B., & Thonart, P. (2013). Improving effect of metal and oxide nanoparticles encapsulated in porous silica on fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum*. *Bioresource technology*, *133*, 109-117.

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., 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.

Bundhoo, M. Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, *41*(16), 6713-6733.

- 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.
- Calero, R. R., Lagoa-Costa, B., Fernandez-Feal, M. M. D. C., Kennes, C., & Veiga, M. C. (2018). Volatile fatty acids production from cheese whey: influence of pH, solid retention time and organic loading rate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *93*(6), 1742-1747.
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the total environment*, *445*, 385-396.
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, *37*(7), 5591-5601.
- Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Tapia-Rodríguez, A. C., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., ... & Zaiat, M. (2020). Standardized protocol for determination of biohydrogen potential. *MethodsX*, *7*, 100754.
- Charalambous, P., Shin, J., Shin, S. G., & Vyrides, I. (2020). Anaerobic digestion of industrial dairy wastewater and cheese whey: performance of internal circulation bioreactor and laboratory batch test at pH 5-6. *Renewable Energy*, *147*, 1-10. (Charalambous *et al.*, 2020)
- Chang, S., Li, J. Z., & Liu, F. (2011). Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. *Renewable Energy*, *36*(5), 1517-1522.
- Chen, Y., Yin, Y., & Wang, J. (2021). Recent advance in inhibition of dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *46*(7), 5053-5073.
- Chen, X., Yuan, H., Zou, D., Liu, Y., Zhu, B., Chufo, A., ... & Li, X. (2015). Improving biomethane yield by controlling fermentation type of acidogenic phase in two-phase anaerobic co-digestion of food waste and rice straw. *Chemical Engineering Journal*, *273*, 254-260.
- Cheng, H. H., Whang, L. M., Chung, M. C., & Chan, K. C. (2016). Biological hydrogen and methane production from bagasse bioethanol fermentation residues using a two-stage bioprocess. *Bioresource technology*, *210*, 49-55.
- Chong, M. L., Yee, P. L., Abd Aziz, S., Rahim, R. A., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2009). Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6. *International journal of hydrogen energy*, *34*(21), 8859-8865.
- Cieciura-Włoch, W., Borowski, S., & Domański, J. (2020). Dark fermentative hydrogen production from hydrolyzed sugar beet pulp improved by iron addition. *Bioresource Technology*, *314*, 123713
- Claudio, B., Lara-Musule, A., Alvarez-Sanchez, E., Trejo-Aguilar, G., Bastidas-Oyanedel, J. R., & Hernandez-Martinez, E. (2020). An Unstructured Model for Anaerobic Treatment of Raw Cheese Whey for Volatile Fatty Acids Production. *Energies*, *13*(7), 1-14.

Contreras Gallegos, M.A. (2019). *Biohydrogen production by dark fermentation using cheese whey* [Tesis Maestría, Universidad de Zaragoza]. Repositorio Institucional Universidad Nacional Autónoma de México.

Colombo, B., Calvo, M. V., Sciarria, T. P., Scaglia, B., Kizito, S. S., D'Imporzano, G., & Adani, F. (2019). Biohydrogen and polyhydroxyalkanoates (PHA) as products of a two-steps bioprocess from deproteinized dairy wastes. *Waste Management*, 95, 22-31.

Dareioti, M. A., Vavouraki, A. I., & Kornaros, M. (2014). Effect of pH on the anaerobic acidogenesis of agroindustrial wastewaters for maximization of bio-hydrogen production: a lab-scale evaluation using batch tests. *Bioresource technology*, 162, 218-227

Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4296-4304.

De Almeida Pires, T., Cardoso, V. L., & Batista, F. R. X. (2021). Feasibility of *Chlorella vulgaris* to waste products removal from cheese whey. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-10.

de Jesus Montoya-Rosales, J., Palomo-Briones, R., Celis, L. B., Etchebehere, C., & Razo-Flores, E. (2020). Discontinuous biomass recycling as a successful strategy to enhance continuous hydrogen production at high organic loading rates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(35), 17260-17269

Dessi, P., Asunis, F., Ravishankar, H., Cocco, F. G., De Gioannis, G., Muntoni, A., & Lens, P. N. (2020). Fermentative hydrogen production from cheese whey with in-line, concentration gradient-driven butyric acid extraction. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(46), 24453-24466.

Detman, A., Mielecki, D., Chojnacka, A., Salamon, A., Błaszczuk, M. K., & Sikora, A. (2019). Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: *Clostridium butyricum* and microbial communities from dark fermentation bioreactors. *Microbial cell factories*, 18(1), 1-12.

Detman, A., Laubitz, D., Chojnacka, A., Kiela, P. R., Salamon, A., Barberán, A., ... & Sikora, A. (2021). Dynamics of dark fermentation microbial communities in the light of lactate and butyrate production. *Microbiome*, 9(1), 1-21.

Dhar, B. R., Elbeshbishy, E., & Nakhla, G. (2012). Influence of iron on sulfide inhibition in dark biohydrogen fermentation. *Bioresource technology*, 126, 123-130.

Diez-Gonzalez, F., Russell, J. B., & Hunter, J. B. (1995). The role of an NAD-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *Clostridium acetobutylicum* strain P262. *Archives of microbiology*, 164(1), 36-42.

Ding, C., Yang, K. L., & He, J. (2016). Biological and fermentative production of hydrogen. In *Handbook of Biofuels Production* (pp. 303-33). Woodhead Publishing.

Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., & Yu, Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 812-820.

Elleuch, L., Salem-Berrabah, O. B., Cherni, Y., Sghaier-Hammami, B., Kasmi, M., Botta, C., ... & Chatti, A. (2020). A new practical approach for the biological treatment of a mixture of cheese whey and white wastewaters using Kefir grains. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(26), 33127-33139.

Engliman, N. S., Abdul, P. M., Wu, S. Y., & Jahim, J. M. (2017). Influence of iron (II) oxide nanoparticle on biohydrogen production in thermophilic mixed fermentation. *international journal of hydrogen energy*, 42(45), 27482-27493.

Farizoglu, B., Keskinler, B., Yildiz, E., & Nuhoglu, A. (2004). Cheese whey treatment performance of an aerobic jet loop membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, 39(12), 2283-2291. (Farizoglu *et al.*, 2004)

Freitas, I. B. F., de Menezes, C. A., & Silva, E. L. (2020). An alternative for value aggregation to the sugarcane chain: Biohydrogen and volatile fatty acids production from sugarcane molasses in mesophilic expanded granular sludge bed reactors. *Fuel*, 260, 116419.

Fuentes-Santiago, V., Valdez-Vazquez, I., Vital-Jácome, M., Zavala-Méndez, M., Razo-Flores, E., & Carrillo-Reyes, J. (2023). Carbohydrates/acid ratios drives microbial communities and metabolic pathways during biohydrogen production from fermented agro-industrial wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(3), 110302.

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., Zaiat, M., & do Nascimento, C. A. O. (2019). Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. *Bioresource technology*, 286, 121379.

