



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD JURIQUILLA**

PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE LA
FERMENTACIÓN DE EFLUENTES VITIVINÍCOLAS
CON DIFERENTES TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ENERGÍAS RENOVABLES

PRESENTA:

DENISE BARRALES ORDOÑEZ

TUTOR:

JULIÁN CARRILLO REYES, INSTITUTO DE
INGENIERÍA



**ENES
JURIQUILLA**

JURIQUILLA, QUERÉTARO, MARZO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



La fase experimental de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA), de la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); bajo la dirección del Dr. Julián Carrillo Reyes.

Este trabajo fue financiado por el proyecto Grupos Interdisciplinarios de Investigación (GII), del Instituto de Ingeniería UNAM “Cambio de Paradigma: Residuos Como Materia Prima Para Conciliar El Eje Agua-Energía-Ambiente-Seguridad Alimentaria”.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Julián Carrillo Reyes, a quien extendiendo mi admiración, le agradezco por la confianza que depositó en mí para formar parte de su equipo y la oportunidad de conocer a la comunidad del LIPATA, por brindarme siempre la mejor guía, paciencia y conocimientos necesarios para lograr con éxito este proyecto.

A la Maestra en Ingeniería, Marcela del Carmen Zavala Méndez, le agradezco por todo su apoyo y por ser un valioso ejemplo a seguir durante todo el proceso; no sólo su compañía, sino también su invaluable amistad que atesoro con mucho cariño, fueron piezas fundamentales para seguir adelante durante todo el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Idania Valdez Vázquez, la Dra. Diana Cristina Martínez Casillas y el Dr. Jesús Manuel Dorador González, por su tiempo dedicado para darme la mejor retroalimentación posible y mejorar mi trabajo final.

A toda la comunidad de LIPATA que me acompañó y ayudó durante mi estadía, particularmente al grupo de investigación del Dr. Julián Carrillo Reyes que me hizo sentir parte del equipo y me brindó su compañerismo.

DEDICATORIAS

A mis papás y mi hermana,
esto es un logro nuestro y fruto de su esfuerzo, gracias por acompañarme a través de los años y nunca dejarme sola. Son la razón de todo lo que hago, gracias por ser el soporte más importante en mi vida y por motivarme cada día a seguir adelante.

A Eli, Bren, Fer, César y Toño,
fueron la forma más bonita que tuvo la universidad para demostrar que podía sentirme en mi hogar sin estar en casa. Cada uno me dio momentos únicos que me llenan el corazón.

A Aldair e Itzel,
crecer juntos es mi parte favorita sobre ser su amiga, gracias por estar conmigo y creer en mí. No importa que camino tomemos, siempre estaremos juntos.

Y a mi canción favorita,
por haber sido la parte más especial de mí.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
1. ÍNDICE DE FIGURAS	1
2. ÍNDICE DE TABLAS	2
3. ACRÓNIMOS	3
4. RESUMEN	4
5. ABSTRACT	5
6. INTRODUCCIÓN	6
7. ANTECEDENTES	8
7.1 Hidrógeno	8
7.2 Formas de producción de hidrógeno	10
7.2.1 Reformado de vapor	11
7.2.2 Oxidación parcial	12
7.2.3 Electrólisis	12
7.2.4 Biomasa.....	13
7.3 Microorganismos y rutas de producción de hidrógeno	21
7.3.1 Biofotólisis	21
7.3.2 Celdas de electrólisis microbianas	23
7.3.3 Fotofermentación.....	25
7.3.4 Fermentación oscura.....	26
7.4 Valorización de residuos y aguas residuales para la producción de biohidrógeno	30
7.5 Efluentes vitivinícolas.....	32
8. JUSTIFICACIÓN	35
9. HIPÓTESIS	35
10. OBJETIVO.....	36
10.1 Objetivo general.....	36
10.2 Objetivos específicos.....	36
11. METODOLOGÍA.....	36
11.1 Sustratos.....	36
11.2 Inóculo	38
11.3 Cinéticas de producción de biohidrógeno.....	38

11.3.1 Modelo de Gompertz	40
11.4 Métodos analíticos	41
11.4.1 Determinación de sólidos totales.....	41
11.4.2 Concentración total de carbohidratos.....	42
11.4.3 Concentración de AGVs y solventes	42
11.4.4 Determinación de DQO	42
11.4.5 Análisis de biogás.....	42
11.5 Análisis estadísticos.....	43
12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
12.1 Caracterización de los efluentes vitivinícolas	43
12.2 Potenciales de producción de biohidrógeno por sustrato	47
12.3 Análisis estadístico del efecto de almacenamiento en la producción de biohidrógeno	53
12.4 Balance de DQO	53
13. CONCLUSIONES.....	57
14. PRODUCTOS ACADÉMICOS	59
14. REFERENCIAS.....	60
15. ANEXOS	70

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Usos del hidrógeno.

Figura 2. Formas de producción de hidrógeno.

Figura 3. Métodos biológicos de producción de hidrógeno.

Figura 4. Estructuras de hidrogenasas: (a) Hidrogenasa-NiFe, (b) Hidrogenasa-FeFe, (c) Hidrogenasa-Fe.

Figura 5. Procesos de biofotólisis directa e indirecta.

Figura 6. Diagrama de una celda microbiana.

Figura 7. Proceso de fotofermentación.

Figura 8. Fermentación oscura.

Figura 9. Ruta metabólica de la fermentación oscura (PFL piruvato formiato liasa; FHL Formiato de hidrógeno liasa; PDH Piruvato deshidrogenasa; ADH Alcohol deshidrogenasa; ACK Acetato quinasa).

Figura 10. Arreglo de los sustratos seleccionados, vino tinto (VT), vino rosa (VR) y vino blanco (VB).

Figura 11. Incubadora de muestras (a), trampa de CO₂ (b), unidad de medición para gases (c), botellas Schott con sistema de agitación.

Figura 12. Evolución de las composiciones de los sustratos: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c).

Figura 13. Cinéticas de producción de hidrógeno de sustratos semana 0: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c), mezcla(d).

Figura 14. Tiempo de retraso de producción: fase 1 (a), fase 2 (b).

Figura 15. Tasas máximas de producción: fase 1 (a), fase 2 (b).

Figura 16. Potenciales máximos de producción en diferentes unidades.

Figura 17-1. Composiciones iniciales y finales de los sustratos: semana 0, vino tinto, rosa y blanco (a) (b) (c); semana 2, vino tinto, rosa y blanco (d) (e) (f); semana 3, vino tinto, rosa y blanco (g) (h) (i).

Figura 17-2. Composiciones iniciales y finales de los sustratos: semana 5, vino tinto, rosa y blanco (j) (k) (l); mezclas, semana 0, semana 2, semana 3, semana 5 (m) (n) (o) (p).

Figura 18. Cinéticas de producción de hidrógeno de los sustratos en la semana 0 por duplicado: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c), mezcla(d).

Figura 19. Cinéticas de producción de hidrógeno de los sustratos en la semana 2 por duplicado: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c), mezcla(d).

Figura 20. Cinéticas de producción de hidrógeno de los sustratos en la semana 3 por duplicado: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c), mezcla(d).

Figura 21. Cinéticas de producción de hidrógeno de los sustratos en la semana 5 por duplicado: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c), mezcla(d).

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las hidrogenasas.

Tabla 2. Características de los métodos biológicos para producción de hidrógeno.

Tabla 3. Productividades de métodos biológicos para la producción de H₂ y el volumen necesario para producir 5kW en una pila de combustible de electrolitos poliméricos (PEMFC).

Tabla 4. Características de efluentes residuales.

Tabla 5. Caracterizaciones de diferentes efluentes vitivinícolas.

Tabla 6. Composición y propiedades del inóculo empleado en las cinéticas.

Tabla 7. Caracterización de los sustratos en la semana 0.

Tabla 8. Valores p obtenidos de la prueba ANOVA de dos vías de cada compuesto.

Tabla 9. Comparación de los potenciales máximos de hidrógeno obtenidos con reportes de la literatura.

3. ACRÓNIMOS

AGVs	Ácidos Grasos Volátiles
ATP	Adenosín trifosfato
CCUS	Carbon Carbon Capture, Use and Storage
CH₄	Metano
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
DQO	Demanda Química de Oxígeno
H₂	Hidrógeno
IEA	Agencia Internacional de Energía
N₂	Nitrógeno dimolecular
NAD	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
PEMFC	Proton Exchange Membrane Fuel Cell
SSF	Sólidos Suspendidos Fijos
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles

4. RESUMEN

El uso del hidrógeno como sustituto energético ha ganado atención durante los últimos años debido a factores como el agotamiento de fuentes fósiles y sus características que lo posicionan como uno de los combustibles más limpios al liberar sólo vapor de agua durante su combustión, además de su alta densidad energética. Los principales medios de producción de hidrógeno utilizan como materia prima combustibles fósiles, sin embargo, existen procesos alternativos como la fermentación oscura. Este es un método biológico, es decir que los microorganismos utilizan la energía química contenida en la biomasa para convertirla en hidrógeno. La fermentación oscura es capaz de aprovechar una amplia variedad de sustratos para la producción de hidrógeno, por ejemplo, las vinazas de vino. Estos efluentes se caracterizan por sus altas cargas orgánicas y por ser un riesgo ambiental al no recibir tratamiento antes de ser descargadas en cuerpos de agua. Según la literatura, su composición varía dependiendo del punto donde son recolectados los efluentes. El objetivo de este trabajo fue monitorear la composición de 3 lotes de efluentes residuales vitivinícolas provenientes del lavado de reactores de tres tipos de vino (tinto, rosa y blanco) durante su almacenamiento por 5 semanas y determinar si el cambio de composición generó un efecto significativo en sus potenciales de producción de biohidrógeno. A través de un análisis estadístico, se demostró que, al aumentar el tiempo de almacenamiento de los sustratos, el potencial de producción de hidrógeno también incrementa. Sin embargo, al realizar una mezcla de los tres lotes por cada condición de tiempo evaluada, los cambios no son significativos y sus potenciales se mantienen constantes indistintamente del tiempo de almacenamiento.

5. ABSTRACT

The use of hydrogen as an energy substitute has gained attention in recent years due to factors such as the depletion of fossil sources and its characteristics that position it as one of the cleanest fuels by releasing only water vapor during its combustion, in addition to its high energy density. Nowadays, the main production methods of hydrogen use as raw material fossil fuels, however, there are alternative processes such as dark fermentation. This is a biological method, which means that the microorganisms use the chemical energy contained in the biomass to convert it into hydrogen. An advantage of dark fermentation is the wide variety of substrates to produce hydrogen, for example, wine vintages. These effluents are characterized by their high organic loads and as an environmental risk by not receiving treatment before being discharged into water bodies. According to the literature, its composition varies depending on the point where the effluents are collected. This paper aimed to assess the composition of 3 batches of wine effluent from the washing of reactors of three types of wine (red, pink, and white) during their storage for 5 weeks and to determine whether the change in composition generated a significant effect on their biohydrogen production potentials. Through a statistical analysis, it was demonstrated that, by increasing the storage time of the substrates, the potential of hydrogen production also increases. However, when combining the three batches for each time condition, their effects remain insignificant, and the potentials stay constant, regardless of storage time.

6. INTRODUCCIÓN

Debido a la dependencia y agotamiento de los combustibles fósiles, cada vez es menos rentable utilizar estos recursos no renovables como principal suministro de energía, por lo que fuentes alternativas han comenzado a ganar relevancia en los últimos años, anudado a eso, autores describen una relación entre estas estrategias y el crecimiento económico en marco de los objetivos de desarrollo sostenible (Sharma et al., 2023), logrando una estabilidad económica gracias a la incorporación de energías renovables.

La bioenergía es una energía renovable capaz de generar biocombustibles sólidos, líquidos y gaseosos (Cherwoo et al., 2023). Uno de los biocombustibles gaseosos es el biohidrógeno que se caracteriza por ser el único combustible conocido libre de carbono y que durante su combustión sólo produzca vapor de agua (Nanda & Sarangi, 2022). Estas características han ocasionado que la producción de hidrógeno (H_2) sea un objeto de estudio muy común con el propósito de mejorar o crear procesos de producción de dicho combustible, puesto que además de que algunos autores han considerado al hidrógeno como una solución a la dependencia a los combustibles fósiles y las emisiones de gases de efecto invernadero. La Comisión Europea estableció en el 2020 estrategias de integración del H_2 como un punto fundamental para lograr la neutralidad de carbono propuesta para 2050 (Schropp et al., 2024; Sharma et al., 2023).

Los usos del hidrógeno se han expandido con el tiempo, lo que ha provocado que anualmente, se comercialicen cerca de 50 millones de toneladas de hidrógeno a nivel global, con una tasa de crecimiento anual del 10% (Nanda & Sarangi, 2022). Existen distintos métodos para la producción de hidrógeno, un ejemplo son los procesos biológicos, que a partir de recursos renovables como los efluentes y residuos orgánicos o biomasa, producen un gas determinado “biohidrógeno” (Darvishi Harzevili & Hiligsmann, 2018). El biohidrógeno ha ganado relevancia en los últimos años debido al aumento en los costos de producción de los combustibles fósiles, ocasionados por el agotamiento de los recursos no renovables (Rajput et al., 2022) y la necesidad de suplir la demanda con otro tipo de combustible. Grupos de científicos, compañías

gubernamentales, agencias, etc., aseguran que las características físicas y químicas del hidrógeno, lo posicionan como un combustible indispensable en el futuro energético (Schlapbach & Züttel, 2010). Sin embargo, los métodos biológicos son los métodos menos utilizados a nivel industrial, a diferencia de los procesos que involucran combustibles fósiles, los cuales representan aproximadamente el 96% de la producción del hidrógeno (Arregi et al., 2018).

Dentro de los diferentes métodos de producción de hidrógeno, la producción biológica destaca por ser una tecnología amigable con el medio ambiente, que promueve un manejo adecuado de residuos y al mismo tiempo aprovecha una amplia variedad de desechos orgánicos a costos bajos (Azwar et al., 2014). Los principales métodos biológicos son la biofotólisis, fermentación y electrólisis microbiana. Particularmente, fermentación oscura es el proceso biológico más estudiado para producir hidrógeno y dependiendo del origen del sustrato empleado, se ha caracterizado por la amplia variedad de biomasa que puede utilizar como sustrato, sus altas tasas de producción de hidrógeno, sus bajos costos de operación y debido a que en el proceso el requerimiento de luz no es necesario, así mismo el diseño del reactor puede ser más simple (Zahuantitla Razo, 2020; Azwar et al., 2014; (Palomo-Briones et al., 2017)). Al igual que los demás biocombustibles, el biohidrógeno puede ser clasificado según la materia primaria a partir del cual son producidos, esta clasificación consiste en cuatro generaciones.

Los biocombustibles de primera generación son producidos a partir de cultivos energéticos o agrícolas, es decir que fueron sembrados específicamente para realizar este proceso de conversión, por ejemplo, los cultivos de caña de azúcar. Los biocombustibles de segunda generación se producen a partir de desechos, pero que a diferencia de los de primera generación, estos no tienen un uso alimenticio, un ejemplo son los residuos agrícolas de la cosecha de los cultivos como el rastrojo de maíz. Los biocombustibles de tercera generación provienen de microalgas y, por último, los biocombustibles de cuarta generación se pueden considerar como biocombustibles con emisiones negativas, ya que provienen de organismos genéticamente modificados para

que puedan consumir una mayor cantidad de CO₂, utilizando el que se encuentra libre en el medio ambiente para producir hidrógeno (Tomar et al., 2023).

Las vinazas de vino son efluentes residuales de todo el proceso de obtención del vino, a partir de los cuales se puede generar biohidrógeno de segunda generación, existen trabajos que comprueban que tratar este tipo de efluentes a través de la fermentación oscura es una alternativa viable para revalorizar estos residuos debido a su composición y altas cargas orgánicas (Mejía-Saucedo et al., 2022; Zavala Méndez, 2020). En trabajos anteriores se ha planteado mejorar el rendimiento a través de técnicas como la variación en la carga orgánica (Cortez-Cervantes, 2019), de tal forma, este trabajo propone evaluar la estrategia para mejorar la producción de hidrógeno a partir del tiempo de almacenamiento de dichos efluentes.

7. ANTECEDENTES

7.1 Hidrógeno

En la búsqueda de fuentes de energía alternativas, el hidrógeno ha comenzado a ganar relevancia ya que es considerado un combustible de naturaleza limpia, debido a que durante su combustión sólo se produce vapor de agua (Kundu et al., 2022). Además, tiene un rendimiento energético de 141.9 J kg⁻¹, 2.8 veces superior en promedio a los combustibles convencionales (Boyles, 1984) tales como el biodiesel (37 J kg⁻¹), el gas natural (50 J kg⁻¹) y el metano (55.7 J kg⁻¹) (Zavala Méndez, 2020).

El hidrógeno es el elemento más abundante en la tierra, sin embargo, menos del 1% se encuentra en su forma molecular como gas, la mayoría se encuentra en forma de agua y otra parte en hidrocarburos líquidos o gaseosos (Schlapbach & Züttel, 2010). Por lo que es necesario separarlo a través de procesos termoquímicos o una conversión biológica (Darvishi Harzevili & Hiligsmann, 2018).

Actualmente, aún existen retos tecnológicos para implementar una economía del hidrógeno como los medios de producción de hidrógeno, los cuales principalmente son procesos termoquímicos a partir de combustibles fósiles como el reformado de metano

(Shanmugam et al., 2020). Adicionalmente, el hidrógeno enfrenta limitaciones para su almacenamiento debido a que es el elemento menos denso (1 kg de hidrógeno ocupa aproximadamente 11 m³), por lo que tiene una densidad energética extremadamente baja, a condiciones de temperatura y presión ambiente. Esta baja densidad provoca un bajo volumen en los sistemas de almacenamiento, dificultando su traslado principalmente para aplicaciones en el sector transporte (Schlapbach & Züttel, 2010; Feng et al., 2023).

