



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
AMBIENTAL**

**“INFLUENCIA DE CARBOHIDRATOS, PROTEÍNAS Y LÍPIDOS SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO DURANTE LA FERMENTACIÓN OSCURA”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

PRESENTA:

YEINNER MAURICIO TARAZONA MONTAÑO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE INGENIERÍA

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO, 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
AMBIENTAL

**“INFLUENCIA DE CARBOHIDRATOS, PROTEÍNAS Y LÍPIDOS SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO DURANTE LA FERMENTACIÓN OSCURA”**

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

PRESENTA:
YEINNER MAURICIO TARAZONA MONTAÑO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR:
DR. SIMÓN GONZÁLEZ MARTÍNEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
DRA. GABRIELA MOELLER CHÁVEZ, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL ESTADO DE
MORELOS

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO, 2019



JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dr. Carlos Alberto Quintal Franco
Secretario:	Dr. Guillermo Quijano Govantes
1er Vocal:	Dr. Simón González Martínez
2do Vocal:	Dra. Gabriela Moeller Chávez
3er Vocal:	Dr. Iván Moreno Andrade

LUGAR O LUGARES DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas de la Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.

TUTOR DE TESIS:

DR. Iván Moreno Andrade

FIRMA



APOYOS RECIBIDOS Y AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas de la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.



**INSTITUTO
DE INGENIERÍA
UNAM**

LIPATA

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN
EN PROCESOS AVANZADOS DE
TRATAMIENTO DE AGUAS

Se agradece el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio del proyecto 240087.

Se agradece el apoyo del “Fondo de Sustentabilidad Energética SENER – CONACYT”, a través del proyecto 247006 - Clúster de Biocombustibles Gaseosos.

Así mismo, se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas y brindarme los medios necesarios para enriquecer mi formación académica y profesional.



AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Con júbilo, me permito agradecer a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis.

Inicio expresándole mi agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Iván Moreno Andrade, por todas las enseñanzas académicas y personales adquiridas bajo su dirección, del mismo modo, agradezco toda la confianza y autonomía brindada para el desarrollo de este proyecto.

A a los doctores Simón Gonzáles Martínez y Gabriela Moeller Chávez por hacer parte de mi comité junto a mi asesor. Aprecio todos sus consejos y comentarios a lo largo de estos dos años, los cuales sin lugar a duda promovieron la evolución de esta tesis y sus alcances.

Agradezco enormemente el constante apoyo y consejo de los doctores Alejandro Vargas Casillas y Guillermo Quijano Govantes, los cuales permitieron profundizar el análisis y discusión de los resultados obtenidos.

Del mismo modo, expreso mi agradecimiento a la M. en C. Gloria Moreno Rodríguez y al M. en B. Jaime Pérez Trevilla por el invaluable apoyo durante la parte experimental de este proyecto y al Ing. Angel Avizua Hernández por el apoyo técnico en cómputo.

A todos mis amigos de la comunidad LIPATA “*old, new generation and Jaime*”, mi más sincero agradecimiento por estos dos años llenos de emociones, experiencias y aprendizaje, realmente es invaluable todo lo que me he llevado de cada uno de ustedes en estos dos años en Juriquilla.

A mis anteriores mentores, el Dr. Wellman Ribbón, al cual agradezco tanto conocimiento, consejos, amistad e invaluable apoyo y la Dra. Neftalí Rojas Valencia, por abrirme las puertas de México, mi segundo hogar, y por todas las enseñanzas y apoyo brindados bajo su dirección.

A mi gran amor y futura esposa Karina, probablemente sea incapaz, de expresarle todo mi agradecimiento. No obstante, estaré eternamente agradecido por su infinito apoyo, compañía, paciencia, cariño y amor. Gracias por decidir compartir tu vida conmigo, formar una familia a tu lado, es el mejor de los regalos.

Por último, y probablemente no me alcance la vida para agradecerles, expreso mi infinito agradecimiento a toda mi familia, mis papás y mi hermano, por darme la vida, forjarme, confiar en mí y apoyarme en todas y cada una de mis egocéntricas y excéntricas aventuras.

Gracias,



DEDICATORIA

*A mis padres Janer Tarazona y Astrid Montaña,
a mi hermano Andrés Tarazona,
a mis sobrinos Jaime y Luciano,
y a mi futura esposa Karina.*



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Consumo mundial de energía en Mtep por tipo combustible desde 1971 a 2015. Adaptado de IEA, (2017).....	13
Figura 1.2. Composición de los RSU en México por tipo de residuo en 2012. Adaptado de SEMARNAT, (2016)...	15
Figura 1.3. Rutas metabólicas del proceso de producción de H ₂ consideradas en el ADM1 (Adaptado de Batstone <i>et al.</i> , 2002).....	17
Figura 1.4. Rutas bioquímicas PFOR y PFL implicadas en la producción de H ₂ mediante fermentación oscura (Adaptado de Hallenbeck, 2013)	18
Figura 3.1. Esquema metodológico.	35
Figura 3.2. Equipo AMPTS II con sus respectivas unidades. a) unidad de incubación de muestras; b) unidad de absorción de CO ₂ ; c) dispositivo de medición de volumen de gas.....	38
Figura 4.1. Inóculo. a) lodo granular anaerobio; b) lodo granular anaerobio después del pretratamiento (b).	43
Figura 4.2. Gráficas de superficie de respuesta. H _{max} (NmL H ₂ /L _{Reactor}). vs. C:P y C:L. a) ajuste a modelo de primer grado; b) ajuste a modelo de segundo grado.....	45
Figura 4.3. Gráficas de superficie de respuesta. R _{max} (NL H ₂ /L _{Reactor} *día). vs. C:P y C:L. a) ajuste a modelo de primer grado; b) ajuste a modelo de segundo grado.....	46
Figura 4.4. Gráficas de superficie de respuesta. Y _{H2} . (mol H ₂ /mol glucosa). vs. C:P y C:L. a) ajuste a modelo de primer grado; b) ajuste a modelo de segundo grado.....	47
Figura 4.5. Diagramas ternarios. H _{max} . vs. C, P y L. a) ajuste a modelo lineal de Scheffe'; b) ajuste a modelo cuadrático de Scheffe'; c) ajuste a modelo cúbico especial de Scheffe'	49
Figura 4.6. Diagramas ternarios. R _{max} . vs. C, P y L. a) ajuste a modelo lineal de Scheffe'; b) ajuste a modelo cuadrático de Scheffe'; c) ajuste a modelo cúbico especial de Scheffe'	50
Figura 4.7. Diagramas ternarios. Y _{H2} . vs. C, P y L. a) ajuste a modelo lineal de Scheffe'; b) ajuste a modelo cuadrático de Scheffe'; c) ajuste a modelo cúbico especial de Scheffe'	51
Figura 4.8. Gráfica de contorno. H _{max} (mL H ₂ /L _{reactor}). vs. C:P y C:L.....	52
Figura 4.9. Gráfica de contorno. R _{max} (NL H ₂ /L _{Reactor} /día ± s) vs. C:P y C:L.	53
Figura 4.10. Gráfica de contorno. Y _{H2} (mol H ₂ /mol glucosa) vs. C:P y C:L.....	53
Figura 4.11. Superficie de respuesta. H _{max} (mL H ₂ /L _{reactor}). vs. C:P y C:L.....	54
Figura 4.12. Superficie de respuesta. R _{max} (NL H ₂ /L _{Reactor} /día). vs. C:P y C:L.....	55
Figura 4.13. Superficie de respuesta. Y _{H2} (mol H ₂ /mol glucosa). vs. C:P y C:L.....	56
Figura 4.14. Diagrama Ternario. H _{max} (mL H ₂ /L _{reactor}). vs. C, P y L.	57
Figura 4.15. Diagrama Ternario. R _{max} (NL H ₂ /L _{Reactor} /día) . vs. C, P y L.....	57
Figura 4.16. Diagrama Ternario. Y _{H2} (mol H ₂ /mol glucosa). vs. C, P y L.....	58
Figura 4.17. Diagrama Ternario. H _{max} . vs. C, P y L.	59
Figura 4.18. Diagrama Ternario. R _{max} . vs. C, P y L.	60
Figura 4.19. Diagrama Ternario. Y _{H2} . vs. C, P y L.	61
Figura 4.20. Biogás atrapado por capa superficial de lípidos en biorreactor del equipo AMPTS II.....	63
Figura 4.21. Regresión lineal entre concentración de materia orgánica del sustrato y producción de AGVs.....	65
Figura 4.22. Composición de AGVS (%) en los distintos ensayos fermentativos.	66
Figura 4.23. Regresión no lineal entre H _{max} y proporción de acetato y butirato en los productos de fermentación	67
Figura 4.24. Regresión no lineal entre H _{max} y generación de propionato en los productos de fermentación.....	68



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Bacterias productoras de H ₂ anaerobias formadoras de endósporas.	19
Tabla 1.2. Bacterias productoras de H ₂ anaerobias no formadoras de endósporas.	20
Tabla 1.3. Bacterias productoras de H ₂ anaerobias facultativas.	21
Tabla 1.4. Asociaciones entre bacterias productoras de H ₂ en biorreactores.	21
Tabla 1.5. Valores de pH de operación óptimos en sistemas de producción de H ₂ empleando RSO.	23
Tabla 1.6. Influencia de Metales en sistemas de producción de H ₂	27
Tabla 1.7. Producción de H ₂ a partir de distintos sustratos en sistemas en continuo y discontinuo de fermentación oscura.	30
Tabla 3.1. Variables y niveles del diseño experimental DCC1.	36
Tabla 3.2. Variables y niveles del diseño experimental DCC2.	36
Tabla 3.3. Composiciones y relaciones C:P y C:L en ensayos de composición de carbohidratos, proteínas y lípidos en el sustrato.	37
Tabla 3.4. Métodos analíticos.	42
Tabla 4.1. Caracterización del inóculo pretratado.	43
Tabla 4.2. Resultados de H _{max} , R _{max} y Y _{H2} , bajo distintas configuraciones de sustrato.	44
Tabla 4.3. Transformación de variables composicionales.	48
Tabla 4.4. Bondad de ajustes de los modelos de superficie de respuesta a los objetivos H _{max} , R _{max} y Y _{H2}	52
Tabla 4.5. Modificación del DCC1.	54
Tabla 4.6. Bondad de ajustes de los modelos de datos composicionales a las respuestas H _{max} , R _{max} y Y _{H2}	56
Tabla 4.7. Modificación y transformaciones del DCC2.	59
Tabla 4.8. Resultados de H _{max} , R _{max} y Y _{H2} en la totalidad de los ensayos realizados.	62
Tabla 4.9. Remoción de carbohidratos, proteínas, lípidos y DQO en ensayos.	64
Tabla 4.10. Composición de AGV _S en los distintos ensayos fermentativos.	66
Tabla 4.11. Estrategias implementadas para reducir la inhibición por propionato en sistemas de FO.	68
Tabla A.1. Concentración de sales y nutrientes en los ensayos de producción de biohidrógeno.	79



GLOSARIO DE TÉRMINOS Y SIGLAS

ADMI	Modelo de digestión anaerobia No. 1
AGVs	Ácidos grasos volátiles
ASBR	Reactor discontinuo secuencial anaerobio
CO	Carga orgánica (g O ₂ / L/d)
CSTR	Reactor continuo de tanque agitado
D	Tasa de dilución (1/h)
DA	Digestión anaerobia
DQO	Demanda química de oxígeno (mg O ₂ /L)
EPS	Exopolisacáridos
F	Flujo (L/h)
FBR	Biorreactor de lecho fluidizado
Fd	Ferredoxina
Fd-[FeFe]	Hidrogenasa dependiente de la ferredoxina
Fd_{ox}	Ferredoxina oxidada
Fd_{red}	Ferredoxina reducida
FO	Fermentación oscura
FORSU	Fración orgánica de residuos sólidos urbanos
CHPB	Bacteria productora de hidrógeno
I-CSTR	Reactor continuo-intermitente de tanque agitado
LAB	Bacterias ácido lácticas
LCFA	Ácidos grasos de cadena larga
MBR	Biorreactor de membrana
PBI	Producto interno bruto
PFL	Piruvato formato liasa
PFOR	Piruvato ferredoxina oxidoreductasa
PIB	Producto interno bruto
PpH₂	Presión parcial de hidrógeno
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR)
RSO	Residuos sólidos orgánicos
RSU	Residuos sólidos urbanos
SBHR	Reactor biológico de hidrógeno sonificado
SF	Sólidos fijos
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
tep	Toneladas equivalentes de petróleo



TRH	Tiempo de residencia hidráulica
TRS	Tiempo de residencia de sólidos
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente
Y_{H_2}	Rendimiento de producción de hidrógeno
μ	Velocidad específica de crecimiento



ÍNDICE GENERAL

1. MARCO TEÓRICO	13
1.1 <i>Panorama energético actual</i>	13
1.2 <i>Residuos susceptibles a valorización mediante fermentación oscura</i>	14
1.3 <i>Producción biológica de H₂ mediante fermentación oscura</i>	16
1.3.1. Bioquímica y microbiología de la producción de H ₂	16
1.3.1.1. Vías metabólicas descritas en la producción de H ₂	17
1.3.1.2. Grupos microbianos productores de hidrógeno	19
1.3.1.3. Enzimas hidrogenasas	21
1.3.2. Factores involucrados en la producción de H ₂ a partir de RSO.....	22
1.3.2.1. Inóculo	22
1.3.2.2. pH.....	23
1.3.2.3. Temperatura	23
1.3.2.4. Presión parcial de hidrógeno (PpH ₂).....	24
1.3.2.5. Tiempo de residencia hidráulico y tiempo de retención de sólidos	25
1.3.2.6. Acumulación de metabolitos solubles	26
1.3.2.7. Nutrientes.....	26
1.3.2.8. Iones metálicos.....	27
1.3.2.9. Presencia de amoníaco (NH ₃) y compuestos fenólicos.....	27
1.3.2.11. Tipos de reactores y operación en sistemas de producción de H ₂	28
1.3.2.10. Sustrato	29
2. OBJETIVOS Y ALCANCES	34
2.1. <i>Objetivo General</i>	34
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	34
2.3. <i>Alcances</i>	34
3. METODOLOGÍA.....	35
3.1. <i>Etapa 1. Evaluación de la influencia de la composición del sustrato</i>	35
3.1.1. Diseños experimentales.	35
3.1.2. Inóculo y sustrato.....	36
3.1.2.1. Selección y almacenamiento del inóculo.....	36
3.1.2.2. Pretratamiento y caracterización del inóculo.....	36
3.1.2.3. Sustrato	36
3.1.3. Configuración y operación de biorreactores.....	37
3.1.3.1. Configuración de biorreactores.....	37
3.1.3.2. Operación de biorreactores	38
3.1.4. Evaluación de biorreactores.....	38
3.2. <i>Etapa 2. Optimización de la composición del sustrato</i>	39
3.2.1. Análisis de superficie de respuesta.	39
3.2.2. Análisis composicional.....	40
3.2.3. Configuración de ensayos de optimización	41
3.4. <i>Métodos analíticos</i>	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. <i>Etapa 1. Evaluación de influencia de biomoléculas</i>	43
4.1.1. Caracterización del inóculo	43
4.1.2. Evaluación de influencia de biomoléculas en la producción de H ₂	43
4.2. <i>Etapa 2. Optimización de biomoléculas en sustrato</i>	45
4.2.1. Análisis de superficie de respuesta	45
4.2.3. Configuración de ensayos de optimización	52
4.2.3.1. Optimización de H _{max} , R _{max} y Y _{H2} empleando las relaciones C:P y C:L como variables de optimización	52
4.2.3.2. Optimización de H _{max} , R _{max} y Y _{H2} empleando las composiciones de carbohidratos, proteínas y lípidos del sustrato como variables de optimización	56
4.2.4. Influencia de los componentes del sustrato en los objetivos de optimización H _{max} , R _{max} y Y _{H2}	62
4.2.3.5. Influencia de composición del sustrato en la remoción de materia orgánica	64



4.2.3.6. Productos de fermentación.....	65
5. CONCLUSIONES	70
6. RECOMENDACIONES	71
7. BIBLIOGRAFÍA	72
8. ANEXOS	79
<i>Anexo A Medio mineral</i>	79
<i>Anexo B Características de la FORSU</i>	80
<i>Anexo C Conversión de masa a volumen</i>	81
<i>Anexo D Indicadores de ajuste a modelos</i>	82



1. Marco Teórico

1.1 Panorama energético actual

Desde 1970, debido al elevado crecimiento demográfico y la urbanización presentada a lo largo de todos los continentes, se ha experimentado un elevado incremento en la demanda energética global, la cual ha sido satisfecha principalmente mediante el uso de combustibles fósiles como se observa Figura 1.1. A pesar de que actualmente se estima una especie de ralentización en el incremento de las necesidades energéticas mundiales, gracias a la aparición de tecnologías más eficientes en el uso de la energía, se estima que la demanda per cápita para el año 2030 podría alcanzar cifras cercanas a 1.09 toneladas equivalente de petróleo (tep) anuales, valor que a pesar de haber sido estipulado con base en un probable lento incremento en la demanda energética no deja de ser holgado, al contrario, representa un reto para la generación de recursos energéticos globalmente (WECI, 2011, 2016a).

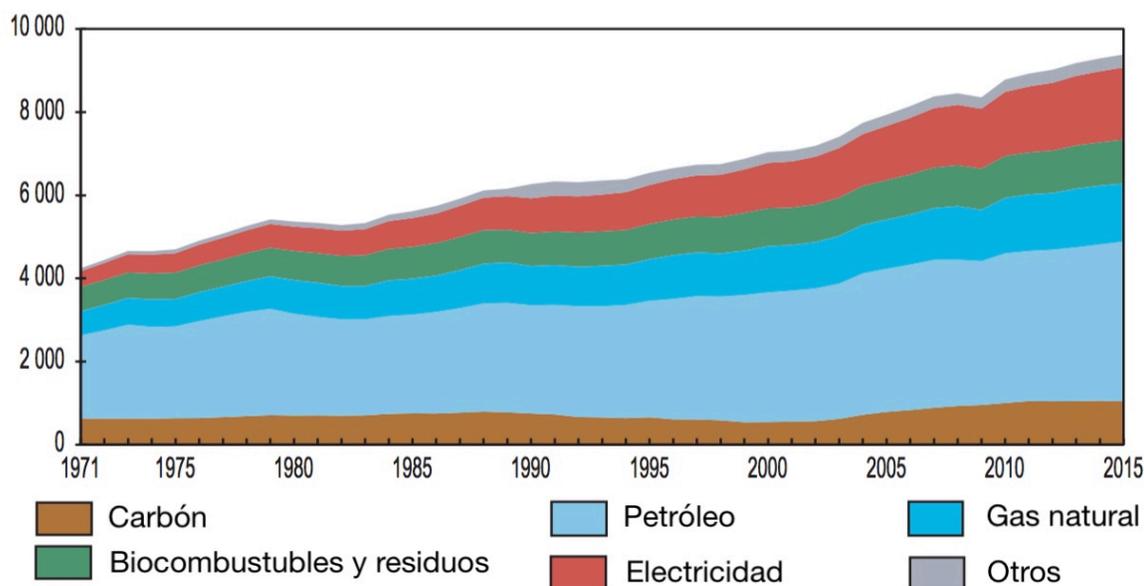


Figura 1.1. Consumo mundial de energía en Mtep por tipo combustible desde 1971 a 2015. Adaptado de IEA, (2017).

En adición a este incremento en la demanda energética mundial, la disminución de los recursos energéticos no renovables, y la necesidad de reducir las emisiones contaminantes generadas por el uso de combustibles fósiles se han materializado. Realidades que a pesar de ser de distinta índole, confluyen en la necesidad de buscar nuevos recursos energéticos que permitan reducir el uso de combustibles como el carbón y el petróleo y del mismo modo favorezcan la disminución de las emisiones generadas por la combustión de estos materiales contribuyendo directamente a la búsqueda de la sostenibilidad energética (WEC, 2011, 2016a).

En consecuencia, en la actualidad el sector energético mundial se encuentra atravesando una de las etapas más críticas de la historia. En las próximas décadas enfrentará desafíos sin precedentes dictados por la demografía y la urbanización, sumados a la disminución paulatina de los recursos energéticos no renovables y a la inminente necesidad de reducir las emisiones de contaminantes derivadas de la producción y el consumo de energía, las cuales afectan directamente a la población mundial, ocasionando serios problemas de salud pública y ambiental al rededor del mundo (WEC, 2011, 2016a, 2016c).



La búsqueda de soluciones a esta problemática a nivel mundial ha llevado a la toma de un gran número de medidas al rededor del mundo, las cuales pueden englobarse en tres grandes grupos. La reestructuración de planes y políticas energéticas, la provisión de recursos para la formulación y ejecución de estos planes y políticas y el desarrollo de investigación básica y aplicada enfocada en la búsqueda de nuevos recursos energéticos renovables capaces de suplir las necesidades energéticas globalmente sin repercutir en el deterioro del medio ambiente y la salud (IEA, 2017; WEC, 2016a).

Dentro del marco de las energías renovables, algunas tecnologías que emplean la energía solar, eólica y la bioenergía actualmente se han establecido como importantes actores energéticos a lo largo de todo el mundo. Los combustibles producidos a partir de biomasa (bioenergía) se destacan por ofrecer, en teoría, un ciclo del carbono (C) completo, ya que el dióxido de carbono (CO₂) producido durante sus procesos de obtención puede ser empleado por organismos fotosintéticos como plantas y algas, las cuales generarían más biomasa que podría emplearse para la producción de más energía (Gonzales, 2016; REN21, 2016; WEC, 2016c).

Asociado al grupo de combustibles generados a partir de biomasa se encuentra el hidrógeno (H₂), al cual se le ha atribuido el potencial de convertirse en el vector energético del futuro dentro del concepto de “Economía del Hidrógeno”, donde se emplea el gas en un ciclo de abastecimiento energético, el cual además de ser el combustible con mayor contenido energético por unidad de peso (122-142 kJ/g), tiene las ventajas de ser sustentable y no repercutir negativamente sobre el medio ambiente, razones por lo cual es considerado dentro de la actual Estrategia Nacional de Energía Mexicana como uno de los pilares de la transición energética, junto con otros recursos renovables como energía solar, eólica, geotérmica y oceánica entre otras (Gonzales, 2016; SENER, 2014).

1.2. Residuos susceptibles a valorización mediante fermentación oscura

El crecimiento demográfico, junto a el consumismo, la progresión y diversificación actual de los sectores productivos, han impulsado la velocidad de generación de residuos sólidos y líquidos globalmente a niveles que superan la capacidad que tiene el medio para asimilar los mismos (Avendaño, 2015; M.-S. S. Kim *et al.*, 2012; Morantes, 2016).

Según estimación realizada por el Banco Mundial, se prevé que en el 2025 la producción de residuos sólidos urbanos (RSU) a nivel mundial estará próxima a 2.2 billones de toneladas por año, cifra cercana al doble de la estimación realizada para el año 2012 (Hoornweg & Bhada-Tata, 2012). A pesar de que en la mayoría de países se cuenta con políticas y programas de gestión integral de RSU enfocados en minimizar la generación de desechos y maximizar su valoración, el desarrollo e implementación de estos programas no han sido suficientes para disminuir la generación de desechos o aumentar el valor de los mismos (Hoornweg & Bhada-Tata, 2012; SEMARNAT, 2016).

Del mismo modo que la generación de RSU a nivel mundial ha aumentado, en México los niveles de generación de RSU han incrementado desproporcionadamente en los últimos años, aumentando el 61% entre el año 2003 y 2015, llevando su producción de 10.24 a 53.1 millones de toneladas anuales (SEMARNAT, 2016). La composición de los residuos varía de región en región y está influenciada por distintos factores asociados al país, como la cultura, el desarrollo económico, el clima y las fuentes de energía. Los países de bajos y medianos ingresos presentan mayor proporción de desechos orgánicos en sus RSU, en contraste con los países de altos ingresos, los cuales producen papel, plásticos y otros materiales inorgánicos en mayor proporción (Hoornweg & Bhada-Tata, 2012).

En la Figura 1.2., se puede observar la composición de los RSU en México. La fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU), es el componente de mayor importancia en sus desechos, representa



al rededor del 52% de la totalidad de RSU, seguido del papel, plástico y otros tipos de residuo (SEMARNAT, 2016).

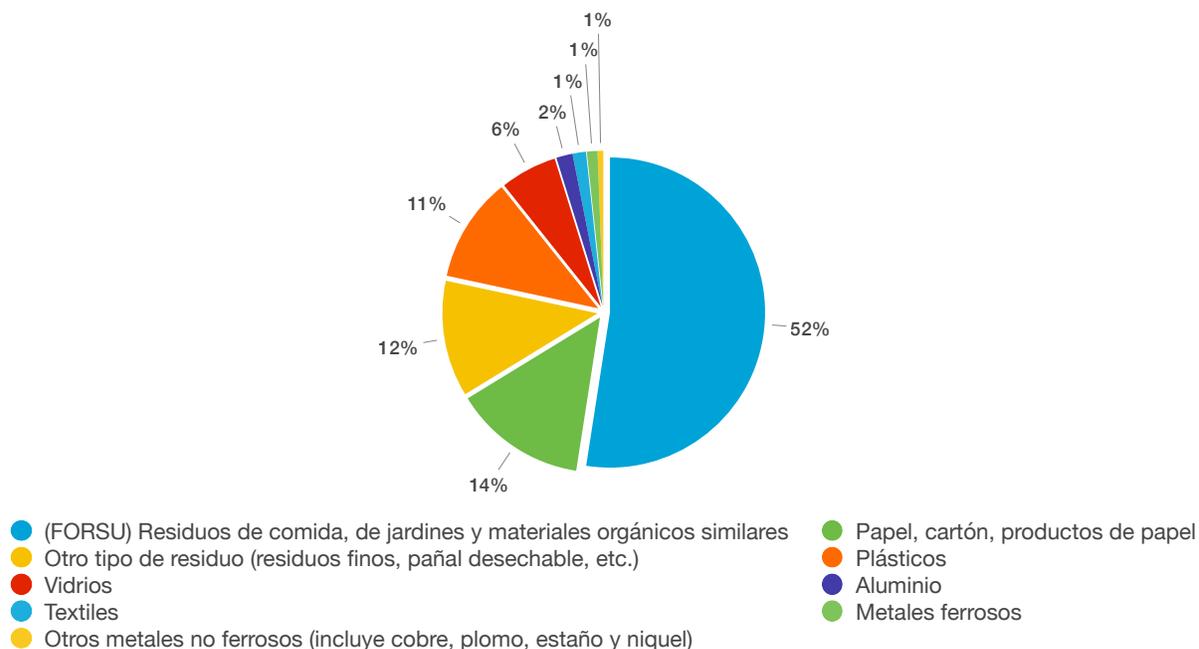


Figura 1.2. Composición de los RSU en México por tipo de residuo en 2012. Adaptado de SEMARNAT, (2016).

Al igual que la generación, la disposición final de RSU se encuentra íntimamente relacionada con el producto interno bruto (PBI) del país. La gran mayoría de países de medianos y bajos ingresos disponen sus desechos en sitios no controlados, los cuales generan serios problemas medioambientales y de salud pública (Hoornweg & Bhada-Tata, 2012).

En México la disposición final RSU se realiza básicamente de cuatro maneras. En rellenos sanitarios, rellenos de tierra controlados, sitios no controlados y reciclaje. En el año 2013, México logró disponer al rededor del 75% de los residuos en rellenos sanitarios y rellenos de tierra controlados, los cuales, a pesar que están diseñados para impedir la diseminación de los residuos y evitar los potenciales riesgos que estos pueden ocasionar a los ecosistemas y la salud ambiental, no tienen la capacidad de valorizar ni reutilizar sus componentes prescindiendo de la oportunidad de recuperar su poder calorífico o su reincorporación en procesos productivos (Hoornweg & Bhada-Tata, 2012; SEMARNAT, 2016).

La FORSU, además de ser el principal componente de los RSU de muchos países, se encuentra dentro del grupo de residuos susceptibles a valorizarse gracias a su capacidad de transformarse en combustibles gaseosos como H_2 o metano (CH_4) mediante procesos biológicos como digestión anaerobia.

La utilización de la FORSU como sustrato para la producción de H_2 como fuente de energía, además de solucionar la problemática asociada a su disposición, contribuir a la disminución del uso de recursos energéticos no renovables y reducir las emisiones contaminantes atmosféricas derivadas del uso de combustibles fósiles, es considerada una de las opciones más viables para producción de H_2 , debido a sus bajos requerimientos de energía e importantes tasas de producción, en comparación con otros procesos biológicos como la fotofermentación y la biofotólisis del agua, los cuales dependen de la luz y no han demostrado tasas de producción con potencial para aplicaciones prácticas (Balachandar *et al.*, 2013).



Teniendo esto en consideración, la sinergia de los atributos propios de la producción de H₂ a partir de residuos sólidos orgánicos (RSO) puede contribuir a mejorar la salud pública y ambiental de las poblaciones, al mismo tiempo que tiene la capacidad de aportar capital económico para subvencionar las economías de los países que implementen estos procesos de valorización de recursos (Hoornweg & Bhada-Tata, 2012; INECC; SEMARNAT, 2012; M.-S. S. Kim et al., 2012; SEMARNAT, 2016; WEC, 2016b).

Por otro lado, la mayoría de las actividades humanas que involucran agua en sus procesos generan aguas residuales, por lo cual a medida que aumenta la demanda de agua, el volumen de generación de aguas residuales y su carga contaminante incrementa desmesuradamente. Se estima que globalmente entre 85 y 95% del agua residual se descarga directamente a ríos, lagos y océanos sin recibir tratamiento previo (UN, 2017; SEMARNAT, 2016).

La capacidad de tratamiento de las aguas residuales urbanas e industriales, al igual que sucede con los RSU, depende del producto interno bruto (PIB) de cada país. Los países con altos ingresos, tratan aproximadamente el 70% de sus aguas residuales, los países de mediano-alto ingreso alrededor del 38%, los países con rentas medio-bajas tratan el 28% y en los países pobres sólo el 8% de las aguas residuales generadas recibe algún tipo de tratamiento (UN, 2017).

En 2014, las cifras de generación de aguas residuales en México estuvieron alrededor de 7,200 hm³/año, el equivalente a 228.7 m³/s, de los cuales sólo se trataron 3,510 hm³ (111.3 m³/s), cifra que no llega al 50% del flujo generado a nivel nacional (SEMARNAT, 2016).

En la actualidad, además de depurar los contaminantes presentes en las aguas residuales tanto de origen municipal como industrial, el objetivo es valorizarlas con el fin de subvencionar los costos de su gestión y mejorar la sustentabilidad económica de los sistemas. Las estrategias de valorización se basan en la recuperación de energía y nutrientes. Dentro de las estrategias de recuperación de energía, se destacan la producción de combustibles gaseosos como H₂ o CH₄ mediante procesos biológicos, calefacción o refrigeración y generación de electricidad (UN, 2017).