Gadhe, A., Sonawane, S. S., & Varma, M. N. (2015). Influence of nickel and hematite nanoparticle powder on the production of biohydrogen from complex distillery wastewater in batch fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(34), 10734-10743.

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., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., & León-Becerril, E. (2019 a). Effect of process parameters on enhanced biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway. *Bioresource technology*, 273, 618-626

- García-Depraect, O., Rene, E. R., Gómez-Romero, J., López-López, A., & León-Becerril, E. (2019 b). Enhanced biohydrogen production from the dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: novel insights into ecological regulation by pH. *Fuel*, 253, 159-166
- García-Depraect, O., Valdez-Vázquez, I., Rene, E. R., Gómez-Romero, J., López-López, A., & León-Becerril, E. (2019 c). Lactate-and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. *Bioresource technology*, 282, 236-244
- García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., Muñoz, R., Rene, E. R., León-Becerril, E., Valdez-Vázquez, I., ... & Buitrón, G. (2020 a). A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: the key to unlocking enhanced dark fermentative processes. *Bioresource technology*, 124595
- García-Depraect, O., Diaz-Cruces, V. F., Rene, E. R., & León-Becerril, E. (2020 b). 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., Muñoz, R., Rodríguez, E., Rene, E. R., & Leon-Becerril, E. (2021). Microbial ecology of a lactate-driven dark fermentation process producing hydrogen under carbohydrate-limiting conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(20), 11284-11296.
- Gokfiliz, P., & Karapinar, I. (2017). The effect of support particle type on thermophilic hydrogen production by immobilized batch dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4), 2553-2561
- Gomes, S. D., Fuess, L. T., Mañunga, T., de Lima Gomes, P. C. F., & Zaiat, M. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(19), 8120-8131.
- Gomez-Flores, M., Nakhla, G., & Hafez, H. (2017). Hydrogen production and microbial kinetics of *Clostridium termitidis* in mono-culture and co-culture with *Clostridium beijerinckii* on cellulose. *AMB Express*, 7(1), 1-12
- Guerreiro, R. C., Jerónimo, E., Luz, S., Pinheiro, H. M., & Prazeres, A. R. (2020). Cheese manufacturing wastewater treatment by combined physicochemical processes for reuse and fertilizer production. *Journal of environmental management*, 264, 110470.
- Guevara-López, E., & Buitrón, G. (2015). Evaluation of different support materials used with a photo-fermentative consortium for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(48), 17231-17238.
- Han, H., Cui, M., Wei, L., Yang, H., & Shen, J. (2011). Enhancement effect of hematite nanoparticles on fermentative hydrogen production. *Bioresource technology*, 102(17), 7903-7909.



Hernández-Mendoza, C. E., & Buitrón, G. (2014). Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(1), 143-149.

Jankowska, E., Chwialkowska, J., Stodolny, M., & Oleskiewicz-Popiel, P. (2017). Volatile fatty acids production during mixed culture fermentation—The impact of substrate complexity and pH. *Chemical Engineering Journal*, 326, 901-910

Jiang, X., Hu, J., Lieber, A. M., Jackan, C. S., Biffinger, J. C., Fitzgerald, L. A., ... & Lieber, C. M. (2014). Nanoparticle facilitated extracellular electron transfer in microbial fuel cells. *Nano letters*, 14(11), 6737-6742

Junghare, M., Subudhi, S., & Lal, B. (2012). Improvement of hydrogen production under decreased partial pressure by newly isolated alkaline tolerant anaerobe, *Clostridium butyricum* TM-9A: Optimization of process parameters. *international journal of hydrogen energy*, 37(4), 3160-3168.

Karadag, D., & Puhakka, J. A. (2010). Enhancement of anaerobic hydrogen production by iron and nickel. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(16), 8554-8560.

Kassongo, J., Shahsavari, E., & Ball, A. S. (2020). Renewable energy from the solid-state anaerobic digestion of grape marc and cheese whey at high treatment capacity. *Biomass and Bioenergy*, 143, 105880.

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.

Kovalev, A. A., Mikheeva, E. R., Katraeva, I. V., Kovalev, D. A., & Kozlov, A. M. (2023). Bioenergy recovery from two-stage mesophilic-thermophilic anaerobic digestion of cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(12), 4676-4685.

Lovato, G., Lazaro, C. Z., Zaiat, M., Ratusznei, S. M., & Rodrigues, J. A. D. (2017). Biohydrogen production by co-digesting whey and glycerin in an AnSBBR: Performance optimization, metabolic pathway kinetic modeling and phylogenetic characterization. *Biochemical Engineering Journal*, 128, 93-105

Lovato, G., Augusto, I. M. G., Júnior, A. D. N. F., Albanez, R., Ratusznei, S. M., Etchebehere, C., ... & Rodrigues, J. A. D. (2021). Reactor start-up strategy as key for high and stable hydrogen production from cheese whey thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(54), 27364-27379.

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.



- Mansor, E. S., Ali, E. A., & Shaban, A. M. (2021). Tight ultrafiltration polyethersulfone membrane for cheese whey wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 407, 127175.
- Maragkaki, A. E., Vasileiadis, I., Fountoulakis, M., Kyriakou, A., Lasaridi, K., & Manios, T. (2018). Improving biogas production from anaerobic co-digestion of sewage sludge with a thermal dried mixture of food waste, cheese whey and olive mill wastewater. *Waste management*, 71, 644-651.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Gonzalez, J. M. D., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in food science & technology*, 30(1), 70-83.
- Matsumoto, M., & Nishimura, Y. (2007). Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(3), 236-241
- 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.
- Moon, C., Jang, S., Yun, Y. M., Lee, M. K., Kim, D. H., Kang, W. S., ... & Kim, M. S. (2015). Effect of the accuracy of pH control on hydrogen fermentation. *Bioresource technology*, 179, 595-601.
- Muñoz-Paez, K. M., Vargas, A., & Buitrón, G. (2023). Feedback Control-Based Strategy Applied for Biohydrogen Production from Acid Cheese Whey. *Waste and Biomass Valorization*, 14(2), 447-460.
- OCDE-FAO. (2017). PERSPECTIVAS AGRÍCOLAS 2017-2026: [https://www.fao.org/3/BT090s/BT090s.pdf?fbclid=IwAR3JXEnYcIJjEWXW4UxzVtCCbcTwdK-JNWaaNR5--pugfwhHJBANNdWS\\_vE](https://www.fao.org/3/BT090s/BT090s.pdf?fbclid=IwAR3JXEnYcIJjEWXW4UxzVtCCbcTwdK-JNWaaNR5--pugfwhHJBANNdWS_vE)
- 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.
- Ohnishi, A., Hasegawa, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2021). Biohydrogen production by mixed culture of *Megasphaera elsdenii* with lactic acid bacteria as lactate-driven dark fermentation. *Bioresource Technology*, 343, 126076.
- ONU.(2017).Informe mundial de las naciones unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos 2017: Aguas Residuales un recurso desaprovechado: <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247647?fbclid=IwAR3KA8bbFW9NiOdYAJsvwVm3d8x-3PHe0eHbcpUdeim-ohAIMIY6LafRPWg>.
- Ordoñez-Frías, E. J., Muñoz-Páez, K. M., & Buitrón, G. (2023). Biohydrogen production from fermented acidic cheese whey using lactate: Reactor performance and microbial ecology analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*.