Más de 50 millones de toneladas de hidrógeno son comercializadas a nivel global anualmente, con una tasa de crecimiento de 10% cada año (Rajput et al., 2022), sin embargo el principal uso del hidrógeno no es como fuente de energía, sino que tiene diversos usos en diferentes industrias (Figura 1). Por ejemplo, es utilizado como materia prima en la producción de dispositivos electrónicos, alcoholes, aldehídos y amoniaco. También se utiliza en la hidrogenación de grasas y aceites, procesamiento de acero y refinerías para la desulfuración o reformulación de gasolina (Nanda & Sarangi, 2022). Específicamente, el 50% de la producción del hidrógeno se utiliza en la fabricación de fertilizantes, mientras que el 37% se destina para la industria del petróleo (Nanda & Sarangi, 2022).

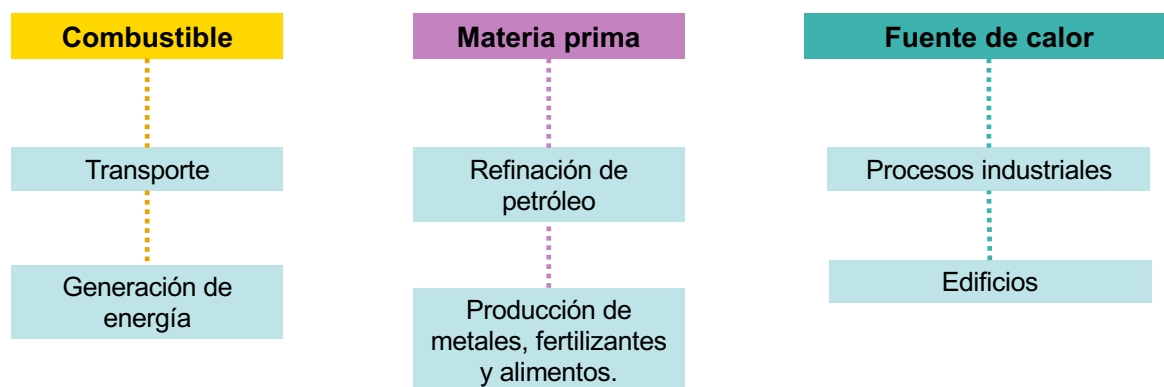


Figura 1. Usos del hidrógeno. Adaptado de “Recent advancement and assessment of green hydrogen production technologies” (p. 113947), por B.S. Zainal, P.J Ker, H. Mohamed, H.C Ong, I.M.R. Fattah, S.M.A. Rahman, L.D. Nghiem & T.M.I Mahlia, 2024, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 189.

A pesar de que el nivel de madurez tecnológica del hidrógeno como combustible continúa siendo relativamente bajo en algunas regiones del mundo, la Agencia Internacional de

Energía (IEA, 2023) reportó en 2022 un aumento anual del 45% en el uso del hidrógeno sólo en transporte terrestre.

7.2 Formas de producción de hidrógeno

Existen diferentes métodos para producir hidrógeno en los cuales pueden participar más de una fuente de energía (Figura 2). Actualmente, los principales métodos de producción no han variado significativamente respecto a años anteriores, en 2020 el 3.9% del hidrógeno se produjo vía electrólisis, mientras que aproximadamente el 96% de la producción provino de combustibles fósiles, principalmente el gas natural (49%), además de otros combustibles como hidrocarburos líquidos (29%) y el carbón (18%). En ese mismo año, tan sólo la producción de hidrógeno a partir de combustibles fósiles, principalmente gas natural, emitió aproximadamente 830 toneladas de CO₂ (Baeyens et al., 2020; Shiva Kumar & Lim, 2022).

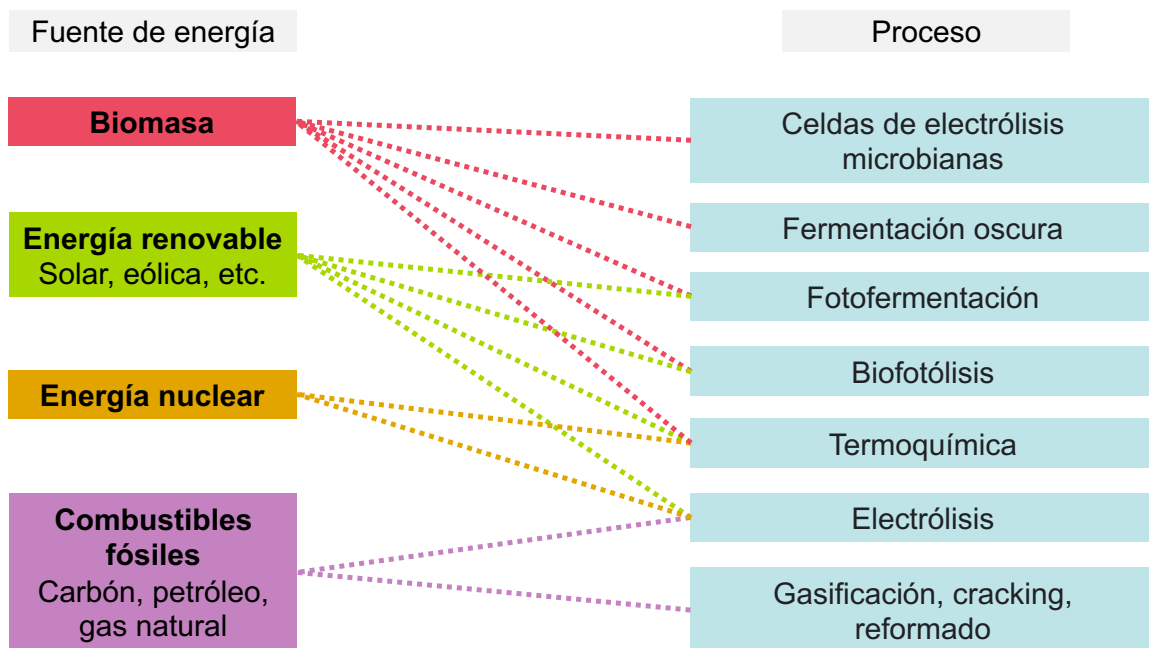


Figura 2. Formas de producción de hidrógeno. Adaptado de *Biohydrogen Production from Organic Wastes*, (p. 4), por J. Wang & Y. Yin, 2017, Springer Singapore.

De acuerdo con Incer-Valverde et al. (2023), el hidrógeno puede clasificarse principalmente en cuatro categorías dependiendo de su método de producción; gris, a

partir de reformado de metano sin CCUS (Carbon Capture, Use and Storage, por sus siglas en inglés); verde, a partir de fuentes renovables, mediante electrólisis o a partir de biomasa; azul, a partir de reformado de metano con CCUS y turquesa, a partir de pirólisis de metano con almacenamiento sólido de CO₂. Además, otros autores también consideran las clasificaciones de hidrógeno café y negro, donde ambos son producidos por un proceso de gasificación: el café a partir de lignito o metano y el hidrógeno negro a partir de carbón (Shiva Kumar & Lim, 2022).

7.2.1 Reformado de vapor

El método de producción de hidrógeno más utilizado a nivel comercial es el reformado de vapor debido a su avanzado desarrollo y alta rentabilidad (Wang & Yin, 2017). Este método consiste en dos etapas, durante la primera etapa la producción de hidrógeno se genera a través de una reacción endotérmica entre el gas metano (generalmente gas natural), con vapor a altas temperaturas (ecuación 1) obteniendo un gas de síntesis compuesto principalmente de hidrógeno y monóxido de carbono (Barelli et al., 2008). Mientras que, en la segunda etapa, se involucra una reacción secundaria de desplazamiento del gas de agua para producir hidrógeno adicional (ecuación 2). Además, es necesario un proceso de purificación del gas para extraer el dióxido de carbono presente a través de técnicas como la adsorción por oscilación de presión, destilación criogénica y captura por medio de membranas.



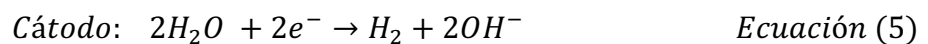
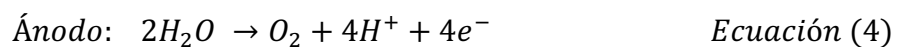
Usualmente, estas reacciones ocurren a condiciones de temperatura de 700 a 1100°C y presiones de 2 a 3 MPa en reactores con un catalizador (comúnmente níquel), para acelerar el proceso (Abdelkareem et al., 2024; Arsad et al., 2023).

7.2.2 Oxidación parcial

Otro método de producción de hidrógeno es la oxidación parcial de hidrocarburos (Wang & Yin, 2017), donde se lleva a cabo una reacción con temperaturas superiores a 700°C (Arsad et al., 2023). Este método consiste en provocar una reacción entre un combustible fósil (generalmente gas natural o un hidrocarburo líquido) con una cantidad limitada de oxígeno, produciendo un gas compuesto de monóxido y dióxido de carbono (Hohn & Lin, 2009). A diferencia del reformado de vapor, la oxidación parcial al ser una reacción exotérmica no requiere de un sistema que le provea energía, sino que la oxidación incompleta del combustible genera calor y rompe el hidrocarburo en moléculas más pequeñas (Rabenstein & Hacker, 2008).

7.2.3 Electrólisis

La electrólisis es un proceso muy común para producir hidrógeno, consiste en la separación molecular del agua a través de una reacción endotérmica, es decir que requiere que se le provea energía (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). Esta técnica consiste en aplicar una diferencia de voltaje al agua a través de dos electrodos, de esta forma la molécula se rompe (ecuación 3) y se produce gas oxígeno en el ánodo y gas hidrógeno en el cátodo (Levene et al., 2007). Las moléculas del agua llevan a cabo una reacción de reducción en el cátodo (electrodo negativo) y una de oxidación en el ánodo (electrodo positivo) como se muestra en las ecuaciones (4) y (5) (Arsad et al., 2023).



La electrólisis se lleva a cabo a través de los electrolizadores, los cuales forman un circuito por el cual los electrones circulan. Los electrolizadores más utilizados se clasifican en tres tipos: electrolizadores alcalinos, electrolizadores de membrana de electrolito y electrolizadores de óxido sólido (Aydin et al., 2021). Un electrolizador a

temperatura y presión estándar requiere una energía libre de Gibbs de $237.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ para poder operar, se ha reportado que la electrólisis es un proceso muy eficiente a comparación de otros métodos, con eficiencias de trabajo de entre 67 y 84% para electrolizadores de membrana (Abdelkareem et al., 2024).

La electrólisis es una tecnología que se encuentra en proceso de investigación, no obstante, no ha tenido el mismo éxito comercial que otros métodos como el reformado de vapor debido a su costo y dependencia a la energía eléctrica, la cual puede ser suministrada por fuentes renovables, sin embargo, se enfrentaría al problema de la intermitencia de estas fuentes. Por otro lado, una de las ventajas de utilizar este método de producción es que es una tecnología escalable, es decir que es una opción viable incluso para pequeñas aplicaciones de producción. La electrólisis es un método con cero emisiones y el más efectivo para producir hidrógeno si se utiliza energía renovable como fuente de electricidad (El-Shafie, 2023). Esta tecnología se encuentra en crecimiento ya que según reportes de la IEA (2023), a finales del 2022 existía una capacidad instalada de 700 MW, lo que representa un 20% de crecimiento a comparación del año anterior. Adicionalmente, la Unión Europea en la estrategia del hidrógeno para Europa, considera metas que requieren un aumento de 40 GW de tecnología instalada de electrólisis para el 2030, con una producción de 10 millones de toneladas (Schropp et al., 2024).

7.2.4 Biomasa

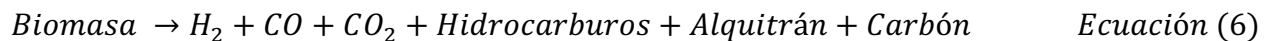
La bioenergía es considerada la energía renovable con mayor cantidad de materia prima disponible en el mundo, es decir, la biomasa (Nanda & Sarangi, 2022), ya que es un recurso ubicuo. La biomasa puede considerarse como una fuente de compuestos orgánicos fotosintéticos neutros en carbono, por lo que es considerada una fuente de energía renovable, capaz de producir hidrógeno (Lee et al., 2010; Nanda & Sarangi, 2022). Para la producción de biohidrógeno, la biomasa puede ser tratada por dos diferentes rutas: termoquímica (pirólisis y gasificación) y biológica (fermentación, fotofermentación y celdas microbianas) (Rubinsin et al., 2023).

7.2.4.1 Conversión termoquímica

La conversión termoquímica aprovecha la energía contenida en la biomasa por medio de procesos que no incluyen microorganismos, a diferencia de la conversión biológica. Este medio de producción suele ser muy eficiente, ya que durante los procesos termoquímicos generalmente se consume totalmente la biomasa y se llevan cabo en tiempos no muy prolongados, además de tener costos operacionales relativamente bajos, ya que la biomasa no requiere de algún pretratamiento (Nanda & Sarangi, 2022).

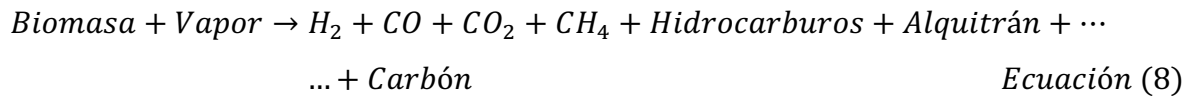
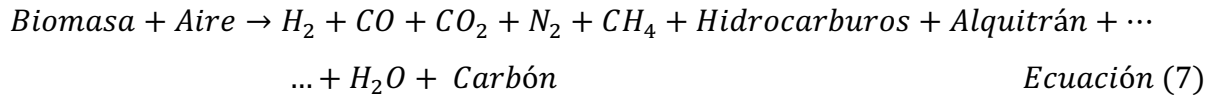
Los métodos termoquímicos más utilizados para producir hidrógeno a partir de biomasa son la pirólisis y la gasificación. En ambos procesos, generalmente se utiliza material lignocelulósico como materia prima, por ejemplo, residuos de la fabricación de aceite de palma, bambú, caña de azúcar y madera (Rubinsin et al., 2023).

Durante la pirólisis ocurre una descomposición térmica de la biomasa que se lleva a cabo a temperaturas de 375-525°C y presiones de 0.1-0.5 MPa en la ausencia de oxígeno (Nanda & Sarangi, 2022). La descomposición pirolítica tiene como subproductos ciertos hidrocarburos, alquitrán y carbón, como se muestra en la ecuación 6 (Parthasarathy & Narayanan, 2014).



La gasificación consiste en una serie de reacciones, generalmente: secado, pirólisis, oxidación y reducción. En la primera etapa, el agua contenida en la biomasa se evapora a una temperatura de 100 a 150°C (Yan et al., 2024), después durante la pirólisis, se obtienen gases volátiles, alquitrán y carbón, posteriormente, en la oxidación, estos productos reaccionan con un agente gasificante, comúnmente oxígeno, para generar más gases y producir calor para la gasificación (Narnaware & Panwar, 2001). Este proceso se lleva a cabo en condiciones de 500 a 1400°C y una presión de aproximadamente 3.3 MPa (Nanda & Sarangi, 2022). La composición del gas resultante suele ser de 18-25% CO, 12-15% H₂, 3-5% metano, así como trazas de gases como N₂ y CO₂ (Arsad et al.,

2023), sin embargo, los porcentajes pueden variar, así como el agente gasificante en la reacción como se muestra en las ecuaciones (7) y (8) (Nikolaidis & Poullikkas, 2017).



7.2.4.2 Conversión biológica

La producción biológica de hidrógeno es considerada uno de los métodos más prometedores debido a sus características de proceso, como la baja liberación de contaminantes y la revalorización de residuos (Nanda & Sarangi, 2022), sin embargo, debido a sus bajos rendimientos en comparación a otros procesos y altos costos operacionales para mantener a los microorganismos en óptimas condiciones, aún es una tecnología poco común a escala industrial.

Durante la producción biológica, los organismos utilizan la energía bioquímica contenida generalmente en carbohidratos como la glucosa, sacarosa, celulosa o proteínas y a través de mecanismos fotosintéticos producen diferentes tipos de combustibles (Dincer & Zamfirescu, 2016). De acuerdo con el tipo de combustible, el método biológico variará, así como los microorganismos y requerirán diferentes tipos de sustratos, condiciones operacionales, etc.

Los métodos biológicos para la producción de hidrógeno utilizan recursos como la luz solar, agua, enzimas y CO₂ para llevar a cabo procesos de fotosíntesis, fermentación y actividades microbianas (Choiron et al., 2020); los usos de estos recursos dependerán del tipo de proceso como se muestra en la Figura 3.