1.3. Producción biológica de H₂ mediante fermentación oscura

Dentro del proceso de digestión anaerobia (DA), se diferencian cuatro etapas; hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, en las cuales están involucradas reacciones bioquímicas y fisicoquímicas desde que la biomasa bacteriana entra en contacto con la materia orgánica susceptible a biodegradarse anaerobiamente dentro del reactor, hasta que se produce el biogás. Dentro del proceso de DA, el H₂ se produce dentro de las etapas de acidogénesis y acetogénesis, a lo cual se le conoce como fermentación oscura (FO), debido a que es un proceso que no requiere luz para ser realizado (Berrocal, 2017; Cabrol *et al.*, 2017; Etchebehere *et al.*, 2016)

1.3.1. Bioquímica y microbiología de la producción de H₂

Según el Modelo de Digestión Anaerobia N° 1 (ADM1 por sus siglas en inglés), previo al proceso de hidrólisis, se lleva a cabo una etapa de desintegración no biológica del material orgánico, donde ocurren procesos como lisis, decadencia no enzimática, separación de fases y degradación física como cizallamiento. Durante el proceso de hidrólisis, bacterias con actividad hidrolítica convierten el material orgánico no soluble como polisacáridos, proteínas y lípidos complejos mediante la secreción de enzimas extracelulares en componentes orgánicos solubles como monosacáridos, aminoácidos y algunos ácidos grasos de cadena larga.



En la acidogénesis o fermentación, se inicia la producción de H₂ cuando dos grupos de fermentadores distintos catabolizan los monosacáridos y aminoácidos en ácidos grasos volátiles (AGVs) como acético, butírico, propiónico, valérico y láctico principalmente, alcoholes como etanol y butanol y gases como H₂ y dióxido de carbono (CO₂). En la acetogénesis la producción de H₂ continúa, mediante el metabolismo del butirato, valerato y propionato producidos en la fase acidogénica y los ácidos grasos de cadena larga del metabolismo de lipídico a ácido acético, H₂ y CO₂ por bacterias acetogénicas, como se presenta en la Figura 1.3. Debido a que el proceso acidogénico es termodinámicamente más favorable que la reacción acetogénica, los microorganismos acidogénicos son mucho más activos durante un proceso de producción de hidrógeno fermentativo (Batstone *et al.*, 2002; Berrocal B., 2017; Etchebehere *et al.*, 2016; M.-S. S. Kim *et al.*, 2012).

1.3.1.1. Vías metabólicas descritas en la producción de H₂

En todos los procesos de FO, el H₂ no se produce únicamente como compuesto reducido, se genera en conjunto con AGVs, alcoholes y CO₂, como se presenta en la Figura 1.3. La producción de H₂ como tal, no representa ninguna ventaja a los grupos bacterianos involucrados en el proceso de FO; no obstante, la eliminación de equivalentes reductores generados en el proceso de fermentación (electrones en exceso) es imperativamente necesaria para algunos miembros de la comunidad microbiana, situación que promueve la producción de H₂ mediante el uso de hidrogenasas (Berrocal B., 2017; M.-S. S. Kim *et al.*, 2012).

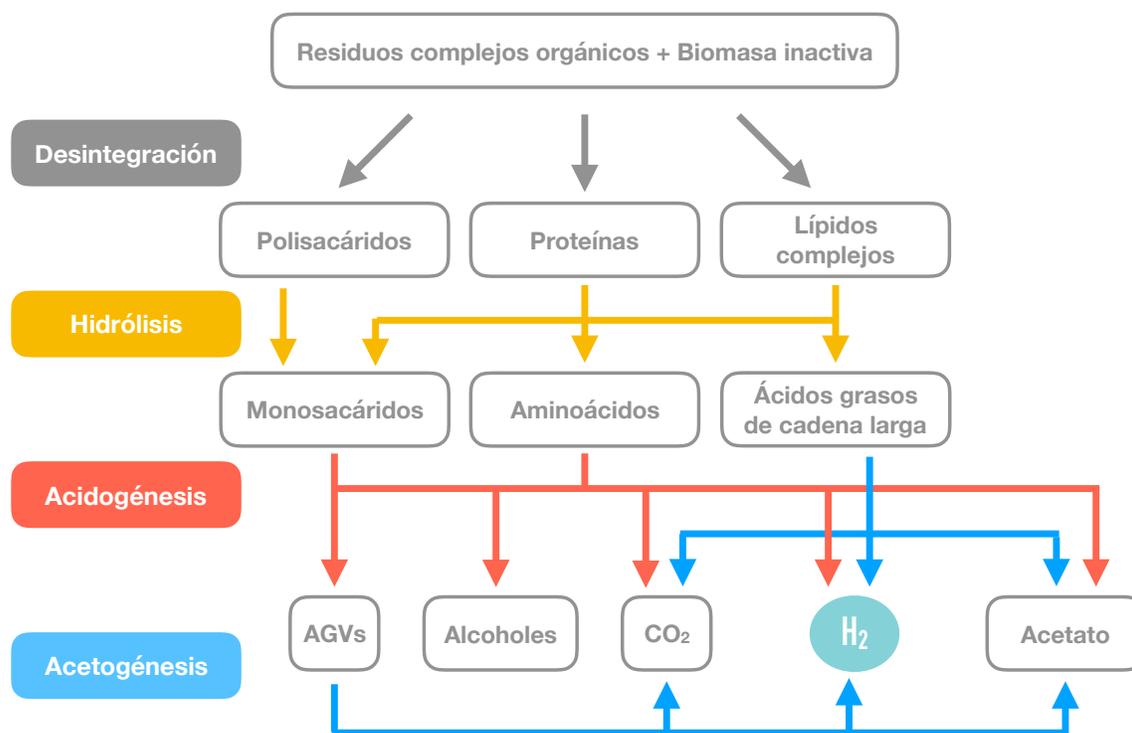


Figura 1.3. Rutas metabólicas del proceso de producción de H₂ consideradas en el ADM1 (Adaptado de Batstone *et al.*, 2002).

La producción de hidrógeno molecular generalmente se realiza mediante dos vías, en las cuales mediante la degradación anaerobia del piruvato se produce hidrógeno. La ruta piruvato formato liasa (PFL) asociada a anaerobios facultativos y la ruta piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), la cual es



común en bacterias anaerobias estrictas, la Figura 1.4. presenta las dos vías de producción de H_2 (Cabrol *et al.*, 2017; Etchebehere *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 2003; Ramirez-Morales *et al.*, 2015).

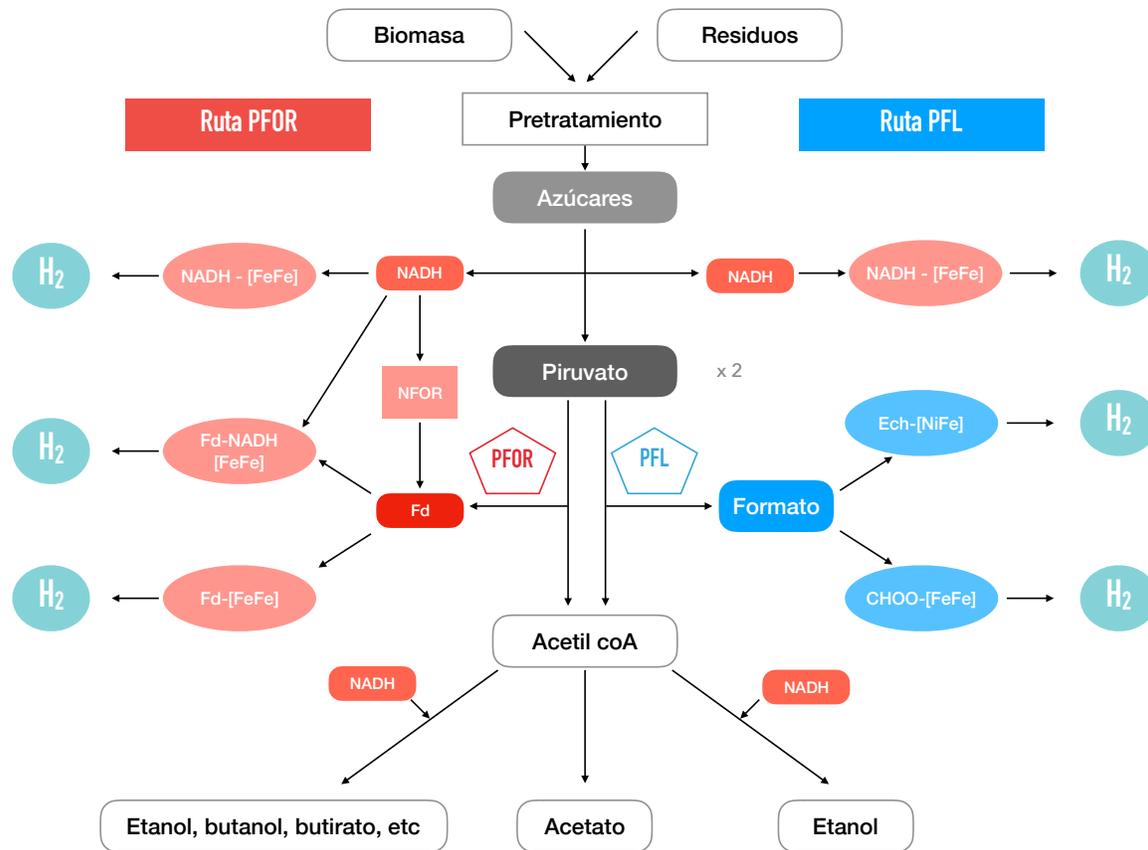


Figura 1.4. Rutas bioquímicas PFOR y PFL implicadas en la producción de H_2 mediante fermentación oscura (Adaptado de Hallenbeck, 2013)

En la ruta PFOR, la degradación del piruvato proveniente de la glucólisis es catalizada por la enzima PFOR, la cual genera una molécula de ferredoxina reducida (Fd_{red}). La generación de hidrógeno ocurre cuando la proteína reducida transfiere los electrones a la hidrogenasa dependiente de la ferredoxina ($Fd-[FeFe]$), la cual convierte cationes hidrógeno (H^+) en hidrógeno molecular (H_2). Anaerobios estrictos como *Clostridium*, junto a esta manera de producir H_2 , tienen la capacidad de emplear moléculas de NADH producidas durante la glucólisis, mediante dos hidrogenasas alternas, una dependiente de NADH ($NADH-[FeFe]$) y otra dependiente de NADH y Ferredoxina reducida ($NADH-Fd_{red}-[FeFe]$). Por lo cual, gracias a esta capacidad de reoxidar las moléculas de NADH, la producción mediante esta ruta podría teóricamente generar 4 moléculas de H_2 a partir de la fermentación de una molécula de glucosa. Figura 1.4. (Cabrol *et al.*, 2017; Oh, Park, Seol, Lee, & Park, 2003; Ramírez-Morales *et al.*, 2015).

En la ruta piruvato formato liasa, anaerobios facultativos metabolizan parcial o totalmente el piruvato producido en la glucólisis a formato, en un proceso redox neutral. El formato posteriormente puede acumularse o utilizarse para generar H_2 y CO_2 mediante el complejo enzimático piruvato formato liasa, el cual consiste en una formato deshidrogenasa, una hidrogenasa y transportadores de transferencia de electrones responsables de la oxidación del ácido fórmico a CO_2 y H_2 . Dependiendo de la especie microbiana involucrada, la hidrogenasa puede presentar iones de níquel y hierro ($[NiFe]$ - hidrogenasa),



como en el caso de *Escherchia coli*, conocida también como Ech hidrogenasa o ser una hidrogenasa dependiente de formato ([FeFe]-hidrogenasa). Los microorganismos que no tienen la capacidad de reoxidar las moléculas de NADH, como lo hacen algunas cepas de *Clostridium*, teóricamente están limitados a producir 2 moles de hidrógeno por molécula de glucosa. Figura 1.4. (Cabrol *et al.*, 2017; Oh *et al.*, 2003; Ramírez-Morales *et al.*, 2015)

1.3.1.2. Grupos microbianos productores de hidrógeno

Las bacterias productoras de hidrógeno (HPB, por sus siglas en inglés), se clasifican en tres grandes grupos, microorganismos anaerobios obligados formadores de endósporas, anaerobios obligados no formadores de endósporas y anaerobios facultativos con metabolismo fermentativo. (Cabrol *et al.*, 2017; Oh *et al.*, 2003).

Anaerobios obligados formadores de endósporas (principales productores de H₂)

Las especies de *Clostridium sp.* al ser el grupo de HPB más eficiente y abundante en reactores productores de hidrógeno son considerados los principales productores de H₂. A pesar de que exhiben patrones metabólicos diferentes de especie a especie, como los casos de *C. acetobutylicum* (productor de solventes) y *C. butyricum* (productor de acetato y butirato); y las abundancias relativas de clostridiales varían dependiendo del tipo de sustrato, las condiciones de operación y configuración del proceso, las poblaciones de *Clostridium spp.* usualmente predominan en los períodos de mayor producción de H₂, alcanzando rendimientos de 1.5 a 3 mol H₂/mol glucosa (Cabrol *et al.*, 2017; White, Drummond, y Fuqua, 2012). En la Tabla 1.1., se pueden ver algunos ejemplos de clostridiales productores de H₂.

Tabla 1.1. Bacterias productoras de H₂ anaerobias formadoras de endósporas.

Especie	Referencia
<i>Clostridium butyricum</i>	(Masset <i>et al.</i> , 2012; Sivagurunathan <i>et al.</i> , 2014)
<i>Clostridium pasteurianum</i>	(Cheng <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2010)
<i>Clostridium beijerinckii</i>	(Chang <i>et al.</i> , 2008; Noparat <i>et al.</i> , 2011)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	(Argun <i>et al.</i> , 2009; Baghchehsaraee <i>et al.</i> , 2008; Lutke-Eversloh y Bahl, 2011)
<i>Clostridium histolyticum</i>	(Song <i>et al.</i> , 2011)
<i>Clostridium perfringens</i>	(Huang <i>et al.</i> , 2010; M.-S. S. Kim <i>et al.</i> , 2012; Sivagurunathan <i>et al.</i> , 2014)
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	(Jo <i>et al.</i> , 2007; Sivagurunathan <i>et al.</i> , 2014)
<i>Clostridium celerecrescens</i>	(Li <i>et al.</i> , 2010; Liang <i>et al.</i> , 2010)

Anaerobios obligados no formadores de endósporas (productores auxiliares de H₂)

Algunas poblaciones de anaerobios estrictos no formadores de endósporas pueden persistir e incluso dominar en sistemas de producción de H₂ con cultivos mixtos a pesar de los radicales pretratamientos térmicos cuando las condiciones del sistema son favorables en términos de origen del inóculo, selección del sustrato y parámetros operativos (Cabrol *et al.*, 2017).



Bajo condiciones de operación específicas las especies de *Clostridium spp.* podrían no ser las HPB más adecuadas para la producción de H₂. No obstante, algunos anaerobios estrictos no formadores de endósporas pertenecientes a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* con patrones metabólicos específicos permiten mantener la producción de H₂ en intervalos aceptables cuando las especies de *Clostridium sp.* se encuentran inactivas (Cabrol *et al.*, 2017). En la Tabla 1.2., se pueden ver los principales anaerobios no formadores de endósporas productores de H₂.

Tabla 1.2. Bacterias productoras de H₂ anaerobias no formadoras de endósporas.

Orden o filo	Ejemplo de género o especie	Referencia
Clostridiales	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	(Chen y Dong, 2004; Xing 2008; Xing <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Acetanaerobacterium elongatum</i>	(Chen y Dong, 2004; Ren <i>et al.</i> , 2007; Xing <i>et al.</i> , 2006; Xing <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans</i>	(Song y Dong, 2009)
Firmicutes	<i>Megasphaera elsdenii</i>	Marounek <i>et al.</i> , 1989; Ohnishi <i>et al.</i> , 2010, 2012; Xing <i>et al.</i> , 2008 (Chen y Dong, 2004; Ren <i>et al.</i> , 2007; Xing <i>et al.</i> , 2006; Xing <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Selenomonas</i>	(Luo <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Acidaminococcus sp.</i>	(Chang <i>et al.</i> , 2008)
Bacteroidetes	<i>Prevotella sp.</i>	(Castelló <i>et al.</i> , 2009; Cheng <i>et al.</i> , 2011; Hung <i>et al.</i> , 2011; C Li, Zhang, y Fang, 2006)

Anaerobios facultativos fermentadores (productores de H₂ “desafiantes”)

Los anaerobios facultativos son considerados productores “desafiantes” en el proceso de producción de H₂, debido a que en la práctica, algunos de ellos tienen la capacidad de alcanzar o superar la productividad de H₂ reportada para cultivos de *Clostridium* (Cabrol *et al.*, 2017). Como lo es el caso de *Enterobacter aerogenes* el cual ha alcanzado rendimientos superiores a 2 mol H₂/mol glucosa (Jayasinghearachchi *et al.*, 2009).

A pesar de que sus rendimientos son teóricamente más bajos, comparadas con otras HPB, las bacterias anaerobias facultativas son particularmente atractivas para la producción de H₂ debido a su poca sensibilidad al oxígeno en comparación con HPB anaerobias estrictas. No obstante su presencia en procesos de FO se encuentra limitada debido a los drásticos pretratamientos realizados al inóculo y sustrato (Cabrol *et al.*, 2017).

Los principales grupos de HPB anaerobias facultativas son principalmente miembros de la familia de Enterobacteriaceae o especies pertenecientes al orden de los *Bacillales*, donde se destacan principalmente géneros como *Enterobacter sp.* y *Bacillus sp.* (Cabrol *et al.*, 2017). En la Tabla 1.3. se presentan microorganismos anaerobios facultativos asociados a la producción de hidrógeno.

**Tabla 1.3. Bacterias productoras de H₂ anaerobias facultativas.**

Grupo	Género o especie	Referencia
	<i>Citrobacter sp.</i>	(Ren <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Klebsiella sp.</i>	(Li <i>et al.</i> , 2006; Niu <i>et al.</i> , 2010; Pattra <i>et al.</i> , 2011)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter aerogenes</i>	(Jayasinghearachchi <i>et al.</i> , 2009; Seol <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Escherichia sp.</i>	(Varrone <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Shigella sp.</i>	(Varrone <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Pantoea agglomerans</i>	(Zhu, <i>et al.</i> , 2008)
Bacillales	<i>Bacillus sp.</i>	(Kotay y Das, 2007; Liu <i>et al.</i> , 2015; Patel <i>et al.</i> , 2012; Porwal <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	(Huang <i>et al.</i> , 2010; Lal <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Shewanella oneidensis</i>	(Meshulam-Simon <i>et al.</i> , 2007)
Otros PBH	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	(Penislus Shiyan & Krishnaveni, 2013)
	<i>Vibrio spp.</i>	(Oh <i>et al.</i> , 2003)

Sinergismo entre HPB

En la práctica del proceso de FO se deben considerar ciertas relaciones entre HPB. Se han reportado casos de coexistencia natural entre diversas HPB, en los cuales estas relaciones son usualmente beneficiosas para la producción de H₂ (Cabrol *et al.*, 2017). En la Tabla 1.4. se presentan algunas de estas interacciones reportadas entre HPB.

Tabla 1.4. Asociaciones entre bacterias productoras de H₂ en biorreactores

HPB involucrados	Sustrato	Operación del reactor	Referencia
<i>Enterobacteriaceae</i> + <i>Clostridium</i>	Glucosa	CTSR	(Song <i>et al.</i> , 2011)
<i>Clostridium spp.</i> + <i>Klebsiella</i> y <i>Prevotella</i>	Sacarosa	CSTR	(Li <i>et al.</i> , 2006)
<i>Selenomonas</i> + <i>Enterobacter</i> + <i>Clostridium spp</i>	Glucosa	Continuo	(Luo <i>et al.</i> , 2008)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> + <i>Eubacterium multiforme</i>	Lodo cloacal pretratado	Lote	(Cai <i>et al.</i> , 2004)
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> + <i>Ethanoligenens harbinense</i>	Sacarosa	Lote	(Mariakakis <i>et al.</i> , 2011)

1.3.1.3. Enzimas hidrogenasas

La hidrogenasa es la enzima que cataliza la interconversión de H₂ en protones y electrones (Ecuación 1.1.), la cual se encuentra en bacterias, arqueas y eucariotas. Los microorganismos la emplean para generar energía, dispersar equivalentes reductores producidos durante la fermentación y generar



cofactores enzimáticos reducidos implicados en varias reacciones del metabolismo celular (Constant y Hallenbeck, 2013).



Las hidrogenasas se clasifican en tres clases distintas en función del contenido metálico de su sitio activo. En este sentido, las hidrogenasas conocidas son [NiFe]-hidrogenasa, [FeFe]-hidrogenasa y [Fe]-hidrogenasa.

Las [NiFe]-hidrogenasas solo se encuentran en arqueas y bacterias, catalizan la oxidación o la producción de H_2 in vivo. Las [FeFe]-hidrogenasas se han detectado en bacterias y eucariotas donde se ha determinado que catalizan exclusivamente la producción de H_2 . Por otro lado, las [Fe]-hidrogenasas se distribuyen de forma indistinta en arqueas metanógenas hidrogenotróficas y utilizan el H_2 para proporcionar equivalentes reductores para los pasos intermedios de reducción de CO_2 a metano (Cabrol et al., 2017; Constant y Hallenbeck, 2013)

1.3.2. Factores involucrados en la producción de H_2 a partir de RSO

1.3.2.1. Inóculo

En sistemas en lote y continuos operados por cortos periodos de tiempo el inóculo es un factor que puede afectar la productividad de los sistemas productores de H_2 significativamente. Se ha reportado el uso de diversas matrices como inóculo, desde microorganismos provenientes de lodos de plantas depuradoras de aguas y digestatos de procesos de producción de biogás, hasta estudios donde no se ha empleado ninguna fuente de inóculo y el proceso es llevado a cabo por la microbiota autóctona fermentativa del sustrato (Kim 2009; Kim et al., 2013; Pakarinen et al., 2008)

La presencia de ciertos grupos microbianos como metanogénicos, homoacetógenos, productores de propionato y sulfatoredutores, entre otros, puede afectar el sistema y disminuir trascendentalmente la eficiencia del mismo. Por tal razón, para potenciar la productividad de los sistemas, se realizan pretratamientos a los inóculos, los cuales se basan principalmente en el sometimiento a condiciones de estrés térmico y químico a los microorganismos y buscan la selección de poblaciones HPB anaerobias formadoras de endósporas en el inóculo e inhibir las demás poblaciones presentes (Berrocal, 2017; Castillo, 2015; Kim et al., 2012; Kim et al., 2013; Venkata Mohan et al., 2008)

Pretratamiento térmico

Es el pretratamiento usualmente más empleado, por su eficiencia y simplicidad. Se basa en someter al inóculo a temperaturas que van desde 100 hasta 125 °C por intervalos de tiempo prolongados, los cuales pueden ir desde 15 minutos a 24 horas (Bujanos, 2013; Castillo, 2015).

Pretratamiento químico

Es el sometimiento del inóculo a condiciones de pH extremas o por medio de la exposición a compuestos tóxicos inhibitorios. El pretratamiento en condiciones ácidas, se puede realizar mediante adición de ácidos concentrados como el ácido ortofosfórico hasta llegar a condiciones de pH inferiores a 3 por intervalos de tiempo de un día (Kim et al., 2013). En cuanto a los tratamientos con compuestos tóxicos, se ha reportado el uso de lumazina, cloroformo y ácido sinfónico 2-bromoetano (BEA), todas en un amplio número de concentraciones e intervalos de tiempo que pueden ir de horas a días (Bujanos, 2013; Castillo, 2015; Kim et al., 2013; Venkata Mohan et al., 2008).



1.3.2.2. pH

El pH es uno de los parámetros de mayor transcendencia para la producción de hidrógeno mediante FO, debido a que puede afectar la actividad enzimática de las hidrogenasas, las rutas metabólicas de los microorganismos y las poblaciones bacterianas dominantes durante el proceso. Para garantizar la estabilidad y productividad del sistema, el pH debe mantenerse en un rango óptimo, lo cual se puede lograr mediante la implementación un sistema de control de pH y/o garantizando cierto grado de alcalinidad en el sistema mediante la adición de soluciones buffer (Kim *et al.*, 2013)

El intervalo de pH del proceso además de controlar las poblaciones presentes en el sistema, influye en la tasa de hidrólisis del sustrato, los tipos y cantidad de metabolitos acidogénicos y la velocidad y cantidad de hidrógeno producido (Kim *et al.*, 2013). El pH óptimo de producción H₂ depende de varios factores asociados a la biodiversidad microbiana presente en el biorreactor, como el origen, tipo y composición microbiana del inóculo, además, el tipo de pretratamiento aplicado al mismo y la temperatura a la que se opere el proceso. Se ha demostrado que rangos de pH de 5.5 ±1 favorecen las rutas de producción de hidrógeno y afectan las reacciones no hidrogénicas *et al.*, 2016). En la Tabla 1.5. se pueden observar algunos valores de pH de operación óptimos en sistemas de producción de H₂ empleando RSO.

Tabla 1.5. Valores de pH de operación óptimos en sistemas de producción de H₂ empleando RSO.

Sustrato	pH	Y _{H2}	Referencias
Residuos de cervecería	5.5	2.2 mol-H ₂ /mol-glucosa	(Fan <i>et al.</i> , 2006)
Residuos de maíz	5.5	176 mL-H ₂ /g-ST	(Fan <i>et al.</i> , 2008)
Residuos de comida + lodos de aguas residuales	5.5	194 mL-H ₂ /g-SV	(Li <i>et al.</i> , 2008)
FORSU	5	180 mL-H ₂ /g-STV	(Lay <i>et al.</i> , 1999)

*: Pretratamiento térmico al sustrato a 102 °C por 30 min; **: Pretratamiento enzimático al sustrato

1.3.2.3. Temperatura

La temperatura, junto con el pH es uno de los parámetros operacionales más importantes en la producción de biohidrógeno. La temperatura óptima para la producción de H₂ a partir de RSO, varía con el sustrato, debido a la complejidad de las comunidades microbianas a emplear en el sistema y la composición de los materiales constituyentes de la materia prima (Kim *et al.*, 2013).

Los procesos de digestión anaerobia se llevan a cabo usualmente en condiciones mesófilas (30 a 40 °C) o termófilas (50 a 60 °C). Se ha reportado que el rendimiento de producción de H₂ en condiciones de termofilia es aproximadamente 90% mayor con respecto a los procesos mesófilos gracias a la disminución directa de poblaciones consumidoras H₂ y mejores eficiencias en los procesos hidrolíticos. No obstante, económicamente, se prefiere la operación en condiciones mesófilas puesto que el gasto energético para llevar a cabo los procesos termofílicos es sustancialmente mayor (Castillo, 2015; Kim *et al.*, 2013).

Yokoyama *et al.*, 2007 estudiaron la influencia de la temperatura en un proceso de producción de hidrógeno empleando estiércol de vacas lecheras como sustrato, encontrando dos picos máximos de producción de H₂ a 60 y 55 °C, con producciones de 392 y 348 mL H₂/L suspensión respectivamente, en la Figura 1.5., se presentan los resultados determinados en el estudio.

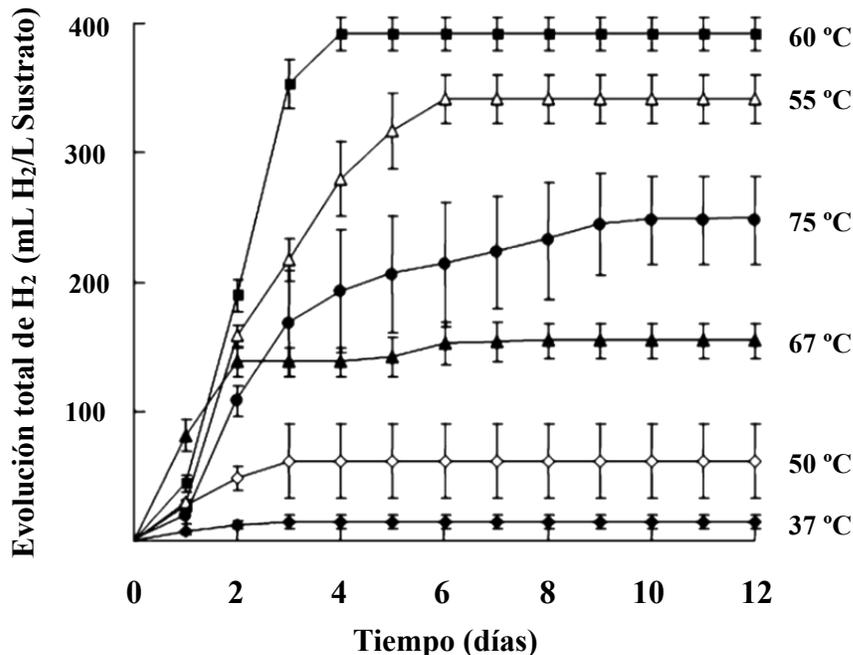


Figura 1.5. Influencia de la temperatura en sistemas de producción de H₂ empleando residuos orgánicos de vacas lecheras. (Adaptado Yokoyama *et al.*, 2007).

1.3.2.4. Presión parcial de hidrógeno (PpH₂)

Las rutas metabólicas PFOR y PFL involucradas en la producción de H₂ mediante FO son muy sensibles a la PpH₂, debido a que esta afecta directamente el equilibrio químico del sistema y por lo tanto la velocidad de formación de H₂. Una elevada PpH₂ en la fase líquida puede inhibir el proceso y disminuir la producción de H₂, debido a que en esas condiciones la energía de Gibbs de la reacción descrita en la Ecuación 1. pasa de tener valores de $\Delta G^{\circ} < 0$ a valores $\Delta G^{\circ} > 0$, lo que hace termodinámicamente desfavorable los procesos de reducción de protones H⁺ llevados a cabo por las hidrogenasas NADH-[FeFe] y NADH-Fred - [FeFe] mediante los cuales se produce la gran mayoría H₂ en procesos FO y además se promueve la reducción de la Fd_{ox}, lo que favorece la oxidación de H₂ a protones, disminuyendo directamente la productividad del sistema (Bundhoo y Mohee, 2016).