- Palmieri, N., Forleo, M. B., & Salimei, E. (2017). Environmental impacts of a dairy cheese chain including whey feeding: An Italian case study. *Journal of Cleaner Production*, *140*, 881-889.
- Park, M. J., Jo, J. H., Park, D., Lee, D. S., & Park, J. M. (2010). Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*(12), 6194-6202.
- Park, J. H., Kumar, G., Park, J. H., Park, H. D., & Kim, S. H. (2015). Changes in performance and bacterial communities in response to various process disturbances in a high-rate biohydrogen reactor fed with galactose. *Bioresource technology*, *188*, 109-116.
- Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Lima, D. F., Borzacconi, L., ... & Etchebehere, C. (2013). Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, *38*(1), 54-62.
- Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A., Zonfa, T., De Gioannis, G., & Muntoni, A. (2022). Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey—new insights into process stability. *International Journal of Hydrogen Energy*, *47*(49), 21044-21059.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of environmental management*, *110*, 48-68.
- Rafieenia, R., Pivato, A., Schievano, A., & Lavagnolo, M. C. (2018). Dark fermentation metabolic models to study strategies for hydrogen consumers inhibition. *Bioresource technology*, *267*, 445-457.
- Rai, P. K., Singh, S. P., & Asthana, R. K. (2012). Biohydrogen production from cheese whey wastewater in a two-step anaerobic process. *Applied biochemistry and biotechnology*, *167*(6), 1540-1549.
- Ramírez-Morales, J. E., Zúñiga, 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.
- Ramos, L. R., & Silva, E. L. (2017). Improving EGSB reactor performance for simultaneous bioenergy and organic acid production from cheese whey via continuous biological H<sub>2</sub> production. *Biotechnology Letters*, *39*, 983-991.
- Ramos, L. R., de Menezes, C. A., Soares, L. A., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2020). Controlling methane and hydrogen production from cheese whey in an EGSB reactor by changing the HRT. *Bioprocess and biosystems engineering*, *43*, 673-684.
- Reddy, K., Nasr, M., Kumari, S., Kumar, S., Gupta, S. K., Enitan, A. M., & Bux, F. (2017). Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate: effects of pH, S/X, Fe<sup>2+</sup>, and magnetite nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(9), 8790-8804.
- Ren, Y., Si, B., Liu, Z., Jiang, W., & Zhang, Y. (2021). Promoting dark fermentation for biohydrogen production: Potential roles of iron-based additives. *International Journal of Hydrogen Energy*.

- REN21. (2021). *Renewables 2021 Global Status Report*: <https://www.ren21.net/gsr-2021>.
- Ribeiro, J. C., Mota, V. T., de Oliveira, V. M., & Zaiat, M. (2022). Hydrogen and organic acid production from dark fermentation of cheese whey without buffers under mesophilic condition. *Journal of Environmental Management*, 304, 114253.
- Rittmann, B y McCarty, P (2001). *Environmental and Biotechnology*. Mc Graw Hill.
- Rivera, I., Bakonyi, P., Cuautle-Marín, M. A., & Buitrón, G. (2017). Evaluation of various cheese whey treatment scenarios in single-chamber microbial electrolysis cells for improved biohydrogen production. *Chemosphere*, 174, 253-259.
- Rosa, P. R. F., Santos, S. C., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2014). Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. *Bioresource technology*, 161, 10-19.
- Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), 13172-13191.
- Salas-Vargas, C., Pérez, L. B., Ortiz, V. E. E., & García, C. G. M. (2021). Environmental impact of Oaxaca cheese production and wastewater from artisanal dairies under two scenarios in Aculco, State of Mexico. *Journal of Cleaner Production*, 127586
- 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.
- Sekoai, P. T., & Daramola, M. O. (2018). Effect of metal ions on dark fermentative biohydrogen production using suspended and immobilized cells of mixed bacteria. *Chemical Engineering Communications*, 205(8), 1011-1022.
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology*, 6(6), 550-556.
- Sivagurunathan, P., Sen, B., & Lin, C. Y. (2015). High-rate fermentative hydrogen production from beverage wastewater. *Applied Energy*, 147, 1-9.
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S. H., Kobayashi, T., Xu, K. Q., ... & Bélafi-Bakó, K. (2016). A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *international journal of hydrogen energy*, 41(6), 3820-3836.
- Sivagurunathan, P., Anburajan, P., Kumar, G., Park, J. H., & Kim, S. H. (2017). Recovering hydrogen production performance of upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASBR) fed with galactose via repeated heat treatment strategy. *Bioresource technology*, 240, 207-213.
- Spagni, A., Casu, S., & Farina, R. (2010). Effect of the organic loading rate on biogas composition in continuous fermentative hydrogen production. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 45(12), 1475-1481.

- Srikanth, S., & Mohan, S. V. (2012). Regulatory function of divalent cations in controlling the acidogenic biohydrogen production process. *RSC advances*, 2(16), 6576-6589.
- Stavropoulos, K. P., Kopsahelis, A., Zafiri, C., & Kornaros, M. (2016). Effect of pH on continuous biohydrogen production from end-of-life dairy products (EoL-DPs) via dark fermentation. *Waste and biomass valorization*, 7(4), 753-764.
- Taherdanak, M., Zilouei, H., & Karimi, K. (2016). The effects of Fe<sub>0</sub> and Ni<sub>0</sub> nanoparticles versus Fe<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> ions on dark hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(1), 167-173.
- Tai, J., Aday, S. S., Su, A., & Lee, D. J. (2010). Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. *International journal of hydrogen energy*, 35(24), 13345-13349.
- Tao, Y., Hu, X., Zhu, X., Jin, H., Xu, Z., Tang, Q., & Li, X. (2016). Production of butyrate from lactate by a newly isolated *Clostridium* sp. BPY5. *Applied biochemistry and biotechnology*, 179(3), 361-374.
- Tehrani, N. S., Najafpour, G. D., Rahimnejad, M., & Attar, H. (2015). Performance of up flow anaerobic sludge fixed film bioreactor for the treatment of high organic load and biogas production of cheese whey wastewater. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 21(2), 229-237.
- Tholozan, J. L., Touzel, J. P., Samain, E., Grivet, J. P., Prensier, G., & Albagnac, G. (1992). *Clostridium neopropionicum* sp. nov., a strict anaerobic bacterium fermenting ethanol to propionate through acrylate pathway. *Archives of microbiology*, 157(3), 249-257
- Tirado, L., Gökkuş, Ö., Brillas, E., & Sirés, I. (2018). Treatment of cheese whey wastewater by combined electrochemical processes. *Journal of Applied Electrochemistry*, 48(12), 1307-1319.
- Wang, J., & Wan, W. (2008). Effect of Fe<sup>2+</sup> concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1215-1220.
- Wang, J., & Yin, Y. (2017). Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(8), 4804-4823.
- Wang, J., & Yin, Y. (2019). Progress in microbiology for fermentative hydrogen production from organic wastes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(10), 825-865.
- Wang, J., & Yin, Y. (2021). *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Weghoff, M. C., Bertsch, J., & Müller, V. (2015). A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria. *Environmental microbiology*, 17(3), 670-677.