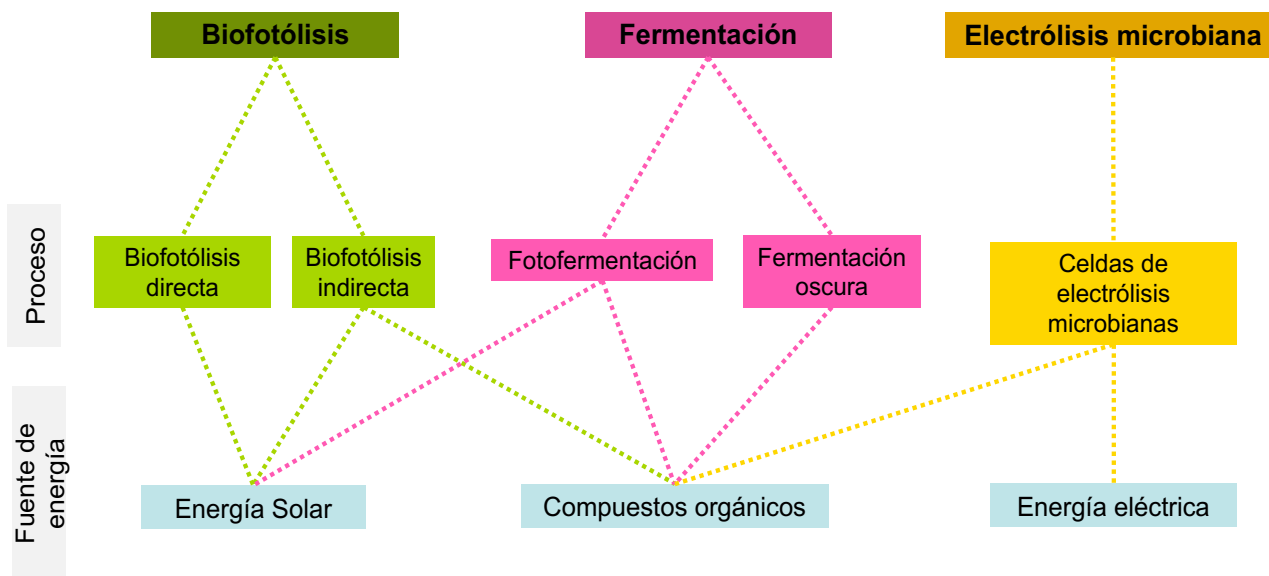
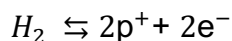


Figura 3. Métodos biológicos de producción de hidrógeno. Adaptado de “Application of modern approaches to the synthesis of biohydrogen from organic waste” (p. 21192), por P. Sharma, A. Jain, B. J. Bora, D. Balakrishnan, P.L. Show, R. Ramaraj, Ü. Ağbulut, K.S. Khoo, 2023, *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(55).

Los métodos presentados en la Figura 3. pueden utilizar una amplia variedad de sustratos como residuos agrícolas, agua residual industrial, desperdicios de comida, residuos municipales y materia lignocelulósica o forestal (Sharma et al., 2023). Para lograr el aprovechamiento máximo de cada sustrato, convendrá caracterizarlo y de acuerdo con su composición elegir el método o serie de métodos que mejor se adecue a sus características.

Los procesos biológicos más utilizados para producción de hidrógeno son la biofotólisis directa e indirecta, fotofermentación, fermentación oscura y sistemas secuenciales de estas dos últimas (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). Una característica de la producción biológica de hidrógeno es que las reacciones llevadas a cabo en el proceso son catalizadas por enzimas, las cuales son principalmente las hidrogenasas y las nitrogenasas. La hidrogenasa cataliza la producción de biohidrógeno de forma reversible, mediante la oxidación del H_2 en protones y electrones (Artz et al., 2017) como se describe en la ecuación (9).



Ecuación (9)

Las hidrogenasas se clasifican según las estructuras de sus sitios activos que se muestran en la Figura 4, siendo estas hidrogenasa-NiFe, hidrogenasa-FeFe e hidrogenasa-Fe (Bagyinka, 2014).

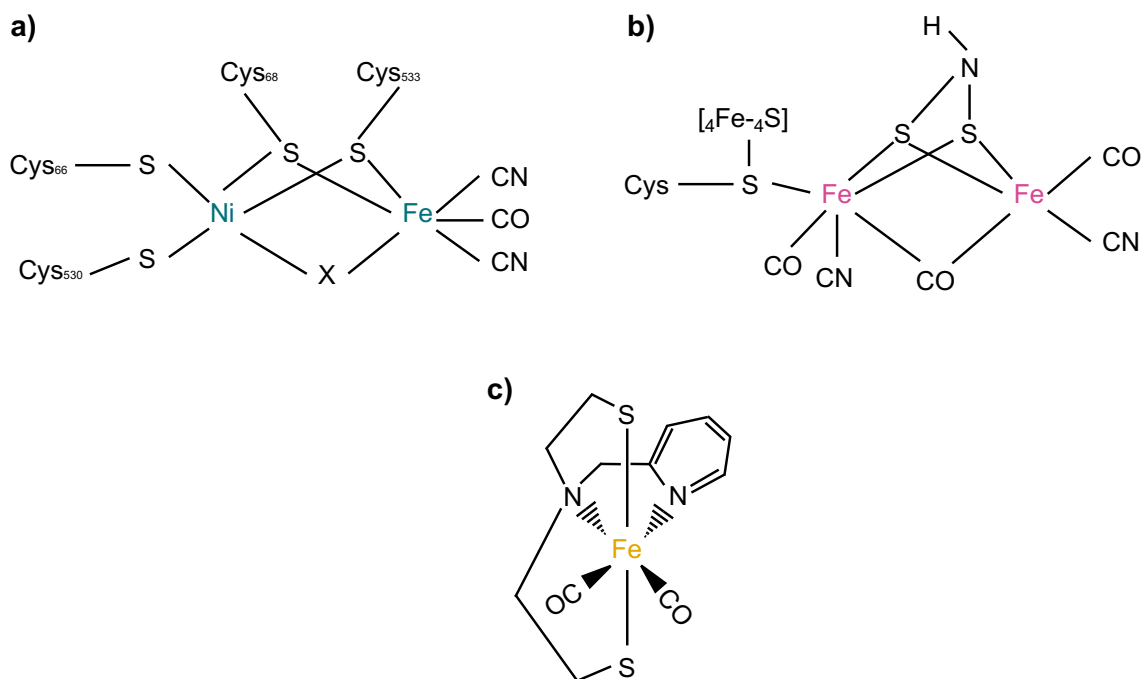


Figura 4. Estructuras de hidrogenasas: (a) Hidrogenasa-NiFe, (b) Hidrogenasa-FeFe, (c) Hidrogenasa-Fe.

Las hidrogenasas-FeFe son comúnmente encontradas en eucariontes, mientras las hidrogenasas-NiFe predominan en bacterias y arqueas (Artz et al., 2017). De la misma forma, Budiman & Wu (2018) reporta que las hidrogenasas-NiFe suelen estar presentes en sistemas bacterianos mientras las hidrogenasas-FeFe son comunes en las microalgas. Por otro lado, la hidrogenasa-Fe está relacionada a actividades metanógenas, su primer reporte se encontró en una arquea *Methanothermobacter marburgensis* (Vignais & Billoud, 2007).

Las hidrogenasas-Fe se encuentran únicamente en arqueas metanogénicas (Lubitz & Ogata, 2013) y también reciben los nombres de hidrogenasas simples e hidrogenasas libres de NiFe, debido a su estructura de sitio activo y su principal función es catalizar la

reducción de CO_2 con H_2 a metano. Este tipo de enzima no posee ningún clúster FeS, el cual es el encargado de transferir electrones entre el sitio activo y el sitio de unión del aceptador o donante de electrones. El hierro presente en la enzima no permite realizar reacciones redox, por lo que tiene propiedades catalíticas diferentes a las de las hidrogenasas-NiFe y FeFe y no puede llevar a cabo la reacción descrita por la ecuación d (Kim & Kim, 2011). Por lo que en general, la producción de H_2 está asociada a la presencia de las hidrogenasas-NiFe y FeFe, sin embargo, según Lubitz & Ogata (2013), las hidrogenasas-NiFe suelen ser más activas en la oxidación de H_2 , mientras las hidrogenasas-FeFe están más relacionadas con la producción de H_2 .

Las hidrogenasas-FeFe poseen una estructura monomérica y contiene una sola subunidad catalítica con dos grupos de hierro ubicados en el centro activo. Se componen por varias subunidades dependiendo de los organismos, sin embargo, en general su estructura consiste en un núcleo conformado por un grupo H (un centro bimetálico FeFe), conectado a un grupo Fe_4S_4 por un tiolato de un residuo de cisteína. La mayor parte de las hidrogenasas-FeFe contienen grupos adicionales de Fe_4S_4 o Fe_4S_4 . No obstante, las hidrogenasas-FeFe presentes en algas verdes contienen sólo el grupo H y ningún otro grupo de FeS (Budiman & Wu, 2018; Lubitz & Ogata, 2013). La estructura de las hidrogenasas-NiFe consiste en un núcleo heterobimetálico de NiFe, Fe está unido a través de tres enlaces a un carbonilo (CO) y dos cianuros (CN). Existen variaciones en la arquitectura molecular de las hidrogenasas-NiFe que afectan directamente su función fisiológica, de acuerdo con esta, se clasifican en cuatro grupos primarios (Tabla 1).

El grupo I se compone por las enzimas de captación de H_2 unidas a la membrana, su función es oxidar el H_2 para liberar electrones que se utilizarán durante la respiración, este grupo de enzimas son las más estudiadas y caracterizadas por su estructura, función y reactividad de enzimas derivadas en bacterias reductoras de sulfato y anaerobias facultativas. El grupo II está integrado por proteínas sensibles al oxígeno presentes en cianobacterias y bacterias fotosintéticas de azufre púrpura. El grupo III se constituye por hidrogenasas cuya función es acoplar directamente la oxidación de H_2 a la reducción de cofactores biológicos como el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD), nicotinamida

adenina dinucleótido fosfato (NADP). Las hidrogenasas que componen al grupo IV tienen diferentes funciones fisiológicas, desde el metabolismo de un carbono del formiato y el CO, hasta la generación de una fuerza motriz de protones a través de una membrana (Shafaat, 2021).

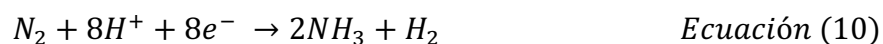
Tabla 1. Clasificación de las hidrogenasas. Adaptado de “Hydrogenases for biological hydrogen production” (p. 8424), por D.-H. Kim & M.-S. Kim, 2011, *Bioresource Technology*, 102(18).

Hidrogenasa	Proceso	Organismos
NiFe	I Conservación de energía	Bacterias y arqueas
	II Componentes de detección de H ₂ en la regulación genética de la expresión de hidrogenasa	Bacterias y cianobacterias
	Conservación de energía	Metanógenos, bacterias, arqueas y cianobacterias
	Conservación de energía	
	III Fermentación	Bacterias y arqueas
	Equilibrio redox	
IV Fermentación		
FeFe	Fermentación	Bacterias y eucariontes
	Conservación de energía	
Fe	Fermentación	Arqueas

Las hidrogenasas sufren un efecto de inhibición en la presencia del O₂, sin embargo, se considera que las hidrogenasas-NiFe presentan una mayor resistencia a comparación de las hidrogenasas-FeFe, las cuales son extremadamente sensibles a ambientes aerobios y pueden inactivarse irreversiblemente incluso por trazas de O₂. El efecto de inhibición en estas enzimas además de ser causado por la presencia de O₂, también puede ser generado por la presión parcial de H₂. Las hidrogenasas-FeFe experimentan un efecto mucho menor a comparación de las hidrogenasas-NiFe, por lo que son reconocidas como los biocatalizadores productores de H₂ más activos (Kim & Kim, 2011).

Otras enzimas catalizadoras presentes durante la producción de biohidrógeno son las nitrogenasas. Las nitrogenasas están presentes en una amplia gama de microorganismos como arqueas y bacterias, su función principal es catalizar la fijación biológica del nitrógeno molecular (Gallon, 1992). Las nitrogenasas son las principales

enzimas productoras de hidrógeno durante los procesos de fotofermentación por medio de bacterias fotosintéticas. Durante la fijación de N_2 , como consecuencia de mantener el equilibrio redox, la nitrogenasa puede producir biohidrógeno, esta reacción se considera irreversible y consume mucha energía, esta reacción consiste en convertir una molécula de nitrógeno en amonio, descrita por la ecuación 10 (Budiman & Wu, 2018).



Las nitrogenasas se pueden clasificar de acuerdo con los elementos que componen su centro activo, los cuales pueden ser hierro FeS, P e FeMo. Sin embargo, los organismos encargados de la fijación biológica de nitrógeno generalmente están involucrados con las nitrogenasas con sitios activos compuestos de Mo y Fe, mientras que las dos nitrogenasas restantes están involucradas con la entrega de electrones al clúster FeMo, el cuál funciona como sitio activo para la reducción de nitrógeno en amonio. La enzima FeMo es la nitrogenasa más estudiada y está conformada por una proteína de hierro y una proteína de MoFe (Artz et al., 2017; Zahuantitla Razo, 2020).

De forma que, en un ambiente anaerobio, los microorganismos obtienen los electrones de la oxidación del piruvato, los cuales son transferidos a la ferredoxina, la cual es la encargada de acarrear los electrones a la enzima hidrogenasa para catalizar la producción de H_2 . Las ferredoxinas son proteínas solubles que contienen grupos de hierro-azufre y bajos potenciales redox. Este tipo de proteínas son comúnmente encontrado en bacterias, plantas, algas y animales, y se clasifican en tres grupos dependiendo de la organización molecular de los grupos FeS, los cuales son: [2Fe2S], [4Fe4S] y [3Fe4S]. Por ejemplo, la ferredoxina presente en *Clostridium pasteurianum* contiene dos grupos [4Fe4S] (Franco Bodek & Castillo Blum, 2013; Skjeldal et al., 1989).

7.3 Microorganismos y rutas de producción de hidrógeno

Existen diferentes métodos biológicos para producir hidrógeno, entre ellos destacan la biofotólisis, fotofermentación, fermentación oscura y las celdas microbianas (Feng et al., 2023). La producción biológica de hidrógeno es llevada a cabo por diferentes organismos, dependiendo del proceso, el cual también definirá las condiciones específicas como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los métodos biológicos para producción de hidrógeno. Adaptado de “Biohydrogen production, storage, and delivery: A comprehensive overview of current strategies and limitations” (p. 144672), por S. Feng, H. Hao-Ngo, W. Guo, S. Woong-Chang, D. Duc-Nguyen, X. Thanh-Bui, X. Zhang, X.Y. Ma & B. Ngoc-Hoang, 2023, *Chemical Engineering Journal*, 471.

Proceso	Condiciones	Sustratos	Organismos
Biofotólisis	Luz	Agua	Algas verdes y <i>cianobacterias</i>
Celdas de electrólisis microbianas	Voltaje externo, ambiente anaerobio	Materia orgánica	Microorganismos electroactivos, por ejemplo <i>Shewanella spp.</i> , <i>Geobacter spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Rhodoferax spp.</i> y <i>Rhodopseudomonas spp.</i>
Fotofermentación	Luz, ambiente anaerobio y bajo en nitrógeno	Materia orgánica	Bacterias de azufre púrpura, púrpura no sulfurosa y azufre verde
Fermentación oscura	Ambiente anaerobio	Materia orgánica	<i>Enterobacter sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> y <i>Clostridium sp.</i>

7.3.1 Biofotólisis

La biofotólisis consiste en adaptar el proceso de fotosíntesis a través del cual las plantas y las algas producen su alimento, de forma que los organismos involucrados en este proceso produzcan gas hidrógeno en su lugar (Das, 2001). El proceso consiste en capturar la energía solar para convertirla en energía química a través de la ruptura de los enlaces del agua, produciendo iones H^+ , O_2 y electrones (Ivanenko et al., 2023).

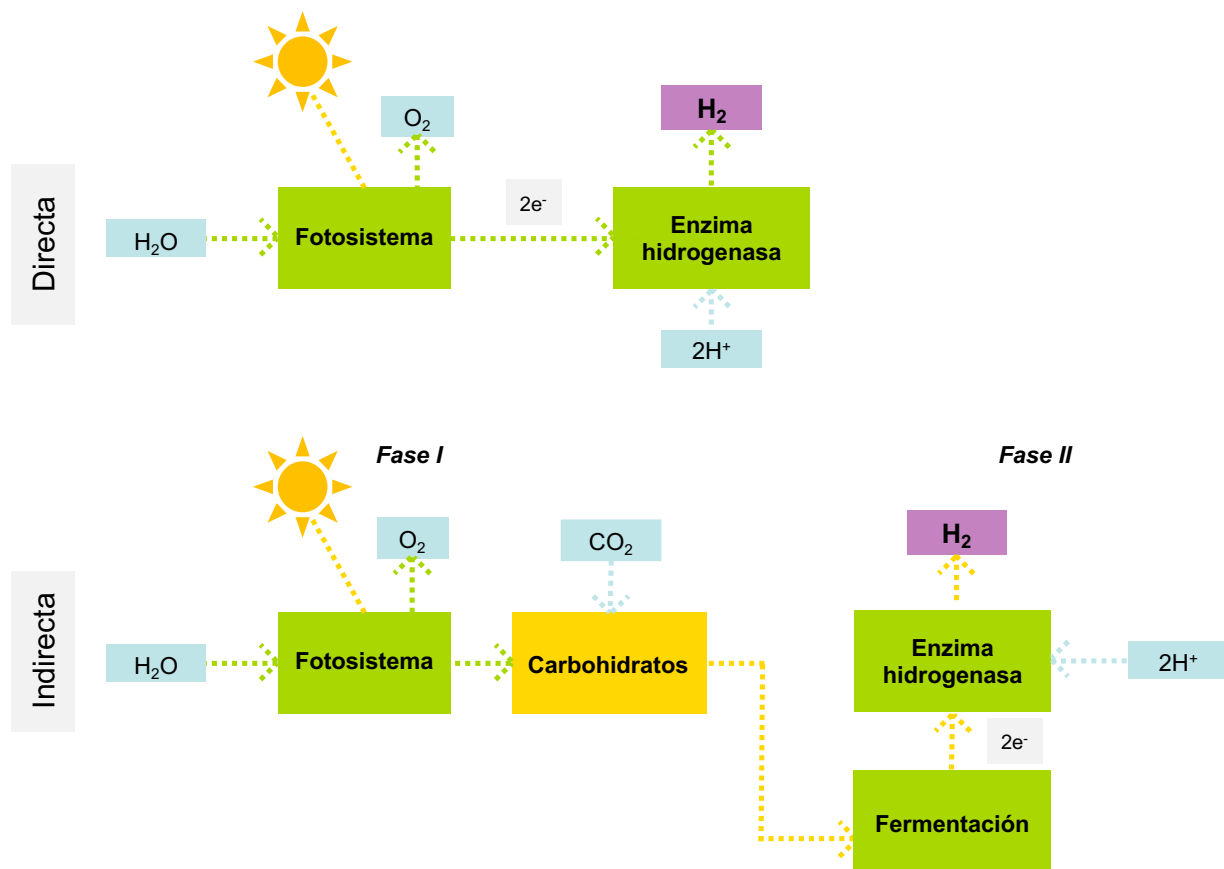
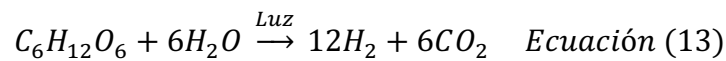
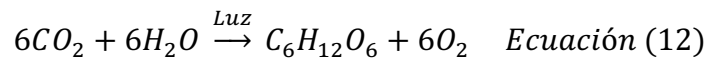
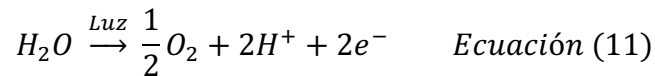


Figura 5. Procesos de biofotólisis directa e indirecta. Adaptado de “A comparative overview of hydrogen production processes” (p. 604), por P. Nikolaidis & A. Poullikkas, 2017, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67.