Algunos autores han reportado que una alta PpH₂ puede inhibir el metabolismo ácidos grasos de cadena larga a acetato e hidrógeno de la etapa acetogénica en el sistema y además direccionar el metabolismo microbiano hacia la producción de otros metabolitos como propionato, lactato, etanol, acetona y butanol, a expensas del H₂ presente en el sistema (Berrocal, 2017; Bundhoo y Mohee, 2016). Considerando la influencia de la PpH₂ en FO, la eliminación del exceso de H₂ es de trascendental importancia para mantener óptima la producción de hidrógeno en el sistema. Se han desarrollado diferentes estrategias para eliminar o separar el H₂ como el burbujeo de nitrógeno gaseoso (N₂) evitando el efecto negativo de la acumulación de H₂ en las fases gaseosa y líquida del proceso (Balachandar *et al.*, 2013; Bundhoo y Mohee, 2016)



1.3.2.5. Tiempo de residencia hidráulico y tiempo de retención de sólidos

El Tiempo de residencia hidráulico (TRH) indica el tiempo medio teórico que permanecen las partículas de fluido alimentadas en el interior del reactor y puede definirse según lo descrito en la Ecuación 1.2.

$$TRH = \frac{V}{F} \quad \text{(Ecuación 1.2.)}$$

Donde, TRH: tiempo de residencia hidráulica; V: volumen del reactor y F: flujo del influente o alimentación de entrada.

El TRH junto con el pH y la temperatura del sistema es uno de los factores operacionales del sistema más importantes en la producción de hidrógeno, debido a que está íntimamente relacionado con la cantidad de sustrato a manejar en el sistema y porque puede determinar las poblaciones microbianas presentes en el biorreactor mediante la selección de comunidades microbianas con velocidades específicas de crecimiento (μ) capaces soportar la tasa de dilución (D) causada por el continuo flujo volumétrico de la alimentación (Balachandar *et al.*, 2013; Berrocal, 2017; M. S. Kim *et al.*, 2013; Redondas, 2013)

El uso de TRH cortos junto con la mantención constante de la concentración de sustrato es una estrategia de control biocinético eficiente que permite eliminar bacterias no productoras de H₂ y favorece el desarrollo de una comunidad microbiana estable de HPB en sistemas continuos tradicionales (Sivagurunathan *et al.*, 2016). Las HPB más eficientes como *Clostridium sp.* tienden a producir ácidos acético y butírico junto con H₂ en la fase de crecimiento exponencial, no obstante, en la fase de crecimiento estacionario producen alcohol, por tal razón el establecimiento de un TRH capaz de retener sólo los microorganismos útiles en la fase exponencial es ampliamente ventajoso para el proceso (Sivagurunathan *et al.*, 2016).

El TRH tiene un impacto directo en la viabilidad económica de un bioproceso puesto que precisa la cantidad de sustrato que puede manejarse por unidad de tiempo en el sistema y por lo tanto define tanto el tamaño del biorreactor, como desembolso de capital a emplear en la construcción del mismo (Kim *et al.*, 2013). Cuando se emplean sustratos complejos como residuos de comida en procesos de producción de hidrógeno, son necesarios TRH amplios para garantizar un óptimo proceso hidrolítico, en este contexto, TRH bajos pueden reducir tanto el uso eficiente de sustrato, como la retención de la biomasa activa, y por ende disminuir eficiencia global del proceso. Sin embargo, TRH altos (del orden de días) pueden propiciar un aumento de microorganismos que pueden afectar el proceso como consumidores de hidrógeno y competidores o inhibidores de HPB (Balachandar *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Redondas, 2013).

Algunos estudios que han empleado RSO como sustrato han determinado TRH óptimos para el proceso óptimos entre 6 y 8 horas, no obstante, esto puede variar de acuerdo con el tipo de sustrato a emplear, la temperatura de funcionamiento, la etapa del proceso y el tipo de reactor a emplear (Balachandar *et al.*, 2013; M. S. Kim *et al.*, 2013; Redondas, 2013).

Por otro lado, el tiempo de retención de sólidos (TRS) es otro parámetro de diseño importante sobre todo en sistemas tratando residuos sólidos y semisólidos para la producción de H₂, del mismo modo que el TRH, determina la eficiencia de consumo de sustrato, la población microbiana y las vías metabólicas a desarrollarse en el sistema. En biorreactores de mezcla completa, asumiendo que no existe acumulación alguna de sólidos, el TRH coincide con el TRS y es definido como el tiempo medio de permanencia de los microorganismos en el sistema (Berrocal, 2017; Redondas, 2013)



Se conoce que TRS altos pueden permitir una adecuada degradación de los componentes del sustrato y garantizar la retención de biomasa activa de HPB, no obstante, TRS muy elevados pueden favorecer el crecimiento de microorganismos que afectan el proceso, como consumidores de H_2 , competidores e inhibidores de HPB, lo que se traduce en una disminución de la eficacia del proceso (Berrocal, 2017; Redondas, 2013). En contraste, el empleo de TRS bajos puede limitar crecimiento de poblaciones nocivas para el sistema, sin embargo, cuando los TRS son muy bajos, la eficiencia de degradación del sustrato y la retención de biomasa de HPB en el sistema pueden verse afectadas, situación que afecta directamente la productividad global del sistema.

Por tal razón, el TRS es un parámetro que al igual que el TRH, se debe considerar de manera trascendente durante todo el proceso, para así poder permitir una óptima tasa de consumo de sustrato, garantizar el crecimiento adecuado de poblaciones que trabajan en función del sistema y al mismo tiempo impedir el crecimiento de poblaciones nocivas para el proceso (Berrocal B., 2017; Redondas, 2013).

1.3.2.6. Acumulación de metabolitos solubles

En la etapa de acidogénesis, la acumulación de metabolitos solubles como los ácidos acético, butírico, propiónico y el etanol causan inconvenientes que disminuyen la producción de H_2 a medida que incrementa su concentración en el medio (Bundhoo y Mohee, 2016). La presencia de los compuestos en el sistema ya sea en su forma disociada o no, tiene efectos de inhibición en la producción de H_2 . Las especies disociadas de ácidos en el sistema tienen la capacidad de incrementar la fuerza iónica del medio, lo que puede promover la lisis celular en HPB, las cuales para disminuir la fuerza iónica del medio, modifican su metabolismo, mediante el cambio de acidogénesis a solventogénesis reduciendo directamente la producción de H_2 (Berrocal B., 2017; Bundhoo y Mohee, 2016).

Se ha reportado que, en sistemas con elevadas concentraciones de ácidos, los protones del medio pueden ingresar a la matriz intracelular bacteriana de HPB y alterar el equilibrio fisiológico celular. Para restaurar la homeóstasis, las células tienen la necesidad de emplear energía del mantenimiento celular, lo cual compromete tanto el crecimiento bacteriano como la producción de hidrógeno significativamente (Balachandar *et al.*, 2013; Bundhoo y Mohee, 2016).

1.3.2.7. Nutrientes

Los sustratos contienen una amplia variedad de constituyentes que varían de acuerdo con las fuentes de generación, método de recolección y clima del sitio de generación de los residuos, entre otros factores. No obstante, en ocasiones los requerimientos de carbono (C), nitrógeno (N) y fosfatos (PO_4^{3-}) entre otros elementos necesarios para los microorganismos, no se encuentran en las proporciones adecuadas para suplir las necesidades microbianas y por lo tanto su adición en el sistema se hace imprescindible para la optimización del proceso (Kim *et al.*, 2013).

Se conoce que el suplemento de nitrógeno, fosfatos y otros minerales a procesos de producción de hidrógeno es esencial para maximizar el Y_{H_2} cuando se emplean carbohidratos como sustrato en el sistema (Balachandar *et al.*, 2013).

El nitrógeno es un componente esencial de los aminoácidos, proteínas y otros componentes celulares esenciales, por lo cual es un nutriente necesario para el crecimiento óptimo de los microorganismos involucrados dentro del sistema. Entre los factores asociados a la presencia de N en el medio, se ha demostrado que tanto el control de una adecuada relación C/N, como el uso de fuentes orgánicas de N pueden potenciar la producción de hidrógeno, en contraste a cuando la relación C/N no es la adecuada o el elemento es suplementado con fuentes inorgánicas en el sistema (Balachandar *et al.*, 2013; Lin, 2004; Yokoi *et al.*, 2002).



El PO_4^{3-} es un nutriente inorgánico determinante para la optimización de la producción de H_2 . Se ha demostrado que concentraciones óptimas de PO_4^{3-} pueden mejorar el rendimiento general del proceso, no obstante, su presencia en exceso puede direccionar el sistema a la producción de AGVs y por ende desviar las especies reductoras involucradas en la producción de hidrógeno y afectar el proceso (Balachandar *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013).

1.3.2.8. Iones metálicos

El suplemento de iones metálicos adecuados al medio es esencial para el desarrollo óptimo de cualquier proceso fermentativo. Ciertos metales juegan un importante papel en el metabolismo, crecimiento y funcionamiento celular microbiano, no obstante, cuando las concentraciones de metales sobrepasan cierto umbral en el medio, la presencia de estos iones puede estar involucrada en distintos procesos de inhibición celular y afectar la producción de hidrógeno (Balachandar *et al.*, 2013; Berrocal, 2017).

En sistemas de producción de H_2 se ha estudiado la influencia de algunos iones metálicos como el hierro (Fe), magnesio (Mg), sodio (Na), calcio (Ca) y níquel (Ni). En la Tabla 1.6. se describe el papel que pueden tener de estos iones en procesos de FO.

Tabla 1.6. Influencia de metales en sistemas de producción de H_2 .

Metal	Influencia	Referencias
Hierro	Presencia en enzimas hidrogenasas	(Y. J. Lee <i>et al.</i> , 2013)
Magnesio	Cofactor de 10 enzimas involucradas en la glucólisis, como hexoquinasa, fosfofructocinasa y fosfoglicerato quinasa	(Balachandar <i>et al.</i> , 2013)
Sodio	Mejora la reducción de Fd_{ox} por NADH, aumentando la proporción de Fd_{red}	(Bundhoo y Mohee, 2016)
Calcio	Promueve el crecimiento bacteriano y favorece la resistencia mecánica del lodo granular	(Berrocal B., 2017)
Níquel	Presente en la [Ni-Fe] hidrogenasa de la vía PFL	(Bundhoo y Mohee, 2016; Constant y Hallenbeck, 2013)

1.3.2.9. Presencia de amoníaco (NH_3) y compuestos fenólicos

Se ha determinado que el amoníaco y los compuestos fenólicos pueden inhibir la producción de biohidrógeno mediante FO. Estos compuestos pueden presentarse en el sistema, por la reducción de nitratos y el metabolismo de aminoácidos en el caso del NH_3 o gracias a procesos de pretratamiento e hidrólisis de sustratos como en el caso de los compuestos fenólicos (Bundhoo y Mohee, 2016).

El N amoniacal puede presentarse en dos formas en el sistema, como amoníaco libre (NH_3) o iones amonio (NH_4^+). Aunque el N en forma de NH_3 o NH_4^+ representa una fuente importante de nutrientes para el crecimiento bacteriano, altas concentraciones de estas especies pueden tener efectos tóxicos o inhibidores en los procesos de digestión anaerobia (Bundhoo y Mohee, 2016).

El NH_3 se considera el principal supresor del proceso, debido a que puede difundirse con facilidad a través de las membranas bacterianas, reaccionar con protones H^+ y formar NH_4^+ , creando un desequilibrio en el pH intracelular e inhibiendo las actividades celular (Bundhoo y Mohee, 2016). Wang



et al., 2009 determinaron que concentraciones de amoníaco superiores a 0.1 g/L de N pueden reducir el rendimiento máximo de producción de H₂.

Para reducir la inhibición por amoníaco se han empleado estrategias como sistemas de control de pH y métodos de aclimatación del inóculo con elevadas concentraciones de amoníaco. Salerno *et al*, 2006 evaluaron ambas estrategias; determinaron que en condiciones de pH inferiores a 5,2 el umbral de inhibición del amoníaco es mayor en comparación con el presentado a pH de 6,2. También observaron producción de hidrógeno a una concentración de amoníaco de 0.8 g/L de N después de un proceso de aclimatación al inóculo, demostrando que tanto el mantenimiento del pH en el sistema, como la aclimatación previa del inóculo pueden ser estrategias empleadas para reprimir la inhibición por amoníaco en sistemas de producción de H₂ mediante FO.

Los compuestos fenólicos se generan a partir de la degradación de la lignina presente en el sustrato durante su pretratamiento o hidrólisis, incluyen la vainillina y el siringaldehído. Estos compuestos pueden afectar las membranas celulares, mediante el aumento de su permeabilidad o el deterioro directo de las membranas, lo cual permite el ingreso de compuestos tóxicos y la salida de componentes celulares, desencadenando finalmente efectos adversos como supresión de actividades microbianas, reducción directa de la tasa de crecimiento y cambios en las vías metabólicas, afectando globalmente la productividad del sistema (Bundhoo y Mohee, 2016).

Con el fin de prevenir la presencia de concentraciones elevadas de compuestos fenólicos en el sustrato, se han planteado estrategias para prevenir su aparición en los procesos de pretratamiento como la modificación de las condiciones de pH y temperatura del pretratamiento o el empleo de otros métodos de pretratamiento como los biológicos (Bundhoo y Mohee, 2016).

1.3.2.11. Tipos de reactores y operación en sistemas de producción de H₂.

Para el estudio de la producción de H₂ mediante FO, se han realizado trabajos empleando biorreactores operados en modo discontinuo, semicontinuo y continuo. Entre los reactores más empleados para la producción de H₂, se encuentran el reactor continuo de tanque agitado (CSTR por sus siglas en inglés), el reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés), el reactor discontinuo secuencial anaerobio (ASBR por sus siglas en inglés), el biorreactor de membrana (MBR por sus siglas en inglés), el biorreactor de lecho fluidizado (FBR por sus siglas en inglés) y el reactor de lecho de lodo granular inducido (CIGSB por sus siglas en inglés) (Balachandar et al., 2013). A continuación, se mencionan algunas consideraciones de cada uno de ellos.

- *Reactor continuo de tanque agitado*

EL CSTR se usa comúnmente para la producción continua de hidrógeno debido a que ofrece un patrón de mezcla constante que favorece la transferencia de masa en el sistema y el contacto de la biomasa con el sustrato. Su elevado grado de mezcla, no permite su operación a elevadas tasas de dilución puesto que se corre el riesgo de eliminar la biomasa del reactor. En comparación con sistemas que emplean lodos granulares o estrategias de inmovilización de biomasa, el CSTR presenta tasas de producción menores, debido a su diseño e incapacidad de mantener altos niveles de biomasa productora de hidrógeno. En este contexto, aunque la producción de H₂ en modo continuo mediante sistemas inmovilización de biomasa se ha vuelto más popular que los sistemas de biomasa suspendida, gracias a sus elevadas tasas de producción incluso con TRH bajos, se ha demostrado que la producción de H₂ a partir de RSO alcanza una tasa máxima de producción de hidrógeno en tiempos de retención hidráulica más bajos por lo que el uso de CSTR puede ser una opción a considerar cuando se pretende trabajar con este tipo de matrices (Balachandar et al., 2013).



- *Reactor Anaerobio de flujo ascendente*

El UASB se ha empleado ampliamente en estudios a nivel laboratorio y escala piloto para la producción de H₂ a partir de diversas matrices de desecho mediante fermentación oscura. En este biorreactor el sustrato asciende a través del lecho de lodo anaerobio y entra en contacto con la biomasa microbiana, la cual puede asociarse en forma de gránulos de 0.2 a 2 mm de diámetro. Esta agrupación favorece la velocidad de sedimentación y permite la conservación de biomasa inclusive cuando se emplean cargas hidráulicas elevadas. El movimiento del biogás generado desde los gránulos hacia la parte superior del reactor genera un patrón de turbulencia hidráulica que mezcla las fases del sistema. La separación del biogás se realiza mediante un dispositivo separador de gas / lodo / líquido trifásico interno (Balachandar et al., 2013).

- *Reactor discontinuo secuencial anaerobio*

El proceso consiste en la ejecución repetitiva de un ciclo de cuatro etapas: alimentación, reacción, sedimentación y vaciado. El ASBR es una tecnología recientemente desarrollada, la cual se ha convertido en una opción atractiva para producir hidrógeno mediante FO gracias a su alta capacidad para remover materia orgánica, sus considerables tasas de producción de H₂ y su simple manipulación y control; no obstante, si durante los ciclos de operación el biorreactor es sobrecargado, el rendimiento del reactor puede verse reducido en gran medida (Balachandar et al., 2013).

- *Biorreactor de membrana*

El MBR es una tecnología de combinación de procesos muy prometedora de las técnicas de filtración por membrana y tratamiento de lodos activados con el fin de aumentar la retención de biomasa. Ofrece la opción de independizar el TRH del TRS, lo que brinda mayor autonomía al controlar los parámetros operacionales (Balachandar et al., 2013). Algunos autores han reportado aumentos en la producción de H₂ empleando MBR en comparación con reactores sin membrana, no obstante, el aumento de sus producciones no ha estado muy distante de los obtenidos con algunos CSTR. Entre las desventajas del MBR se encuentran la saturación constante de las membranas y los elevados costos de operación (Balachandar et al., 2013; Li y Fang, 2007).

- *Biorreactor de lecho fluidizado*

EL FBR es una combinación de los reactores de lecho empacado y tanque agitado más comunes, el cual tiene excelentes características de transferencia de calor y masa. El FBR ofrece atractivas tasas de degradación de materia orgánica debido a que la biomasa forma agregados en forma de biopelícula o gránulos, los cuales se mantienen suspendidos y en contacto con el sustrato gracias a las fuerzas de arrastre del flujo ascendente de la alimentación. En comparación con el UASB, el FBR se considera un reactor más eficaz puesto que presenta una mejor retención de las partículas, sin embargo, tiene la desventaja de que requiere más energía para lograr la fluidización en el biorreactor y por ende sus costos de operación son mayores (Balachandar et al., 2013).

1.3.2.10. Sustrato

La diversidad de matrices estudiadas como sustratos en procesos de producción de hidrógeno mediante FO ha sido particularmente elevada, aguas residuales municipales e industriales, RSO como desechos de comida, residuos agrícolas y de actividades de ganadería, entre otros, pueden potencialmente ser usados como fuentes económicas y de fácil acceso para la producción de H₂ (Kim et al., 2013) . El anexo B, presenta en promedio las características de la FORSU de 14 ciudades en ocho países, con base en reportes realizados por diferentes autores. Debido a la gran variedad en la composición del sustrato, este es el



principal factor que determinará el potencial de producción de hidrógeno. Entre los factores asociados al sustrato que pueden afectar la productividad de los sistemas, se encuentran la composición de biomoléculas presentes en el sustrato, el tamaño de las partículas y la carga orgánica con la que se alimenta el reactor.

El tamaño de la partícula del sustrato que entra al reactor es un factor en procesos de producción de H₂. Empleando residuos de comida como sustrato, se ha demostrado que tamaños de partícula menores de 0.5mm, ofrecen mejores tasas de producción de H₂ que partículas con tamaños superiores a 0.5mm considerando cargas orgánicas de alrededor de 15 gST/L. Estas diferencias en las tasas producción, se asocian a que los tamaños de partícula más pequeños aumentan la tasa de solubilidad del sustrato y por ende aumentan el grado de accesibilidad de la materia orgánica para los microorganismos dentro del reactor (Castillo, 2015; Moreno-Andrade y Buitrón, 2015).

Por otra parte, la carga orgánica (CO) establece la cantidad de materia orgánica alimentada al biorreactor por unidad de tiempo y por unidad de volumen; también puede considerarse como el flujo volumétrico de la materia orgánica por unidad de volumen o la concentración del sustrato entre el tiempo de retención hidráulica (TRH) (Castillo, 2015) y puede expresarse como está descrita en la Ecuación 1.3.

$$CO = \frac{S_0 Q}{V} = \frac{F}{V} = \frac{S_0}{TRH} \quad \text{(Ecuación 1.3.)}$$

Donde, CO: carga orgánica; S₀: concentración del sustrato de entrada; Q: flujo de la alimentación; V: volumen del reactor; F₀: flujo del sustrato en la alimentación; TRH: tiempo de retención hidráulica.

Algunos trabajos han demostrado que el aumento en la CO alimentada a los biorreactores, incrementa la producción de H₂, no obstante, la eficiencia de remoción de la materia orgánica y el rendimiento de la producción puede verse afectada si el aumento de la CO es muy elevado (Berrocal B., 2017; Castillo H, 2015; Koutrouli *et al.*, 2009). En la Tabla 1.7. se presentan las productividades de H₂ a partir del uso de distintos sustratos en sistemas en lote y en continuo, distintas condiciones de operación.

Tabla 1.7. Producción de H₂ a partir de distintos sustratos en sistemas en continuo y discontinuo de fermentación oscura.

Sistemas continuos							
Sustrato	Temperatura (°C)	Reactor	Carga orgánica (g-O ₂ / L/día)	TRH	Y _{H2}	R _{max} (L H ₂ / L/día)	Referencias
Residuos de comida	30	SBHR	45.9	2h	332 mL-H ₂ /g SSV	4.8	(Elbeshbishy y Nakhla, 2011)
Residuos de cocina	35	I-CSTR	100	1.3h	86 mL-H ₂ /g-SV	3.4	(Li <i>et al.</i> , 2011)
Residuos líquidos + papel	55	MBR	97	1.2 días	2.4 mol-H ₂ /mol-glucosa	5.4	(Ueno, Fukui, y Goto, 2007)
Residuos de cocina	Termofílico	CSTR	39	1.9 días	1.82 mol-H ₂ /mol-glucosa	11.1	(Lee y Chung, 2010)
Residuos de tofu	Termofílico	MBR	-	-	1.45 mol-H ₂ /mol-glucosa	19.9	(Kim <i>et al.</i> , 2011)



Sistemas discontinuos

Sustrato	Pretratamiento	pH	Temperatura (°C)	Y _{H2}	Referencias
Residuos de cafetería	Calentamiento	7	35	154 mL-H ₂ /g-SV	(D.-H. Kim et al., 2009)
Residuos de maíz	Ácido	7	36	150 mL-H ₂ /g-x	(Zhang et al., 2007)
Residuos de cafetería	Ninguno	6.5	35	120 ml- H ₂ /g-SV	(Zhu et al., 2008)
Residuos de maíz	Biológico	5.5	36	176 mL-H ₂ /g-ST	(Fan et al., 2008)
Residuos de paja de trigo	Ácido + calentamiento	-	36	141 mL-H ₂ /g-SV	(Nasirian, 2012)
FORSU	Ninguno	5	37	180 mL-H ₂ /g-STV	(Lay et al., 1999)
Residuos de comida + lodo PTAR		5	36	194 mL-H ₂ /g-SV	(M. Li et al., 2008)

Composición de biomoléculas del sustrato

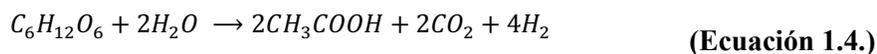
Las principales biomoléculas (carbohidratos, proteínas y lípidos) consideradas como sustrato directo para la producción de hidrógeno en el contexto del proceso de FO, han demostrado tener influencia en los sistemas de producción de H₂ a partir de RSO. Las productividades de H₂ más elevadas se han asociado al uso de sustratos ricos en carbohidratos, a su vez, sustratos con proporciones elevadas de lípidos y proteínas se han asociado a producciones bajas o nulas de H₂ (Alibardi y Cossu, 2016). En la siguiente sección se describen los procesos de producción de H₂ a partir de carbohidratos, lípidos y proteínas.

- *Carbohidratos*

El H₂ en sistemas de FO usualmente se deriva de la descomposición anaerobia de azúcares mediante glucólisis, donde la mayor proporción de hidrógeno es impulsada por el metabolismo anaerobio del piruvato (Figura 1.4.). Los procesos fermentativos para la producción de H₂ donde se generan acetato y butirato a partir carbohidratos son termodinámicamente favorables como se presenta en las ecuaciones 1.3. y 1.4. (Dong et al., 2009).

En teoría, la acetogénesis tiene la capacidad de generar 4 mol H₂/mol glucosa (Ecuación 1.3.) cuando se emplean las 2 moléculas de NADH y las 2 moléculas de Fd_{red} generadas durante la ruta PFOR (Figura 1.4.), lo cual se conoce como el "límite de Thauer" (Cabrol et al., 2017; Dong et al., 2009).

Producción de H₂ vía fermentación acética



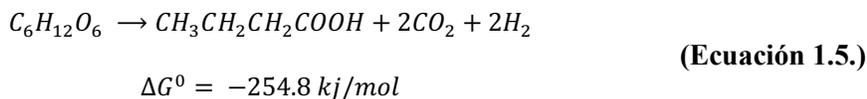
$$\Delta G^0 = -206.3 \text{ kJ/mol}$$

El rendimiento en la producción de H₂ derivado de la fermentación de butírica es de 2 mol H₂/mol glucosa (Ecuación 1.5.), debido a que la producción únicamente se lleva a cabo por el uso de las 2 moléculas de



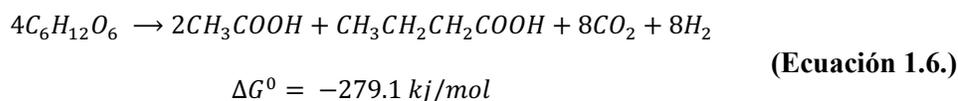
F_{red} y las dos moléculas de NADH no son destinadas a la producción de H_2 . (Dong et al., 2009; Rosenberg *et al.*, 2013)

Producción de H_2 vía fermentación butírica



En la práctica, los rendimientos de producción y las rutas metabólicas por las cuales se lleva a cabo la producción de H_2 a partir de carbohidratos, es variable. Muchos estudios indican que los rendimientos reales son mucho menores a los del límite de Thauer, oscilando usualmente entre 0.5 y 2.5 mol H_2 /mol glucosa. Así mismo, el proceso fermentativo tiende a ser ácido-mixto como se describe en la Ecuación 1.6., generando una mezcla de acetato y butirato como metabolitos secundarios (Dong et al., 2009).

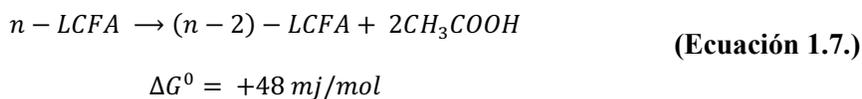
Producción de H_2 vía fermentación ácido-mixta



- *Lípidos*

Los lípidos no son considerados buenos sustratos para la producción de H_2 por medio de FO, debido a que la producción de H_2 a partir de ácidos grasos de cadena larga (LCFA por sus siglas en inglés) por medio de β -oxidación es termodinámicamente desfavorable, a menos que la PpH_2 se mantenga en niveles extremadamente bajos, lo cual no es una situación habitual en procesos de FO donde el hidrógeno se genera constantemente para disminuir los equivalentes reductores generados durante el proceso fermentativo (Ecuación 1.7.) (Dong et al., 2009)

Producción de H_2 vía de β -oxidación LCFA

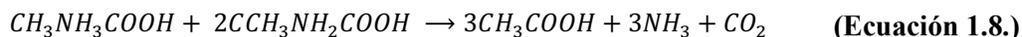


Aunado a su incapacidad como sustratos para producir H_2 , los LCFA son inhibidores de bacterias anaerobias debido a que pueden adherirse a la pared bacteriana y limitar el transporte transmembrana (Dong et al., 2009). El estudio de su potencial de inhibición en sistemas de FO no ha sido estudiado con detalle hasta la fecha en que se realizó la presente revisión bibliográfica.

- *Proteínas*

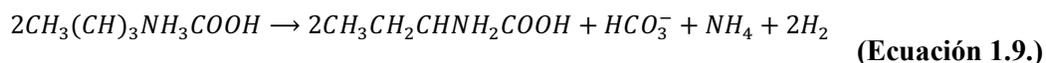
Las proteínas son hidrolizadas a aminoácidos por medio de complejos enzimáticos extracelulares. El metabolismo anaerobio de aminoácidos se lleva a cabo por medio de tres procesos, la reacción de Stickland (Ecuación 1.8.), la desanimación oxidativa de un sólo aminoácido (Ecuación 1.9.) y la desanimación reductiva de un sólo aminoácido (Ecuación 1.10).

Reacción de Stickland



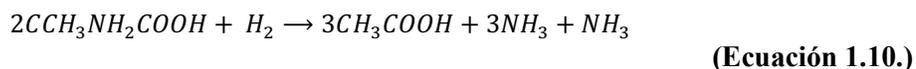


Desaminación oxidativa



$$\Delta G^0 = +4.2 \text{ kJ/mol}$$

Desaminación reductiva



$$\Delta G^0 = -77 \text{ kJ/mol}$$

Todas las rutas de degradación de aminoácidos implican la generación de AGVs y amoníaco como metabolitos secundarios. La producción de H₂ a partir de sustratos ricos en proteínas, no ha tenido resultados alentadores experimentalmente, puesto que aproximadamente el 90% de la degradación anaerobia de aminoácidos se lleva a cabo mediante la reacción de Stickland la cual no produce H₂, la desaminación oxidativa no es termodinámicamente favorable a menos que PpH₂ sea muy baja y la desaminación reductiva consume H₂ (Dong et al., 2009). Aunado a esto, la generación de amoníaco producida por la degradación de los aminoácidos puede afectar la productividad del sistema como se describe en la sección 1.3.2.9.

Independientemente, de su papel como sustrato directo para la producción de H₂, algunos trabajos han evaluado el efecto de ciertos aminoácidos en la producción de H₂. Sharma y Melkania, 2018 determinaron que algunos aminoácidos como metionina, alanina, histidina, citosina y lisina pueden mejorar las productividades de H₂ en procesos de FO, debido a que su biodisponibilidad puede mejorar el crecimiento y las actividades biológicas de bacterias fermentativas como HPB.

Considerando la potencial influencia de los carbohidratos, proteínas y lípidos en la productividad de los sistemas de FO y debido a que son aspectos que no han sido estudiados a profundidad, la influencia de estas tres biomoléculas en la productividad, velocidad y rendimiento de la producción de H₂ será objetivo de estudio del presente trabajo de investigación.



2. Objetivos y alcances

2.1. Objetivo General

Determinar la influencia de la composición del sustrato sobre la producción de hidrógeno en un sistema discontinuo de fermentación oscura.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto la composición de carbohidratos, proteínas y lípidos del sustrato sobre la productividad de hidrógeno en sistemas discontinuos de fermentación oscura.
- Optimizar la productividad de hidrógeno en sistemas de fermentación oscura discontinuos modificando la composición inicial del sustrato.
- Evaluar la remoción de materia orgánica y la producción de metabolitos secundarios bajo diferentes composiciones de carbohidratos, proteínas y lípidos en el sustrato.

2.3. Alcances

- Se propondrá un modelo matemático que estime los tres objetivos de optimización: producción máxima, tasa máxima específica y rendimiento de producción de hidrógeno.
- Se seleccionará una de las formas canónicas de Scheffe' como modelo de estimación de los tres objetivos de optimización.
- Se determinarán las composiciones de carbohidratos, proteínas y lípidos bajo las cuales se logra maximizar la producción de hidrógeno.



3. Metodología

El trabajo de investigación se realizó en dos etapas. La primera se enfocó en la evaluación de la influencia de las composiciones de carbohidratos, proteínas y lípidos del sustrato sobre la productividad de biohidrógeno en ensayos en modo discontinuo empleando sustratos sintéticos y la segunda, en la maximización de tres objetivos de optimización: la producción máxima de H_2 (H_{max}), la tasa máxima de producción de H_2 (R_{max}) y rendimiento de producción de H_2 (Y_{H_2}). En la Figura 3.1. se presenta el esquema metodológico implementado en el presente estudio y sus diferentes etapas.