Wu, C. W., Whang, L. M., Cheng, H. H., & Chan, K. C. (2012). Fermentative biohydrogen production from lactate and acetate. *Bioresource technology*, *113*, 30-36.

Yang, K., Yu, Y., & Hwang, S. (2003). Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation. *Water Research*, *37*(10), 2467-2477.

Yang, Y., Nie, X., Jiang, Y., Yang, C., Gu, Y., & Jiang, W. (2018). Metabolic regulation in solventogenic clostridia: regulators, mechanisms and engineering. *Biotechnology advances*, *36*(4), 905-914.

Yang, G., & Wang, J. (2018). Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *95*, 130-146

Yang, G., Yin, Y., & Wang, J. (2019). Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, *44*(26), 13147-13156.

Yin, Y., & Wang, J. (2019). Mechanisms of enhanced biohydrogen production from macroalgae by ferrous ion: insights into correlations of microbes and metabolites. *Bioresource Technology*, *291*, 121808.

Yu, R., Wang, R., Bi, T., Sun, W., & Zhou, Z. (2013). Blocking the butyrate-formation pathway impairs hydrogen production in *Clostridium perfringens*. *Acta Biochim Biophys Sin*, *45*(5), 408-415.

Zagrodnik, R., & Laniecki, M. (2016). An unexpected negative influence of light intensity on hydrogen production by dark fermentative bacteria *Clostridium beijerinckii*. *Bioresource technology*, *200*, 1039-1043.

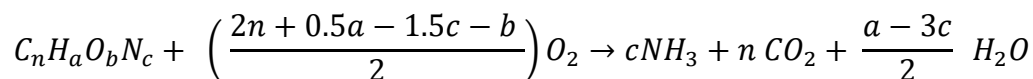
Zhang, J., Fan, C., & Zang, L. (2017). Improvement of hydrogen production from glucose by ferrous iron and biochar. *Bioresource technology*, *245*, 98-105.

Zhao, X., Xing, D., Qi, N., Zhao, Y., Hu, X., & Ren, N. (2017). Deeply mechanism analysis of hydrogen production enhancement of *Ethanoligenens harbinense* by  $Fe^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ : Monitoring at growth and transcription levels. *International Journal of Hydrogen Energy*, *42*(31), 19695-19700.

### Apéndice A

Cálculo de la relación F/M propia del reactor, llevada a las pruebas en lote.

- DQO<sub>eq</sub> del lactato (CH<sub>3</sub>CH(OH)COOH)



$$\frac{DQO_{eq}}{Peso} = \frac{(2n + 0.5a - 1.5c - b)16}{12n + a + 16b + 14c}$$

$$\frac{DQO_{eq}(C_3H_6O_3)}{Peso} = \frac{(2(3) + 0.5(6) - 1.5(0) - (3))16}{12(3) + 6 + 16(3) + 14(0)} = 1.06 \text{ g DQO}_{eq}$$

- Teniendo en cuenta una concentración de alimentación de 10 g lactato. L<sup>-1</sup> para el reactor UASB productor de hidrógeno.

$$\frac{10 \text{ g Lactato}}{L} * \frac{1.06 \text{ g DQO}_{eq}}{1 \text{ g Lactato}} = \frac{10.6 \text{ g DQO}_{eq}}{L}$$

$$\frac{10.6 \text{ g DQO}_{eq}}{L} * \frac{7.4 \text{ mL}}{\text{min}} * \frac{1L}{1000 \text{ mL}} * \frac{1440 \text{ min}}{\text{día}} = \frac{112.56 \text{ g DQO}_{eq}}{\text{día}}$$

- Puesto que 9.36 g de lodo húmedo ocuparon un volumen, medido en probeta de 10 mL, y que el reactor fue inoculado con, aproximadamente, 400 mL de este lodo entonces:

$$400 \text{ mL lodo humedo} * \frac{9.36 \text{ g de lodo humedo}}{10 \text{ mL}} = 374.4 \text{ g lodo humedo}$$

- De acuerdo con el análisis de sólidos del lodo hidrogenogénico, correspondiente a la etapa 2, con la alimentación de lactosuero ácido rico en lactato (días 53 – 68) se tiene que  $0.118 \pm 0.003$  g SV sólido volátil / g sólido húmedo.

$$374.4 \text{ g lodo humedo} * \frac{0.118 \text{ g SV}}{\text{g lodo humedo}} = 43.80 \text{ g SV}$$

- Finalmente, la relación sustrato microorganismo (F/M) para el reactor:

$$\frac{F}{M} = \frac{112.56 \text{ g } DQO_{eq}}{43.80 \text{ g sólido volatil}} = 2.56$$

## Apendice B

Determinación de sólidos para lodos de tipo metanogénico e hidrogenogénico.