La producción de hidrógeno a partir de la biofotólisis puede ser directa o indirecta (Figura 5). Los organismos presentes en la biofotólisis directa pueden producir hidrógeno directamente a partir del agua proporcionada por la luz solar, algunos ejemplos son las cianobacterias y las algas verdes. Por otro lado, este mismo tipo de organismos en la biofotólisis indirecta llevan a cabo un proceso de varios pasos para producir hidrógeno, en primera instancia, los organismos producen compuestos orgánicos y moléculas de oxígeno a través de la fotosíntesis, los cuales son descompuestos en hidrógeno y dióxido de carbono, así como algunos metabolitos solubles (Abdelkareem et al., 2024).

En la biofotólisis directa, los iones hidrógeno (ecuación 11) se reducen a hidrógeno gas a través de una enzima hidrogenasa (hidrogenasa-Fe), sin embargo, su actividad se ve

inhibida en presencia de O₂, gas que simultáneamente es producido en este proceso. Por otro lado, en la biofotólisis indirecta se dividen los procesos de producción de oxígeno e hidrógeno, existe una primera fase de producción de oxígeno donde a partir de la fijación de CO₂ se acumulan carbohidratos, los cuales serán utilizados posteriormente en la segunda fase como sustratos para la producción de hidrógeno en condiciones anaerobias (ecuaciones 12 y 13) (Akhlaghi & Najafpour-Darzi, 2020).



Los organismos más utilizados para producir hidrógeno vía biofotólisis son las cianobacterias y las algas verdes (Dincer & Zamfirescu, 2016), sin embargo es reportado que las cianobacterias son preferidas en este proceso debido a los nutrientes que requieren ya que son simples y tienen los mejores rendimientos de hidrógeno (Sen et al., 2008).

7.3.2 Celdas de electrólisis microbianas

La producción de hidrógeno por celdas de electrólisis microbianas se basa en el principio de la electrólisis química, produciendo energía eléctrica a través de la oxidación de materia orgánica. Este tipo de celda consiste en un cátodo, ánodo, fuente de alimentación y membrana, pero además tiene una capa con un cultivo de microorganismos capaces de transferir electrones (Figura 6) (Ivanenko et al., 2023). Es decir, una celda electrolítica microbiana consiste en una versión modificada de una celda de combustible, donde en lugar de producir electricidad, se aplica una corriente eléctrica para generar hidrógeno (Aydin et al., 2021). En el ánodo, los microorganismos electroactivos convierten los desechos orgánicos en electrones, protones y CO₂. En el cátodo los electrones producidos son transferidos a través de un circuito externo y los protones son transmitidos

directamente o través de una membrana semi-permeable (Feng et al., 2023). Los electrodos están contenidos en cámaras y las reacciones que se llevan a cabo en ellas suelen estar descritas por las ecuaciones (14) y (15).

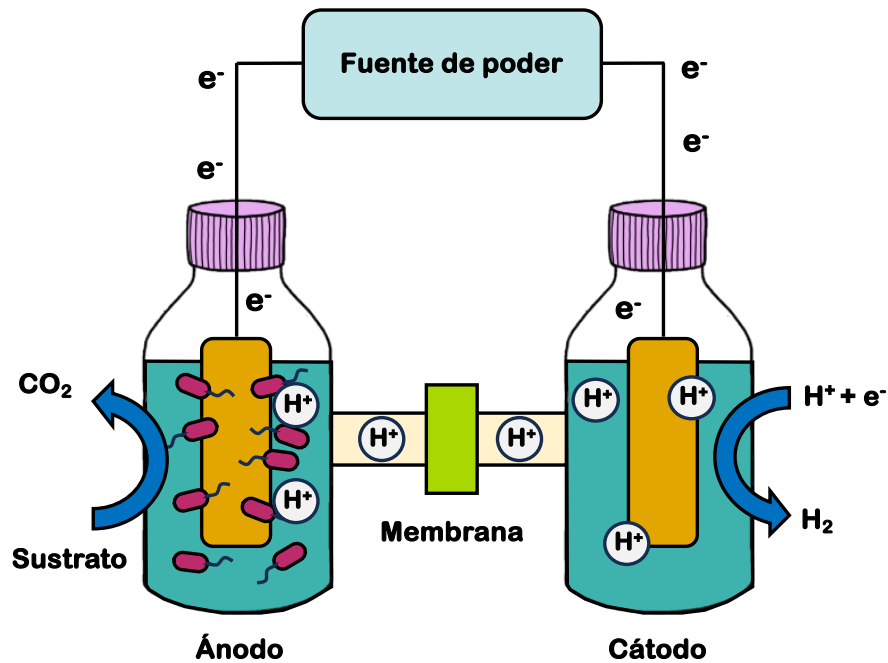
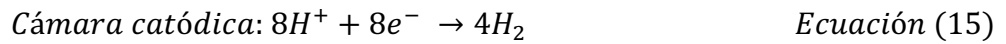
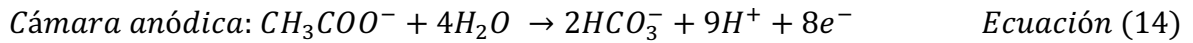


Figura 6. Diagrama de una celda microbiana. Adaptado de “Factors affecting hydrogen production in microbial electrolysis cell (MEC): A review” (p. 1474), por A. Sharma, S.E. Hussain-Mehdi, S. Pandit, S. Eun-Oh, V. Natarajan, 2024, *International Journal of Hydrogen Energy*, 61.

Los ácidos grasos volátiles son un tipo de sustrato que puede aprovecharse a través de esta celda y además son un subproducto de la digestión anaerobia, lo que ha ocasionado el estudio de sistemas secuenciales donde se utilizan los metabolitos de la digestión anaerobia como materia prima para la producción de hidrógeno. Además, existen estudios que prueban la viabilidad de las celdas electrolíticas microbianas para el tratamiento de aguas residuales, reportando una eficiencia de eliminación de la demanda

química oxígeno (DQO) de 73% y una tasa de producción de hidrógeno de $145 \text{ L m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ (Aydin et al., 2021; Yan et al., 2024).

Un estudio comparó cinco tecnologías de producción de hidrógeno a partir de aguas residuales: fotofermentación, fotocatálisis, fermentación oscura, procesos fotoelectroquímicos microbianos y celdas de electrólisis microbianas. A partir de este análisis se concluyó que las celdas proporcionaban el tratamiento más favorable a las aguas residuales, eliminando aproximadamente el 80% de DQO en los efluentes y el mejor rendimiento de producción de hidrógeno con un rango de 3.6 a $7.9 \text{ L L} \cdot \text{d}^{-1}$ (Abdelkareem et al., 2024).

7.3.3 Fotofermentación

Durante la fotofermentación, las bacterias fotosintéticas utilizan la luz como fuente de energía y convierten la materia orgánica en hidrógeno (Figura 7) (Hoàng et al., 2021). Las bacterias púrpuras del azufre, bacterias púrpuras no sulfurosas y las bacterias verdes del azufre son los principales microorganismos que llevan a cabo la fotofermentación, a través de la reacción descrita por la ecuación (16) (Saravanan et al., 2021).

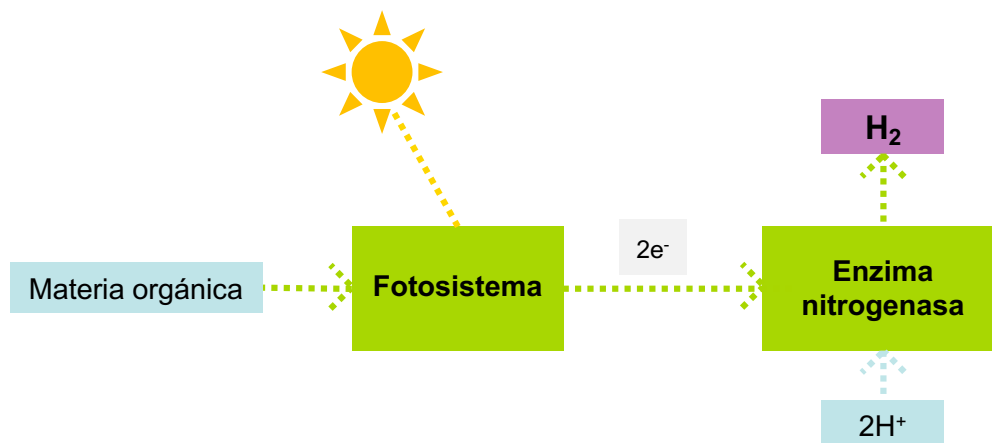
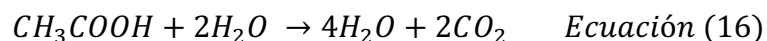


Figura 7. Proceso de fotofermentación. Adaptado de “A comparative overview of hydrogen production processes” (p. 605), por P. Nikolaidis & A. Poullikkas, 2017, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67.

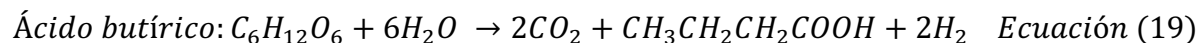
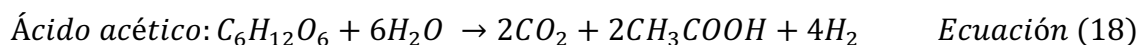
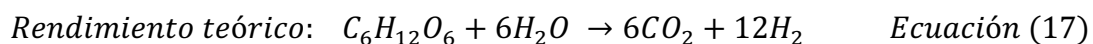


La hidrogenasa y la nitrogenasa son los principales enzimas que actúan con las bacterias púrpuras no sulfurosas en la producción de hidrógeno, estas bacterias utilizan la energía de la luz para generar ATP (adenosín trifosfato) y electrones de alta energía para reducir la ferredoxina. La hidrogenasa es la enzima principal para la producción de hidrógeno molecular en condiciones anaerobias (Sharma et al., 2023).

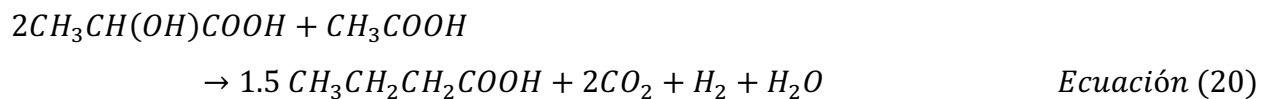
Sin embargo, el hidrógeno no es el único producto que puede obtenerse a partir de la fotofermentación, sino que se han reportado sistemas capaces de producir paralelamente químicos de interés. Como describe Policastro et al. (2022), lograron producir gas hidrógeno junto con poli-β-hidroxibutirato a partir del tratamiento de aguas residuales con fotofermentación, obteniendo producciones de 468 mL L⁻¹ y 1500 mg L⁻¹, respectivamente.

7.3.4 Fermentación oscura

La producción de hidrógeno vía fermentación oscura es descrita por una reacción entre los carbohidratos presentes del sustrato y los microorganismos (ecuación 17), sin embargo durante este proceso, además de producir hidrógeno, también se involucra la formación de subproductos como los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico, así como etanol, los cuales representan aproximadamente el 80% de los productos finales (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). En este sentido, el metabolito de la reacción determinará el rendimiento de producción de hidrógeno como se describe en las ecuaciones (18) y (19) a partir de un sustrato modelo (glucosa) (Sharma et al., 2023).



Además de las vías conocidas de producción de biohidrógeno mencionadas anteriormente, existen otras como a partir de lactato (ecuación 20). Esta ruta metabólica ha ganado mucho interés debido a que hay evidencia de los impactos beneficiosos en el proceso como la estabilidad del proceso, este efecto podría ser causado por la disponibilidad del lactato ya que es un precursor del biohidrógeno y un derivado de la fermentación de compuestos más complejos (García-Depraect et al., 2020).



Esta ruta ha sido asociada a una gran parte de la producción de hidrógeno, como describe Zavala Méndez (2020), algunos autores han encontrado evidencia de que la producción de H₂ a partir de ácido láctico y acetato podría explicar más del 70% de la producción total a partir de suero de leche sintético.

De acuerdo con el diagrama de la Figura 8, la fermentación oscura se compone de tres etapas, sin embargo, según el tipo de sustrato, el pretratamiento variará e incluso podría omitirse.

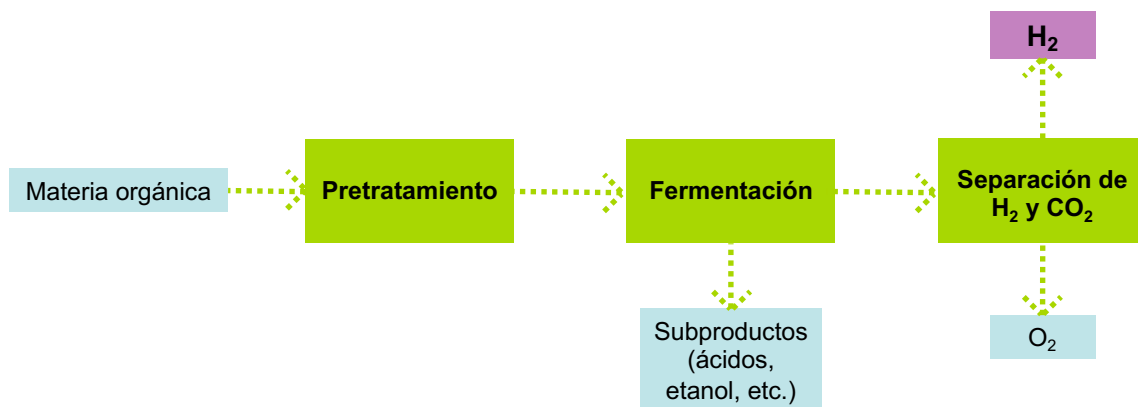


Figura 8. Fermentación oscura. Adaptado de “A comparative overview of hydrogen production processes” (p. 604), por P. Nikolaidis & A. Poullikkas, 2017, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67.

El proceso que llevan a cabo las bacterias anaerobias en la fermentación oscura es descrito por Sharma et al. (2023) (Figura 9), donde convierten el sustrato en piruvato y crean un intermediario: la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) en forma reducida

y CO₂. La conversión del piruvato puede realizarse por tres diferentes rutas, en la primera se transforma en acetil-CoA y ferredoxina reducida en los subproductos (ácido butírico, etanol y butanol). En la segunda ruta, el piruvato se convierte en ácido metanoico o ácido fórmico y en la tercera, el piruvato puede reducirse con la hidrogenasa-FeFe e hidrogenasa-NiFe para la producción de biohidrógeno.