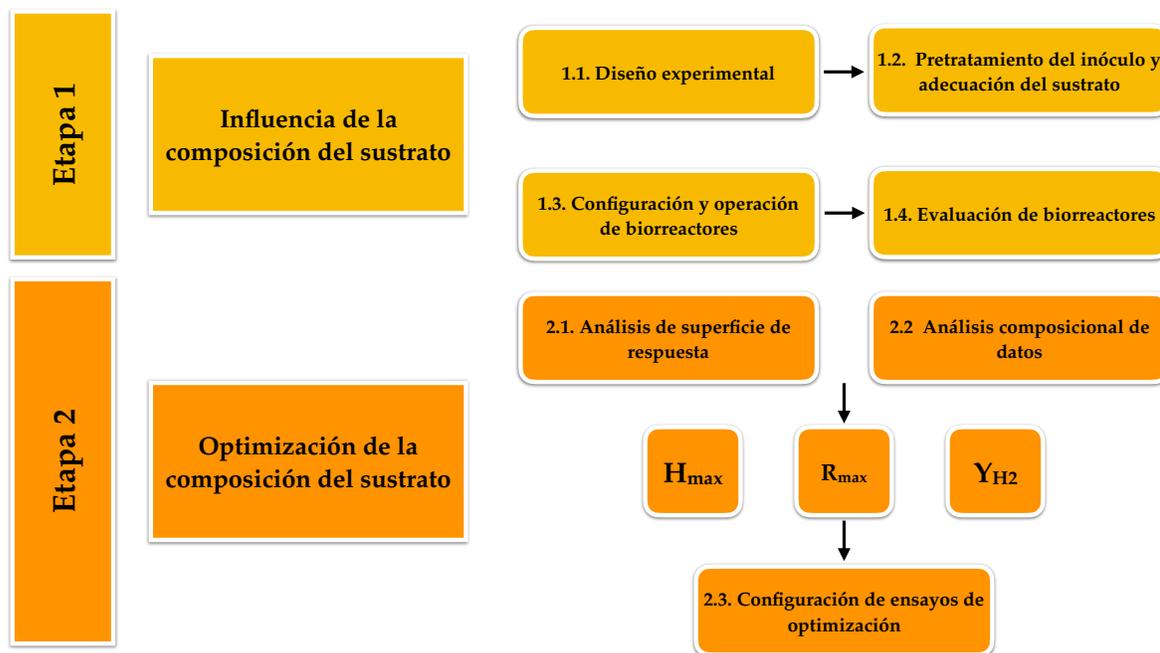


Figura 3.1. Esquema metodológico.

3.1. Etapa 1. Evaluación de la influencia de la composición del sustrato

3.1.1. Diseños experimentales.

Se determinó la influencia de las composiciones de carbohidratos, proteínas y lípidos empleando un sustrato sintético denominado sustrato modelo (descrito en la sección 3.1.2.3.) en H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} mediante dos diseños de experimentos tipo factorial ampliados a diseño central compuesto (DCC) denominados DCC1 y DCC2.

Diseño Central Compuesto 1. Obedece al diseño con el cual se realizó el análisis y el ajuste de los modelos de superficie de respuesta descritos en la sección 3.2.1. Este diseño de experimentos consideró dos variables de entrada u optimización, las cuales fueron relación carbohidratos:proteínas (C:P), y relación carbohidratos:lípidos (C:L) codificadas en la Tabla 3.1. como variables A y B, respectivamente.

Diseño Central Compuesto 2. Obedece al diseño con el cual se realizó el análisis estadístico y ajustes a los modelos de datos composicionales o de mezcla descritos en la sección 3.2.2. Este diseño de experimentos consideró tres variables de entrada u optimización, las cuales fueron concentración de



carbohidratos (g/L), concentración de proteínas (g/L) y concentración de lípidos (g/L), codificadas en la Tabla 3.2. como variables A, B y C respectivamente.

Tabla 3.1. Variables y niveles del diseño experimental DCC1

Variable	Codificación	Nivel alto (+1)	Nivel bajo (-1)	Punto central (0)
Relación carbohidratos:proteínas	A	1.5	0.5	1.0
Relación carbohidratos:lípidos	B	1.5	0.5	1.0

Tabla 3.2. Variables y niveles del diseño experimental DCC2

Variable	Codificación	Nivel alto (+1)	Nivel bajo (-1)	Punto central (0)
Concentración de carbohidratos	A	15	10	-
Concentración de proteínas	B	20	10	25
Concentración de lípidos	C	20	10	15

3.1.2. Inóculo y sustrato.

3.1.2.1. Selección y almacenamiento del inóculo

Como inóculo se empleó lodo granular anaerobio de un reactor UASB de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de una cervecera localizada en el estado de Jalisco, México. El cual se almacenó a una temperatura de 4 °C hasta el proceso de pretratamiento y respectivo uso.

3.1.2.2. Pretratamiento y caracterización del inóculo

Se realizó un pretratamiento térmico a 105 ± 5 °C por un periodo de 24 h, con el propósito de seleccionar las poblaciones de HPB anaerobias estrictas formadoras de endósporas e impedir la presencia de poblaciones que puedan interferir en el proceso de producción de H₂ (Bujanos, 2013; Castillo, 2015). Posterior al pretratamiento térmico, el inóculo se trituró y tamizó con un tamiz N° 65 (210 µm) con el fin de homogeneizar el inóculo y permitir una adecuada caracterización en términos de ST, SV, SF y humedad. Los métodos empleados en la caracterización del inóculo están definidos en la sección 3.4.

3.1.2.3. Sustrato

Con el fin de valorar la reproducibilidad de la influencia de las biomoléculas en la producción de hidrógeno, los diseños experimentales se ejecutaron empleando un sustrato sintético denominado sustrato modelo. En el cual se ajustaron en cada uno de los ensayos las concentraciones de carbohidratos, proteínas y lípidos definidas por los niveles de los diseños experimentales DCC1 y DCC2, empleando D-(+)-glucosa (SIGMA ALDRICH, $\geq 99.5\%$), peptona de caseína (BD BIOXON, $\geq 90\%$) y aceite de oliva extravirgen comercial (Carbonell selección especial, 100%) como matrices de cada una de las biomoléculas, de acuerdo con lo estipulado en la Tabla 3.3., como matrices de cada uno de los componentes, de acuerdo con lo estipulado en la Tabla 3.3., para la disposición del aceite de oliva en los ensayos, se realizó una conversión de peso a volumen asumiendo una densidad del aceite del 0.9172 g/mL, reportada a 20 °C por Mariotti, 2014. como se presenta en el Anexo C. El sustrato modelo se preparó momentos antes de iniciar el ensayo con el fin de prevenir la degradación o descomposición de los componentes del mismo.



Tabla 3.3. Composiciones y relaciones C:P y C:L en ensayos de composición de carbohidratos, proteínas y lípidos en el sustrato.

Ensayo N°	Inóculo (gSV/L)	C (g/L)	P (g/L)	L (g/L)	Relación C:P	Relación C:L
1-2	10	15	10	15	1.5	1
3-4	10	15	10	10	1.5	1.5
5-6	10	10	10	20	1	0.5
7-8-9	10	15	15	15	1	1
10-11	10	15	15	10	1	1.5
12-13	10	10	20	20	0.5	0.5
14-15	10	10	20	10	0.5	1
C*. endógeno	10	0	0	0	N/A	N/A
C*.proteínas (10g/L)	10	0	10	0	N/A	N/A
C*.proteínas (15g/L)	10	0	15	0	N/A	N/A
C*. lípidos (10g/L)	10	0	0	10	N/A	N/A
C*. lípidos (15g/L)	10	0	0	15	N/A	N/A
C*. glucosa (10g/L)	10	10	0	0	N/A	N/A
C*. glucosa (15g/L)	10	15	0	0	N/A	N/A

C*: Control; C: carbohidratos; P: proteínas; L: lípidos. N/A: no aplica

3.1.3. Configuración y operación de biorreactores

3.1.3.1. Configuración de biorreactores

Los ensayos se realizaron en el Sistema Automático de Potencial de Metano II (AMPTS II por sus siglas en inglés) de la empresa Bioprocess Control (Suecia), el cual está compuesto por tres unidades, unidad de incubación de muestras, unidad de absorción de CO₂ y dispositivo de medición de volumen de gas. En la Figura 3.2. se presentan todas las unidades que conforman el sistema AMPTS II.

La unidad de incubación de muestras está compuesta por 15 reactores de vidrio con un volumen total de 500 mL, con dimensiones de 59 x 34 x 28 cm, cada uno de ellos presenta un sistema de control de temperatura con una precisión de 0.2°C hasta 95°C, la unidad provee un sistema de agitación mecánica (intervalo ajustable, velocidad y direcciones de rotación), con una velocidad máxima de 200 rpm.

La unidad de absorción de CO₂ está compuesta por 15 botellas trampa de CO₂ de 100 mL, con dimensiones de 44 x 30 x 6 cm, las cuales son cargadas con 80 mL de solución de NaOH 3 M e indicador de pH (líquido de absorción). La unidad de absorción de CO₂ tiene una eficiencia de adsorción de CO₂ superior al 98%, por lo cual se garantiza que la mayoría del CO₂ producido durante los ensayos es retenido.

El dispositivo de medición de volumen de gas tiene como principio de funcionamiento el desplazamiento de líquido y flotabilidad, presenta 15 celdas de medición de volumen en paralelo. Dimensiones de 1 x 44 x 18 cm y está hecho de plástico. Presenta un sensor incorporado de presión y temperatura, resolución estándar de 9 mL con posibilidad 2 mL (opcional), capacidad de detección acumulada de 12 L por canal



para cada prueba en lote con celda de flujo de 9 mL o hasta 2.5 L por canal para cada prueba en lote con celda de flujo de 2 mL. El rango de medición para la tasa de flujo de gas instantáneo del dispositivo es de 9 a 110 mL/min para celda de flujo de 9 mL y de 2 a 24 mL/min para celda de flujo de 2 mL. Presenta un sistema de adquisición de datos integrado con una capacidad máxima de 2×10^4 aperturas de celda de flujo y una precisión con un coeficiente de variación (CV) menor al 1%.

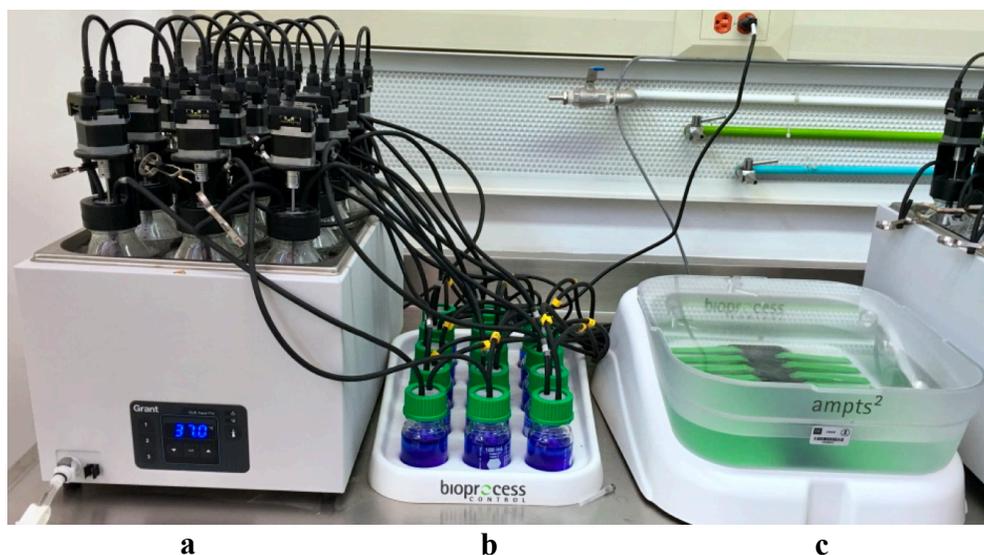


Figura 3.2. Equipo AMPTS II con sus respectivas unidades. a) unidad de incubación de muestras; b) unidad de absorción de CO₂; c) dispositivo de medición de volumen de gas.

3.1.3.2. Operación de biorreactores

Los biorreactores se operaron en lote con un volumen de trabajo de 450 mL por un periodo de 30 horas, a excepción de los controles de lípidos, en los cuales las cinéticas tuvieron un tiempo de 30 días. Mediante la adición de la solución A, se garantizó la proporción necesaria de nutrientes y minerales para un óptimo metabolismo microbiano, del mismo modo, mediante la adición de compuestos como fosfato disódico (Na₂HPO₄), fosfato de amonio (NH₄H₂PO₄) y fosfato dipotásico (K₂HPO₄) se previno la acidificación de los biorreactores por la producción de AGVs (ver anexo A). Se empleó el inóculo el descrito en la sección 3.1.1.2., el pH al inicio de todos los ensayos se ajustó a 7.5 mediante la adición de NaOH 5 N y HCl 5 N. (Nowak et al., 2011). La temperatura de operación fue de 37 °C, se tuvo un patrón de agitación de 120 rpm, programado en un minuto de agitación constante por cada tres minutos de descanso del motor.

Con el objetivo de valorar la influencia de las composiciones y relaciones C:P y C:L del sustrato en H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} , se evaluaron los niveles definidos en el diseño experimental descrito en la sección 3.1.1. empleando el sustrato modelo de acuerdo con las composiciones y relaciones descritas en la Tabla 3.3. En la tabla se pueden observar el número de réplicas de cada uno de los ensayos y las concentraciones en g/L de cada una de las biomoléculas.

3.1.4. Evaluación de biorreactores

La productividad de los biorreactores se evaluó con base en H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} . Aunado a esto, se evaluó la producción de metabolitos secundarios (acetona, etanol, butanol, acetato, propionato, isobutirato, butirato, valerato, isovalerato y caproato) y se determinaron las remociones de carbohidratos, proteínas,



lípidos y demanda química de oxígeno (DQO). Los métodos empleados en la evaluación están definidos en la sección 3.4. A continuación, se describen los mecanismos empleados para determinar los indicadores de H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} .

Productividad máxima de H_2 (H_{max})

La productividad máxima se determinó a las 30 horas de la cinética de producción de hidrógeno empleando los resultados de producción de biogás suministrados por el equipo AMPTS II y realizando la normalización por volumen de reactor en operación empleando la Ecuación 3.1.

$$H_{max} = \frac{\text{Hidrógeno producido (NL)}}{\text{Volumen de operación (L)}} \quad \text{(Ecuación 3.1)}$$

Tasa máxima específica de producción de H_2 (H_{max})

La tasa máxima específica de producción de H_2 se definió como el máximo valor de flujo de producción de biogás generado por hora, en las primeras 30 horas de las cinéticas de producción de H_2 . Considerando la precisión ofrecida por el sistema de adquisición de datos del equipo AMPTS II ($CV < 1\%$), se decidió emplear el dato directo arrojado por el equipo.

Rendimiento de producción de H_2 (Y_{H_2})

El rendimiento de la producción de H_2 se definió como el cociente del número moles de H_2 generados a las 30 horas entre la cantidad de moles de carbohidrato (glucosa) consumidos. En la Ecuación 3.3. se presenta la fórmula empleada para el cálculo de Y_{H_2} .

$$Y_{H_2} = \frac{\text{Hidrógeno producido (mol)}}{\text{Carbohidratos consumidos (mol)}} \quad \text{(Ecuación 3.3)}$$

3.2. Etapa 2. Optimización de la composición del sustrato

El proceso de optimización del presente trabajo se realizó con un enfoque multiobjetivo, pues se procuró la maximización de tres respuestas que reflejan la productividad de sistemas de fermentación oscura FO; como lo son H_{max} , que ofrece una medida de la cantidad de hidrógeno generado por volumen de trabajo dentro del reactor, R_{max} , que es una estimación de la velocidad máxima alcanzada por el sistema para producir hidrógeno y Y_{H_2} , que indica la capacidad de transformación o generación de hidrógeno por carbohidrato consumido dentro del sistema.

Considerando la disponibilidad de dos diseños experimentales, la etapa de optimización se realizó empleando dos metodologías de análisis distintas. La de superficie de respuesta, considerando las relaciones C:P y C:L como variables de optimización con la restricción de que ambas variables dependen de la concentración de carbohidratos; y el análisis de datos composicionales, considerando tres variables composicionales independientes de optimización.

3.2.1. Análisis de superficie de respuesta.

Los resultados obtenidos de H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} a las 30 horas bajo la ejecución del diseño experimental DCC1 de la primera etapa, se ajustaron a los modelos lineales de superficie de respuesta de primer grado para ambas variables (Ecuación 3.4.) y de segundo grado para ambas variables (Ecuación 3.5.), considerando las relaciones C:P y C:L como variables de entrada u optimización y empleando los



estadísticos R^2 y R^2_{adj} (Anexo D) como indicadores de la bondad del ajuste de los datos a los modelos evaluados.

$$f(x, y) = P^{00} + P^{10}x + P^{01}y \quad \text{(Ecuación 3.4.)}$$

$$f(x, y) = P^{00} + P^{10}x + P^{01}y + P^{20}x^2 + P^{11}xy + P^{02}y^2 \quad \text{(Ecuación 3.5.)}$$

Donde, x : Relación carbohidratos:proteínas; y : Relación carbohidratos:lípidos; P^{00} , P^{10} , P^{01} : coeficientes lineales; P^{20} , P^{02} : coeficientes cuadráticos y P^{11} : coeficientes de interacción.

Se procuró encontrar una aproximación de la relación de las variables C:P y C:L con las variables de respuesta u objetivos de optimización H_{max} , R_{max} y Y_{H2} , con el fin de emplear estas relaciones como elementos de decisión en la etapa de optimización. Para el desarrollo de la metodología de superficie de respuesta se utilizó el software MATLAB® empleando la aplicación curve fitting.

3.2.2. Análisis composicional

Los resultados de H_{max} , R_{max} y Y_{H2} obtenidos a las 30 horas bajo la ejecución del diseño experimental DCC2, se ajustaron a las formas canónicas de Scheffe' de los modelos de mezcla para datos composicionales empleando los estadísticos R^2 y R^2_{adj} (Anexo D) como indicadores de la bondad del ajuste de los datos a las formas canónicas de Scheffe'.

Para el adecuado análisis de las composiciones del sustrato se ejecutó el operador o transformación Clausura C, el cual permite la ubicación de los elementos de las composiciones en el espacio muestral Simplex, el operador Clausura C, está definido en la Ecuación 3.6.

Operados Clausura

$$C(x) = \left(\frac{x_1}{\sum_{i=1}^D x_i} \right), \left(\frac{x_2}{\sum_{i=1}^D x_i} \right), \left(\frac{x_3}{\sum_{i=1}^D x_i} \right) \quad \text{(Ecuación 3.6.)}$$

Donde, C: composición del sustrato; x_1 : subcomposición de carbohidratos; x_2 : subcomposición de proteínas y x_3 : subcomposición lípidos.

Las transformaciones obtenidas de las composiciones (concentración de carbohidratos, proteínas y lípidos) se ajustaron a las formas canónicas lineal, cuadrática y cúbica especial de Scheffe', que obedecen a las ecuaciones 3.6., 3.7. y 3.8. respectivamente, para cada una de las respuestas H_{max} , R_{max} y Y_{H2} .

Forma lineal de Scheffe'

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i \quad \text{(Ecuación 3.7.)}$$

Forma cuadrática de Scheffe'

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i + \sum_{i<j=2}^q \sum_{j=2}^q \beta x_{ij} x_i x_j \quad \text{(Ecuación 3.8.)}$$



Forma cúbica especial de Scheffe'

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i + \sum_{i<j=2}^q \beta x_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k=2}^q \beta x_{ijk} x_i x_j x_k \quad \text{(Ecuación 3.9.)}$$

Donde, E: es cada una de las respuestas H_{\max} [NmL H_2/L_{reactor}], R_{\max} [NmL $H_2/L_{\text{reactor}} \cdot \text{día}$], y Y_{H_2} [mol H_2 /mol glucosa] x_i : subcomposición de carbohidratos [%]; x_j : subcomposición de proteínas [%] y x_k : subcomposición lípidos [%], β_i , β_j y β_k : son coeficientes lineales; β_{ij} , β_{ik} , β_{jk} y β_{ijk} : son coeficientes de interacción.

Posteriormente, empleando la forma canónica de Scheffe' que mejor se ajustó a los datos de las composiciones y los tres objetivos de optimización (H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2}), se procuró encontrar una aproximación de la relación de las variables composicionales con las variables de respuesta, con el fin de emplear estas relaciones como elementos de decisión en la etapa de optimización, al igual que lo realizado en la metodología de superficie de respuesta. Para el desarrollo de la metodología de análisis de composicional de datos, se emplearon los software MATLAB® y CoDaPack.

3.2.3. Configuración de ensayos de optimización

Las etapas de optimización se realizaron de forma paralela para H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} empleando el modelo de superficie de respuesta y la forma canónica de Scheffe' que ofrecieron mejores ajustes como herramientas de decisión para la configuración de los ensayos en cada una de las etapas de optimización.

Superficie de respuesta.

Considerando la relación entre las variables C:P, C:L y los objetivos de optimización estimada por el modelo de superficie de respuesta y sus parámetros de ajuste, se procedió a agregar al diseño experimental DCC1 nuevos niveles para cada una de las variables con el fin de acercarse a las potenciales condiciones de optimización para los tres objetivos.

Este procedimiento se realizó reiteradamente hasta determinar las condiciones para las variables C:P y C:L que maximizaron las respuestas H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} simultáneamente bajo las condiciones de experimentación evaluadas.

Análisis composicional.

Considerando la relación entre las composiciones de carbohidratos, proteínas y lípidos del sustrato con los objetivos de optimización estimada por la forma canónica de Scheffe' seleccionada y sus parámetros de ajuste, se procedió a agregar al diseño experimental DCC2 nuevos niveles para cada una de las composiciones con el fin de acercarse a las potenciales condiciones de optimización para los tres objetivos.

Este procedimiento se realizó reiteradamente hasta determinar las composiciones que maximizaron las respuestas H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} simultáneamente bajo las condiciones de experimentación evaluadas.

El ajuste de los sustratos en los ensayos de optimización se realizó de la manera descrita en la sección 3.1.2.3. La configuración y operación de los biorreactores en las etapas de optimización siguió los parámetros definidos en la sección 3.1.3. La productividad de los biorreactores se evaluó con base en los parámetros definidos en la sección 3.1.4. La configuración y operación de los biorreactores fueron



definidos con base los parámetros definidos en la sección 3.1.3. Finalmente, La productividad de los biorreactores se evaluó con base en los mismos parámetros definidos en la sección 3.1.4.

3.4. Métodos analíticos

En la Tabla 3.4, se presentan las técnicas que se emplearon en la caracterización y determinación de los diferentes parámetros evaluados durante toda la experimentación, las cuales permitieron conocer las características del inóculo y dar seguimiento a todos los ensayos que se realizaron en la experimentación del proyecto.

Tabla 3.4. Métodos analíticos

Determinación	Método
Humedad	Gravimetría, se obtiene por diferencia entre la masa inicial y los sólidos totales determinados (APHA, 2540 B)
Sólidos totales (ST)	Gravimetría. Sólidos secados a una temperatura de 103 a 105°C (APHA, 2540- B)
Sólidos volátiles (SV) y sólidos fijos (SF)	Gravimetría. Sólidos previamente secados a 103-105°C e incinerados a 550°C (APHA, 2540-E)
Demanda química de oxígeno (DQO)	Fotometría. Digestión por reflujo cerrado a 150°C con reactivos preparados HACH, lectura a 600 nm (APHA, 5220-D)
Carbohidratos totales	Fotometría. Fenol y ácido sulfhídrico 490 nm por el método colorímetro de Dubois (Dubois et al., 1956)
Grasas y aceites	Gravimetría. Extracción con mezcla cloroformo-metanol y posterior evaporación (Método Soxhlet modificado de APHA, 5520-D)
Proteínas totales	Fotometría. Método modificado de Lowry, 1951 (Lowry., 1951)
pH	Medido con potenciómetro Fisher Scientific™ accumet™ AE150 pH
Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)	Cromatógrafo de gases (CG) (7890B, Agilent Technologies, USA) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna DB-FFAP de 15 m de longitud (530 µm x 1 µm). Las temperaturas del inyector y detector fueron mantenidas a 190 y 210 °C, respectivamente. Se empleará nitrógeno como gas acarreador, con un flujo de 25 mL/min.
Composición del biogás	Cromatógrafo de gases (SRI 8610c) equipado con detector de conductividad térmica, columna de acero inoxidable empacada con sílica gel (8600-PK1A), helio como gas de arrastre con flujo de 27 mL/min. Inyección de 0.5 ml de biogás a las siguientes condiciones: 1 min a 50 °C, incremento 50 °C/min hasta 100 °C y se mantiene por 1 min. La temperatura del detector es de 150 °C.



4. Resultados

4.1. Etapa 1. Evaluación de influencia de biomoléculas

4.1.1. Caracterización del inóculo

En la Tabla 4.1. se presentan las características del lodo granular anaerobio pretratado en términos ST, SV, SF, % de humedad y tamaño de partícula. En la Figura 4.1., se presenta el inóculo antes y después del proceso de pretratamiento térmico.

Tabla 4.1. Caracterización del inóculo pretratado

Parámetro	Promedio \pm s	Máximo	Mínimo
ST (g/g inóculo)	0.973 \pm 0.001	0.97	0.971
SV (g/g inóculo)	0.783 \pm 0.028	0.804	0.750
SF (g/g inóculo)	0.190 \pm 0.027	0.222	0.170
Humedad (%)	2.708 \pm 0.130	2.853	2.60
Tamaño de partícula	< 210 μ m	-	-



a



b

Figura 4.1. Inóculo. a) lodo granular anaerobio; b) lodo granular anaerobio después del pretratamiento (b).

4.1.2. Evaluación de influencia de biomoléculas en la producción de H₂.

En la Tabla 4.2. se presentan los resultados de las respuestas de productividad (H_{max}), tasa máxima específica (R_{max}) y rendimiento de producción de H₂ (Y_{H_2}) a las 30 horas realizados bajo los diseños experimentales DCC1 y DCC2 descritos en la sección 3.1.1. junto a los respectivos controles de carbohidratos, lípidos, proteínas y endógeno.

Considerando que la productividad de hidrógeno a partir del control de glucosa de 15 g/L fue de 2206 ± 17 NmL H₂/L_{Reactor}, y la productividad a partir del control de glucosa de 10 g/L fue de 1444 ± 28 NmL H₂/L_{Reactor}, es posible deducir con base en los resultados, que hay cierto grado de correlación en la productividad máxima de hidrógeno y la concentración de glucosa, conjetura que está de acuerdo con lo descrito por Dong *et al.*, 2009 los cuales definen que la concentración de carbohidratos dicta el grado de productividad del proceso en términos de H_{max} .

**Tabla 4.2. Resultados de H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} , bajo distintas configuraciones de sustrato.**

Ensayo N°	C (g/L)	P (g/L)	L (g/L)	H_{max} (NmL $H_2/L_{Reactor} \pm s$)	R_{max} (NL $H_2/L_{Reactor}/día \pm s$)	Y_{H_2} (mol H_2 /mol glucosa)
1-2	15	10	15	839 ± 57	3.4 ± 0.7	0.51 ± 0.04
3-4	15	10	10	1639 ± 60	7.8 ± 0.5	1 ± 0.03
5-6	10	10	20	337 ± 75	1.2 ± 0.2	0.31 ± 0.07
7-8-9	15	15	15	1362 ± 138	6.5 ± 0.3	0.84 ± 0.09
10-11	15	15	10	1137 ± 51	4.9 ± 1.8	0.71 ± 0.03
12-13	10	20	20	744 ± 180	3.2 ± 0.9	0.69 ± 0.19
14-15	10	20	10	583 ± 95	2.3 ± 0.6	0.55 ± 0.09
C*. endógeno	0	0	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
C*.proteínas (10g/L)	0	10	0	32 ± 7	1 ± 0.1	0 ± 0
C*.proteínas (15g/L)	0	15	0	53 ± 15	1.3 ± 0.1	0 ± 0
C*. lípidos (10g/L)	0	0	10	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
C*. lípidos (15g/L)	0	0	15	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
C*. glucosa (10g/L)	10	0	0	1444 ± 28	4.4 ± 0.2	1.32 ± 0.01
C*. glucosa (15g/L)	15	0	0	2206 ± 17	4.1 ± 0.0	1.29 ± 0.02

C*: Control; C: carbohidratos; P: proteínas; L: lípidos. N/A: no aplica

Por otra parte, los resultados demuestran que no hay una correlación definida entre la concentración de glucosa y los indicadores tasa máxima específica y rendimiento de producción. En primer lugar, porque las respuestas alcanzadas por ambos controles no distan en gran medida, a pesar de haber diferencias significativas en el caso de R_{max} ; y en segundo, porque tanto la tasa máxima (4.4 ± 0.2 NL $H_2/L_{Reactor}/día$) como el rendimiento más alto de producción (1.32 ± 0.01 mol H_2 /mol glucosa) lograda con ambos controles, se alcanzaron con la concentración de 10g/L de glucosa, y los más bajos (4.1 ± 0.0 NL $H_2/L_{Reactor}/día$ y 1.29 ± 0.02 mol H_2 /mol glucosa) se lograron con el ensayo de 15g/L.

La producción de hidrógeno a partir de lípidos como único sustrato (aceite de oliva) no fue efectiva, pues tras de 30 días de proceso fermentativo no hubo producción alguna de hidrógeno, lo cual se justifica en el hecho de que a pesar de que los microorganismos pueden metabolizar de forma anaerobia los lípidos, la producción de H_2 , mediante la ruta de B-oxidación no es termodinámicamente favorable (Ecuación 1.7.).(Dong *et al.*, 2009)

Del mismo modo, en el caso de las proteínas (peptona de caseína), la producción de H_2 no supero los 53 ± 15 NmL con una concentración de 15 g/L. Esta baja producción se debe a que las rutas de catabolismo anaerobio de aminoácidos como la reacción de Stickland (Ecuación 1.8.) y las rutas de desaminación oxidativa (Ecuación 1.9.) y desaminación reductiva (Ecuación 1.10.) termodinámicamente no tienen la capacidad de producir hidrógeno en los sistemas. La poca producción de hidrógeno demostrada por los controles de proteínas se puede atribuir a procesos anabólicos de gluconeogénesis a partir del esqueleto de ácido carboxílico presente en aminoácidos, donde la glucosa generada posteriormente derivó el poco hidrógeno producido en el sistema (Dong *et al.*, 2009; Munoz-Elias y McKinney, 2006).