**Tabla B-1** Estimación de sólidos para lodo metanogénico e hidrogenogénico

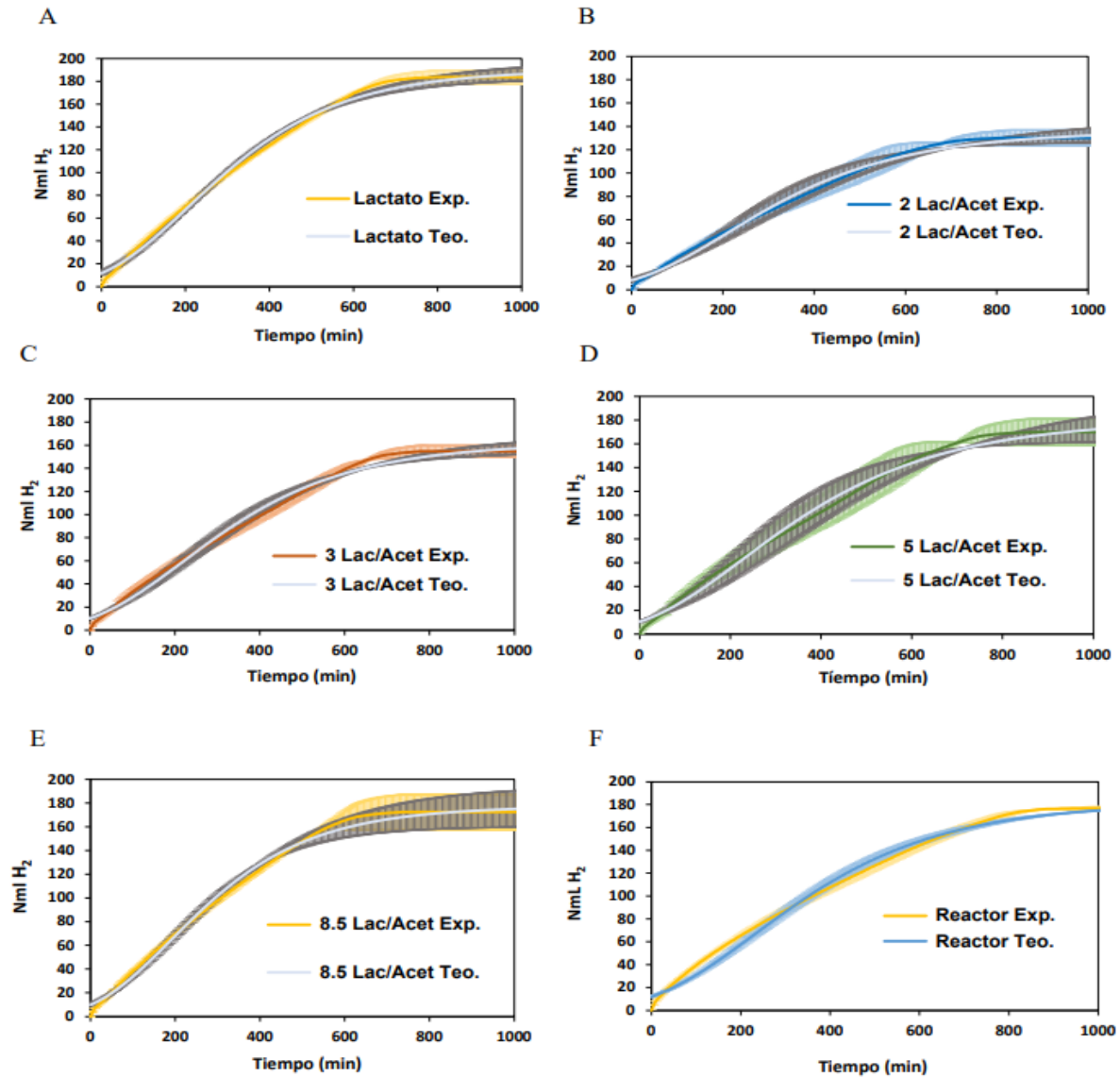
<b>Lodo Metanogénico</b>			
<b><sup>a</sup>(ST / SH)<sup>c</sup> (g)</b>		<b><sup>b</sup>(SV/SH) (g)</b>	
0.425		0.412	
0.414	0.415 ±0.009	0.399	0.401 ±0.010
0.406		0.392	
<b>Lodo Hidrogenogénico</b>			
0.130		0.114	
0.138	0.134 ±0.004	0.121	0.118 ±0.004
0.133		0.118	

<sup>a</sup> Sólido total; <sup>b</sup> sólido volátil; <sup>c</sup> sólido húmedo.



### Apéndice C

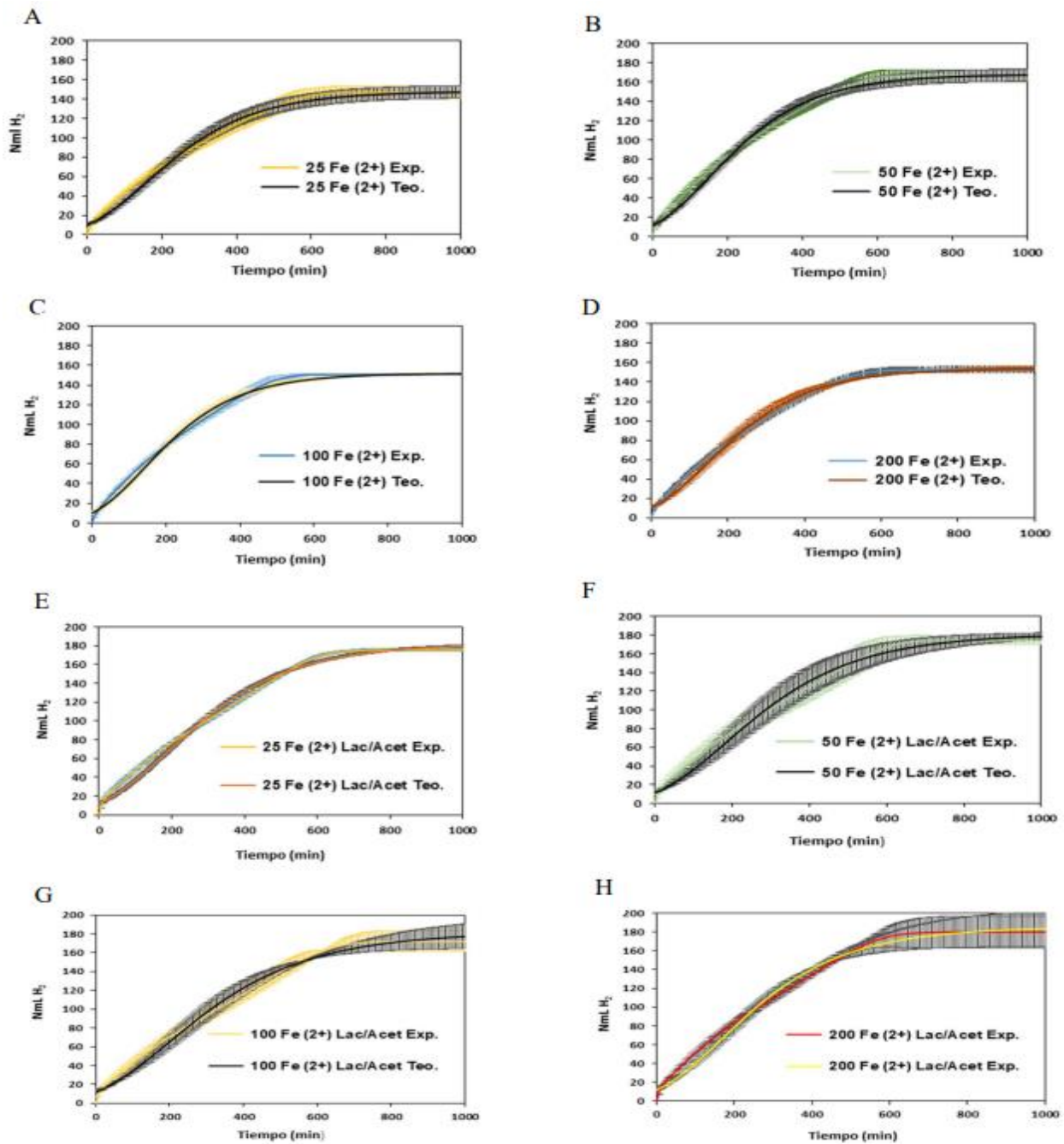
Modelos de Gompertz para los ensayos en lote, teniendo en cuenta las diferentes relaciones lactato/acetato.



*Nota:* Curva asociada a los datos experimentales (Exp); curva ajustada al modelo de Gompertz (Teo).

## Apéndice D

Modelos de Gompertz para los ensayos en lote, teniendo en cuenta la relación 3 lactato/acetato y las diferentes adiciones de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ).



*Nota:* Curva asociada a los datos experimentales (Exp); curva ajustada al modelo de Gompertz (Teo).