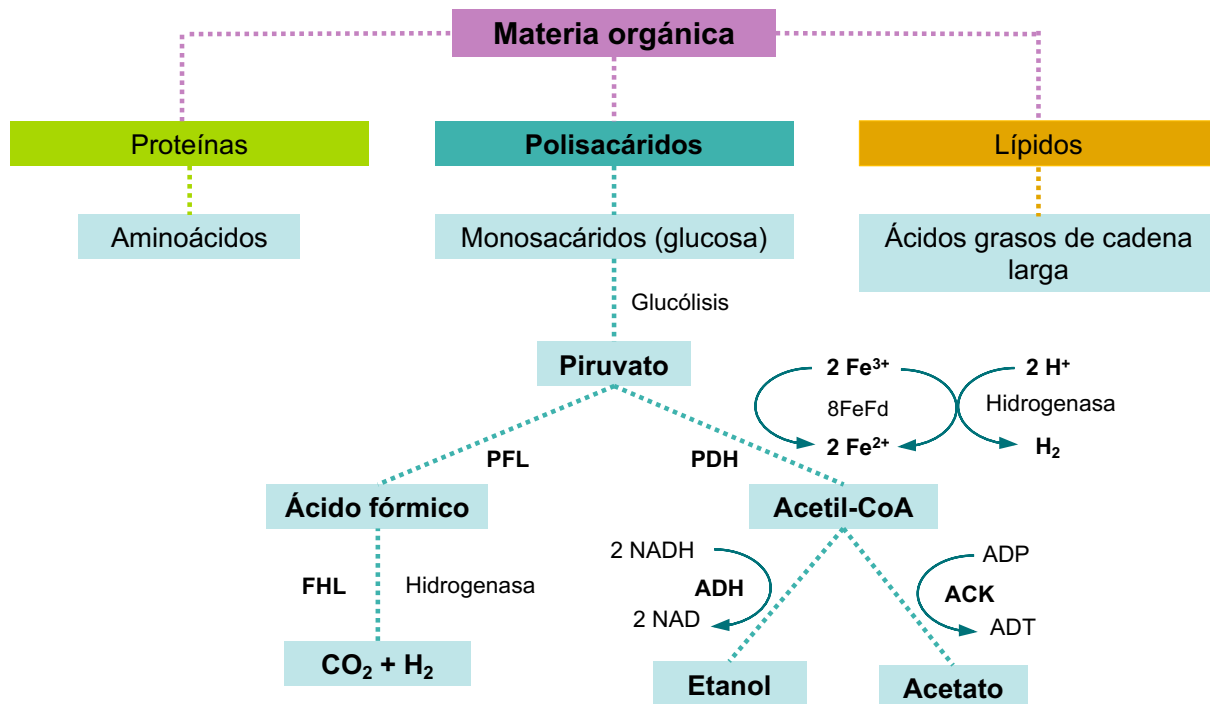


Figura 9. Ruta metabólica de la fermentación oscura (PFL piruvato formiato liasa; FHL Formiato de hidrógeno liasa; PDH Piruvato deshidrogenasa; ADH Alcohol deshidrogenasa; ACK Acetato quinasa). Adaptado de *Biohydrogen Production from Organic Wastes*, (p. 10), por J. Wang & Y. Yin, 2017, Springer Singapore.

La fermentación oscura destaca entre los métodos biológicos de producción de hidrógeno debido a su eficiencia y su mayor productividad a comparación de los demás procesos (Tabla 3), además de sus bajos requerimientos operacionales, ya que su rendimiento no es afectado por los ciclos naturales de la luz, permitiendo tener un diseño de biorreactor más sencillo (Aydin et al., 2021).

Tabla 3. Productividades de métodos biológicos para la producción de H₂ y el volumen necesario para producir 5kW en una pila de combustible de electrolitos poliméricos (PEMFC). Adaptado de “A comparative overview of hydrogen production processes” (p. 605), por P. Nikolaidis & A. Poullikkas, 2017, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67.

Método	Productividad de H₂ (mmol H₂/h)	Volumen del reactor (m³)
Biofotólisis directa	0.07	1707
Biofotólisis indirecta	0.355	337
Fotofermentación	0.16	1-14.75
Fermentación oscura	8.2-121	747

Adicionalmente, la producción de hidrógeno vía fermentación oscura es un método prometedor para ayudar a minimizar el impacto de los residuos orgánicos y su mal manejo, debido a que puede utilizar una amplia variedad de sustratos como lodos activados, biomasa de algas, residuos de comida y biomasa lignocelulósica. Además es posible tratar las aguas residuales junto con la producción de hidrógeno, sin embargo el proceso se limita a los principios de la digestión anaerobia (Aydin et al., 2021; Pérez-Rangel et al., 2023).

Este proceso puede considerarse parte del esquema de una biorrefinería, ya que además de obtener subproductos como los bioplásticos y el hidrógeno gas, también se puede producir un efluente rico en ácidos orgánicos a partir del cual pueden fabricarse otros productos de valor agregado como CH₄ y biodiésel (Martínez-Mendoza et al., 2022; Muñoz-Páez & Buitrón, 2022). Además, existen reportes donde los ácidos grasos volátiles y el etanol generados durante la fermentación oscura, son utilizados como sustratos para fotofermentación y en celdas electrolíticas microbianas (Saravanan et al., 2021).

Los microorganismos encargados de llevar a cabo la fermentación oscura son capaces de producir biohidrógeno mediante el uso de protones como sumidero de electrones durante la fermentación de sustratos orgánicos. Estos microorganismos son sensibles a ciertos rangos de temperatura y oxígeno, basándose en la tolerancia de las bacterias a estas condiciones, Blackburn et al. (2009), describe la siguiente clasificación.

Según su tolerancia al oxígeno:

- Microorganismos anaerobios: Requieren un ambiente estrictamente libre de oxígeno, por ejemplo, *Clostridium*, *Ethanoligenens* y *Desulfovibrio*.
- Microorganismos facultativos anaerobios: Pueden sobrevivir a condiciones aerobias o anaerobias, algunos ejemplos son *Enterobacter sp.*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *C. paraputrificum*, *C. thermocellum*, *C. termolacticum*, *C. beijerinckii*, *C. acetobutyricum*, *C. butyricum* and *C. tyrobutyricum*.

Según su tolerancia a la temperatura:

- Microorganismos termofilicos: Crecen en ambientes con altas temperaturas como aguas termales. Algunos ejemplos son *Thermotoga*, *Thermoanaerobacter* y *Caldicellulosiptor*.
- Microorganismos mesofílicos: Requieren de temperaturas ambiente para su crecimiento, por ejemplo, *Escherichia coli*.

7.4 Valorización de residuos y aguas residuales para la producción de biohidrógeno

El uso de residuos como sustrato en la producción de hidrógeno promueve la economía circular y una mejor gestión del medio ambiente mediante la conversión de residuos (Yörüklü et al., 2022). Algunos autores han estimado el potencial de producción biológica de hidrógeno a partir de desechos, Bundhoo (2019) evaluó el rendimiento de biohidrógeno de diferentes residuos de cultivos para estimar su potencial energético a nivel global. Entre los cultivos estudiados están la caña de azúcar, maíz, arroz, trigo y determinó que el mayor rendimiento potencial se puede obtener a partir de la fermentación oscura de la paja de arroz, produciendo 58,0002 Mm³/ año de biohidrógeno. Otros autores, sugieren que la fuente más abundante de materia orgánica son los residuos sólidos urbanos, específicamente los residuos alimentarios, por lo que es viable su aprovechamiento como sustrato para la producción de hidrógeno (Grause et al., 2012).

Los desechos son considerados una fuente importante de emisiones y huellas de carbono, por lo que los residuos de cualquier tipo son reconocidos como una carga en

términos de espacio que necesitan ser eliminados o tratados. Específicamente las aguas residuales son un recurso potencial para la producción de hidrógeno a través de su aprovechamiento, ya que a medida que se contaminan los escasos recursos de agua dulce en el mundo, la necesidad de tratar las aguas residuales aumenta drásticamente y la producción de biohidrógeno contribuye a la solución de este problema (Abdelkareem et al., 2024).

La importancia de la aplicación de sistemas que puedan producir hidrógeno a la par de tratar aguas residuales es que existe una reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero mientras se genera una recuperación de la energía invertida en el tratamiento de esos efluentes. Actualmente, las principales fuentes de aguas residuales son las industrias y viviendas, por lo que se prevé que los recursos de agua limpia se volverán insuficientes debido al aumento de población y actividad industrial, pues se estima que la generación mundial anual de aguas residuales es de alrededor de 380 mil millones de m³, y se prevé que aumente un 51% para el 2050. Las industrias productoras de hierro, acero, papel, minería, destilados, productos petroquímicos, etc., son las principales fuentes de aguas residuales. Como se detalla en la Tabla 4, debido a sus características requieren un tratamiento intensivo para poder ser descargadas en cuerpos de agua (Aydin et al., 2021).

Tabla 4. Características de efluentes residuales. Adaptado de “A comparative review on clean hydrogen production from wastewaters” (p. 111796), por M.I. Aydin, A.E. Karaca, A.M.M.I. Qureshy, I. Dincer, 2021, *Journal of Environmental Management*, 279.

Fuente	pH	DQO* (mg/L)	Nitrógeno (mg/L)	Fenoles (mg/L)
Doméstica	7-8	500-1200	30-100	0.02-0.1
Destilería	4-4.6	85000-110000	4200-4800	3000-4000
Petroquímica	8.3-10.2	1000- 1500	30-38	-
Minería	2.5-12.9	81-16000	50-1625	0.002-1650
Hierro y acero	1.5-9	-	48-1500	82-123
Papelera	2.5-10.5	1124-39800	12-306	-
Farmacéutica	3.9-11	180-32500	65.5-770	-
Textil	5.5-10.5	150-30000	70-80	-

*DQO, demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) es el parámetro más común para cuantificar la contaminación orgánica en aguas residuales. Como se muestra en la Tabla 4, los efluentes residuales con una mayor concentración de DQO son las aguas residuales provenientes de las destilerías, con un rango mayor incluso que las aguas residuales de uso doméstico y provenientes de procesos petroquímicos.

7.5 Efluentes vitivinícolas

El vino es una bebida obtenida a partir de la fermentación alcohólica total o parcial de uvas sanas y de acuerdo con el tipo de vino, suele tener un contenido de etanol de entre el 9 y 20% (v/v). El vino contiene compuestos endógenos provenientes de los procesos de fermentación, envejecimiento, almacenamiento de las uvas, entre los cuales están agua, etanol, glicerina, azúcares, alcoholes, ácidos compuestos fenólicos o polifenoles, compuestos nitrogenados, compuestos volátiles, lípidos, vitaminas y sales minerales. Además, durante el proceso de vinificación, son añadidos algunos compuestos exógenos a las uvas para favorecer el proceso, entre ellos están los sulfitos, enzimas pectolíticas y trazas de metales, los cuales sirven para prevenir la aparición de microorganismos indeseables o alteraciones (Zahuantitla Razo, 2020).

El proceso de vinificación produce diferentes tipos de residuos dependiendo de la etapa del proceso. Durante las primeras etapas conocidas como vendimia y prensado, se obtienen como desechos hojas y orujo. Por otro lado, los principales residuos, es decir los efluentes vitivinícolas son producidos en las siguientes etapas de la vinificación, como la fermentación, sedimentación, decantación y lavado en línea. En 2015, la producción mundial de vino superó los 28 millones de m³, equivalente a 36.4 millones de toneladas de aguas residuales, considerando un factor de 1.3 kg de residuos por cada litro de vino producido (Carrillo-Reyes et al., 2019).

Las aguas residuales son el principal flujo de residuos durante la producción de vino, se componen de pulpa de uva, pieles, semillas, trazas de levadura y compuestos utilizados en los procesos de filtración, precipitación y purificación. Policastro et al. (2020) estima que cada año se producen alrededor de 270 millones de hL de vino en todo el mundo.

Los efluentes residuales vitivinícolas suelen tener un alto contenido de materia orgánica y sólida, así como polifenoles y metales pesados, además de tener pH ácidos a comparación de otros efluentes residuales como se muestra en la Tabla 5. Estas características inhabilitan la posibilidad de reutilizar este tipo de efluentes en actividades agrícolas, por lo que requieren un tratamiento previo para su uso (Carrillo-Reyes et al., 2019). La composición de los efluentes varía de acuerdo con varios factores como la etapa de elaboración del vino de donde son obtenidos, la técnica de vinificación (vinos tintos, blancos, rosas, etc.), infraestructura de producción y métodos de limpieza de los reactores (Amor et al., 2019).

Tabla 5. Caracterizaciones de diferentes efluentes vitivinícolas. Adaptado de “Characteristics and practical treatment technologies of winery wastewater: A review for wastewater management at small wineries” (p. 118348), por S.H. Latessa, L. Hanley, W. Tao, 2023, *Journal of Environmental Management*, 342.

Parámetro*	Unidades	(Latessa et al., 2023)	Vlotman et al. (2022)	Ngwenya et al. (2022)	Remmas (2022)	Johnson and Mehrvar (2020)
pH	g/L	2.5-9.38	3.0-12.9	3.4-6.9	3.6-4.9	2.8-11
SST	g/L	0.00-9.00	0.1-30.3	0.14-65.6	0.08-2.4	0.007-84.4
DQO	g/L	0.15-45.6	0.34-296	2.60-273	0.5-15.9	0.04-360
Nitrógeno	mg/L	1.4-328	10-415	-	60-200	-
Fósforo	mg/L	0.29-106	3.3-188	7.0-250	10-55	0.70-1120
Fenoles	mg/L	0.19-268	-	-	30-200	-

*SST, sólidos suspendidos totales; DQO, demanda química de oxígeno

Según reporta Elorza Vázquez et al. (2022), la industria productora de vino tiene presencia en 14 estados, los cuales son: Aguascalientes, Baja California, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas. De acuerdo con la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), en 2022 México produjo 396 mil hL de vino posicionándolo en el puesto 32 en la lista países productores en el mundo. En términos de residuos, esto representa aproximadamente 51,480 toneladas, utilizando el mismo factor que Carrillo-Reyes et al. (2019).

Los componentes de los efluentes vitivinícolas más peligrosos para el medio ambiente son las sustancias orgánicas biodegradables, los sólidos y el nitrógeno. Pues a pesar de que el riego con estos efluentes puede traer beneficios como el aumento en la fertilidad del suelo y mayor disponibilidad de nutrientes para las plantas, se requieren grandes extensiones de tierra para evitar una sobrecarga de nutrientes en los suelos ya que su uso excesivo puede provocar problemas fisicoquímicos y microbiológicos en el suelo, así como la contaminación de aguas subterráneas, lixiviación de nitratos y condiciones anaerobias que pueden movilizar metales como el hierro y el manganeso en condiciones ácidas (Latessa et al., 2023). Sin embargo, su tratamiento en plantas de agua residuales también presenta importantes desafíos debido a su alta carga orgánica compuesta principalmente de alcoholes altamente solubles, azúcares y ácidos, se ha reportado que su contratamiento con aguas residuales municipales causa problemas de estabilidad en su tratamiento biológico (Johnson & Mehrvar, 2020), lo cual puede deberse a las grandes diferencias en sus composiciones (Tabla 5), por lo que es necesario utilizar otro método para tratarlos o ser aprovechados.

Actualmente se ha propuesto utilizar técnicas alternativas para el tratamiento de efluentes residuales de la industria vitivinícola, no obstante, no todas las bodegas de vino son aptas para utilizar tecnologías de tratamiento debido a la complejidad técnica, costos de operación y mantenimiento. Por lo que las bodegas más pequeñas requieren de tecnologías prácticas y escalables, una alternativa es la producción de biohidrógeno, que, a partir de efluentes como las lías y otros subproductos de la fermentación, se aprovechan en un proceso de fermentación oscura. Existen trabajos que han comprobado sus potenciales como sustratos para la producción de hidrógeno (Zavala-Méndez et al., 2022). De la misma manera, Buitrón et al., (2020) reportaron concentraciones de hasta 33 g L^{-1} de carbohidratos en efluentes vitivinícolas, posicionándolos como aguas residuales con un alto potencial para la producción de hidrógeno a partir de fermentación oscura, obteniendo un beneficio doble: la producción de biocombustible y el tratamiento de este residuo.

8. JUSTIFICACIÓN

Debido a la nueva perspectiva energética que busca soluciones a la dependencia de combustibles fósiles, las energías renovables representan un papel muy importante en el futuro energético global. La bioenergía además de ser una fuente de energía renovable contribuye a la mitigación de otros problemas ambientales, revalorizando residuos mediante su transformación en un producto de valor agregado. Por ejemplo, las vinazas de vino son residuos con un alto contenido de nutrientes que, de no ser tratados correctamente, pueden contaminar suelos y cuerpos de agua, por lo que es necesario desarrollar tecnologías que den un tratamiento adecuado a estos efluentes. En trabajos recientes, se ha reportado su aprovechamiento para la producción de biohidrógeno, sin embargo, resulta ser una tecnología aún en desarrollo.

El resultado de conocer el efecto del tiempo de almacenamiento de los efluentes vitivinícolas para la producción de biohidrógeno es conocer cuáles son algunas de las condiciones que maximizan los potenciales de producción de hidrógeno y contribuir a estrategias de optimización para estos procesos.

9. HIPÓTESIS

El tiempo de almacenamiento determina la composición de los efluentes vitivinícolas, disminuyendo la cantidad de carbohidratos disponibles, e incrementado la concentración de ácidos orgánicos debido a la fermentación natural de estos efluentes. Este cambio de composición favorece la producción de hidrógeno al utilizar estos efluentes como sustrato para la fermentación oscura, a través de la ruta metabólica que utiliza lactato y acetato.

10. OBJETIVO

10.1 Objetivo general

Determinar el efecto del tiempo de almacenamiento de efluentes vitivinícolas sobre el potencial de producción de biohidrógeno.

10.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento de los efluentes vitivinícolas sobre el contenido de carbohidratos y ácidos orgánicos.
- Determinar si los cambios en las composiciones de los efluentes afectan significativamente a los potenciales de producción de biohidrógeno.

11. METODOLOGÍA

La fase experimental del proyecto consistió en obtener semanalmente las muestras de cada lote proveniente del lavado de los reactores de tres vinos (vino tinto, vino rosa y vino blanco), las cuales fueron analizadas para conocer sus composiciones a través del tiempo y después ser evaluadas como sustratos para fermentación oscura.