4.2. Etapa 2. Optimización de biomoléculas en sustrato

4.2.1. Análisis de superficie de respuesta

Ajuste de modelos a H_{max}

Considerando que el estadístico R^2 para el modelo de primer grado fue de 0.546 y para el modelo de segundo grado fue de 0.9623 (Figura 4.2.), el ajuste de las variables C:P y C:L a la respuesta de H_{max} , presentó significativamente mejor ajuste al modelo lineal de segundo grado para ambas variables (Ecuación 3.5.)

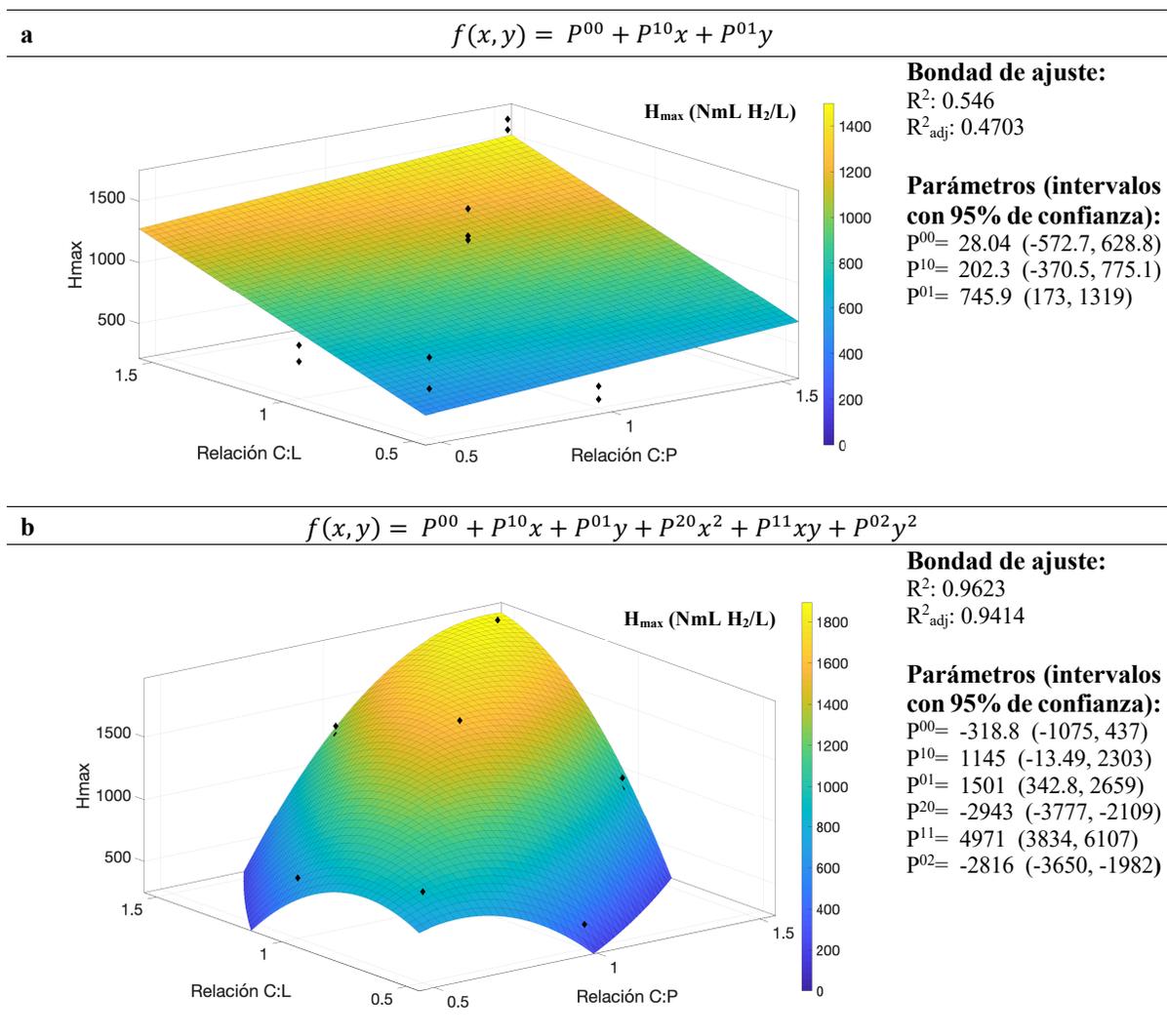


Figura 4.2. Gráficas de superficie de respuesta. H_{max} (NmL $H_2/L_{Reactor}$). vs. C:P y C:L. a) ajuste a modelo de primer grado; b) ajuste a modelo de segundo grado.

Puesto que el coeficiente de determinación R^2 presenta la limitación de aumentar con el número de parámetros del modelo, se descartó la presencia de este sesgo estadístico empleando el R^2_{adj} , el cual ajusta el coeficiente de determinación al número de parámetros del modelo, y por lo tanto, permite la comparación entre modelos con diferentes número de predictores. El R^2_{adj} , al igual que el R^2 , presentó



significativamente mejor ajuste al modelo lineal de segundo grado, con un R^2_{adj} de 0.9414, a diferencia del R^2_{adj} de 0.4703 alcanzado por el modelo de primer grado para ambas variables. Teniendo en consideración la superioridad para representar la respuesta H_{max} demostrada por el modelo lineal de segundo grado en comparación con el modelo de primer grado, se determinó como herramienta de optimización el modelo lineal de segundo grado para las variables C:P y C:L.

Ajuste de modelos a R_{max}

Considerando que el estadístico R^2 para el modelo de primer grado fue de 0.4724 y para el modelo de segundo grado fue de 0.927 (Figura 4.3.), el ajuste de las variables C:P y C:L a la respuesta de R_{max} , presentó significativamente mejor ajuste al modelo lineal de segundo grado para ambas variables (Ecuación 3.5.)

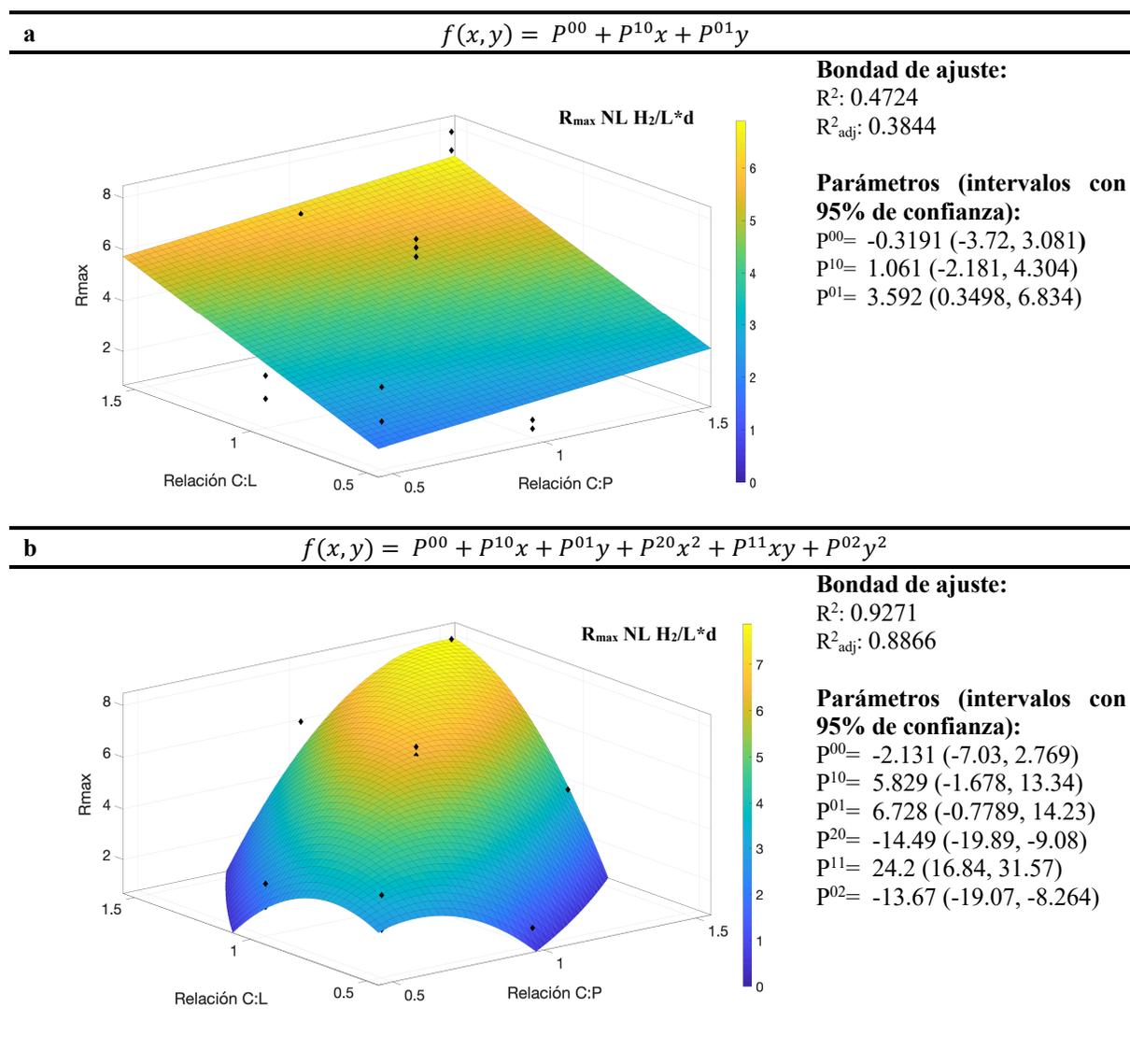


Figura 4.3. Gráficas de superficie de respuesta. R_{max} (NL $H_2/L_{Reactor}$ *día). vs. C:P y C:L. a) ajuste a modelo de primer grado; b) ajuste a modelo de segundo grado.



A pesar de tener seis parámetros predictores, en comparación con los tres que presenta el modelo de primer grado, el coeficiente de determinación R^2_{adj} del modelo lineal de segundo grado fue superior, con un valor de 0.8866, a diferencia del R^2_{adj} alcanzado por el modelo de primer grado que fue sólo de 0.3844.

Valorando la eficacia demostrada por el modelo lineal de segundo grado para representar R_{max} con base en los coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} , se seleccionó este modelo como herramienta de optimización en la metodología de superficie para maximizar el objetivo R_{max} .

Ajuste de modelos a Y_{H2}

El ajuste de la respuesta Y_{H2} , al igual que H_{max} y R_{max} fue mejor representada por el modelo lineal de segundo grado para las variables C:P y C:L (Figura 4.4.); considerando estadísticos R^2 y R^2_{adj} de 0.9009 y 0.8458 respectivamente, a diferencia de los coeficientes de determinación R^2 de 0.3462 y R^2_{adj} de 0.2372 alcanzados por el modelo lineal de primer grado.

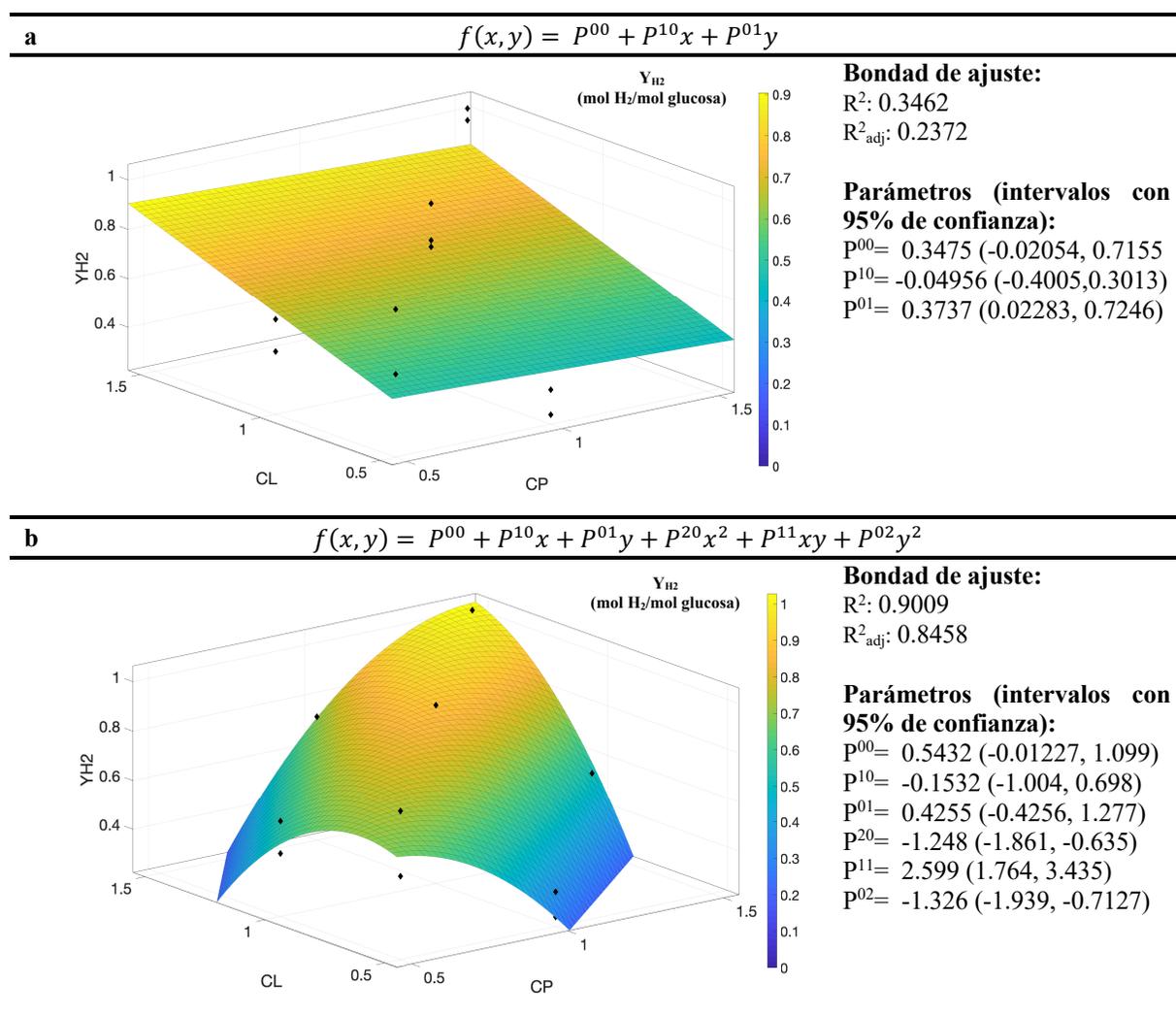


Figura 4.4. Gráficas de superficie de respuesta. Y_{H2} . (mol H_2 /mol glucosa). vs. C:P y C:L. a) ajuste a modelo de primer grado; b) ajuste a modelo de segundo grado.



4.2.2. Análisis composicional de datos

Para proceder con el análisis composicional de datos, se realizó la transformación de las variables y los controles de concentración de carbohidratos, proteínas y lípidos descritas en el diseño experimental DCC1, empleando el operador clausura (Ecuación 3.6.) y el software CoDaPack - Version 2.02.21, como se presenta en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Transformación de variables composicionales

Ensayo N°	Carbohidratos (g/L)	Proteínas (g/L)	Lípidos (g/L)	% C	% P	% L
1-2	15	10	15	37.50	25.00	37.50
3-4	15	10	10	42.90	28.60	28.60
5-6	10	10	20	25.00	25.00	50.00
7-8-9	15	15	15	33.30	33.30	33.30
10-11	15	15	10	37.50	37.50	25.00
12-13	10	20	20	20.00	40.00	40.00
14-15	10	20	10	25.00	50.00	25.00
C. endógeno	0	0	0	0.00	0.00	0.00
C. proteínas (15g/L)	0	15	0	0.00	100.00	0.00
C. lípidos (15g/L)	0	0	15	0.00	0.00	100.00
C. carbohidratos (15g/L)	15	0	0	100.00	0.00	0.00

C: control

Ajuste de modelos a H_{max}

El ajuste a la respuesta H_{max} fue significativamente mejor para la forma cúbica especial de Scheffe', con coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.9294 y 0.9045 respectivamente. Las formas lineal y cuadrática de Scheffe' presentaron coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} inferiores como se presenta en la Figura 4.5., por lo cual se seleccionó a la forma canónica cúbica especial de Scheffe' como herramienta de optimización de este objetivo.

Ajuste de modelos a R_{max}

Considerando los estadísticos R^2 (0.8169) y R^2_{adj} (0.7523) alcanzados por el modelo cúbico especial de Scheffe', para representar el objetivo de optimización R_{max} (Figura 4.6.), en comparación con los estadísticos R^2 (0.6980) y R^2_{adj} (0.6915) alcanzados por el modelo cuadrático de Scheffe' y los R^2 (0.2577) y R^2_{adj} (-0.0042) logrados por el modelo lineal de Scheffe', se determinó al modelo cúbico especial de Scheffe' como herramienta de optimización para la respuesta R_{max} .

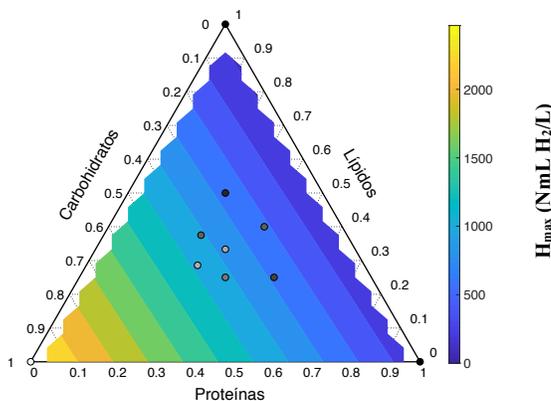
Ajuste de modelos a Y_{H2}

Al igual que los objetivos H_{max} y R_{max} , el ajuste a la respuesta Y_{H2} fue estadísticamente mejor a la forma canónica cúbica especial de Scheffe', con coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.9041 y 0.8702 respectivamente como se presenta en la Figura 4.7. Considerando esa situación, se seleccionó la forma canónica cúbica especial de Scheffe' como herramienta de optimización de este objetivo.



a

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i$$



Bondad de ajuste:

R^2 : 0.546

R^2_{adj} : 0.7358

Parámetros:

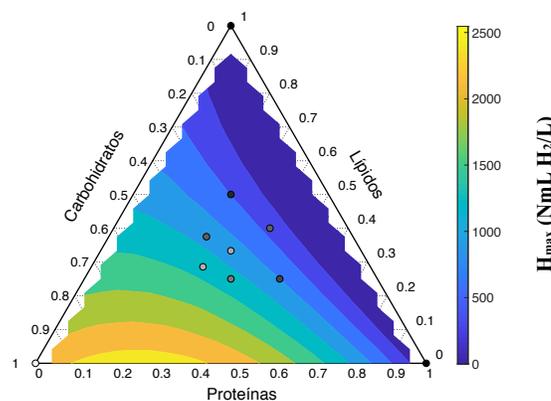
$\beta_1 = 2466.74$

$\beta_2 = 245.57$

$\beta_3 = 104.50$

b

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i + \sum_{i<j=2}^q \sum_{i<j=2}^q \beta x_{ij} x_i x_j$$



Bondad de ajuste:

R^2 : 0.8723

R^2_{adj} : 0.8273

Parámetros:

$\beta_1 = 2220.71$

$\beta_2 = 29.59$

$\beta_3 = -19.19$

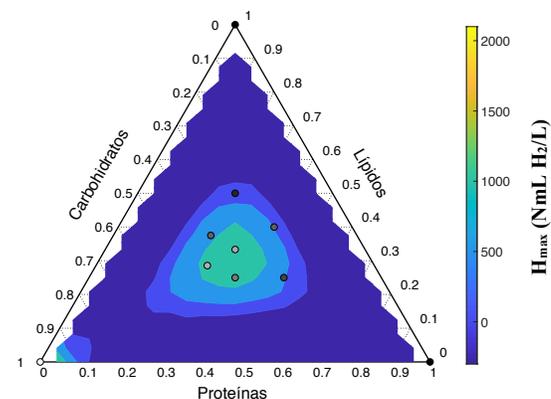
$\beta_{12} = 4681.36$

$\beta_{13} = 49.64$

$\beta_{23} = -2011.67$

c

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i + \sum_{i<j=2}^q \sum_{i<j=2}^q \beta x_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k=2}^q \sum_{i<j<k=2}^q \beta x_{ijk} x_i x_j x_k$$



Bondad de ajuste:

R^2 : 0.9294

R^2_{adj} : 0.9045

Parámetros:

$\beta_1 = 2221.13$

$\beta_2 = 41.96$

$\beta_3 = -6.81$

$\beta_{12} = -18281.25$

$\beta_{13} = -22912.97$

$\beta_{23} = -17205.73$

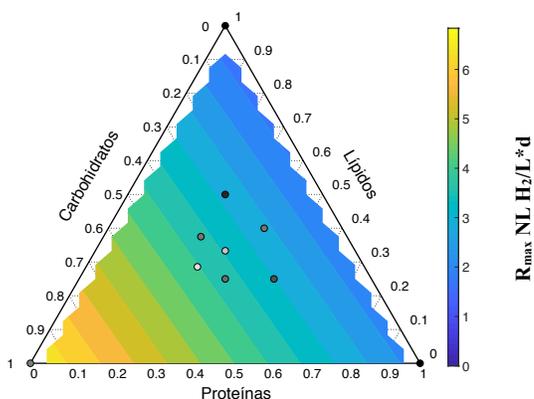
$\beta_{123} = 192235.41$

Figura 4.5. Diagramas ternarios. H_{max} . vs. C, P y L. a) ajuste a modelo lineal de Scheffe'; b) ajuste a modelo cuadrático de Scheffe'; c) ajuste a modelo cúbico especial de Scheffe'.



a

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i$$



Bondad de ajuste:

R^2 : 0.2577

R^2_{adj} : -0.0042

Parámetros:

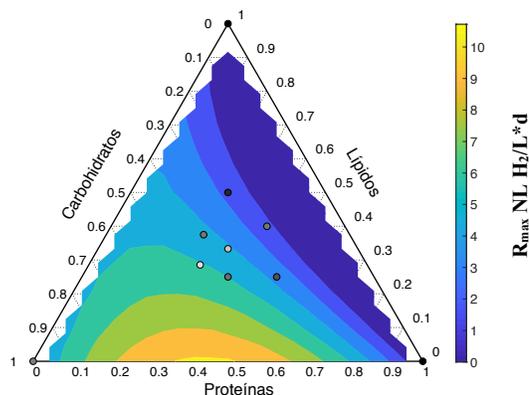
β_1 = 6.83

β_2 = 2.16

β_3 = 1.65

b

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i + \sum_{i<j=2}^q \sum_{i<j=2}^q \beta x_{ij} x_i x_j$$



Bondad de ajuste:

R^2 : 0.6980

R^2_{adj} : 0.5915

Parámetros:

β_1 = 4.18

β_2 = -0.04

β_3 = -0.11

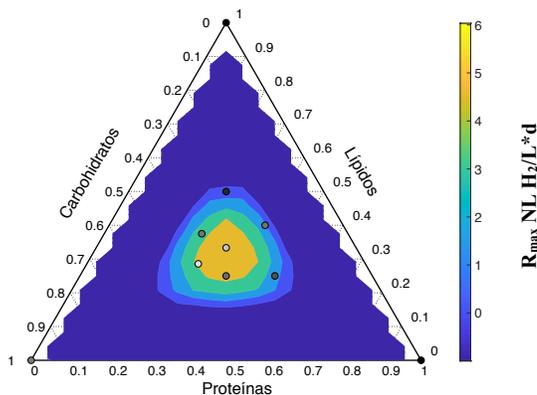
β_{12} = 34.28

β_{13} = 12.36

β_{23} = -16.33

c

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i + \sum_{i<j=2}^q \sum_{i<j=2}^q \beta x_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k=2}^q \sum_{i<j<k=2}^q \beta x_{ijk} x_i x_j x_k$$



Bondad de ajuste:

R^2 : 0.8169

R^2_{adj} : 0.7523

Parámetros:

β_1 = 4.18

β_2 = 0.03

β_3 = -0.04

β_{12} = -91.76

β_{13} = -113.67

β_{23} = -99.73

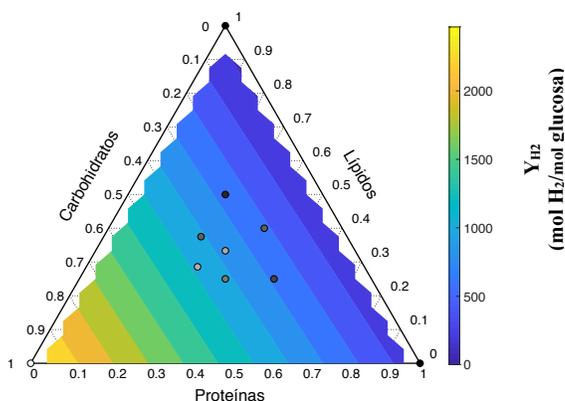
β_{123} = 1055.18

Figura 4.6. Diagramas ternarios. R_{max} . vs. C, P y L. a) ajuste a modelo lineal de Scheffe'; b) ajuste a modelo cuadrático de Scheffe'; c) ajuste a modelo cúbico especial de Scheffe'.



a

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i$$



Bondad de ajuste:

R^2 : 0.7440

R^2_{adj} : 0.6536

Parámetros:

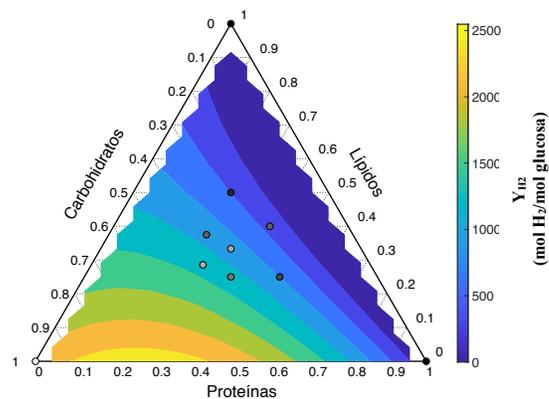
$\beta_1 = 1.48$

$\beta_2 = 0.26$

$\beta_3 = 0.15$

b

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i + \sum_{i<j=2}^q \sum_{i<j=2}^q \beta x_{ij} x_i x_j$$



Bondad de ajuste:

R^2 : 0.8680

R^2_{adj} : 0.8214

Parámetros:

$\beta_1 = 1.30$

$\beta_2 = -0.01$

$\beta_3 = -0.01$

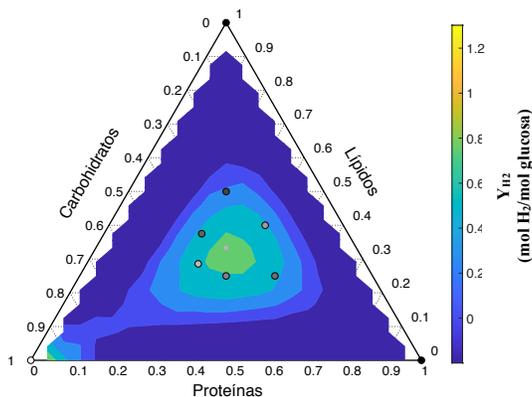
$\beta_{12} = 2.53$

$\beta_{13} = -1.31$

$\beta_{23} = 1.24$

c

$$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i + \sum_{i<j=2}^q \sum_{i<j=2}^q \beta x_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k=2}^q \sum_{i<j<k=2}^q \beta x_{ijk} x_i x_j x_k$$



Bondad de ajuste:

R^2 : 0.9041

R^2_{adj} : 0.8702

Parámetros:

$\beta_1 = 1.30$

$\beta_2 = -0.01$

$\beta_3 = -0.01$

$\beta_{12} = -8.15$

$\beta_{13} = -11.9$

$\beta_{23} = -5.82$

$\beta_{123} = 89.44$

Figura 4.7. Diagramas ternarios. Y_{H_2} . vs. C, P y L. a) ajuste a modelo lineal de Scheffe'; b) ajuste a modelo cuadrático de Scheffe'; c) ajuste a modelo cúbico especial de Scheffe'.



4.2.3. Configuración de ensayos de optimización

4.2.3.1. Optimización de H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} empleando las relaciones C:P y C:L como variables de optimización

El análisis de superficie de respuesta realizado en la sección 4.2.1., indicó que las variables C:P y C:L presentaron influencias similares en los tres objetivos de optimización. No sólo porque las variables se ajustaron mejor al mismo modelo de superficie de respuesta (modelo lineal de segundo grado), como se presenta en la Tabla 4.4., sino porque H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} presentaron mejores respuestas al aumento de las relaciones C:P y C:L del sustrato como se evidencia en las Figuras 4.2.b., 4.3.b. y 4.4.b.

Tabla 4.4. Bondad de ajustes de los modelos de superficie de respuesta a los objetivos H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} .

Modelo	$f(x, y) = P^{00} + P^{10}x + P^{01}y$		$f(x, y) = P^{00} + P^{10}x + P^{01}y + P^{20}x^2 + P^{11}xy + P^{02}y^2$	
Respuesta	R^2	R^2_{adj}	R^2	R^2_{adj}
H_{\max}	0.5466	0.471	0.9623	0.9414
R_{\max}	0.4724	0.3844	0.9271	0.8866
Y_{H_2}	0.3462	0.2372	0.9009	0.8458

Maximización simultánea de H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} empleando las relaciones C:P y C:L

Con el fin de aumentar la productividad, velocidad y rendimiento de la producción de H_2 forma paralela, se decidió emplear la capacidad del modelo lineal de segundo grado (Ecuación 3.5.) para describir las respuestas H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} junto a la similitud de la influencia de las variables C:P y C:L en las tres respuestas como herramientas de decisión en la configuración de los ensayos de optimización.

Para facilitar la visualización de la influencia de las variables C:P y C:L en las respuestas H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} y poder considerar un acercamiento a las relaciones C:P y C:L adecuadas u óptimas para maximizar la productividad, velocidad y rendimiento de la producción, se construyeron las gráficas de contorno presentadas en las Figuras 4.8., 4.9. y 4.10., empleando los ajustes al modelo de superficie de respuesta realizados en la etapa 4.2.1.

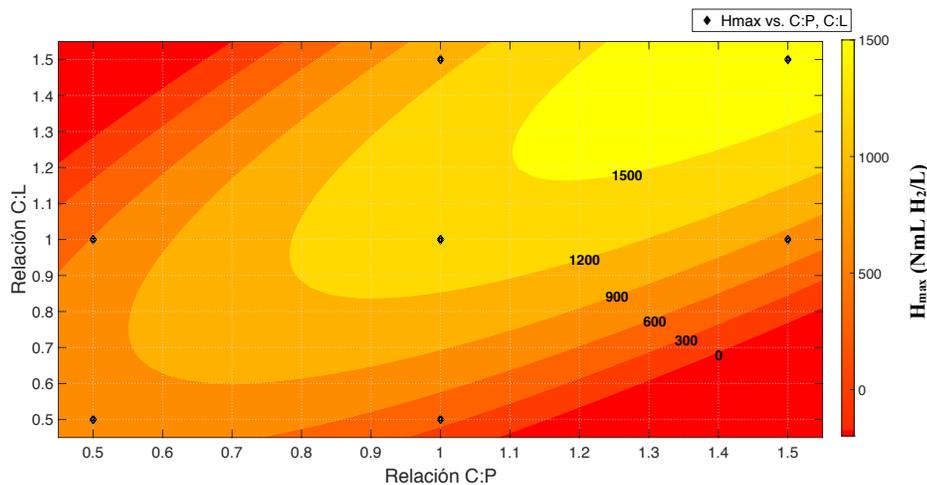


Figura 4.8. Gráfica de contorno. H_{\max} (mL H_2/L_{reactor}). vs. C:P y C:L.