## Apendice E

Tabla resumen de los metabolitos estimados para los distintos ensayos en lote, teniendo en cuenta la relación 3 lactato/acetato y las diferentes adiciones de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

**Tabla E-1** Metabolitos asociados a los distintos ensayos en lote y composición del biogás.

Condiciones	Concentración inicial (g DQO <sub>eq</sub> · L <sup>-1</sup> )					Consumo o producción final (g DQO <sub>eq</sub> · L <sup>-1</sup> )					% Consumo Carb.	% H <sub>2</sub>	% CO <sub>2</sub>
	Lac	Carb	Acet	Prop	But	Lac	Carb	Acet	Prop	But			
<b>Reactor</b>	2.51	1.48	1.35	0.0	0.0	-2.46	-1.43	0.13	0.06	0.13	96.4	32.8	67.2
<b>Lactato</b>	3.00	1.80	0.05	0.0	0.0	-3.00	-1.56	0.60	0.35	0.40	86.3	36.2	63.8
<b>2 Lac /Acet</b>	2.00	1.20	0.93	0.0	0.0	-2.00	-0.99	0.14	0.27	0.45	82.5	32.9	67.1
<b>3 Lac /Acet</b>	2.25	1.35	0.71	0.0	0.0	-2.25	-1.17	0.26	0.28	0.47	86.6	32.9	67.1
<b>5 Lac /Acet</b>	2.50	1.50	0.49	0.0	0.0	-2.50	-1.23	0.42	0.31	0.44	81.6	33.4	66.6
<b>8.5 Lac /Acet</b>	2.69	1.61	0.33	0.0	0.0	-2.69	-1.39	0.46	0.28	0.37	86.0	36.4	63.6
<b>Adición de Fe<sup>2+</sup></b>													
<b>Lac – 25 Fe<sup>2+</sup></b>	2.25	1.35	0.04	0.0	0.0	-2.21	-1.29	0.19	0.10	0.22	95.7	28.1	71.9
<b>Lac – 50 Fe<sup>2+</sup></b>	2.25	1.35	0.04	0.0	0.0	-2.19	-1.31	0.03	0.70	0.44	97.0	30.0	70.0
<b>Lac – 100 Fe<sup>2+</sup></b>	2.25	1.35	0.04	0.0	0.0	-2.20	-1.27	0.22	0.16	0.36	93.8	30.0	70.0
<b>Lac – 200 Fe<sup>2+</sup></b>	2.25	1.35	0.04	0.0	0.0	-2.23	-1.26	0.19	0.06	0.06	92.8	31.1	68.9
<b>3 Lac/Acet – 25 Fe<sup>2+</sup></b>	2.25	1.35	0.71	0.0	0.0	-2.25	-1.09	0.06	0.28	0.42	80.7	29.2	70.8
<b>3 Lac/Acet – 50 Fe<sup>2+</sup></b>	2.25	1.35	0.71	0.0	0.0	-2.25	-1.13	0.20	0.37	0.52	83.5	28.7	71.3
<b>3 Lac/Acet – 100 Fe<sup>2+</sup></b>	2.25	1.35	0.71	0.0	0.0	-2.25	-1.11	-0.06	0.30	0.36	82.1	31.0	69.0
<b>3 Lac/Acet – 200 Fe<sup>2+</sup></b>	2.25	1.35	0.71	0.0	0.0	-2.25	-1.11	-0.06	0.23	0.33	81.7	28.4	71.6

Lac (ácido láctico), Carb (carbohidratos), Acet (ácido acético), Prop (ácido propiónico), But (ácido butírico); % Consumo Carb (porcentaje en el consumo de carbohidratos); % H<sub>2</sub> y % CO<sub>2</sub> (porcentaje en la composición de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> del biogás en cada ensayo).

## Apendice F

Reacciones medias empleadas en el balance de electrones para la operación del reactor UASB y los ensayos en lote, con la adición de hierro ( $Fe^{2+}$ ) y acetato.

*Tabla F-1* Reacciones medias utilizadas en el balance de electrones.

Metabolito	Reacción media
<b>Lactato</b>	$\frac{1}{6}CO_2 + \frac{1}{12}HCO_3^- + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{12}CH_3CHOHCOO^- + \frac{1}{3}H_2O$
<b>Glucosa</b>	$\frac{1}{4}CO_2 + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{24}C_6H_{12}O_6 + \frac{1}{4}H_2O$
<b>Acetato</b>	$\frac{1}{8}CO_2 + \frac{1}{8}HCO_3^- + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{8}CH_3COO^- + \frac{3}{8}H_2O$
<b>Butirato</b>	$\frac{3}{20}CO_2 + \frac{1}{20}HCO_3^- + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{20}CH_3CH_2CH_2COO^- + \frac{7}{20}H_2O$
<b>Propionato</b>	$\frac{1}{7}CO_2 + \frac{1}{14}HCO_3^- + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{14}CH_3CH_2COO^- + \frac{5}{14}H_2O$
<b>Valerato</b>	$\frac{4}{26}CO_2 + \frac{1}{26}HCO_3^- + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{26}CH_3(CH_2)_3COO^- + \frac{9}{26}H_2O$
<b>Caproato</b>	$\frac{5}{32}CO_2 + \frac{1}{32}HCO_3^- + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{32}CH_3(CH_2)_4COO^- + \frac{11}{32}H_2O$
<b>Hidrógeno</b>	$H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{2}H_2$

## Apendice G

Coeficientes estequiométricos de los metabolitos escogidos, que representan el funcionamiento del reactor UASB con lactosuero ácido, producto del balance de electrones derivado de las reacciones medias.

**Tabla G-1** Coeficientes estequiométricos de las reacciones asociadas al comportamiento del reactor UASB, producto del balance de electrones.

<b>Dia</b>	<b>Lac</b>	<b>Carb</b>	<b>Acet</b>	<b>But</b>	<b>Prop</b>	<b>Val</b>	<b>Capr</b>	<b>H<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>HCO<sub>3</sub></b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>(e- H<sub>2</sub> /e- don) %</b>	<b>(e- acep/e-don) %</b>
<b>27</b>	1	1.36	0.51	0.66	0.44	0.16	0.25	4.53	-4.28	1.01	0.37	4.5	22.0
<b>29</b>	1	1.43	1.27	0.04	0.09	0.17	0.52	6.66	-5.17	1.08	-0.88	4.7	16.4
<b>34</b>	1	1.57	0.62	1.40	0.31	0.09	0.18	2.16	-4.13	1.60	2.58	5.2	59.6
<b>36</b>	1	1.40	1.88	0.94	0.41	0.17	0.00	0.73	-3.56	2.40	3.45	0.5	14.8
<b>39</b>	1	1.81	0.33	1.84	0.53	0.05	0.11	1.84	-4.56	1.85	3.34	3.2	48.0
<b>41</b>	1	1.40	0.34	1.53	0.47	0.03	0.09	1.04	-3.36	1.46	2.94	2.8	62.7
<b>44</b>	1	1.41	0.23	1.40	0.38	0.05	0.22	1.11	-3.35	1.29	2.85	3.4	69.7
<b>46</b>	1	1.40	0.13	1.37	0.42	0.05	0.23	1.24	-3.34	1.20	2.71	3.8	69.2
<b>48</b>	1	1.29	0.15	1.26	0.41	0.05	0.23	1.05	-3.03	1.10	2.59	3.6	73.1
<b>56</b>	1	0.28	0.01	0.41	0.15	0.02	0.21	0.62	-0.43	-0.20	0.43	4.7	71.6
<b>58</b>	1	0.30	0.08	0.37	0.17	0.02	0.19	1.17	-0.66	-0.17	0.10	6.8	55.8
<b>59</b>	1	0.31	0.23	0.30	0.18	0.01	0.23	0.64	-0.56	-0.04	0.53	6.4	98.3
<b>60</b>	1	0.31	0.24	0.23	0.17	0.01	0.27	0.85	-0.59	-0.09	0.36	7.0	80.2
<b>61</b>	1	0.32	0.28	0.15	0.22	0.02	0.30	0.56	-0.54	-0.03	0.59	4.4	77.4
<b>63</b>	1	0.31	0.26	0.11	0.13	0.02	0.33	1.19	-0.69	-0.15	0.12	5.5	45.1
<b>64</b>	1	0.31	0.35	0.13	0.16	0.02	0.32	0.58	-0.54	-0.02	0.57	4.8	80.3
<b>68</b>	1	0.31	0.28	0.10	0.14	0.02	0.33	1.17	-0.70	-0.13	0.14	5.0	41.3