11.1 Sustratos

Los sustratos consistieron en aguas residuales de la industria de vino, provenientes de un viñedo ubicado en el municipio de Ezequiel Montes, Querétaro, México, recuperadas en septiembre del 2022. Los efluentes fueron obtenidos de los lavados de los fermentadores de cada lote de vino, es decir, vino tinto, vino rosa y vino blanco, posteriormente fueron almacenados en tres bidones en refrigeración (4-5 °C), etiquetados con su vino de origen. Estos bidones fueron las muestras iniciales, correspondientes a la condición de semana 0, posteriormente en una semana bajo las mismas condiciones de refrigeración, se tomó una muestra de 1L para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs), solventes y carbohidratos, obteniendo los sustratos de la

condición semana 1, y así consecutivamente por dos meses para las demás condiciones de almacenamiento.

Según con su composición, se seleccionaron estratégicamente las muestras que funcionarían como sustratos para evaluar la producción de biohidrógeno, seleccionando 4 semanas no consecutivas de almacenamiento. En total se evaluó el potencial de producción de biohidrógeno de 16 condiciones distintas, distinguiéndose por su tiempo de almacenamiento (4 semanas) y su lote de origen proveniente de los diferentes efluentes (vino tinto, vino rosa y vino blanco) y la mezcla equitativa de los efluentes (Figura 10).

Adicional a los efluentes analizados de manera individual, se realizaron mezclas de proporciones equitativas de los diferentes lotes a los cuatro tiempos seleccionados, es decir, una mezcla con un tercio proveniente de las muestras de vino tinto, blanco y rosa, respectivamente (Figura 10).

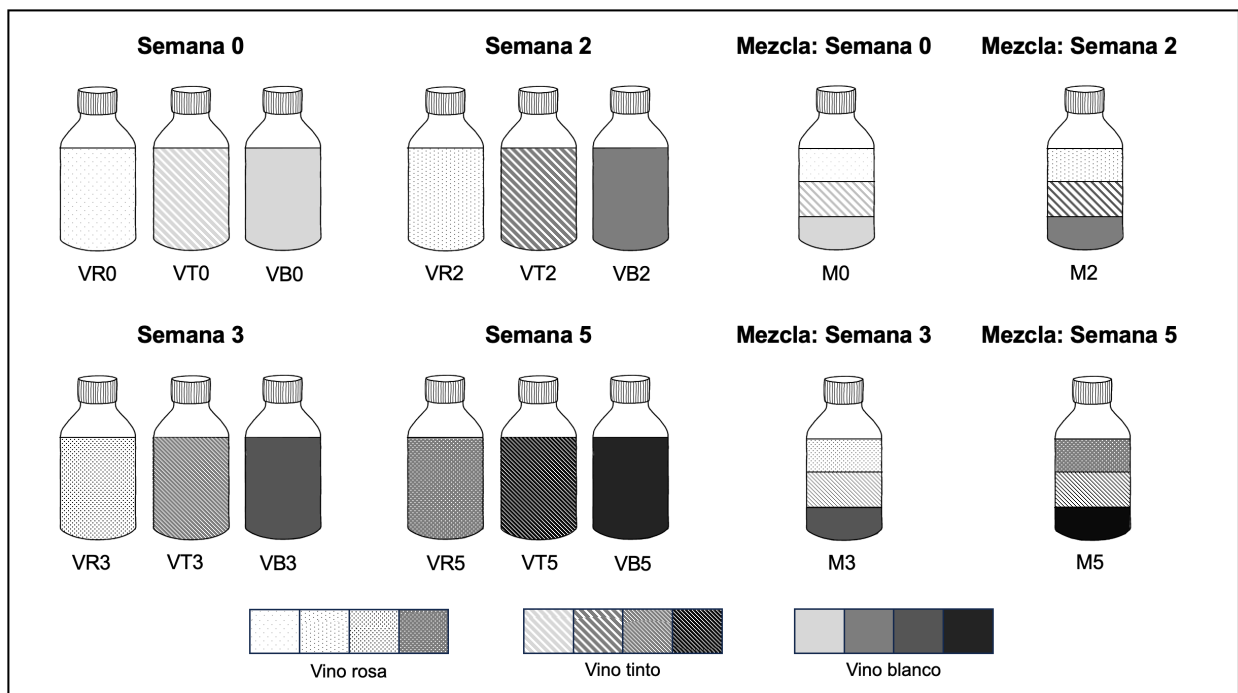


Figura 10. Arreglo de los sustratos seleccionados, vino tinto (VT), vino rosa (VR) y vino blanco (VB).

11.2 Inóculo

Se obtuvieron tres tipos de inóculos nativos dependiendo del sustrato de procedencia (vino tinto, rosa y blanco), a través de su fermentación natural en recipientes abiertos y expuestos a temperatura ambiente (~ 25°C). Para cada inóculo, se hicieron dos ensayos de fermentación, por un mes aproximadamente para obtener la mayor cantidad posible de microorganismos, siguiendo la metodología modificada descrita por Fernandes et al., (2013). En breve, esta metodología consistió en separar 5 L de cada sustrato, para cada ensayo, dando un total de 10 L de efluente vitivinícola por inóculo, posteriormente se ajustó el pH a 7.0 con una solución de NaOH 10N (Zavala Méndez, 2020) y se dejaron fermentar hasta bajar su pH a un rango de 4.0-5.0, con el propósito de inhibir la actividad metanogénica y favorecer el crecimiento de las bacterias *Clostridium* y *Enterobacter* (Wang & Yin, 2017). Los sustratos fermentados fueron centrifugados (10 min a 6,000 rpm) para concentrar la mayor cantidad posible de biomasa. El precipitado recuperado se consideró el inóculo nativo, con una cantidad de Sólidos Suspendedos Volátiles (SSV) de 14.4, 28.9 y 42.1 g SV L⁻¹ para vino tinto, blanco y rosa, respectivamente.

11.3 Cinéticas de producción de biohidrógeno

Para evaluar el potencial de biohidrógeno de los sustratos, se siguió la metodología del protocolo automático descrito por Carrillo-Reyes et al., (2020) a partir de experimentos en lote con el sistema automático AMPTS II (Bioprocess Control, Suecia). El equipo cuenta con la capacidad de realizar quince cinéticas simultáneas, registrar las productividades de gas en línea y una trampa de CO₂ (Figura 11). Para la trampa de CO₂ se preparó una solución de NaOH 3N y se agregó un indicador de pH (timolftaleína), el cuál sirvió para determinar cuando la solución de NaOH llegó a su punto máximo de absorción de CO₂. Se adicionaron 80 mL de esta solución a cada botella en la unidad que se muestra en la Figura 11.b. para asegurar que las mediciones de biogás fueran únicamente H₂.

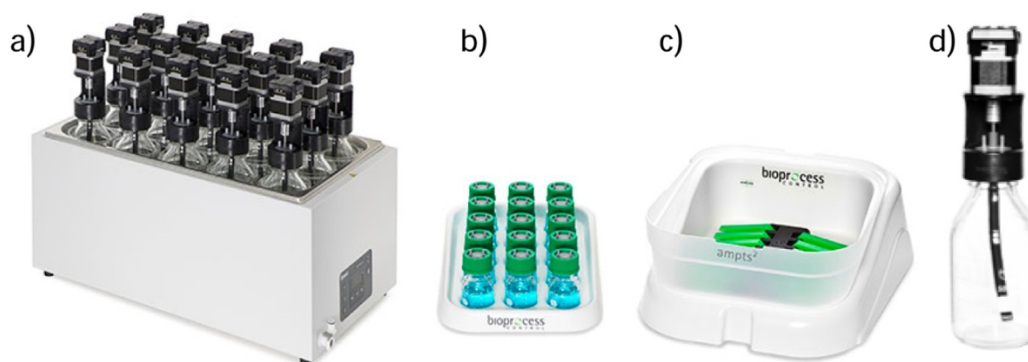


Figura 11. Incubadora de muestras (a), trampa de CO₂ (b), unidad de medición para gases (c), botellas Schott con sistema de agitación. Recuperada de “Standardized protocol for determination of biohydrogen potential” (p. 100758), por J. Carrillo-Reyes, G. Buitrón, I. Moreno-Andrade, A.C. Tapia-Rodríguez, R. Palomo-Briones, E. Razo-Flores, O. Aguilar-Juárez, J. Arreola-Vargas, N. Bernet, A.F.M. Braga, L. Braga, E. Castelló, L. Chatellard, C. Etchebehere, L. Fuentes, E. León-Becerril, H.O. Méndez-Acosta, G. Ruiz-Filippi, E. Tapia-Venegas, E. Trably, J. Wenzel, M. Zaiat, 2020, *MethodsX*, 7.

Cada cinética utilizó una botella Schott de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL, el cual consistía en 266.6 mL del sustrato correspondiente, 22.6 mL de medio mineral y 10.8 mL de inóculo, compuesto por una mezcla de los tres inóculos obtenidos de cada lote y su proporción varió para obtener una concentración inicial de 1 gSVV L⁻¹ (Tabla 6). Como medio mineral se preparó una solución descrita por Fuentes-Santiago et al., (2023) donde un litro de la solución contenía: 2600 mg NH₄Cl, 250 mg K₂HPO₄, 125 mg MgCl₂ · 6 H₂O, 100 mg FeSO₄ · 7 H₂O, 2.5 mg CoCl₂ · 6 H₂O, 2.5 mg MnCl₂ · 4 H₂O, 2.5 mg KI, 0.5 mg NiCl₂ · 6 H₂O, 0.5 mg ZnCl₂.

Tabla 6. Composición y propiedades del inóculo empleado en las cinéticas.

Inóculo	Volumen (mL)	Concentración (gSVV/L)
Tinto	3.5	0.05
Blanco	4.3	0.125
Rosa	3	0.125
Mezcla*	10.8	0.3

*El inóculo mezcla es la combinación de los inóculos anteriores en la tabla, el cual se utilizó en cada condición.

Una vez adicionado el volumen de trabajo, el pH se ajustó a 7.5 con NaOH 5N y HCl 5N y se desplazó la atmosfera de cada botella con N₂ durante 15 s para mantener un medio

anaerobio. Las botellas fueron incubadas a 37°C y se ajustó la agitación intermitente a 60 s encendida y 180 s apagada, según el protocolo. Se añadieron dos condiciones más que fueron el control endógeno (sin sustrato) y el control positivo, el cual utilizó como sustrato una mezcla sintética con concentraciones promedio de los sustratos en el tiempo 0 de 1.14 g L⁻¹ de ácido láctico, 0.40 g L⁻¹ de ácido acético y 0.20 g L⁻¹ de carbohidratos. Los experimentos de cada condición se realizaron por duplicado, dando un total de 34 cinéticas, las cuales tuvieron una duración de 100 horas (aproximadamente 4 días). Para conocer la composición del espacio de cabeza de las botellas, se tomaron muestras gaseosas de 5 mL con ayuda de una jeringa, succionando y desplazando el gas tres veces para asegurar homogeneidad. Por último, al final de los experimentos, se recuperaron muestras líquidas de 25 mL para determinar la concentración de DQO, AGVs y solventes.

11.3.1 Modelo de Gompertz

Para interpretar las cinéticas de los sustratos a partir de parámetros y obtener el potencial máximo de producción de biohidrógeno, se utilizó el modelo modificado Gompertz, cuya efectividad para describir la producción de biohidrógeno vía fermentación ha sido reportada en trabajos anteriores (Martínez et al., 2022).

A partir de los volúmenes de H₂ obtenidos por el sistema de medición automático a condiciones de 273 K y 1 atm, se ajustaron los datos al modelo de Gompertz con la herramienta *Microsoft Math Solver* (2024), siguiendo la metodología utilizada por Carrillo-Reyes et al., (2019). Debido al comportamiento bifásico o diaúxico observado durante la producción de biohidrógeno, se modificó el modelo de Gompertz, agregando un segundo término a la ecuación (21).

$$\begin{aligned}
 H(t) = & H_{max,1} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{2.71828 R_{max,1}}{H_{max,1}} (\lambda_1 - t) + 1 \right] \right\} \\
 & + H_{max,2} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{2.71828 R_{max,2}}{H_{max,2}} (\lambda_2 - t) \right. \right. \\
 & \left. \left. + 1 \right] \right\} \quad [ml] \quad \text{Ecuación (21)}
 \end{aligned}$$

Donde $H(t)$ (mL) es la producción acumulada de H_2 en el tiempo t ; H_{max} es la cantidad máxima de H_2 producido (mL); R_{max} ($mL\ h^{-1}$) es la máxima velocidad de producción de H_2 ; λ (h), es el tiempo de la fase de latencia antes de la producción exponencial de H_2 . Los subíndices 1 y 2, hacen referencia a los valores de la primera y segunda curva de producción de H_2 observada en la diaúxia, respectivamente.

11.4 Métodos analíticos

11.4.1 Determinación de sólidos totales

Se utilizó la metodología modificada de APHA (2005) para la determinación de los SST (Sólidos Suspendidos Totales), SSF (Sólidos Suspendidos Fijos) y SSV.

Cada análisis requirió considerar un peso constante inicial, para ello se sometió un filtro Whatman de fibra de vidrio (5.5 cm de diámetro) a un lavado de agua destilada de 60 mL con un matraz Kitasato conectado a una línea de vacío. Posteriormente el filtro fue colocado en una charola de aluminio y expuesto a la mufla a 550°C por 20 minutos, 15 minutos en la estufa de secado a 105°C y 15 minutos en el desecador de gel de sílice, después se pesó y registró la masa del filtro (P_1). Una vez registrada la masa, se filtraron 45 mL de la muestra con ayuda del matraz Kitasato y la línea de vacío, para colocarlo 12 horas en la estufa y 20 minutos en el desecador antes de volver a registrar la masa del filtro (P_2). Para incinerar la muestra, el filtro fue colocado en la mufla por 20 minutos, posteriormente 20 minutos en la estufa y 20 minutos en el desecador, por último, se pesó el filtro y se registró la masa (P_3). Este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra a analizar y se calcularon los SST, SSF y SSV de acuerdo con las ecuaciones (22), (23) y (24).

$$SST = \frac{(P_2 - P_1)}{\text{Volumen filtrado}} \left[\frac{g}{mL} \right] \quad \text{Ecuación (22)}$$

$$SSF = \frac{(P_3 - P_1)}{\text{Volumen filtrado}} \left[\frac{g}{mL} \right] \quad \text{Ecuación (23)}$$

$$SSV = SST - SSF \left[\frac{g}{mL} \right] \quad \text{Ecuación (24)}$$

11.4.2 Concentración total de carbohidratos

La determinación de carbohidratos totales se realizó siguiendo el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico. En un tubo de vidrio de 10 mL se colocaron 0.5 mL de la muestra por analizar con un factor de dilución de 5, 0.5 mL de fenol y 2 mL de ácido sulfúrico. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 490 μm , posteriormente se calculó su respectiva concentración de carbohidratos siguiendo la metodología planteada por DuBois et al., (1956).

11.4.3 Concentración de AGVs y solventes

Se acidificó cada muestra por analizar a un pH menor a dos con HCl, se diluyó con un factor 10 y fue filtrada con un filtro de nitrocelulosa de 0.45 μm . Las muestras filtradas se almacenaron en viales y analizadas por un equipo HPLC (Agilent Technologies, 2023), el cual utilizó H_2SO_4 5mM como fase móvil.

11.4.4 Determinación de DQO

Al igual que para la determinación de AGVs y solventes, las muestras fueron acidificadas a un pH menor a dos y filtradas con filtros Whatman de 25 mm de diámetro. Para analizarlas, fue necesario hacer una dilución con factor de 50 y se siguió el método HACH 8000 (Manual de análisis de agua, 2000) para el rango de concentración de 0 a 1500 mg L^{-1} .

11.4.5 Análisis de biogás

Las muestras de gas obtenidas durante las cinéticas de producción fueron inyectadas y analizadas en un cromatógrafo de gases (SRI Instruments, 2023) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas empacadas (ambas de 6 pies x 1/8 pulgada, una de sílice gel y la otra de tamiz molecular 13x).

11.5 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza de dos vías (Spiegel et al., 2006) para determinar si la relación entre el tiempo de almacenamiento y el potencial máximo de producción fue significativa para todos los sustratos, donde la variable independiente fue el tiempo de almacenamiento, el potencial máximo la variable dependiente y el sustrato la variable moderadora. Además, se comprobó la ausencia de valores extremos y la prueba de normalidad, desarrollada por Shapiro-Wilks, descrita por (Porrás Cerrón, 2016). Para realizar estas pruebas estadísticas, se utilizó el entorno de *RStudio* (2023).

12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12.1 Caracterización de los efluentes vitivinícolas

En la Tabla 7, se presentan las composiciones iniciales de las muestras pertenecientes a cada lote. Como puede apreciarse, estas fueron relativamente bajas a comparación de caracterizaciones de vinazas de vino reportadas por Cortez-Cervantes (2019) y Policastro et al. (2022), esto debido a que los efluentes analizados se trataban en realidad de vinazas diluidas, ya que procedían del lavado de los reactores de fermentación de vino. Sin embargo, las demandas químicas de oxígeno obtenidas en este estudio, se encuentran entre los rangos reportados por Carrillo-Reyes et al. (2019) y Vlotman et al. (2022), de entre 0.7 y 296 g L⁻¹ y 0.34-296 g L⁻¹, respectivamente. Estas variaciones se explican por las diferentes partes del proceso de producción de vino de donde provienen los efluentes reportados, que pueden considerar desde el lavado de instalaciones y equipo de proceso, hasta residuos de fermentación.

Tabla 7. Caracterización de los sustratos en la semana 0.