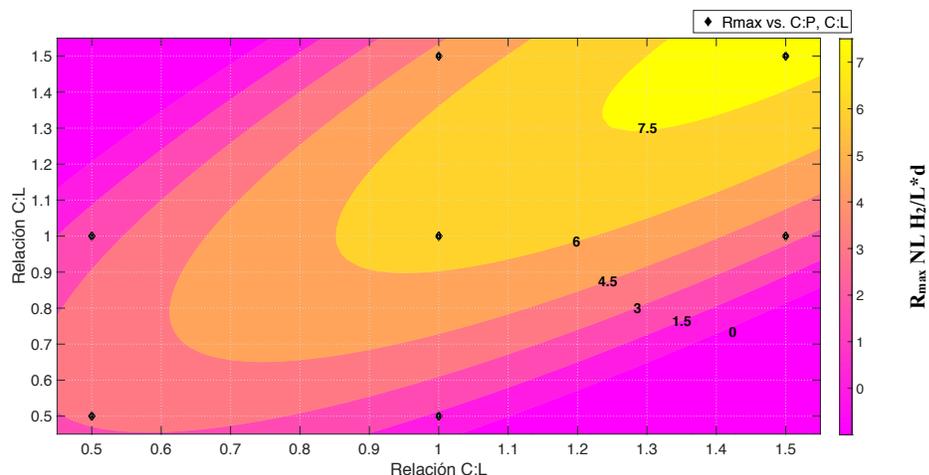


Figura 4.9. Gráfica de contorno. R_{\max} (NL $H_2/L_{\text{Reactor}}/\text{día} \pm s$) vs. C:P y C:L.

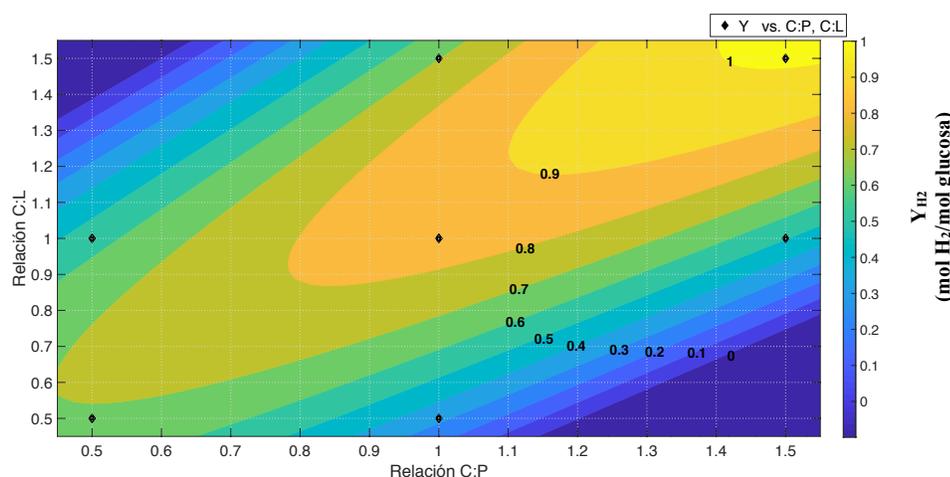


Figura 4.10. Gráfica de contorno. Y_{H_2} (mol H_2/mol glucosa) vs. C:P y C:L.

Las líneas de contorno sugieren que los valores óptimos de las variables C:P y C:L en el proceso se encuentran inmersos en valores superiores a 1.5 para ambas variables, donde la productividad del proceso puede superar los valores de 1639 ± 60 NmL H_2/L_{Reactor} para H_{\max} , 7.8 ± 0.5 NL $H_2/L_{\text{Reactor}}/\text{día}$ para R_{\max} y 1 ± 0.03 mol H_2/mol glucosa para Y_{H_2} alcanzados con las relaciones 1.5 de C:P y C:L.

Por tal razón, con base en estos resultados y la solución analítica del modelo lineal de segundo grado empleando los estimadores determinados para cada una de las respuestas (Figuras 4.2.b., 4.3.b. y 4.4.b), se decidió agregar paulatinamente nuevos niveles más al diseño experimental DCC1, manteniendo la misma concentración de carbohidratos como se presenta en la Tabla 4.5.

Con los datos de las respuestas H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} obtenidos a partir de la modificación del diseño experimental DCC1, se realizaron nuevos ajustes al modelo descrito por la Ecuación 3.5.

El análisis estadístico del modelo de superficie de respuesta para el objetivo H_{\max} , al igual que el primer análisis realizado describe un buen ajuste de los datos al modelo, con coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.9588 y 0.9467 respectivamente, por lo que el grado de precisión del modelo obtenido, continúa siendo relativamente bueno y podría emplearse potencialmente para estimar la producción máxima de hidrógeno después atravesar una etapa de validación del mismo.



Tabla 4.5. Modificación del DCC1.

Componentes del sustrato			Relaciones	
Carbohidratos (g/L)	Proteínas (g/L)	Lípidos (g/L)	C:P	C:L
10	20	20	0.5	0.5
10	10	20	1	0.5
10	20	10	0.5	1
15	15	15	1	1
15	10	15	1.5	1
15	15	10	1	1.5
15	10	10	1.5	1.5
15	7.5	10	2	1.5
15	7.5	7.5	2	2
15	6	6	2.5	2.5
15	1.9	2.13	7.9	7.0

Los parámetros de ajuste del modelo lineal de segundo grado a la respuesta H_{\max} bajo el diseño DCC1 modificado con un 95% de confianza son: $P^{00} = 81.35$ (-162.1, 324.8); $P^{10} = 232.3$ (-315.4, 780); $P^{01} = 1115$ (410.9, 1820); $P^{20} = -1999$ (-2553, -1444); $P^{11} = 4060$ (2842, 5277); $P^{02} = -2216$ (-2984, -1448).

El segundo ajuste realizado al modelo de superficie de respuesta para el objetivo H_{\max} , sustenta el comportamiento de las variables evidenciado en el primer análisis. Se puede observar que el aumento de las relaciones C:P y C:L en el sustrato, aumentó la productividad máxima del sistema significativamente, pasando de 1639 ± 60 NmL H_2/L_{reactor} con relaciones C:P y C:L de 1.5 a 2605 ± 54 NmL H_2/L_{reactor} con relaciones 2.5 de C:P y C:L, como se presenta en la Figura 4.11.

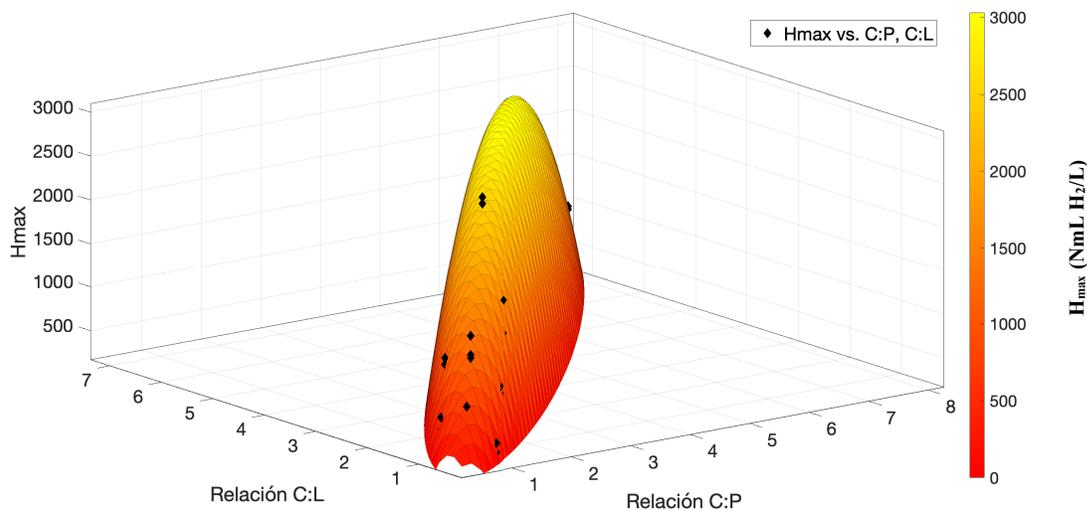


Figura 4.11. Superficie de respuesta. H_{\max} (mL H_2/L_{reactor}). vs. C:P y C:L.

El análisis estadístico del modelo de superficie de respuesta para el objetivo R_{\max} , al igual que el primer análisis realizado para esta respuesta, describe un buen ajuste de los datos al modelo, con coeficientes de



determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.9226 y 0.8998 respectivamente, por lo que el grado de precisión del modelo obtenido, continúa siendo relativamente bueno y al igual que sucede con la respuesta H_{max} , podría emplearse potencialmente para estimar la tasa máxima específica de producción de hidrógeno después de atravesar una etapa de validación del mismo.

Los parámetros de ajuste del modelo a la respuesta R_{max} bajo el diseño DCC1 modificado con un 95% de confianza son: $P^{00} = -1.124$ (-3.249, 1.001); $P^{10} = 2.811$ (-1.969, 7.591); $P^{01} = 5.426$ (-0.7242, 11.58); $P^{20} = -12.27$ (-17.11, -7.434); $P^{11} = 24.1$ (13.47, 34.73); $P^{02} = -12.69$ (-19.39, -5.987).

Al haber incrementado las relaciones C:P y C:L mediante la adición de nuevos puntos al diseño experimental DCC1, la tasa máxima específica de producción de H_2 del sistema aumentó significativamente, pasando de 7.8 ± 0.5 NL $H_2/L_{Reactor}/día$ con relaciones C:P y C:L de 1.5 a 14.8 ± 1.4 NL $H_2/L_{Reactor}/día$ con relaciones 2.5 de C:P y C:L, como se presenta en la Figura 4.12.

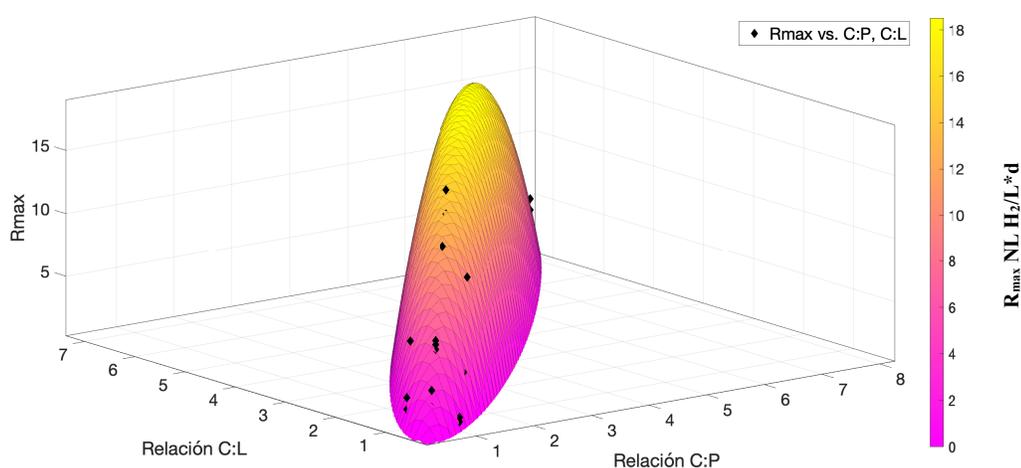


Figura 4.12. Superficie de respuesta. R_{max} (NL $H_2/L_{Reactor}/día$). vs. C:P y C:L.

El análisis estadístico del modelo de superficie de respuesta para el objetivo Y_{H_2} , al igual que el primer análisis realizado para esta respuesta, describe un buen ajuste de los datos al modelo, con coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.8989 y 0.8692 respectivamente, por lo que el grado de precisión del modelo obtenido, continúa siendo relativamente bueno y al igual que sucede con las respuestas H_{max} y R_{max} , el modelo podría emplearse potencialmente para estimar el rendimiento de producción de hidrógeno después de atravesar una etapa de validación del mismo bajo las condiciones de experimentación evaluadas.

Los parámetros de ajuste del modelo a la respuesta Y_{H_2} bajo el diseño DCC1 modificado con un 95% de confianza son: $P^{00} = 0.3031$ (0.1036, 0.5027); $P^{10} = -0.08623$ (-0.5351, 0.3626); $P^{01} = 0.7406$ (0.1631, 1.318); $P^{20} = -1.203$ (-1.658, -0.7489); $P^{11} = 2.564$ (1.566, 3.562); $P^{02} = -1.447$ (-2.077, -0.8178).

Al haber incrementado las relaciones C:P y C:L mediante la adición de nuevos puntos al diseño experimental DCC1, el rendimiento de producción de H_2 , al igual que sucedió con los objetivos H_{max} y R_{max} aumentó significativamente, pasando de 1 ± 0.03 mol H_2/mol glucosa con relaciones C:P y C:L de 1.5 a 1.48 ± 0.24 mol H_2/mol glucosa con relaciones 2.5 de C:P y C:L, como se presenta en la Figura 4.13.

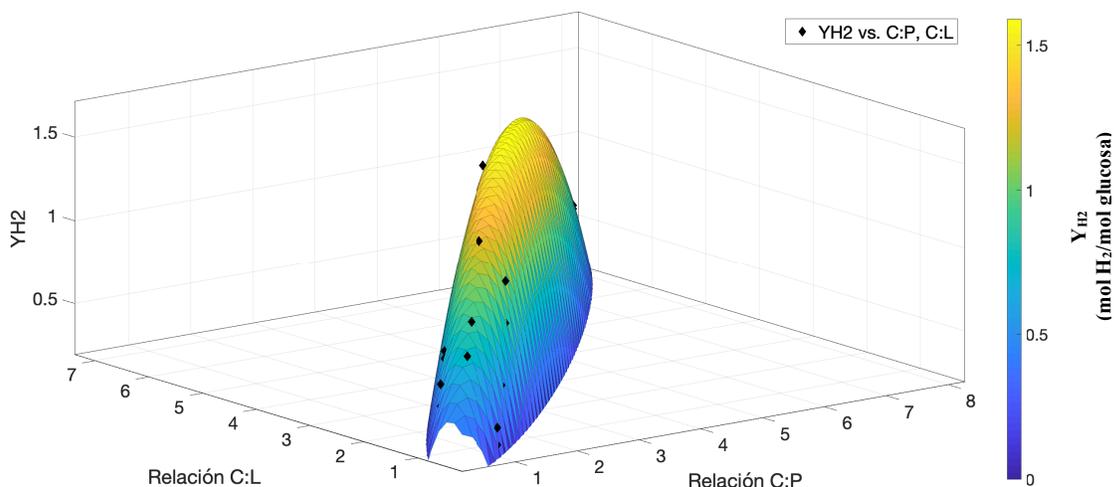


Figura 4.13. Superficie de respuesta. Y_{H_2} (mol H_2 /mol glucosa). vs. C:P y C:L.

La búsqueda de la maximización de las respuestas del proceso empleando las variables C:P y C:L fue satisfactoria, pues se lograron un aumentos definitivos en los tres objetivos de optimización de forma paralela empleando la misma concentración de carbohidratos (15g/L).

La metodología de superficie de respuesta demostró que las relaciones C:P y C:L además de tener influencia en la productividad, velocidad y rendimiento de producción de H_2 , tienen un gran potencial como herramienta optimización de procesos de FO para la producción de hidrógeno, pues se comprobó su capacidad para mejorar H_{max} , R_{max} , y Y_{H_2} de forma simultánea.

4.2.3.2. Optimización de H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} empleando las composiciones de carbohidratos, proteínas y lípidos del sustrato como variables de optimización

El análisis de datos composicionales indicó que las variables composicionales carbohidratos, proteínas y lípidos presentaron influencias similares en los tres objetivos de optimización. No sólo porque las variables se ajustaron mejor al mismo modelo de datos composicionales (modelo cúbico especial de Scheffe'), como se presenta en la Tabla 4.6., sino porque se evidenció que las respuestas H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} tuvieron disminuciones significativas en el proceso cuando las composiciones de proteínas y lípidos aumentaron en el sustrato (Figuras 4.5.c., 4.6.c. y 4.7.c).

Tabla 4.6. Bondad de ajustes de los modelos de datos composicionales a las respuestas H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} .

Modelo	$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i$		$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i + \sum_{i<j=2}^q \beta x_{ij} x_i x_j$		$E(x) = \sum_{i=1}^q \beta x_i + \sum_{i<j=2}^q \beta x_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k=2}^q \beta x_{ijk} x_i x_j x_k$	
Respuesta	R^2	R^2_{adj}	R^2	R^2_{adj}	R^2	R^2_{adj}
H_{max}	0.8047	0.7358	0.8723	0.8273	0.9294	0.9045
R_{max}	0.2577	-0.004	0.6980	0.5915	0.8169	0.7523
Y_{H_2}	0.7440	0.6536	0.8680	0.8214	0.9041	0.8702



Maximización simultánea de H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} empleando las composiciones de carbohidratos, proteínas y lípidos

Con el fin de alcanzar el objetivo principal del presente proyecto, maximizar la productividad, velocidad y rendimiento de la producción de H_2 de forma paralela, se decidió emplear la capacidad del modelo cúbico especial de Scheffe' para describir las respuestas H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} junto a la similitud de la influencia de las variables composicionales carbohidratos, proteínas y lípidos en las tres respuestas como herramientas de decisión en la configuración de los ensayos de optimización.

Empleando los ajustes del modelo cúbico especial de Scheffe' para cada una de las respuestas, se procedió a realizar los diagramas ternarios que se presentan las Figuras 4.14., 4.15. y 4.16., para H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} respectivamente. Esto con el fin de comprender con un poco más de profundidad la influencia de cada una de las composiciones de biomoléculas en los tres objetivos de optimización.

Bondad de ajuste:

R^2 : 0.7464

R^2_{adj} : 0.6569

Parámetros:

β_1 = 4.21

β_2 = -0.05

β_3 = -0.21

β_{12} = 11.13

β_{13} = -0.05

β_{23} = -81.37

β_{123} = 351.78

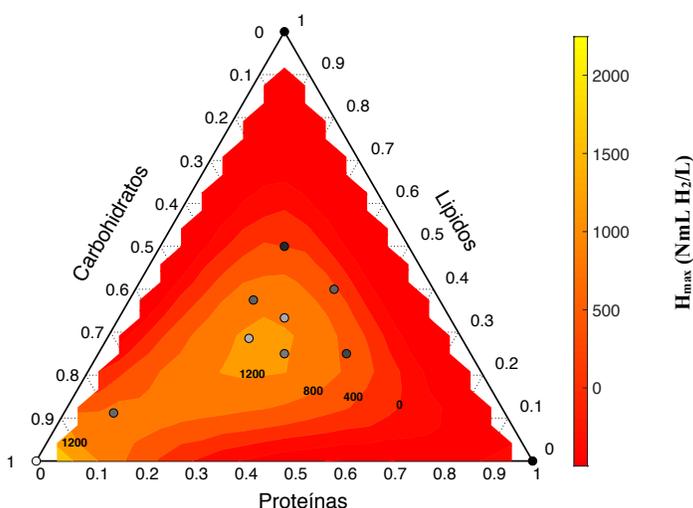


Figura 4.14. Diagrama Ternario. H_{max} (mL H_2 /L $_{reactor}$). vs. C, P y L.

Bondad de ajuste:

R^2 : 0.6699

R^2_{adj} : 0.5534

Parámetros:

β_1 = 4.21

β_2 = -0.05

β_3 = -0.21

β_{12} = 11.13

β_{13} = -0.05

β_{23} = -81.37

β_{123} = 351.78

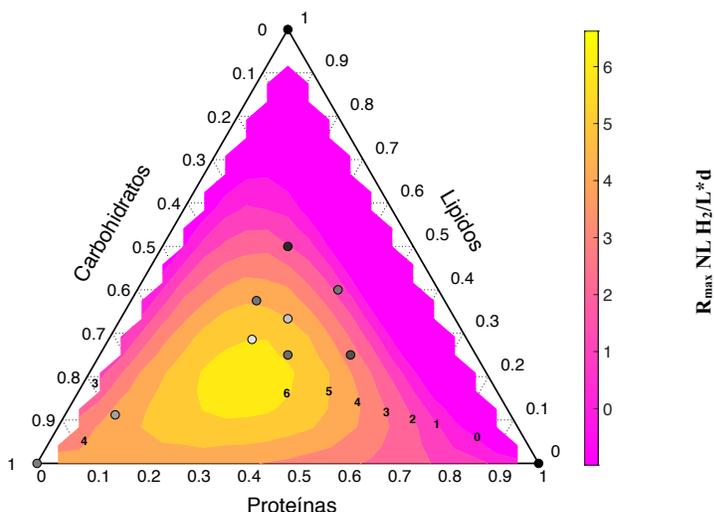


Figura 4.15. Diagrama Ternario. R_{max} (NL H_2 /L $_{Reactor}$ /día) . vs. C, P y L.



Bondad de ajuste:

R^2 : 0.7120

R^2_{adj} : 0.6103

Parámetros:

$\beta_1 = 1.20$

$\beta_2 = 0.00$

$\beta_3 = -0.02$

$\beta_{12} = -0.86$

$\beta_{13} = -1.53$

$\beta_{23} = -3.78$

$\beta_{123} = 30.40$

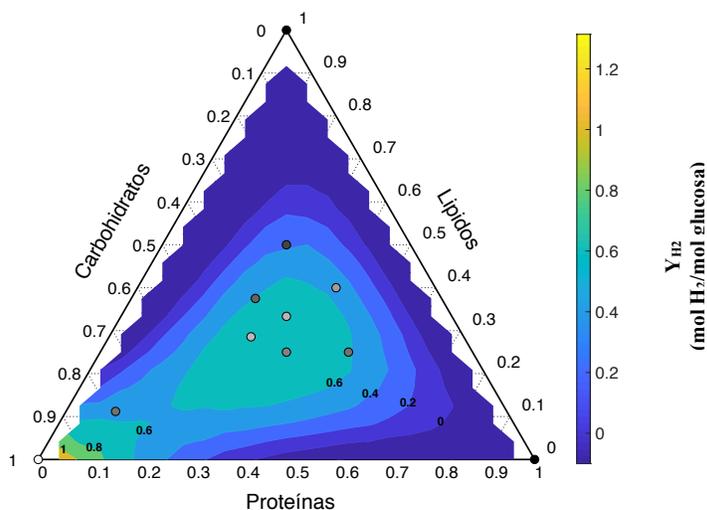


Figura 4.16. Diagrama Ternario. Y_{H_2} (mol H_2 /mol glucosa). vs. C, P y L.

Las líneas de contorno estimadas por el modelo cúbico especial de Scheffe' sobre los diagramas ternarios, sugieren que los valores óptimos de las composiciones en el proceso para maximizar H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} se encuentran entre 49% a 79% en términos de composición de carbohidratos, y entre 10 y 28% en términos de composición de lípidos y proteínas, situación que va de la mano, con lo descrito en estudios previos, donde se destaca que los carbohidratos son mejores sustratos que las proteínas y los lípidos para la producción de hidrógeno (Alibardi & Cossu, 2016; Dong et al., 2009).

Con base en estos resultados y la solución analítica del modelo cúbico especial de Scheffe' empleando los estimadores determinados para cada una de las respuestas (Figuras 4.14., 4.15. y 4.16.) se decidió agregar paulatinamente nuevos niveles más al diseño experimental DCC2, manteniendo la concentración de carbohidratos en 15 g/L como se presenta en la Tabla 4.7.

Con los datos de las respuestas H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} obtenidos a partir de la modificación del diseño experimental DCC2, se realizaron nuevos ajustes al modelo descrito por la Ecuación 3.9. El análisis estadístico del modelo de datos composicionales para el objetivo H_{max} , ajustó en menor medida en comparación con el primer ajuste realizado, con coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.7464 y 0.6569 respectivamente. Este ajuste del modelo soporta el primer análisis realizado, donde se estima que los valores óptimos de las composiciones en el proceso para maximizar las respuestas se encuentran entre 49% a 79% en términos de composición de carbohidratos, y entre 10 y 28% en términos de composición de lípidos y proteínas.

Se puede observar que la modificación de las composiciones del sustrato, aumentó la productividad máxima del sistema significativamente, pasando de productividades de 839 ± 57 NmL H_2 /L_{reactor} con composiciones de 37.5 % de carbohidratos, 25 % de proteínas y 37.5% de lípidos a 2605 ± 54 NmL H_2 /L_{reactor} con composiciones de 56 % de carbohidratos, 22 % de proteínas y 22 % de lípidos como se presenta en la Figura 4.17.

Los resultados demuestran que el uso de la metodología de análisis composicional para maximizar este objetivo en el sistema fue exitoso, pues aunque no se logró determinar las composiciones óptimas para maximizar la respuesta H_{max} , el empleo del modelo cúbico especial de Scheffe' como herramienta de optimización para la respuesta H_{max} , permitió un aumento neto de la producción de H_2 de 1543 NmL H_2 /L_{reactor} empleando la misma concentración de carbohidratos, lo que se traduce aproximadamente en 210 % más productividad por volumen de reactor en el sistema.



Tabla 4.7. Modificación y transformaciones del DCC2.

Carbohidratos (g/L)	Proteínas (g/L)	Lípidos (g/L)	% Carbohidratos	% Proteínas	% Lípidos
15	10	15	37.50	25.00	37.50
15	10	10	42.90	28.60	28.60
10	10	20	25.00	25.00	50.00
15	15	15	33.30	33.30	33.30
15	15	10	37.50	37.50	25.00
10	20	20	20.00	40.00	40.00
10	20	10	25.00	50.00	25.00
0	0	0	0.00	0.00	0.00
0	15	0	0.00	100.00	0.00
0	0	15	0.00	0.00	100.00
15	0	0	100.00	0.00	0.00
15	7.5	10	0.46	0.23	0.31
15	7.5	7.5	0.50	0.25	0.25
15	6	6	0.56	0.22	0.22
15	1	10	0.58	0.04	0.38
15	10	1	0.58	0.38	0.04

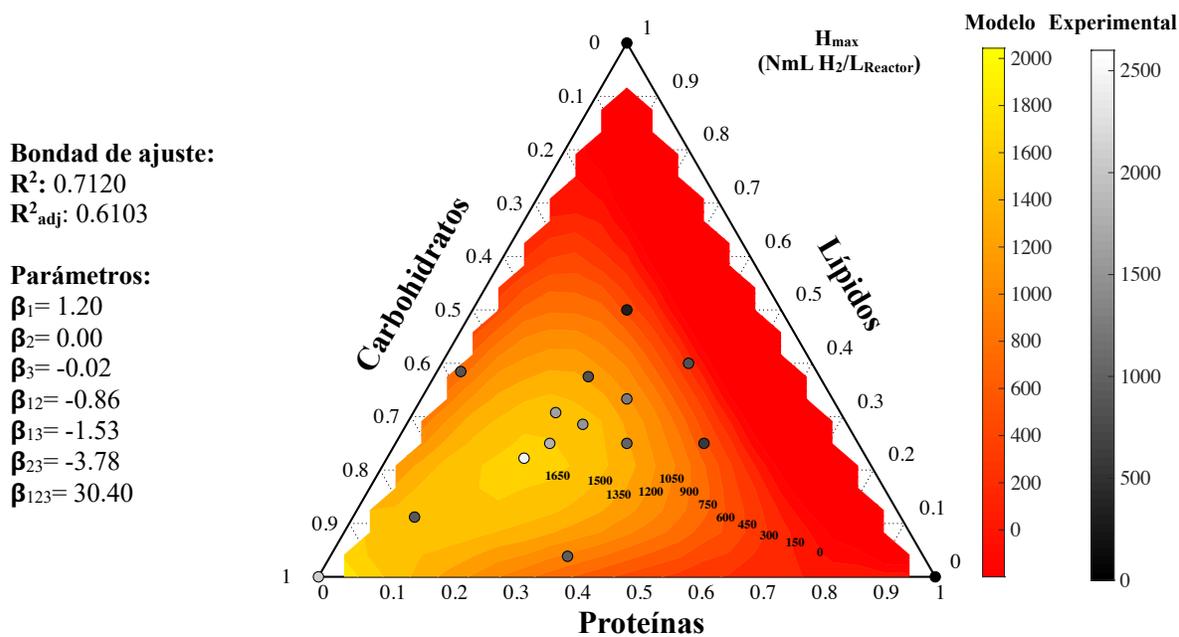


Figura 4.17. Diagrama Ternario. H_{max} . vs. C, P y L.



El análisis estadístico del modelo de datos composicionales para el objetivo R_{\max} , ajustó en menor medida en comparación con el primer ajuste realizado, con coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.6699 y 0.5534 respectivamente.

El ajuste del objetivo R_{\max} bajo la modificación del diseño DCC2 soporta el primer análisis realizado, donde se estima que los valores óptimos de las composiciones en el proceso para maximizar las respuestas se encuentran entre 49% a 79% en términos de composición de carbohidratos, y entre 10 y 28% en términos de composición de lípidos y proteínas.

Se puede observar que la modificación de las composiciones en el sustrato, aumentó la tasa específica máxima de producción de H_2 significativamente, pasando de velocidades de 3.4 ± 0.7 NL $H_2/L_{\text{Reactor}}/\text{día}$ con composiciones de 37.5 % de carbohidratos, 25 % de proteínas y 37.5% de lípidos a 14.8 ± 1.4 NL $H_2/L_{\text{Reactor}}/\text{día}$ con composiciones de 56 % de carbohidratos, 22 % de proteínas y 22 % de lípidos como se presenta en la Figura 4.18.