Los valores positivos y negativos representan: H<sub>2</sub>O (+) producto (-) reactivo; HCO<sub>3</sub> (-) producto (+) reactivo; CO<sub>2</sub> (-) producto; AGV: Lac (láctico), Acet (acético), But (butírico), Prop (propiónico), Val (valerico), Capr (caproico) (+) producto (-) reactivo; Carb (carbohidratos) (+) reactivo. Igualmente se muestran (e- H<sub>2</sub> /e- don) % porcentaje de electrones utilizados para la producción de hidrógeno, respecto a la cantidad de aportados por los donadores (ácido láctico, carbohidratos); (e- acep/e-don) % porcentaje de electrones utilizados para la formación de productos como los AGV previamente mencionados e H<sub>2</sub>, respecto a la cantidad de aportados por los donadores (ácido láctico, carbohidratos).

## Apendice H

Coefficientes estequiométricos de algunos metabolitos que representan cada una de las condiciones evaluadas en los ensayos en lote con lactosuero ácido, producto del balance de electrones derivado de las reacciones medias.

**Tabla G-2** Coeficientes estequiométricos de las reacciones asociadas a los ensayos en lote con adición de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y acetato, producto del balance de electrones.

Condición	Lac	Carb	Acet	But	Prop	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	(e- H <sub>2</sub> /e- don) %	(e- acep/e-don) %
<b>Reactor</b>	1	0.03	0.08	0.03	0.02	0.26	-0.18	0.02	-0.08	3.2	11.8
<b>Lactato</b>	1	0.03	0.10	0.02	0.03	0.08	-0.13	0.05	0.05	2.9	34.3
<b>2 Lac /Acet</b>	1	0.02	0.04	0.04	0.04	0.09	-0.12	0.01	0.03	3.1	32.4
<b>3 Lac /Acet</b>	1	0.03	0.06	0.04	0.03	0.09	-0.12	0.03	0.04	3.2	33.7
<b>5 Lac /Acet</b>	1	0.02	0.08	0.03	0.03	0.08	-0.12	0.04	0.04	3.3	36.0
<b>8.5 Lac /Acet</b>	1	0.03	0.09	0.03	0.03	0.09	-0.13	0.05	0.04	3.0	31.8
<b>Lac – 25 Fe<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	1	0.03	0.08	0.03	0.02	0.16	-0.15	0.03	0.00	3.0	18.2
<b>Lac – 50 Fe<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	1	0.03	0.01	0.03	0.07	0.09	-0.13	0.01	0.04	3.4	37.1
<b>Lac – 100 Fe<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	1	0.03	0.07	0.04	0.02	0.12	-0.14	0.03	0.02	3.3	25.4
<b>Lac – 200 Fe<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	1	0.03	0.11	0.01	0.02	0.23	-0.18	0.04	-0.05	3.1	12.9
<b>3 Lac/Acet – 25 Fe<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	1	0.02	0.02	0.04	0.04	0.13	-0.12	0.00	0.00	3.8	26.7
<b>3 Lac/Acet - 50 Fe<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	1	0.03	0.04	0.04	0.04	0.09	-0.12	0.02	0.03	3.7	36.6
<b>3 Lac/Acet – 100 Fe<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	1	0.02	-0.02	0.05	0.05	0.15	-0.13	-0.02	-0.03	3.7	21.2
<b>3 Lac/Acet – 200 Fe<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	1	0.02	-0.02	0.05	0.05	0.18	-0.13	-0.03	-0.05	3.8	18.6

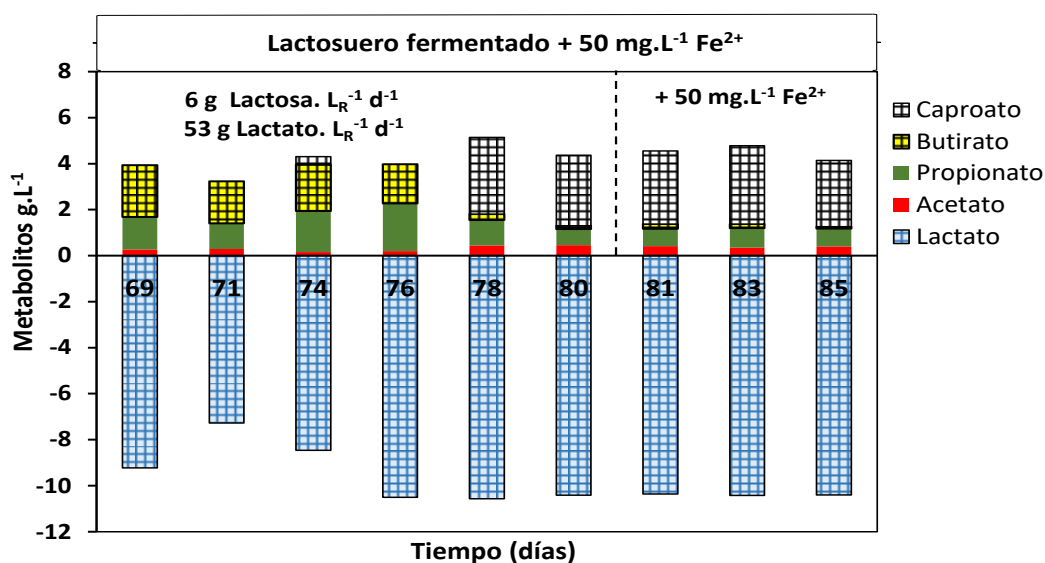
Los valores positivos y negativos representan: H<sub>2</sub>O (+) producto (-) reactivo; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (-) producto (+) reactivo; CO<sub>2</sub> (-) producto; AGV: Lac (láctico), Acet (acético), But (butírico), Prop (propiónico), Val (valérico), Capr (caproico) (+) producto (-) reactivo; Carb (carbohidratos) (+) reactivo. Igualmente se muestran (e- H<sub>2</sub> /e- don) % porcentaje de electrones utilizados para la producción de hidrógeno, respecto a la cantidad de aportados por los donadores (ácido láctico, carbohidratos); (e- acep/e-don) % porcentaje de electrones utilizados para la formación de productos como los AGV previamente mencionados e H<sub>2</sub>, respecto a la cantidad de aportados por los donadores (ácido láctico, carbohidratos).