Parámetro	Unidades	Vino blanco	Vino tinto	Vino Rosa
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	g/L	0.16	0.03	0.27
Sólidos Suspendidos Fijos (SSF)	g/L	0.01	0.00	0.18
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	g/L	0.15	0.03	0.09
Demanda Química de Oxígeno Total (DQOtotal)	g/L	10.78	6.68	7.98
Carbohidratos Totales	g/L	0.15	0.32	0.08
Ácido Acético	g/L	1.02	0.08	0.21
Ácido Propiónico	g/L	4.35	0.00	0.14
Ácido Láctico	g/L	0.54	1.94	1.24
Glicerol	g/L	0.00	0.67	0.26

La caracterización de los efluentes y su evolución durante el paso del tiempo, se monitoreo a través de la concentración de diferentes compuestos como se muestra en la Figura 12. Como se mencionó anteriormente, la concentración de carbohidratos es una de las características más importantes de este tipo de efluentes. Cortez-Cervantes (2019), realizó una recopilación de diferentes caracterizaciones de efluentes provenientes de la misma región que los efluentes utilizados en este trabajo (Querétaro), reportando concentraciones de carbohidratos totales de 49.6 y 32.9 g L⁻¹ para efluentes provenientes de vino tinto y vino blanco respectivamente. De forma similar, en la caracterización de los sustratos, se registró la mayor concentración de carbohidratos totales en los efluentes del vino tinto como se puede observar en la Tabla 7. Mejía-Saucedo et al. (2022), reportaron una caracterización de efluentes vitivinícolas provenientes de un lote de vino rojo. El análisis del contenido de ácidos grasos demostró que el ácido más abundante fue el ácido láctico con una concentración de 5.4± 0.8 g L⁻¹, análogo a la Figura 12.a.

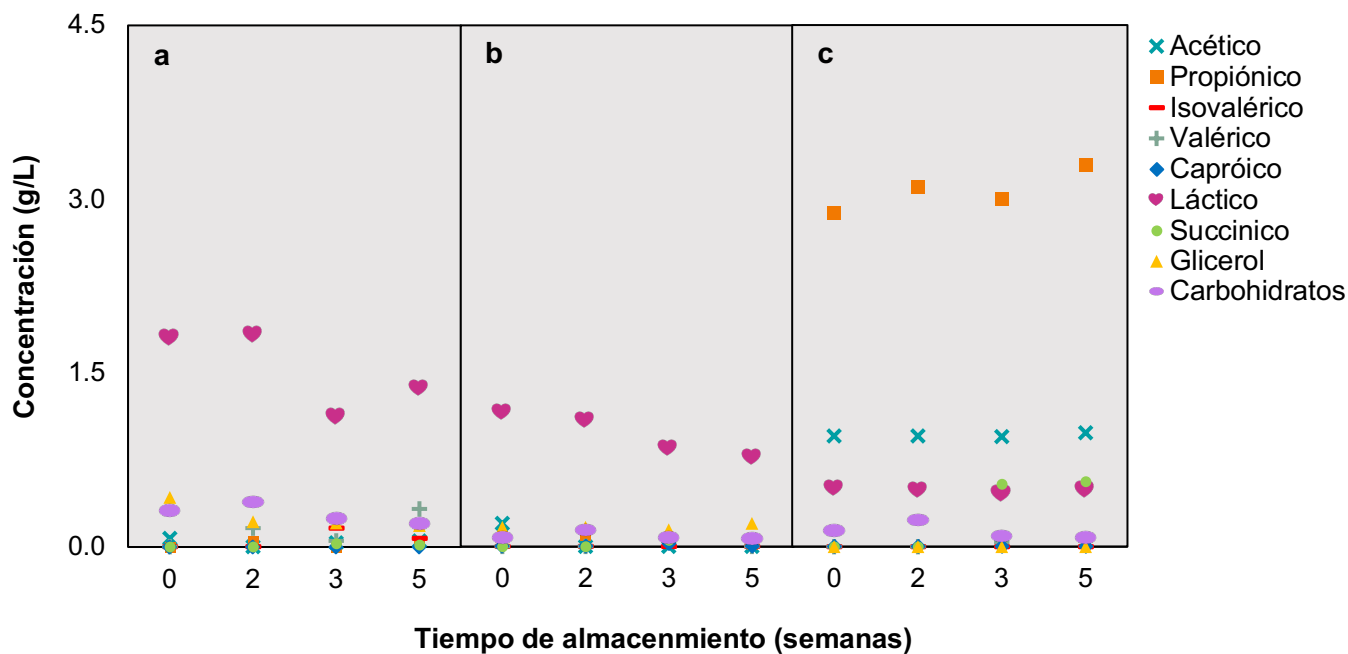


Figura 12. Evolución de las composiciones de los sustratos: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c).

Se determinó si el tiempo generó un cambio significativo en la concentración de los compuestos de interés para cada lote, a través de un análisis ANOVA de dos vías para cada compuesto, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 8). Para las concentraciones de carbohidratos, ácidos propiónico, acético y succínico ninguno de los lotes representó un cambio significativo, es decir que se mantuvieron relativamente constantes durante todo el tiempo de muestreo. Respecto a la concentración de ácido láctico, ninguno de los lotes experimento cambios significativos, sin embargo, el valor p en el lote del vino rosa fue de 0.064, valor cercano a poder rechazar la hipótesis ya que como se observa en la Figura 12.b, puede sugerirse una tendencia a disminuir la concentración de este compuesto si se muestreará por más tiempo.

Tabla 8. Valores *p* obtenidos de la prueba ANOVA de dos vías de cada compuesto.

Lote	Carbohidratos	Ácido láctico	Ácido propiónico	Ácido acético	Ácido succínico
Tinto	0.302	0.328	0.615	0.76	0.322
Rosa	0.775	0.064	0.152	0.199	0.129
Blanco	0.493	0.684	0.103	0.229	0.155

Por otra parte, puede observarse una concentración relativamente baja de carbohidratos, lo que indica que la ruta metabólica principal de producción de hidrógeno durante la experimentación podría no ser necesariamente la de la glucosa, sino alguna de las rutas descritas anteriormente. La concentración de ácido láctico es relevante para la producción de biohidrógeno, ya que recientemente su fermentación se ha encontrado presente en procesos de producción de hidrógeno a partir de una amplia variedad de residuos como suero de queso sintético, vinazas de tequila, vinazas de caña de azúcar, aguas residuales y estiércol de vaca (García-Depraect, Rene, et al., 2019).

12.2 Potenciales de producción de biohidrógeno por sustrato

Durante la producción de hidrógeno, se observó un comportamiento diáuxico como se muestra en la Figura 13 que contiene las cinéticas de los sustratos de la semana 0, sin embargo, este comportamiento se repitió en todas condiciones y pueden consultarse sus cinéticas al final de este trabajo en el apartado de anexos (Figuras 18-21).

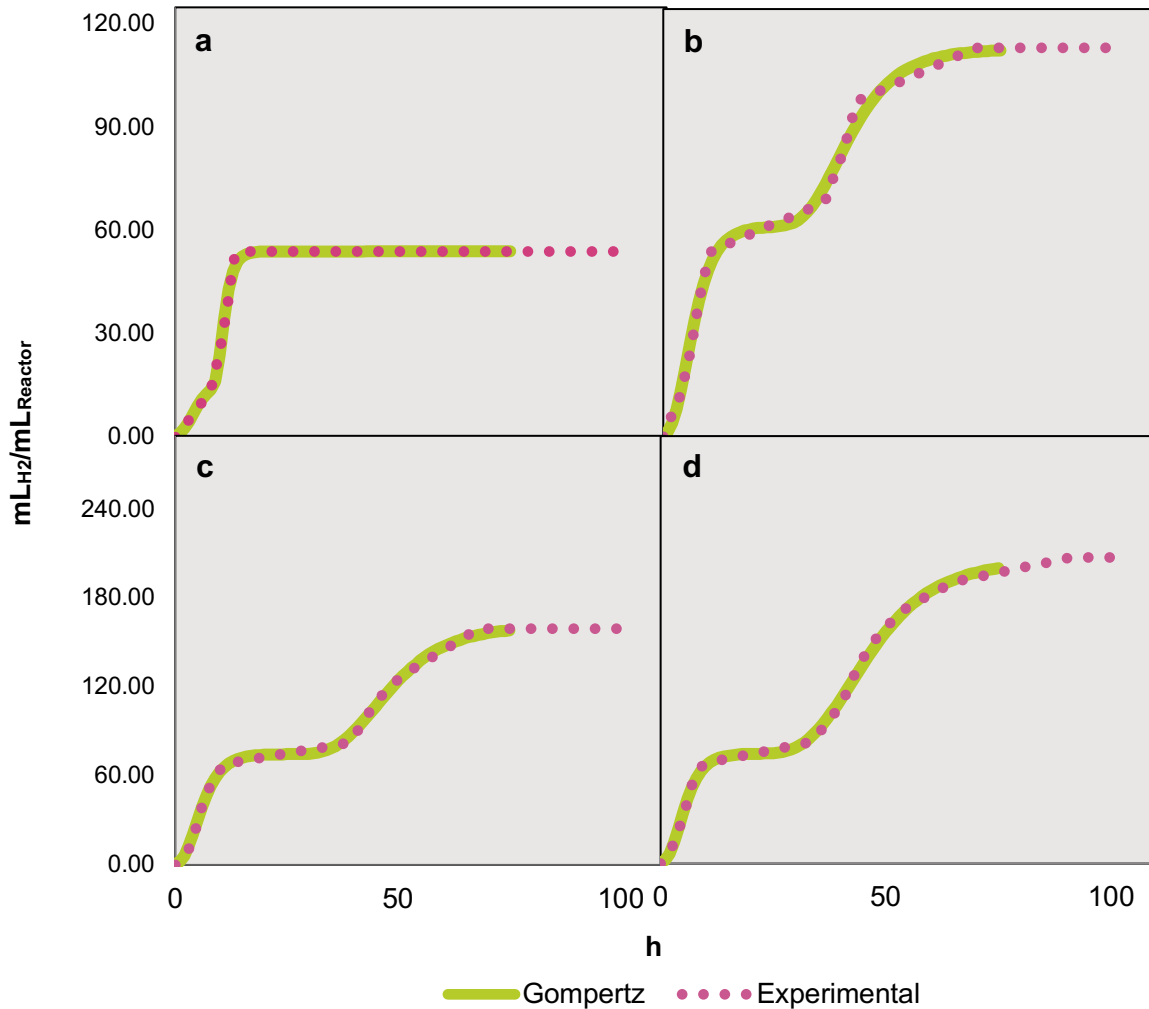


Figura 13. Cinéticas de producción de hidrógeno de sustratos semana 0: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c), mezcla(d).

Se observaron dos tiempos de retraso en la producción de hidrógeno correspondientes a la fase 1 y fase 2 (Figura 14), menores a los obtenidos por García-Depraect, Valdez-Vázquez, et al. (2019) al utilizar vinazas de tequila, de 94 horas. Todas las condiciones reportaron un retraso mayor al rango registrado por (Martínez et al., 2022) el cual es de 13 a 29 horas, sin embargo, existen trabajos en la literatura que muestran rangos muy amplios y que no se relacionan necesariamente con un aumento en el potencial de producción de hidrógeno (del Angel-Acosta et al., 2021). En este sentido, el bajo tiempo de retraso puede explicarse por el uso del consorcio nativo como inóculo, a diferencia de los inóculos externos utilizados por otros trabajos (García-Depraect, Valdez-Vázquez, et al., 2019; del Angel-Acosta et al., 2021).

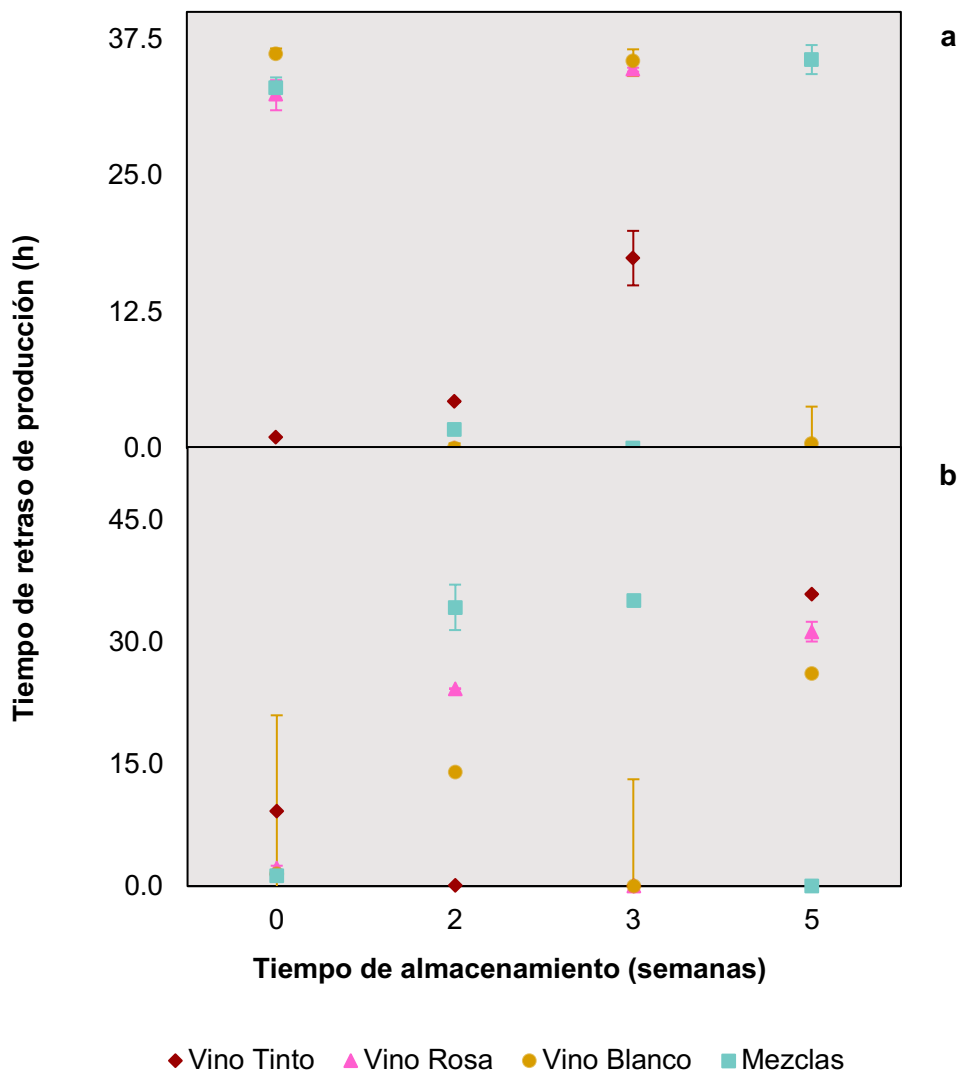


Figura 14. Tiempo de retraso de producción: fase 1 (a), fase 2 (b).

Al igual que los tiempos de retraso, las tasas de producción están divididas en fase 1 y fase 2 (Figura 15). Como puede observarse, tanto en la fase 1 como en la fase 2, los sustratos mantuvieron tasas máximas de producción relativamente similares. A pesar de ser lotes y composiciones distintas, las tasas parecieron variar de acuerdo con el tiempo de almacenamiento y no de acuerdo con el sustrato. Sin embargo, como describe Moreno-Andrade et al. (2015), los valores elevados de las tasas máximas de producción no siempre están asociadas con la producción máxima de biohidrógeno.

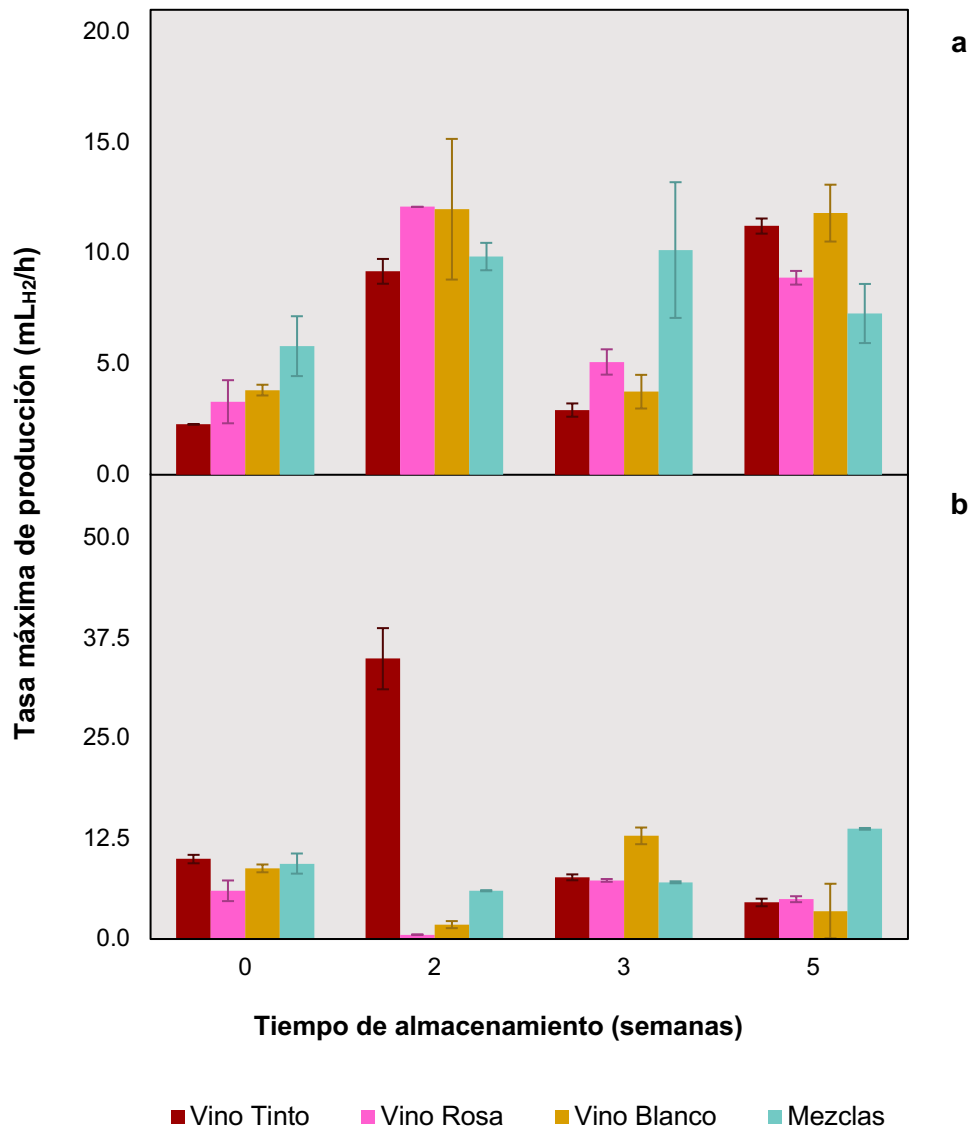


Figura 15. Tasas máximas de producción: fase 1 (a), fase 2 (b).