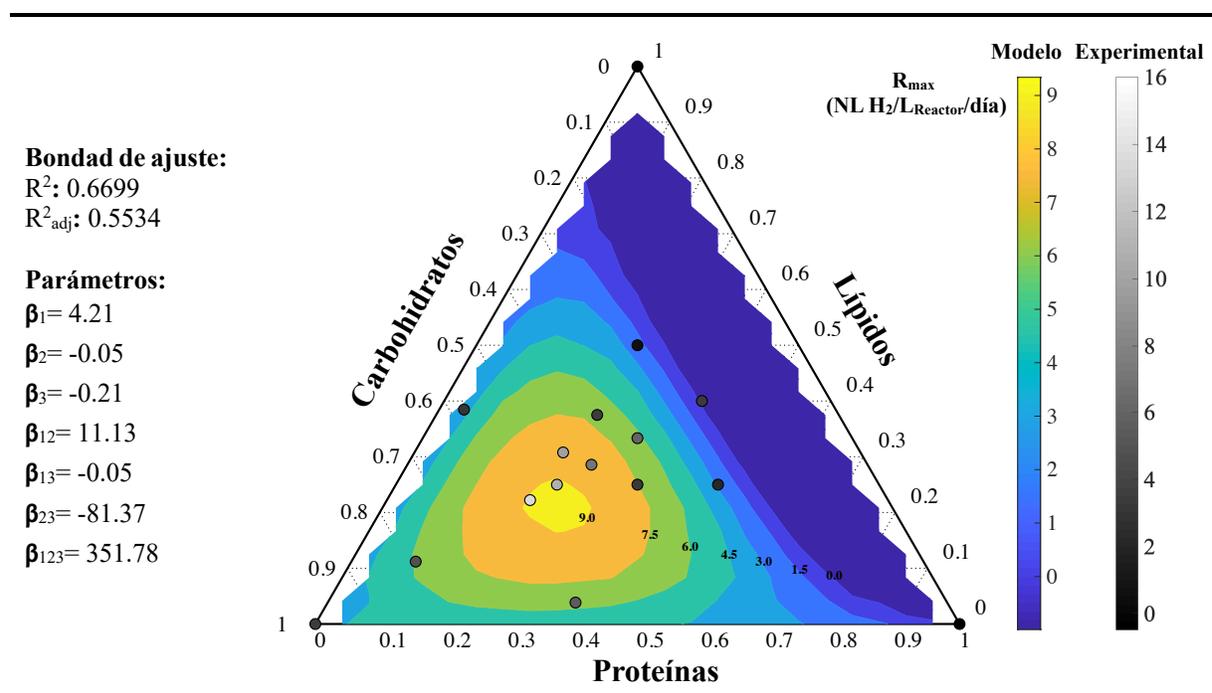


Figura 4.18. Diagrama Ternario. R_{\max} vs. C, P y L.

Al igual que ocurrió con el objetivo H_{\max} , aunque no se logró determinar las composiciones óptimas para maximizar la respuesta R_{\max} bajo las condiciones de experimentación empleadas, los resultados demuestran que el uso de la metodología de análisis composicional para maximizar este objetivo en el proceso fue exitoso, pues al emplear el modelo cúbico especial de Scheffe' como herramienta de optimización para la respuesta R_{\max} , hubo un aumento neto de la tasa máxima específica de producción de H_2 de 11.4 NL $H_2/L_{\text{Reactor}}/\text{día}$ empleando la misma concentración de carbohidratos, lo que se traduce en al rededor 335 % más velocidad de producción de H_2 en el sistema.

El análisis estadístico del modelo de datos composicionales para el objetivo Y_{H_2} , ajustó en menor medida en comparación con el primer ajuste realizado, con coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.7120 y 0.6103 respectivamente.



La modificación del diseño DCC2 soporta el primer análisis realizado, donde se estima que los valores óptimos de las composiciones en el proceso para maximizar H_{\max} , R_{\max} y Y_{H_2} se encuentran entre 49% a 79% en términos de composición de carbohidratos, y entre 10 y 28% en términos de composición de lípidos y proteínas.

Se puede observar que la modificación de las composiciones en el sustrato, aumentó el rendimiento de producción de H_2 significativamente, pasando de rendimientos de 0.51 ± 0.04 mol H_2 /mol glucosa con composiciones de 37.5 % de carbohidratos, 25 % de proteínas y 37.5% de lípidos a 1.48 ± 0.24 mol H_2 /mol glucosa con composiciones de 56 % de carbohidratos, 22 % de proteínas y 22 % de lípidos como se presenta en la Figura 4.19.

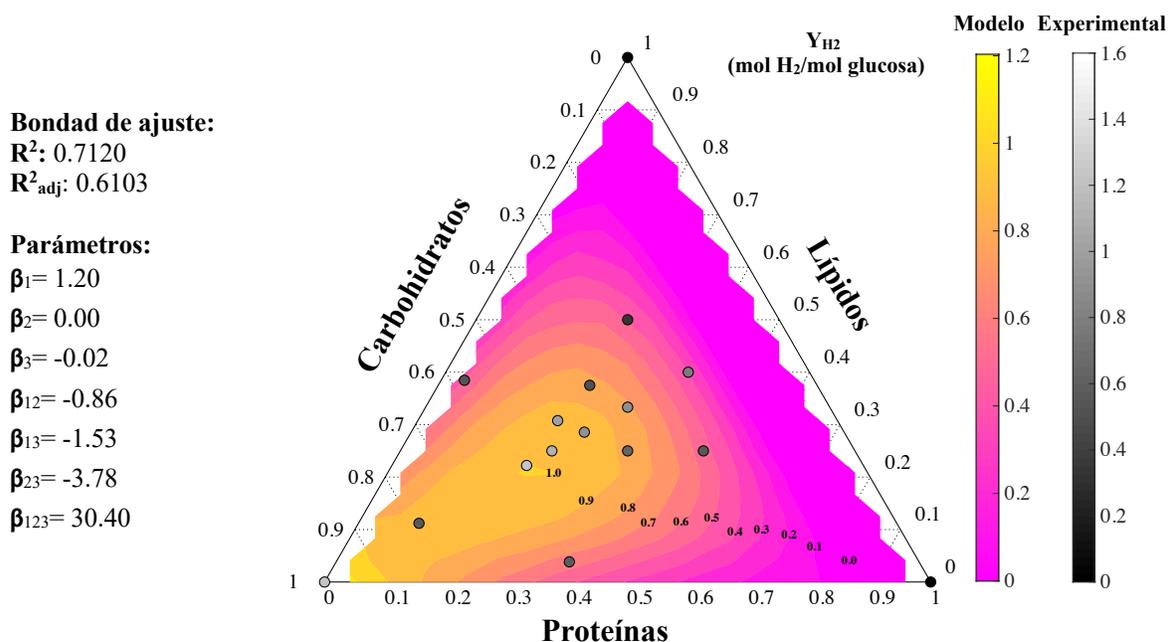


Figura 4.19. Diagrama Ternario. Y_{H_2} . vs. C, P y L.

Del mismo modo que ocurrió con los objetivos H_{\max} y R_{\max} , aunque no se logró determinar las composiciones óptimas para maximizar la respuesta Y_{H_2} bajo las condiciones de experimentación empleadas, los resultados demuestran que el uso de la metodología de análisis composicional para maximizar este objetivo en el proceso fue exitoso, pues al emplear el modelo cúbico especial de Scheffe' como herramienta de optimización para la respuesta Y_{H_2} , hubo un aumento neto en el rendimiento de la producción de H_2 de 0.97 de mol H_2 /mol glucosa empleando la misma concentración de carbohidratos, lo que se traduce en al rededor 190 % más rendimiento de producción de H_2 en el sistema.

Al comparar el rendimiento de producción alcanzado (1.48 ± 0.24) con el límite de Thauer (4 de mol H_2 /mol glucosa), es evidente que el valor dista en gran medida del máximo teórico (Cabrol et al., 2017; Dong et al., 2009).

Esta situación puede justificarse debido a que algunos parámetros operativos como el pH y la agitación no estuvieron optimizados durante la operación del sistema; pues además de no haberse implementado un sistema de control de pH y contar con un sistema de agitación poco robusto en el equipo AMPTS II, el pH al inicio del proceso fue de 7.5, valor equidistante del 5.5 óptimo determinado por muchos autores (K. S. Fan et al., 2006; Y. Fan et al., 2008; M. Li et al., 2008).



4.2.4. Influencia de los componentes del sustrato en los objetivos de optimización H_{max} , R_{max} y Y_{H_2}

Los análisis de superficie de respuesta y de datos composicionales, demostraron que las proteínas y los lípidos, al igual que los carbohidratos, tienen influencia en la productividad máxima del proceso, independientemente de su papel como sustrato directo en la producción de H_2 , del mismo modo, se demostró su influencia en la velocidad y rendimiento de la producción de hidrógeno, como se presenta en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Resultados de H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} en la totalidad de los ensayos realizados.

C (g/L)	P (g/L)	L (g/L)	%C	%P	%L	C:P	C:L	H_{max} (NmL $H_2/L_{Reactor} \pm s$)	R_{max} (NL $H_2/L_{Reactor}/día \pm s$)	Y_{H_2} (mol H_2/mol glucosa)
15	10	15	37.5	25.0	37.5	1.5	1	839 ± 57	3.4 ± 0.7	0.51 ± 0.04
15	10	10	42.9	28.6	28.6	1.5	1.5	1639 ± 60	7.8 ± 0.5	1 ± 0.03
10	10	20	25.0	25.0	50.0	1	0.5	337 ± 75	1.2 ± 0.2	0.31 ± 0.07
15	15	15	33.3	33.3	33.3	1	1	1362 ± 138	6.5 ± 0.3	0.84 ± 0.09
15	15	10	37.5	37.5	25.0	1	1.5	1137 ± 51	4.9 ± 1.8	0.71 ± 0.03
10	20	20	20.0	40.0	40.0	0.5	0.5	744 ± 180	3.2 ± 0.9	0.69 ± 0.19
10	20	10	25.0	50.0	25.0	0.5	1	583 ± 95	2.3 ± 0.6	0.55 ± 0.09
15	7.5	10	46.2	23.1	30.8	2	1.5	1518 ± 269	8.1 ± 3.2	0.96 ± 0.18
15	7.5	7.5	50.0	25.0	25.0	2	2	1980 ± 113	11.8 ± 0.6	1.23 ± 0.07
15	6	6	55.6	22.2	22.2	2.5	2.5	2605 ± 54	14.8 ± 1.4	1.48 ± 0.24
15	1.9	2.13	78.8	10.0	11.2	7.9	7.0	986 ± 26	4.9 ± 0.6	0.60 ± 0.01
15	1	10	57.7	3.8	38.5	15	1.5	1019 ± 127	4.0 ± 0.9	0.62 ± 0.07
15	10	1	57.7	38.5	3.8	1.5	15	1050 ± 27	6.1 ± 0.2	0.65 ± 0.05
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	N/A	N/A	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0.0	10*	0.0	0.0	100.0	0.0	N/A	N/A	32 ± 7	1 ± 0.1	0 ± 0
0.0	15*	0.0	0.0	100.0	0.0	N/A	N/A	53 ± 15	1.3 ± 0.1	0 ± 0
0.0	0.0	10*	0.0	0.0	100.0	N/A	N/A	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0.0	0.0	15*	0.0	0.0	100.0	N/A	N/A	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
10*	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	N/A	N/A	1444 ± 28	4.4 ± 0.2	1.32 ± 0.01
15*	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	N/A	N/A	2206 ± 17	4.1 ± 0.0	1.29 ± 0.02

C: carbohidratos; P: proteínas; L: lípidos. N/A: no aplica; *: Control.

Los ensayos donde las concentraciones de proteínas y lípidos superaron el 37.4 % en el sustrato ofrecieron menores productividades en términos de H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} . Las bajas productividades en el sistema cuando las concentraciones de proteínas predominaron en el sustrato pueden tener varios justificantes. En primer lugar, el hecho de que la producción H_2 a partir de estas moléculas no es viable como se discutió en la sección 4.1.2.; en segundo, la existencia de procesos catabólicos que consumen H_2 , como la desaminación reductiva (Ecuación 1.8); y en tercero, aunque no se midió experimentalmente, la acumulación de amoníaco producida por la degradación de las elevadas concentraciones de aminoácidos en los ensayos pudo desbalancear el pH intracelular y haber interferido en la productividad del proceso como se ha determinado en investigaciones previas (Bundhoo y Mohee, 2016; Dong *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).



En cuanto a los lípidos, aunado a la limitante termodinámica que no los hace un buen sustrato para la producción de H_2 , los lípidos presentan características que podrían afectar los sistemas de producción de H_2 de manera biológica y química cuando se presentan en el proceso en concentraciones elevadas. La inhibición biológica tiene lugar mediante la restricción del transporte transmembrana cuando los LCFA se adhieren a la pared bacteriana e impiden la adecuada nutrición de los microorganismos (Dong et al., 2009), por otra parte, se observó que al encontrarse en concentraciones por encima de 15g/L se forma una capa superficial que impide la adecuada liberación de los gases formados durante el proceso fermentativo como se presenta en la Figura 4.20., la cual potencialmente puede aumentar la $P_p H_2$ dentro del sistema, lo que hace termodinámicamente desfavorable los procesos de reducción de protones H^+ llevados a cabo por las hidrogenasas NADH- [FeFe] y NADH-Fdred - [FeFe] mediante los cuales se produce la gran mayoría H_2 en procesos FO (Bundhoo y Mohee, 2016).



Figura 4.20. Biogás atrapado por capa superficial de lípidos en biorreactor del equipo AMPTS II

De manera similar, la productividad de los sistemas puede verse comprometida cuando hay presentes LCFA instaurados, como en el caso del sustrato empleado (aceite de oliva), puesto que el hidrógeno generado por el sistema podría potencialmente emplearse en reacciones de hidrogenación en presencia de metales como Ni, Pd, Pt, Cu, Ag, Au/Rh, tal cual ocurre en los procesos de hidrogenación convencional (Ajzenberg, 2002; Johnstone, 1985).

Las metodologías de superficie de respuesta y de análisis composicional de datos determinaron que relaciones C:P y C:L de 2.5 para el análisis de superficie de respuesta y composiciones de 55.6 % de carbohidratos, 22.2 % de proteínas y 22.2% de lípidos para análisis composicional de datos, ofrecieron productividades en términos de H_{max} , R_{max} y Y_{H_2} determinante superiores a todos los ensayos evaluados, incluyendo los controles para cada una de las biomoléculas.

Este hecho puede deberse a que, aunque no juegan un papel directo en la producción de hidrógeno en el sistema, tanto las proteínas como los lípidos cumplen papeles elementales en el metabolismo y la fisiología bacteriana. Situación a la cual, en el presente trabajo de investigación se le atribuyen los marcados aumentos en la productividad, velocidad y rendimiento de producción alcanzados, a pesar de emplear las mismas concentraciones de carbohidratos en el sustrato (15g/L).

Recientes investigaciones han demostrado que la presencia de ciertos aminoácidos en procesos de FO puede mejorar las productividades de H_2 . Sharma y Melkania, 2018 demostraron que la suplementación de metionina, alanina, histidina, citosina y lisina pueden mejorar las productividades de H_2 en procesos



de FO, debido a que su biodisponibilidad puede mejorar el crecimiento y el desempeño fisiológico de HPB.

Por otra parte, aunque no existen antecedentes de que los lípidos puedan mejorar la productividad de sistemas de FO, los resultados de la presente investigación demuestran que cuando las composiciones de lípidos en el sustrato son extremadamente bajas (3.8 %), manteniendo las concentraciones de carbohidratos, en valores cercanos al óptimo determinado (57.7 %), la productividad del sistema al disminuye alrededor de 40% en términos de productividad máxima de H₂, 41% en términos de tasa específica máxima de producción y 43% en términos de rendimiento de producción de H₂.

4.2.3.5. Influencia de composición del sustrato en la remoción de materia orgánica

En la Tabla 4.9. se presenta la capacidad de los sistemas para remover materia orgánica en términos de proporción de remoción de carbohidratos, proteínas, lípidos y DQO en los ensayos realizados.

Tabla 4.9. Remoción de carbohidratos, proteínas, lípidos y DQO en ensayos.

C (g/L)	P (g/L)	L (g/L)	%C	%P	%L	Remoción de C (% ± s)	Remoción de P (% ± s)	Remoción de L (% ± s)	Remoción de DQO (% ± s)
15	10	15	38	25	38	98.7 ± 0.7	37 ± 6.0	20.6 ± 4.5	66 ± 2.7
15	10	10	43	29	29	98.7 ± 0.0	35 ± 8.8	38.2 ± 5.7	57.6 ± 6.1
10	10	20	25	25	50	98.5 ± 1.9	42 ± 1.8	34.1 ± 1.4	78.3 ± 0.1
15	15	15	33	33	33	98 ± 0.8	43.5 ± 8.7	35.3 ± 3.2	60.2 ± 3.4
15	15	10	38	38	25	97.5 ± 0.5	60.3 ± 4.0	32.1 ± 5.0	57.5 ± 2.4
10	20	20	20	40	40	97.1 ± 2.5	57.3 ± 4.8	33.8 ± 6.8	67.5 ± 0.8
10	20	10	25	50	25	97.1 ± 1.1	47.6 ± 2.8	54.6 ± 4.9	52.1 ± 0.5
15	7.5	10	46	23	31	96.1 ± 1.2	42.3 ± 6.1	15.4 ± 0.6	59.1 ± 4.3
15	7.5	7.5	50	25	25	97.3 ± 0.2	32.7 ± 0.0	24.8 ± 1.6	57.4 ± 0.4
15	6	6	56	22	22	96.4 ± 1.5	31.7 ± 1.2	25.8 ± 6.8	53.3 ± 6.4
15	1.9	2.13	79	10	11	97.0 ± 0.7	49.6 ± 4.1	35.9 ± 2.8	62.9 ± 1.8
15	1	10	58	4	39	97.5 ± 0.5	36.6 ± 1.1	24.2 ± 3.2	57.3 ± 1.9
15	10	1	58	39	4	99.3 ± 0.2	53.7 ± 2.6	40.6 ± 3.4	52.0 ± 2.8
15*	0	0	100	0	0	91.5 ± 2.3	-	-	97.0 ± 2.5
10*	0	0	100	0	0	95.4 ± 2.5	-	-	93.5 ± 2.5
0	15*	0	0	100	0	-	39.9 ± 2.4	-	46.6 ± 1.9
0	10*	0	0	100	0	-	46.2 ± 2.3	-	41.3 ± 2.1
0	0	15*	0	0	100	-	-	49.3 ± 1.2	70.2 ± 0.0
0	0	10*	0	0	100	-	-	55.2 ± 4.2	58.7 ± 3.5

C: carbohidratos; P: proteínas; L: lípidos; *: Control

La remoción de carbohidratos en todos los ensayos superó el 95% como se presenta en la Tabla 4.9. Estos resultados, además demostrar que el sistema tuvo una elevada capacidad de remoción de esta



biomolécula, lo cual se puede justificar debido a la elevada biodegradabilidad y afinidad de los microorganismos a la glucosa, evidencian que las composiciones de las biomoléculas no influyen en el grado de consumo de los carbohidratos en el sistema, pero sí en el grado de transformación de los carbohidratos a H_2 , como se demostró en las secciones anteriores.

El rango de remoción de proteínas en los ensayos fue bastante amplio, se obtuvieron remociones entre el 30 y 60%, sin asociaciones marcadas entre las composiciones del sustrato y la capacidad de remoción de proteínas en el sistema como se presenta en la Tabla 4.9.

La remoción de lípidos en los ensayos, al igual que en el caso de las proteínas, presentó un rango bastante amplio, se obtuvieron remociones entre el 15 y 55%, sin asociaciones marcadas entre la composición de del sustrato y la capacidad de remoción de lípidos en el sistema como se presenta en la Tabla 4.9.

La remoción de materia orgánica en forma de DQO en todos los ensayos superó el 50% como se presenta en la Tabla 4.9., con rangos entre el 52 y 78%. Estas elevadas capacidades de remoción demostradas pueden asociarse al elevado consumo de carbohidratos alcanzado en todos los ensayos, debido a la afinidad de los microorganismos a la glucosa como se describió en apartados anteriores.

4.2.3.6. Productos de fermentación

La producción de AGVs en los ensayos de fermentación fue bastante variada, con rangos que estuvieron desde concentraciones $12.9 \pm 2.3 \text{ gO}_2/\text{L}_{\text{reactor}}$ alcanzados con el ensayo (50% de carbohidratos y 25% de proteínas y lípidos) a concentraciones de $20.1 \pm 1.6 \text{ gO}_2/\text{L}_{\text{reactor}}$ alcanzados con el ensayo de 20% de carbohidratos y 40% de proteínas y lípidos.

A pesar de que sí existen diferencias significativas entre la producción de AGVs de los ensayos con distintas concentraciones de materia orgánica en el sustrato como se presenta en la Figura 4.21., se prescindió de esta asociación mediante un análisis de regresión lineal, el cual permitió descartar la existencia de una asociación entre la concentración de DQO inicial (gO_2/L) en el sustrato y la generación de productos de fermentación en forma de AGVs (gO_2/L) con coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.4571 y 0.4406 respectivamente.

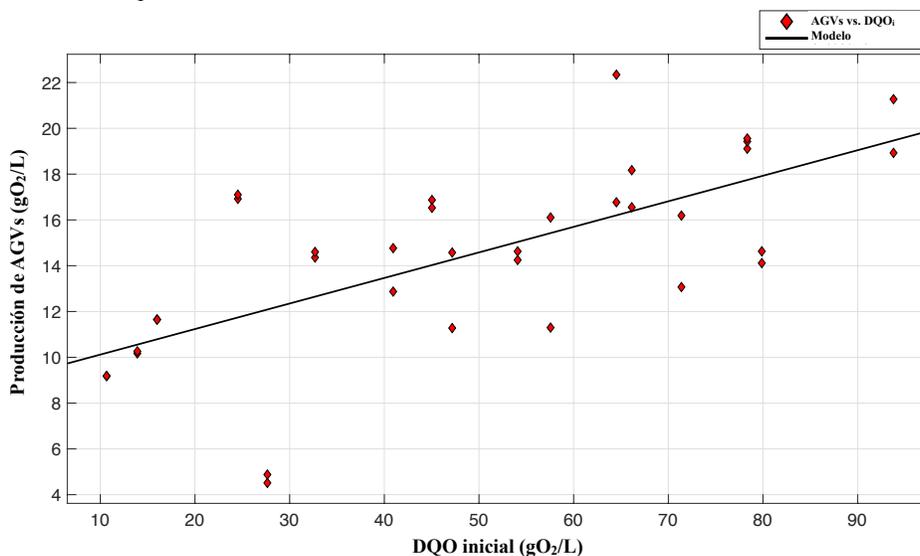


Figura 4.21. Regresión lineal entre concentración de materia orgánica del sustrato y producción de AGVs.



La composición de AGVs en los ensayos evidencia la presencia de procesos metabólicos de fermentación acido-mixta, con un perfil de etanol, acetato, propionato, isobutirato, butirato e isovalerato bastante diverso, como se presenta en la Tabla 4.10. y la Figura 4.22.

Tabla 4.10. Composición de AGVs en los distintos ensayos fermentativos

Composición de biomoléculas			Composición de productos de fermentación (% ± s)									
% C	% P	% L	Acetona	Etanol	Butanol	Acetato	Propionato	Isobutirato	Butirato	Valerato	Isovalerato	Caproato
38	25	38	0.3 ± 0.4	11.2 ± 4.7	0.3 ± 0.2	28.7 ± 0.7	23.9 ± 12.4	3.3 ± 0.3	28.8 ± 7.5	0.5 ± 0.3	2.9 ± 0.2	0.1 ± 0.1
43	29	29	0.0 ± 0.0	4.7 ± 0.5	0.9 ± 0.1	37.0 ± 1.9	9.6 ± 2.0	3.1 ± 0.1	41.4 ± 0.3	0.0 ± 0.0	3.4 ± 0.6	0.0 ± 0.0
25	25	50	0.0 ± 0.0	4.2 ± 2.0	0.3 ± 0.0	32.1 ± 7.1	27.9 ± 0.5	3.8 ± 0.0	27.3 ± 7.9	0.1 ± 0.1	4.2 ± 0.7	0.0 ± 0.0
33	33	33	0.5 ± 0.0	6.3 ± 0.5	0.3 ± 0.1	39.7 ± 0.1	17.3 ± 2.0	3.8 ± 0.1	27.6 ± 2.2	0.1 ± 0.1	4.4 ± 0.0	0.1 ± 0.1
38	38	25	0.5 ± 0.1	4.9 ± 0.9	0.5 ± 0.1	47.2 ± 13.8	7.1 ± 1.6	3.8 ± 0.3	31.4 ± 12.0	0.0 ± 0.0	4.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0
20	40	40	0.4 ± 0.0	4.2 ± 0.7	0.4 ± 0.0	57.4 ± 4.4	8.2 ± 1.0	5.1 ± 0.1	18.5 ± 3.2	0.0 ± 0.0	5.8 ± 0.6	0.0 ± 0.0
25	50	25	0.6 ± 0.1	8.0 ± 0.4	0.5 ± 0.1	31.6 ± 3.5	13.4 ± 2.5	6.5 ± 0.0	32.5 ± 1.4	0.0 ± 0.0	6.9 ± 0.0	0.0 ± 0.0
46	23	31	0.0 ± 0.0	9.6 ± 1.0	0.7 ± 0.0	48.8 ± 5.1	8.1 ± 2.8	3.3 ± 0.2	25.5 ± 0.6	0.3 ± 0.1	3.6 ± 0.3	0.0 ± 0.0
50	25	25	0.0 ± 0.0	6.3 ± 0.6	0.8 ± 0.3	52.8 ± 1.2	5.3 ± 0.0	3.2 ± 0.3	27.7 ± 1.2	0.2 ± 0.1	3.4 ± 0.1	0.0 ± 0.0
56	22	22	0.0 ± 0.0	5.7 ± 0.7	0.7 ± 0.0	48.8 ± 2.1	4.8 ± 0.6	3.0 ± 0.2	32.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	3.5 ± 0.0	0.1 ± 0.1
79	10	11	0.0 ± 0.0	8.5 ± 0.0	0.8 ± 0.1	35.2 ± 0.9	17.5 ± 0.9	6.2 ± 0.4	28.1 ± 0.0	0.8 ± 0.1	2.7 ± 0.4	0.2 ± 0.0
58	4	39	0.0 ± 0.0	8.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	36.9 ± 0.6	15.9 ± 0.1	3.1 ± 0.2	26.8 ± 0.4	0.4 ± 0.1	7.5 ± 0.1	0.2 ± 0.1
58	39	4	0.0 ± 0.0	7.4 ± 0.4	0.5 ± 0.0	40.0 ± 0.4	14.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1	26.7 ± 0.4	0.6 ± 0.0	6.5 ± 0.3	0.0 ± 0.1
100	0	0	0.0 ± 0.0	17.1 ± 0.6	0.8 ± 0.1	40.3 ± 0.6	3.1 ± 0.2	1.6 ± 0.1	39.4 ± 1.0	0.3 ± 0.0	1.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1
0	100	0	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.3	0.4 ± 0.0	56.4 ± 1.3	16.7 ± 0.3	9.8 ± 1.7	23.3 ± 1.2	0.7 ± 0.0	11.8 ± 0.5	0.6 ± 0.0
0	0	100	0.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	48.6 ± 1.1	14.1 ± 0.1	4.6 ± 1.7	20.8 ± 1.3	1.4 ± 0.3	8.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2

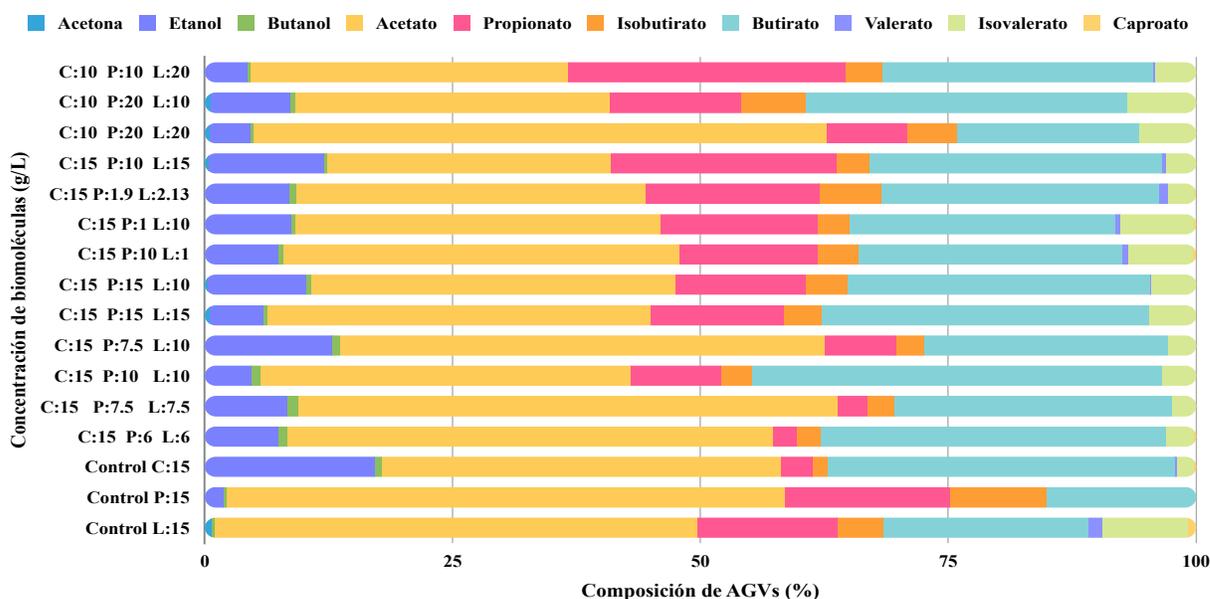


Figura 4.22. Composición de AGVS (%) en los distintos ensayos fermentativos.