### Apéndice I

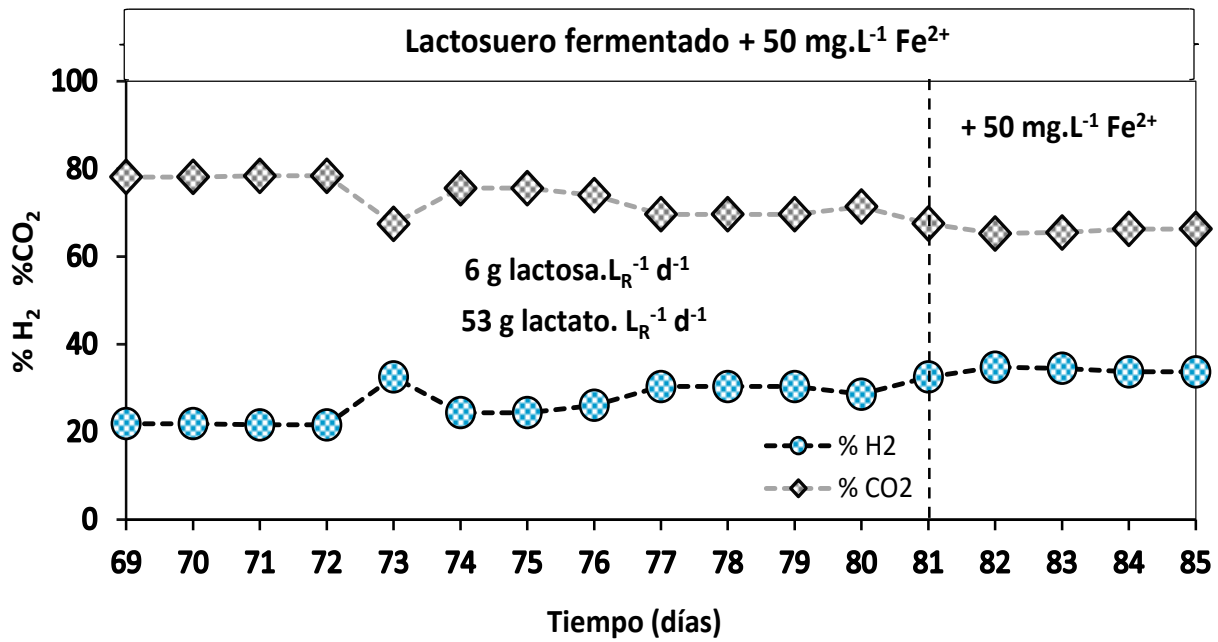
Caracterización de lactosuero fermentado (lote 2) y metabolitos desarrollados, durante la operación del reactor UASB con la adición de hierro ( $50 \text{ mg. L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ ).

**Tabla I-1** Caracterización de lactosuero fermentado (lote 2).

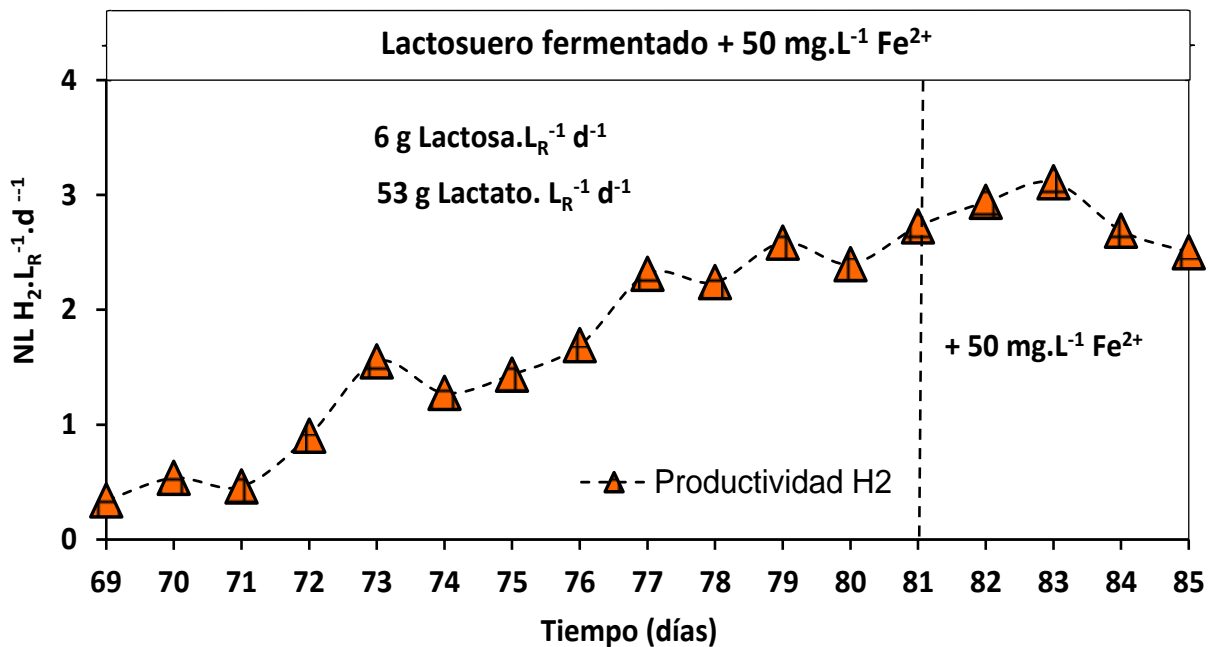
Parámetro	Unidades	Lactosuero Fermentado (lote 2)
DQO total	$\text{g.L}^{-1}$	48.25
DQO Soluble	$\text{g.L}^{-1}$	45.84
pH	—	3.5
Carbohidratos Totales	$\text{g.L}^{-1}$	1.42
Lactato	$\text{g.L}^{-1}$	42.13
Acetato	$\text{g.L}^{-1}$	1.71
Propionato	$\text{g.L}^{-1}$	1.20
Butirato	$\text{g.L}^{-1}$	—
Caproato	$\text{g.L}^{-1}$	—
SST	$\text{g.L}^{-1}$	0.75
SSV	$\text{g.L}^{-1}$	0.54
Fe Total	$\text{g.L}^{-1}$	0.003



Metabolitos desarrollados durante la operación del reactor UASB con lactosuero ácido +  $50 \text{ mg. L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$



Composición de biogás durante la operación del reactor UASB con lactosuero ácido + 50 mg. L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>



Productividad de H<sub>2</sub> durante la operación del reactor UASB con lactosuero ácido + 50 mg. L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>