Asociación entre H_{max} y la generación de acetato y butirato como productos de fermentación

Se determinó una relación de tipo exponencial entre la productividad máxima de hidrógeno en los ensayos y la sumatoria de las proporciones de acetato y butirato en los productos de fermentación como se presenta en la Figura 4.23

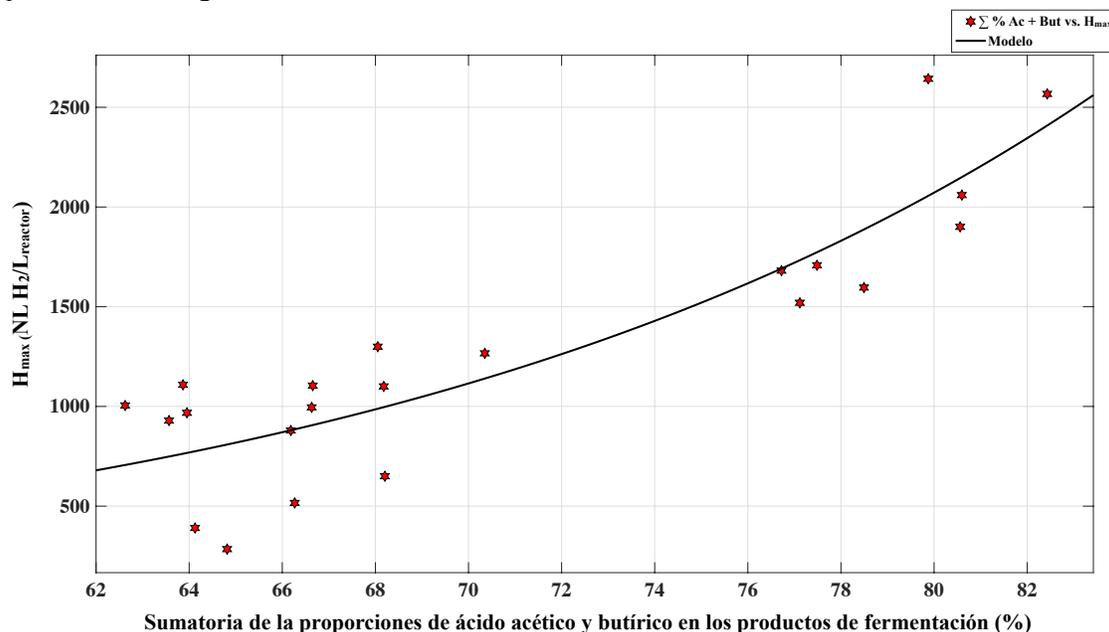


Figura 4.23. Regresión no lineal entre H_{max} y proporción de acetato y butirato en los productos de fermentación

Se realizó un análisis de regresión no lineal, donde se demuestra por medio de la función descrita en la Ecuación 4.1., y coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.7971 y 0.787 respectivamente, que el aumento de la proporción de ácido acético y butírico en los productos de fermentación se asoció a incrementos en la productividad máxima del sistema.

$$f(x) = a * e^{(b*x)} \quad \text{(Ecuación 4.1.)}$$

Los parámetros de ajuste a la Ecuación 4.1. con un 95% de confianza son: $a = 1169$ (1022, 1317) y $b = 0.4231$ (0.3177, 0.5285). Esta situación puede justificarse gracias a que las rutas metabólicas de fermentación acética y butírica en procesos de FO son las que derivan la producción de hidrógeno en los sistemas, como lo describen las ecuaciones 1.2., 1.3. y 1.4. definidas en el marco teórico del presente trabajo de investigación (Dong et al., 2009)

Asociación entre H_{max} y la generación de propionato como producto de fermentación

Del mismo modo que se correlacionó la proporción de acetato y butirato en los productos de fermentación con la productividad máxima del sistema. Se determinó una relación de tipo exponencial entre la productividad máxima de hidrógeno y la concentración de propionato en términos de DQO equivalente ($mg O_2/L$) los ensayos como se presenta en la Figura 4.24.

Se realizó un análisis de regresión no lineal, donde se demuestra por medio de la función descrita en la ecuación 4.1., y coeficientes de determinación R^2 y R^2_{adj} de 0.8176 y 0.8089 respectivamente, que cuando la generación de ácido propiónico aumenta en los productos de fermentación, la productividad máxima



del sistema se ve afectada. Los parámetros de ajuste a la ecuación exponencial Ecuación 4.2.3.6.1. con un 95% de confianza son: $a = 1141$ (1006, 1276) y $b = -0.4762$ (-0.589, -0.3634).

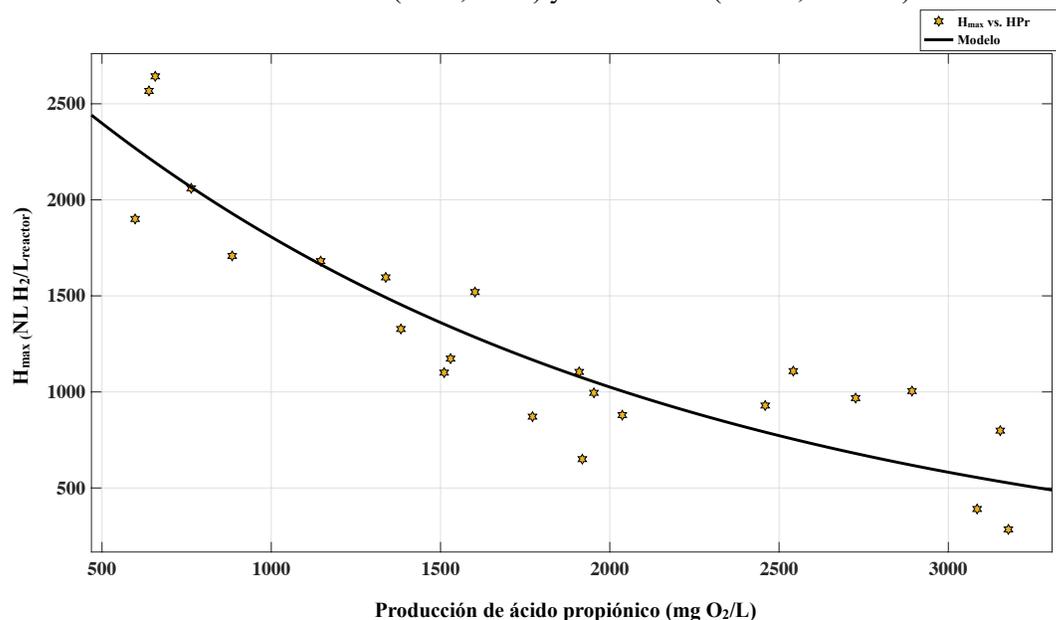


Figura 4.24. Regresión no lineal entre H_{max} y generación de propionato en los productos de fermentación

La correlación identificada por el análisis de regresión no lineal está de acuerdo con lo determinado por un amplio número de investigaciones previas, donde se ha definido de manera general que la producción de ácido propiónico es un problema grave en sistemas continuos y discontinuos de FO para la producción de hidrógeno, como en el presente trabajo de investigación. Esta asociación se justifica debido al consumo de equivalentes reductores por microorganismos productores de propionato que impiden su uso para la síntesis de H_2 por las rutas PFOR y PFL (Bundhoo y Mohee, 2016; Cabrol *et al.*, 2017; Sivagurunathan *et al.*, 2014). A continuación, en la Tabla 4.11. se presentan algunas estrategias implementadas para impedir la acumulación de propionato en sistemas de FO, las cuales van desde operaciones en condiciones de termofilia hasta cambios en los regímenes de operación.

Tabla 4.11. Estrategias implementadas para reducir la inhibición por propionato en sistemas de FO.

Sustrato	Concentración de propionato (g/L)		Inhibición de Y_{H_2} (mol H_2 /mol glucosa)		Estrategia	Referencias
	I*	N.I*	I*	N.I*		
Almidón trigo y otros	0.77	0.15	0.5	1.87	Disminución TRH y gasificación con N_2	(Hussy <i>et al.</i> , 2003)
Sucrosa	3.47	1.05	0.06	0.08	Cambio de operación de lote a continuo	Kim <i>et al.</i> , 2008 (Kim <i>et al.</i> , 2008)
Agua residual industria de bebidas	2.36	0.73	1.04	1.68	Variación de temperatura de 37 a 45°C	(Sivagurunathan <i>et al.</i> , 2014)
Sustrato sintético	2.2	0.4	0.3	1.48	Adecuación de biomoléculas del sustrato	Este trabajo

* I: inhibición; N.I: no inhibición



La adecuación de los componentes del sustrato en términos de carbohidratos, proteínas y lípidos, permitió reducir efectivamente la acumulación de propionato en los ensayos, pasando de 2.2 g/L a 0.4g/L como se presenta en la Tabla 4.11. Esta estrategia permitió mejoras sustanciosas en el rendimiento de producción de hidrógeno en el sistema pasando de 0.3 a 1.48 mol H₂/mol glucosa, lo que se traduce en mejoras alrededor de 393%. Situación comparable con estrategias como la termofilia a 60 °C, cambios en TRH y gasificación con N₂, y cambios de operación de lote a continuo, entre otros, como se presenta en la Tabla 4.11.



5. Conclusiones

Se determinó la influencia de la composición del sustrato sobre la producción de hidrógeno en un sistema discontinuo de fermentación oscura encontrando que existe una influencia significativa de los componentes del sustrato en forma de carbohidratos, proteínas y lípidos sobre la productividad máxima, tasa específica máxima y rendimiento de la producción de hidrógeno.

La concentración de carbohidratos influyó en la productividad máxima de los procesos, no obstante, no se evidenció una influencia significativa de la concentración de esta biomolécula en la tasa máxima específica y rendimiento de la producción de hidrógeno.

El uso de las metodologías de optimización empleadas para maximizar la productividad de hidrógeno en los sistemas permitió la definición de composiciones iniciales de carbohidratos, proteínas y lípidos que pueden aumentar la productividad máxima en 210%, la velocidad en 335% y el rendimiento de producción en 190%.

Se determinó que los procesos de remoción de materia orgánica y la generación de metabolitos secundarios no están asociados a la concentración de materia orgánica en el sustrato debido a que componentes orgánicos como las proteínas y los lípidos no son metabolizados totalmente.

La composición de carbohidratos, proteínas y lípidos en el sustrato, además de estar relacionada con la productividad de hidrógeno de los sistemas de FO, está relacionada exponencialmente con la producción de metabolitos secundarios como acetato, butirato y propionato.



6. Recomendaciones

Implementar la estrategia de optimización ejecutada en la presente investigación empleando sustratos reales mediante estrategias de codigestión.

Determinar el efecto de los carbohidratos, las proteínas y los lípidos en la productividad y estabilidad de reactores acidogénicos operados en régimen continuo.

Identificar si las diferencias de productividad están asociadas a procesos físico-químicos del sistema o a cambios poblaciones y/o fisiológicos microbianos.

Determinar el efecto de las composiciones de carbohidratos, proteínas y lípidos en procesos de inhibición como la acumulación de amoníaco e incrementos de la PpH_2 dentro de los sistemas.

Emplear los efluentes del proceso en celdas de electrólisis microbiana o reactores metanogénicos con el fin de incrementar el poder calorífico de los residuos.



7. Bibliografía

- Alibardi, L., & Cossu, R. (2016). Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 47(Pt A), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.049>
- Argun, H., Kargi, F., & Kapdan, I. K. (2009). Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.066>
- Avendaño, E. (2015). *Panorama Actual De La Situación Mundial, Nacional Y Distrital De Los Residuos Sólidos. Análisis Del Caso Bogotá D.C. Programa Basura Cero*. National University of Colombia. Retrieved from <http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/3417/1/79911240.pdf>
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., & Reid, G. (2008). The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(15), 4064–4073. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.069>
- Balachandar, G., Khanna, N., & Das, D. (2013). Biohydrogen Production from Organic Wastes by Dark Fermentation. In *Biohydrogen* (1st ed., Vol. #volume#, pp. 103–144). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00006-4>
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., ... Vavilin, V. A. (2002). The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology*. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.678>
- Berrocal B., M. J. (2017). *Producción de hidrógeno y metano mediante codigestión de residuos alimenticios y lodos de purga*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bujanos, M. C. (2013). *Producción biológica de hidrógeno a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos de una cafetería*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bundhoo, M. A. Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16), 6713–6733. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- 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. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>
- Cai, M., Liu, J., & Wei, Y. (2004). Enhanced Biohydrogen Production from Sewage Sludge with Alkaline Pretreatment. *Environmental Science & Technology*, 38(11), 3195–3202. <https://doi.org/10.1021/es0349204>
- Campuzano Á, R. (2015). *Lixiviación de residuos sólidos urbanos para incrementar la rapidez de producción de biogás. Instituto de ingeniería*. Universidad Nacional autónoma de México, Ciudad de México.
- Castelló, E., García y Santos, C., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebehere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>
- Castillo H, A. (2015). *Efecto de la carga orgánica sobre la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en un reactor continuo*. Instituto de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
- Chang, J. J., Chou, C. H., Ho, C. Y., Chen, W. E., Lay, J. J., & Huang, C. C. (2008). Syntrophic co-culture of aerobic Bacillus and anaerobic Clostridium for bio-fuels and bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.021>
- Chang, J. J., Wu, J. H., Wen, F. S., Hung, K. Y., Chen, Y. T., Hsiao, C. L., ... Huang, C. C. (2008). Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.045>



- Chen, S., & Dong, X. (2004). *Acetanaerobacterium elongatum* gen. nov., sp. nov., from paper mill waste water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2257–2262. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63212-0>
- Cheng, C.-H. H., Hsu, S.-C. C., Wu, C.-H. H., Chang, P.-W. W., Lin, C.-Y. Y., & Hung, C.-H. H. (2011). Quantitative analysis of microorganism composition in a pilot-scale fermentative biohydrogen production system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14153–14161. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.05.023>
- Constant, P., & Hallenbeck, P. C. (2013). *Hydrogenase. Biohydrogen*. Elsevier. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319914000639>
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E., & Davila Vazquez Rosales-Colunga, de León-Rodríguez, Razo-Flores, C.-N. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4296–4304. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.063>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.031>
- Elbeshbishy, E., & Nakhla, G. (2011). Comparative study of the effect of ultrasonication on the anaerobic biodegradability of food waste in single and two-stage systems. *Bioresour Technol*, 102(11), 6449–6457. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.082>
- Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., ... Zaiat, M. (2016). Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7325-y>
- Eugene Rosenberg Stephen Lory, Erko Stackebrandt, Fabiano Thompson, E. F. D., & Rosenberg, E. (2013). *Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. Springer Reference. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4>
- Fan, K. S., Kan, N. R., & Lay, J. J. (2006). Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR. *Bioresour Technol*, 97(1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.014>
- Fan, Y., Xing, Y., Ma, H., Pan, C., & Hou, H. (2008). Enhanced cellulose-hydrogen production from corn stalk by lesser panda manure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6058–6065. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.005>
- Gonzales Araiza, D. D. (2016). *Producción de H₂ por oxidación parcial de CH₃OH en nano catalizadores de Cu soportado en CeO₂ con diferentes morfología*. Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from <http://132.248.9.195/ptd2016/febrero/514024950/Index.html>
- Hallenbeck, P. C. (2013). Fundamentals of Biohydrogen. In *Biohydrogen* (pp. 25–43). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00002-7>
- Hoornweg, D., & Bhada-Tata, P. (2012). What a waste: a global review of solid waste management. *World Bank, Washington DC*, 1–116. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:WHAT+A+WASTE:+A+global+review+of+solid+waste+management#0%5Cnhttps://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/17388>
- Huang, Y., Zong, W., Yan, X., Wang, R., Hemme, C. L., Zhou, J., & Zhou, Z. (2010). Succession of the bacterial community and dynamics of hydrogen producers in a hydrogen-producing bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02444-09>
- Hung, C. H., Cheng, C. H., Guan, D. W., Wang, S. T., Hsu, S. C., Liang, C. M., & Lin, C. Y. (2011). Interactions between *Clostridium* sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 36, pp. 8704–8711). <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.010>



- Hussy, I., Hawkes, F. R., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2003). Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(6), 619–626. <https://doi.org/10.1002/bit.10785>
- INECC; SEMARNAT. (2012). *Diagnóstico Básico Para La Gestión Integral De Los Residuos. Versión Ejecutiva*. INECC, SEMARNAT. México City. Retrieved from http://www.inecc.gob.mx/descargas/dgcenica/diagnostico_basico_extenso_2012.pdf
- International Energy Agency. (2017). *Key World Energy Statistics*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jayasinghearachchi, H. S., Sarma, P. M., Singh, S., Aginhotri, A., Mandal, A. K., & Lal, B. (2009). Fermentative hydrogen production by two novel strains of *Enterobacter aerogenes* HGN-2 and HT 34 isolated from sea buried crude oil pipelines. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7197–7207. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.06.079>
- Jo, J. H., Jeon, C. O., Lee, D. S., & Park, J. M. (2007). Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *J Biotechnol*, 131(3), 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.492>
- Kim, D.-H., Kim, S.-H., & Shin, H.-S. (2009). Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(3), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.06.013>
- Kim, D., Kim, S., Ko, I., Lee, C., & Shin, H. (2008). Start-up strategy for continuous fermentative hydrogen production: Early switchover from batch to continuous operation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1532–1541. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.01.012>
- Kim, M.-S., Lee, D.-Y., & Kim, D.-H. (2011). Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14), 8712–8718. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.040>
- Kim, M.-S. S., Cha, J., Kim, D.-H. H., Kim, S. H. S. S. H., Shin, H. S., Venkata Mohan, S., ... C., T. M. M. L. T. H. S. W. P. J.-L. G. B. K. (2012). Anaerobic bioconversion of food waste into energy: A critical review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 4(16), 6713–6733. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59555-3.00006-4>
- Kim, M. S., Cha, J., & Kim, D. H. (2013). *Fermentative Biohydrogen Production from Solid Wastes*. *Biohydrogen* (1st ed., Vol. #volume#). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00011-8>
- Kotay, S. M., & Das, D. (2007). Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.009>
- Koutrouli, E. C., Kalfas, H., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., Stamatelatou, K., & Lyberatos, G. (2009). Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp. *Bioresour Technol*, 100(15), 3718–3723. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.037>
- Lal, S., Romano, S., Chiarini, L., Signorini, A., & Tabacchioni, S. (2012). The *Paenibacillus polymyxa* species is abundant among hydrogen-producing facultative anaerobic bacteria in Lake Averno sediment. *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0763-0>
- Lay Lee, Y.J., Noike, T., J. J. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res*, 33, 2579–2586. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00483-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00483-7)
- Lee, Y.-W., & Chung, J. (2010). Bioproduction of hydrogen from food waste by pilot-scale combined hydrogen/methane fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(21), 11746–11755. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.093>
- Lee, Y. J., Miyahara, T., & Noike, T. (2001). Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 80(3), 227–231. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00067-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00067-0)
- Li, C, Zhang, T., & Fang, H. H. P. (2006). Fermentative hydrogen production in packed-bed and packing-free upflow reactors. *Water Science & Technology*, 54(9). <https://doi.org/10.2166/wst.2006.712>
- Li, Chenlin, & Fang, H. H. P. (2007). Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid



- Wastes by Mixed Cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(1), 1–39. <https://doi.org/10.1080/10643380600729071>
- Li, M., Zhao, Y., Guo, Q., Qian, X., & Niu, D. (2008). Bio-hydrogen production from food waste and sewage sludge in the presence of aged refuse excavated from refuse landfill. *Renewable Energy*, 33(12), 2573–2579. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.02.018>
- Li, S.-L. L., Whang, L.-M. M., Chao, Y.-C. C., Wang, Y.-F. F. H. F. Y.-H. Y. H. F., Wang, Y.-F. F. H. F. Y.-H. Y. H. F., Hsiao, C.-J. J., ... Cheng, S.-S. S. (2010). Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(1), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.033>
- Li, S. L., Lin, J. S., Wang, Y. H., Lee, Z. K., Kuo, S. C., Tseng, I. C., & Cheng, S. S. (2011). Strategy of controlling the volumetric loading rate to promote hydrogen-production performance in a mesophilic-kitchen-waste fermentor and the microbial ecology analyses. *Bioresour Technol*, 102(18), 8682–8687. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.067>
- Liang, D. W., Shayegan, S. S., Ng, W. J., & He, J. (2010). Development and characteristics of rapidly formed hydrogen-producing granules in an acidic anaerobic sequencing batch reactor (AnSBR). *Biochemical Engineering Journal*, 49(1), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.005>
- Lin, C. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(1), 41–45. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00083-1)
- Liu, H., Chen, G., & Wang, G. (2015). Characteristics for production of hydrogen and bioflocculant by *Bacillus* sp. XF-56 from marine intertidal sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.11.110>
- Luo, Y., Zhang, H., Salerno, M., Logan, B., & Bruns, M. (2008). Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(22), 6566–6576. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.047>
- Lutke-Eversloh, T., Bahl, H., Lütke-Eversloh, T., Bahl, H., Lutke-Eversloh, T., & Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Curr Opin Biotechnol*, 22(5), 634–647. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.011>
- Mariakakis, I., Bischoff, P., Krampe, J., Meyer, C., & Steinmetz, H. (2011). Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(17), 10690–10700. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.06.008>
- Mariotti, M. (2014). *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook*. (C. Peri, Ed.), *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118460412>
- Marounek, M., Fliegrova, K., Bartos, S., Milan Marounek Stanislav Bartos, K. F., Marounek, M., Fliegrova, K., & Bartos, S. (1989). Metabolism and Some Characteristics of Ruminant Strains of *Megasphaera elsdenii*. *Applied And Environmental Microbiology*, 5, 1570–1573. <https://doi.org/10.1093/aem/55.10.1570>
- Masset, J., Calusinska, M., Hamilton, C., Hiligsmann, S., Joris, B., Wilmotte, A., ... Thonart, P. (2012). Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. *Biotechnology for Biofuels*. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-35>
- Meshulam-Simon, G., Behrens, S., Choo, A. D., & Spormann, A. M. (2007). Hydrogen metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01588-06>
- Morantes, B. (2016). *Caracterización bioquímica de especies bacterianas aisladas del campo escuela colorado y su proyección en el aprovechamiento biotecnológico de residuos sólidos urbanos biodegradables*. Industrial University of Santander. Retrieved from <http://tangara.uis.edu.co>
- Moreno-Andrade, I., & Buitrón, G. (2015). Evaluation of particle size and initial concentration of total



- solids on biohydrogen production from food waste. *Fresenius Environmental*, 24.
- Munoz-Elias, E. J., & McKinney, J. D. (2006). Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cellular Microbiology*, 8(1), 10–22. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00648.x>
- Nasirian, N. (2012). Biological hydrogen production from acid-pretreated straw by simultaneous saccharification and fermentation. *African Journal of Agricultural Research*, 7(6). <https://doi.org/10.5897/ajar10.552>
- Nations, U. (2017). *Informe Mundial sobre el Desarrollo de los Recursos Hidricos de las Naciones Unidas 2017*.
- Niu, K., Zhang, X., Tan, W.-S., & Zhu, M.-L. (2010). Characteristics of fermentative hydrogen production with *Klebsiella pneumoniae* ECU-15 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(1), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.071>
- Noparat, P., Prasertsan, P., & O-Thong, S. (2011). Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain *Clostridium beijerinckii* PS-3 from fermented oil palm sap. In *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.143>
- Nowak, K., Chojnacka, A., Zielenkiewicz, U., Sumińska, M., Szczyński, P., Błaszczak, M. K., ... Sikora, A. (2011). Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. *Bioresource Technology*, 102(21), 10057–10064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.063>
- Oh, Y.-K. K., Park, M. S., Seol, E.-H. H., Lee, S.-J. J., & Park, S. (2003). Isolation of Hydrogen-producing Bacteria from Granular Sludge of an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(1), 54–57. <https://doi.org/10.1007/BF02932899>
- Ohnishi, A., Bando, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2010). Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.113>
- Pakarinen, O., Lehtomäki, A., Rintala, J., & Pakarinen A.; Rintala J., O. L. ki. (2008). Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: The effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(2), 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.10.008>
- Patel, S. K. S., Singh, M., Kumar, P., Purohit, H. J., & Kalia, V. C. (2012). Exploitation of defined bacterial cultures for production of hydrogen and polyhydroxybutyrate from pea-shells. *Biomass and Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.10.027>
- Patra, S., Lay, C. H., Lin, C. Y., O-Thong, S., & Reungsang, A. (2011). Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum*. In *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.120>
- Penislus Shiyan, S., & Krishnaveni, M. (2013). Hydrogen production by *Pseudomonas stutzeri* JX442762 isolated from thermal soil at Mettur power station, Salem district, Tamil nadu, India. *Journal of Pharmacy Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2012.11.023>
- Porwal, S., Kumar, T., Lal, S., Rani, A., Kumar, S., Cheema, S., ... Kalia, V. C. (2008). Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.011>
- Ramírez-Morales, J. E., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., Ruiz-Filippi, G., Ramírez-Morales, J. E., Tapia-Venegas, E., ... Ruiz-Filippi, G. (2015). Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. *Water Sci Technol*, 71(9), 1271–1285. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.104>
- Redondas, V. (2013). *Obtención de hidrógeno mediante la fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero*. Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad. Universidad de León, León.
- Ren, N., Xing, D., Rittmann, B. E., Zhao, L., Xie, T., & Zhao, X. (2007). Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*.



- <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01234.x>
- Renewable Energy Policy Network for the 21st Century, R. (2016). *REPORTE SOBRE LA SITUACIÓN MUNDIAL DE LAS ENERGÍAS RENOVABLES (GSR)*. Retrieved from <http://www.ren21.net/gsr>
- Salerno, M. B., Park, W., Zuo, Y., & Logan, B. E. (2006). Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Res*, *40*(6), 1167–1172. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.024>
- SEMARNAT. (2016). *INFORME DE LA SITUACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE EN MÉXICO. COMPENDIO DE ESTADÍSTICAS AMBIENTALES*. México City. Retrieved from <http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe15/index.html>
- SENER, S. de E. Estrategia Nacional de Energía 2014-2018 (2014). México.
- Seol, E., Kim, S., Raj, S. M., & Park, S. (2008). Comparison of hydrogen-production capability of four different Enterobacteriaceae strains under growing and non-growing conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.007>
- Sharma, P., & Melkania, U. (2018). Enhancement effect of amino acids on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of Escherichia coli and Enterobacter aerogenes. *Energy Conversion and Management*, *163*, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.02.072>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.081>
- Sivagurunathan, P., Sen, B., & Lin, C. Y. (2014). Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*, *39*(33), 19232–19241. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.03.260>
- Song, J., An, D., Ren, N., Zhang, Y., & Chen, Y. (2011). Effects of pH and ORP on microbial ecology and kinetics for hydrogen production in continuously dark fermentation. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.024>
- Song, L., & Dong, X. (2009). Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans gen. nov., sp. nov., isolated from H₂-producing UASB granules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000349-0>
- Ueno, Y., Fukui, H., & Goto, M. (2007). Operation of a Two-Stage Fermentation Process Producing Hydrogen and Methane from Organic Waste. *Environ. Sci. Technol.*, *41*, 1413–1419. <https://doi.org/10.1021/es062127f>
- Varrone, C., Rosa, S., Fiocchetti, F., Giussani, B., Izzo, G., Massini, G., ... Wang, A. (2013). Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.069>
- Venkata Mohan, S., Lalit Babu, V., & Sarma, P. N. (2008). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.004>
- Wang, B., Wan, W., & Wang, J. (2009). Effect of ammonia concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Bioresour Technol*, *100*(3), 1211–1213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.018>
- White, D., Drummond, J., & Fuqua, C. (2012). *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. New York: Oxford University Press.
- World Energy Council. (2011). *Global Transport Scenarios 2050*. World Energy Council. London. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.05.049>
- World Energy Council. (2016a). World Energy Scenarios 2016: THE GRAND TRANSITION. *World Energy Council (2016)*, 1–138. <https://doi.org/ISBN:9780946121571>
- World Energy Council, W. E. C. (2016b). *World Energy Trilemma Index | 2016*. World Energy Council. Retrieved from <https://www.worldenergy.org/publications/>
- Xing, D., Ren, N., Li, Q., Lin, M., Wang, A., & Zhao, L. (2006). Ethanolgenens harbinense gen. nov., sp. nov., isolated from molasses wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary*



- Microbiology*, 56(4), 755–760. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63926-0>
- Xing, D., Ren, N., & Rittmann, B. E. (2008). Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H₂-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1232–1239. <https://doi.org/10.1128/AEM.01946-07>
- Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J., & Hayashi, S. (2002). Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. *Biomass and Bioenergy*, 22(5), 389–395. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00014-4](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00014-4)
- Yokoyama, H., Waki, M., Moriya, N., Yasuda, T., Tanaka, Y., & Haga, K. (2007). Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74(2), 474–483. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0647-4>
- Zhang, M.-L., Fan, Y.-T., Xing, Y., Pan, C.-M., Zhang, G.-S., & Lay, J.-J. (2007). Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass and Bioenergy*, 31(4), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.08.004>
- Zhu, D., Wang, G., Qiao, H., & Cai, J. (2008). Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6116–6123. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.008>



8. Anexos

Anexo A Medio mineral

Solución A (Medio mineral)

En la Tabla A.1. se presenta la concentración de los distintos compuestos empleados como fuente de nutrientes y capacidad buffer durante las tres etapas experimentales. (Davila-Vazquez *et al.*, 2009).

Tabla A.1. Concentración de sales y nutrientes en los ensayos de producción de biohidrógeno.

Compuesto	Concentración final en ensayos (mg/L)
Na ₂ HPO ₄	11900
NH ₄ H ₂ PO ₄	4500
K ₂ HPO ₄	125
MgCl ₂	100
ZnCl ₂	75
FeSO ₄ * 6H ₂ O	25
MnSO ₄ * 7H ₂ O	15
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	12.5
CuSO ₄ * 5H ₂ O	5
CoCl ₂ * 8H ₂ O	3
Agua destilada	1L

Adaptado de Davila-Vazquez *et al.*, (2009)



Anexo B Características de la FORSU

Características de la FORSU

En la Tabla A.2 se presentan promedio y desviaciones estándar de las características de muestras FORSU de 14 ciudades en ocho países, con base en reportes realizados por diferentes autores (Campuzano-Ángeles, 2015).

Tabla A.2. Promedios de las características de la FORSU en distintos países

pH*	ST (%)*	SV (%)*	Composición elemental (%) **				Lípidos (%SV)	Proteínas (%SV)	Azúcares totales (%SV)	Lignina (%SV)	Fibras crudas (%SV)	DQO (gO ₂ /kg)*
			C	H	N	S						
4.5 ± 0.99	23.7 ± 6.9	23.1 ± 6.0	46.6 ± 4.7	2.8 ± 0.37	6.7 ± 0.68	0.18 ± 0.04	15.2 ± 4.2	17.2 ± 4.0	55.1 ± 13.4	10.2 ± 5.8	24.0 ± 8.1	368.6 ± 141.11

*: Valores reportados en base húmeda
**: Valores reportados en base seca
-Promedios calculados con base en datos de distintos países
-Adaptado de (Campuzano, 2015)



Anexo C Conversión de masa a volumen

Ecuación de conversión de masa a volumen

Ecuación empleada para la conversión de masa (g) de aceite de oliva extra virgen a volumen (mL), considerando una densidad de 0.9172 a 20°C (Mariotti, 2014)

$$\text{Peso de aceite (g)} = \frac{1}{0.9172 \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)} = \text{mL de aceite}$$



Anexo D Indicadores de ajuste a modelos

Estadísticos empleados en el ajuste de los datos a los modelos

Estadísticos empleados en el ajuste a los modelos de superficie de respuesta y de las formas canónicas de Scheffe’.

Coefficiente de determinación R^2

$$R^2 = \frac{SS_R}{SS_T} = 1 - \frac{SS_E}{SS_T} \quad \text{(Ecuación A.1.)}$$

Donde, R^2 : coeficiente de determinación R^2 ; SS_R : suma de cuadrados debidos a la regresión; SS_T : suma corregida total de cuadrados ; SS_E : suma de cuadrados debida al error.

Coefficiente de determinación R^2_{adj}

$$R^2_{Adj} = 1 - \left(\frac{n-1}{n-p} \right) \frac{SS_E}{SS_T} \quad \text{(Ecuación A.2.)}$$

Donde, R^2_{adj} : coeficiente de determinación R^2 ajustado; SS_E : suma de cuadrados debida al error; SS_T : suma corregida total de cuadrados; p : es el número de coeficientes de regresión (incluyendo intervención); n es el número de observaciones.