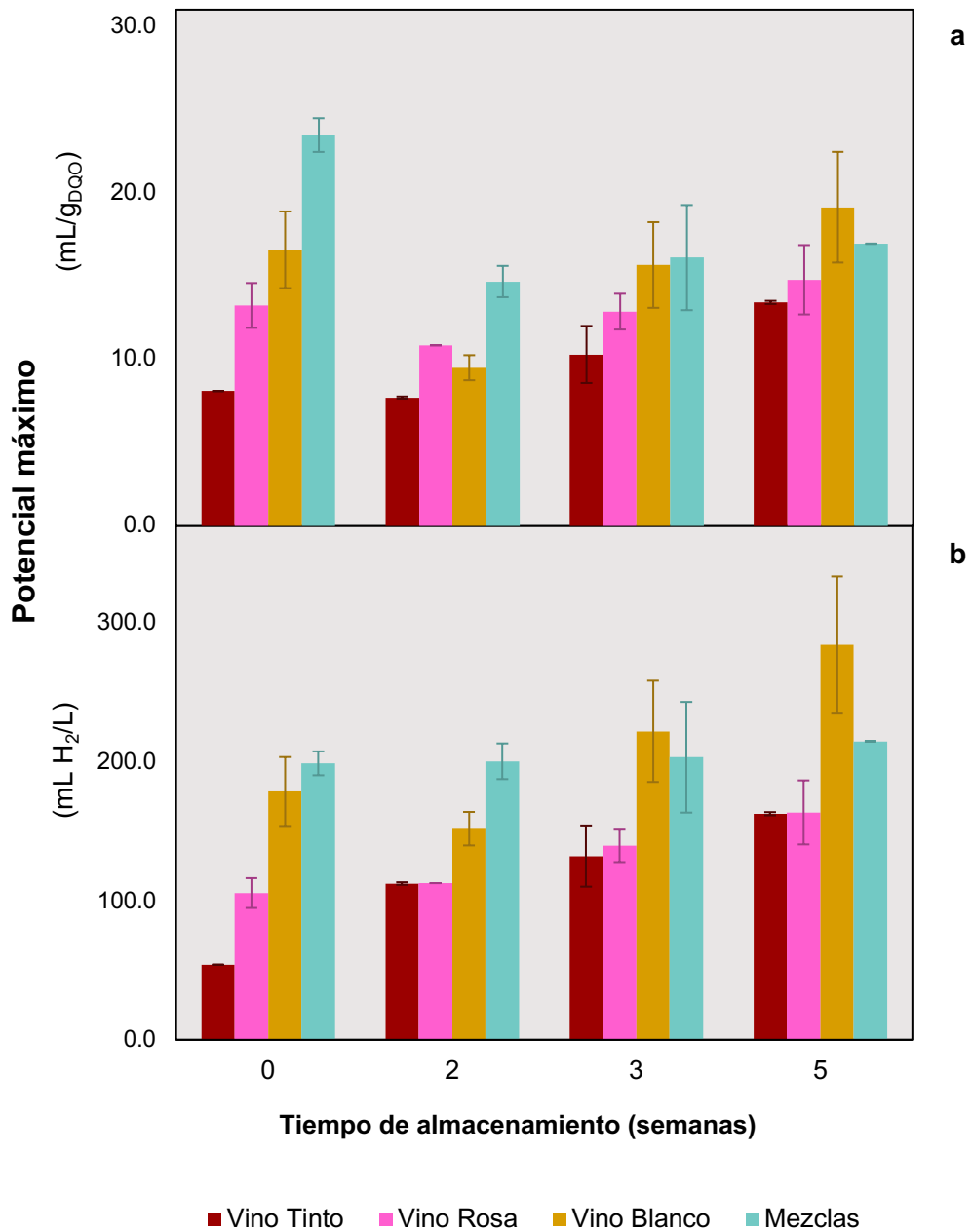


Figura 16. Potenciales máximos de producción en diferentes unidades.

En la Figura 16, se observa una comparación entre los potenciales máximos de producción de cada lote en diferentes unidades, donde se puede resaltar que las mezclas obtuvieron los potenciales máximos en la mayoría de las condiciones evaluadas del tiempo. A partir de la semana 3, el vino blanco obtuvo un potencial mayor y fue el único

sustrato puro cuyo potencial superó al de las mezclas, pudiéndose deber a los cambios en su composición como el aumento en las concentraciones de ácido propiónico y ácido succínico, ya que como se describe más adelante, fueron algunos de los compuestos que se consumieron totalmente en la producción de H₂. También, se sugiere que el aumento en el potencial podría deberse a que algunos compuestos presentes en los demás sustratos comenzaron a inhibir la producción, al no homogenizar el sustrato en una mezcla, estos compuestos no afectaron el rendimiento.

De forma visual, en la Figura 16, puede apreciarse una diferencia entre los potenciales máximos de producción en los sustratos puros, donde se puede sugerir una tendencia al aumento de producción del hidrógeno conforme al tiempo de almacenamiento incrementa. Sin embargo, las muestras de las mezclas parecieron mantenerse constantes en su producción máxima. Estos supuestos fueron analizados más adelante a través de análisis estadísticos. Todos los sustratos puros obtuvieron una mayor producción con su respectiva muestra del tiempo 5, destacando el vino blanco con un potencial máximo de 284.2 mL H₂ L_{reactor}⁻¹ a comparación de trabajos donde se utilizaron vinazas de tequila para la producción de hidrógeno, el potencial máximo del vino blanco fue un 60% menor que los reportados (Moreno-Andrade et al., 2015)

La Figura 16.a, permite realizar un análisis del comportamiento de la producción de hidrógeno en función de la DQO de cada sustrato. Como lo muestra la gráfica, la trayectoria formada por esta relación es análoga a la producción en función de los litros de sustrato, en comparación de reportes en la literatura, los registros están por debajo a los resultados obtenidos por Ferraz Júnior et al. (2015), donde a partir de la fermentación oscura de la vinaza de caña de azúcar, obtuvo una potencial de producción de 27.12 mL_{H2O} g_{DQO}⁻¹, a comparación del potencial máximo obtenido en este trabajo de 23.46 mL_{H2O} g_{DQO}⁻¹ con el sustrato mezcla de la semana 0.

Además, se puede destacar que los potenciales máximos de producción de las mezclas sólo fueron menores en comparación a los obtenidos en las muestras del vino blanco para los tiempos 3 y 5, lo que sugiere que, al realizar la mezcla en estos últimos tiempos,

la composición de los vinos tinto y rosa, inhiben la producción de hidrógeno a partir del vino blanco.

En la Tabla 9, se presentan los potenciales de hidrógeno obtenidos en este trabajo en comparación con otros trabajos de efluentes similares. El potencial de H₂ determinado por mL gDQO⁻¹ es equivalente a trabajos anteriores, pero no es así si se expresa en unidades de L L⁻¹ (Tabla 9). Esta diferencia se explica por la menor concentración de DQO contenido en los lotes de efluentes vitivinícolas evaluado en el presente estudio.

Tabla 9. Comparación de los potenciales máximos de hidrógeno obtenidos con reportes de la literatura.

Sustrato	Tipo de reactor	Potencial de hidrógeno		Referencia
		mL/g _{DQO}	L/L	
Vinaza de caña de azúcar	Lecho empacado	27.12	0.95	(Nunes Ferraz Júnior et al., 2015)
Vinazas de tequila	Lecho empacado	19.20	0.58	(Buitrón et al., 2014)
Efluentes vitivinícolas	Lecho empaquetado			(Mejía-Saucedo et al., 2022)
	estructurado	2.75	0.61	
<i>Efluentes vitivinícolas de lavado</i>				
Vino Tinto: Semana 5		13.42	0.16	
Vino Rosa: Semana 5	Sistema	14.78	0.16	Este estudio
Vino Blanco: Semana 5	AMPTS	19.13	0.28	
Mezcla: Semana 5		16.94	0.21	

La comunidad microbiana no fue analizada en este trabajo, sin embargo, el consumo del ácido láctico contenido en los sustratos, puede sugerir la presencia de ciertas comunidades de bacterias productoras de hidrógeno, asociadas a los géneros *Clostridium*, *Streptococcus* y *Acetobacter*, como describe Zavala Méndez (2020), esta actividad se ha asociado cuando se utilizan vinazas de tequila y caña de azúcar como sustrato.

12.3 Análisis estadístico del efecto de almacenamiento en la producción de biohidrógeno

A través de una prueba ANOVA, se rechazó la hipótesis nula para todos los lotes puros, es decir que sí existen diferencias significativas en la producción de hidrógeno en función al tiempo de almacenamiento, comprobando estadísticamente que al aumentar el tiempo de almacenamiento el potencial de producción de H₂ también aumenta. Sin embargo, en el caso de las mezclas, los potenciales máximos no son lo suficientemente diferentes entre ellos para representar una diferencia significativa, pudiéndose deber a la homogeneidad del sustrato como resultado de la mezcla de los diferentes ácidos orgánicos contenidos en los sustratos individuales. Es decir que independientemente del tiempo almacenado, la producción de hidrógeno fue la misma sin importar la mezcla que se utilizó como sustrato. Cabe resaltar que las producciones máximas de las mezclas fueron superiores a las de los sustratos individuales en todas condiciones evaluadas, con una sola excepción para el sustrato del vino blanco en la semana 5, superando a la mezcla de ese mismo tiempo por 69.26 mL_{H₂} L⁻¹.

12.4 Balance de DQO

Las Figuras 17-1 y 17-2, muestran las composiciones de todos sustratos antes y posteriormente a la fermentación oscura. Como principales metabolitos se obtuvieron los ácidos butírico, isovalérico y acético, lo cual coincide con los reportes obtenidos por Carrillo-Reyes et al. (2019) y Buitrón et al. (2020), durante la fermentación oscura de efluentes vitivinícolas, como principales compuestos registraron el ácido acético y butírico, además de ácido valérico en el caso del segundo autor.

En el caso de todos los sustratos, las concentraciones de acetato aumentaron, lo que indica que durante la fermentación este compuesto no se consumió neto en ninguna de las condiciones evaluadas. Siendo el acetato uno de los metabolitos más producido, puede deberse a que la fermentación oscura incluye reacciones que consumen H₂, ya sea para la formación de equivalentes reductores (NADH²⁻), la generación de subproductos reducidos como propionato y lactato, o la absorción directa de H₂ con dióxido de carbono para generación de metano o acetato. Además, la actividad

homoacetogénica se ve favorecida en reactores con largos tiempos de retención de sólidos y alta presión parcial de H_2 (Buitrón et al., 2020).

La producción de biohidrógeno a partir del lactato es comúnmente conocida como fermentación tipo HLac, la cual podría describir los cambios en la composición de la DQO del vino tinto, que fue el sustrato con mayores concentraciones de ácido láctico. La fermentación tipo HLac consiste en consumir el ácido láctico, generalmente en conjunto con el ácido acético, para generar butirato e hidrógeno como principales subproductos, explicando el cambio en la Figura 17-2.j (García-Depraect, Rene, et al., 2019).

Las bacterias productoras de ácido láctico compiten con las bacterias productoras de hidrógeno por los carbohidratos presentes en el sustrato. La vía del ácido propiónico consume 2 moles de hidrógeno por mol de propionato producido y la vía homoacetogénica, que se ve favorecida cuando se aumenta el tiempo de retención de sólidos, consume hidrógeno y CO_2 para producir acetato (Mejía-Saucedo et al., 2022).

La inhibición de la producción de H_2 puede deberse a la generación secundaria de AGVs, la presencia en grandes concentraciones de estos compuestos puede disminuir drásticamente el pH, autores han observado rendimientos mayores de hidrógeno al mantener un pH controlado. Así mismo, se ha comprobado que el crecimiento celular óptimo y la producción óptima de H_2 , no ocurren al mismo pH (Grause et al., 2012).

Una técnica para aumentar el rendimiento de producción de hidrógeno es aprovechar el sustrato en dos métodos secuenciales con condiciones específicas para cada proceso, Laurinavichene et al. (2018), reportaron un rendimiento de hasta $17.6 LH_2 L_{sus}^{-1}a$ a partir de aguas residuales de destilería a través de fermentación oscura secuenciado por un proceso de fotofermentación, en este trabajo comprobaron que se redujeron las producciones de azúcares y ácidos grasos volátiles.

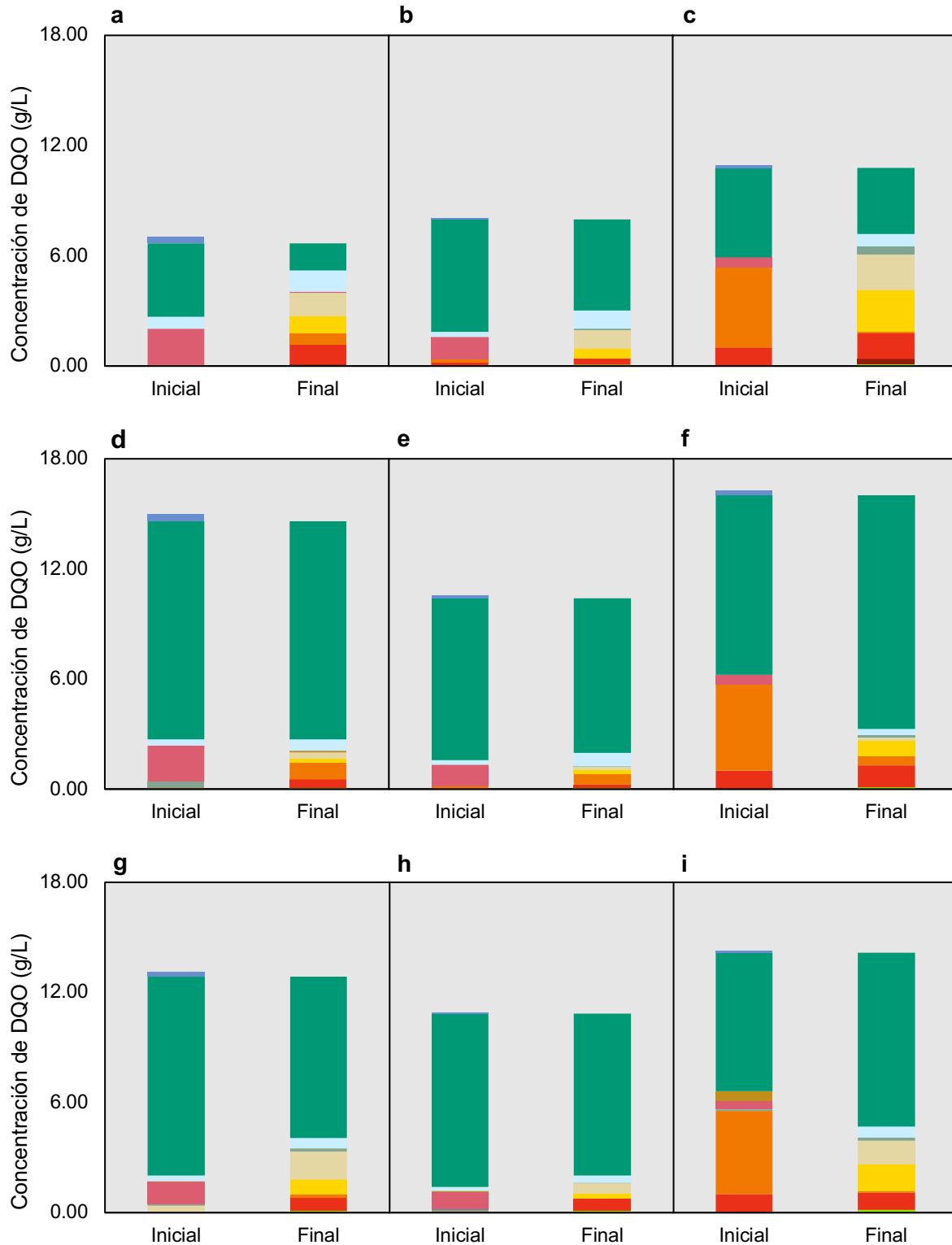


Figura 17-1. Composiciones iniciales y finales de los sustratos: semana 0, vino tinto, rosa y blanco (a) (b) (c); semana 2, vino tinto, rosa y blanco (d) (e) (f); semana 3, vino tinto, rosa y blanco (g) (h) (i).

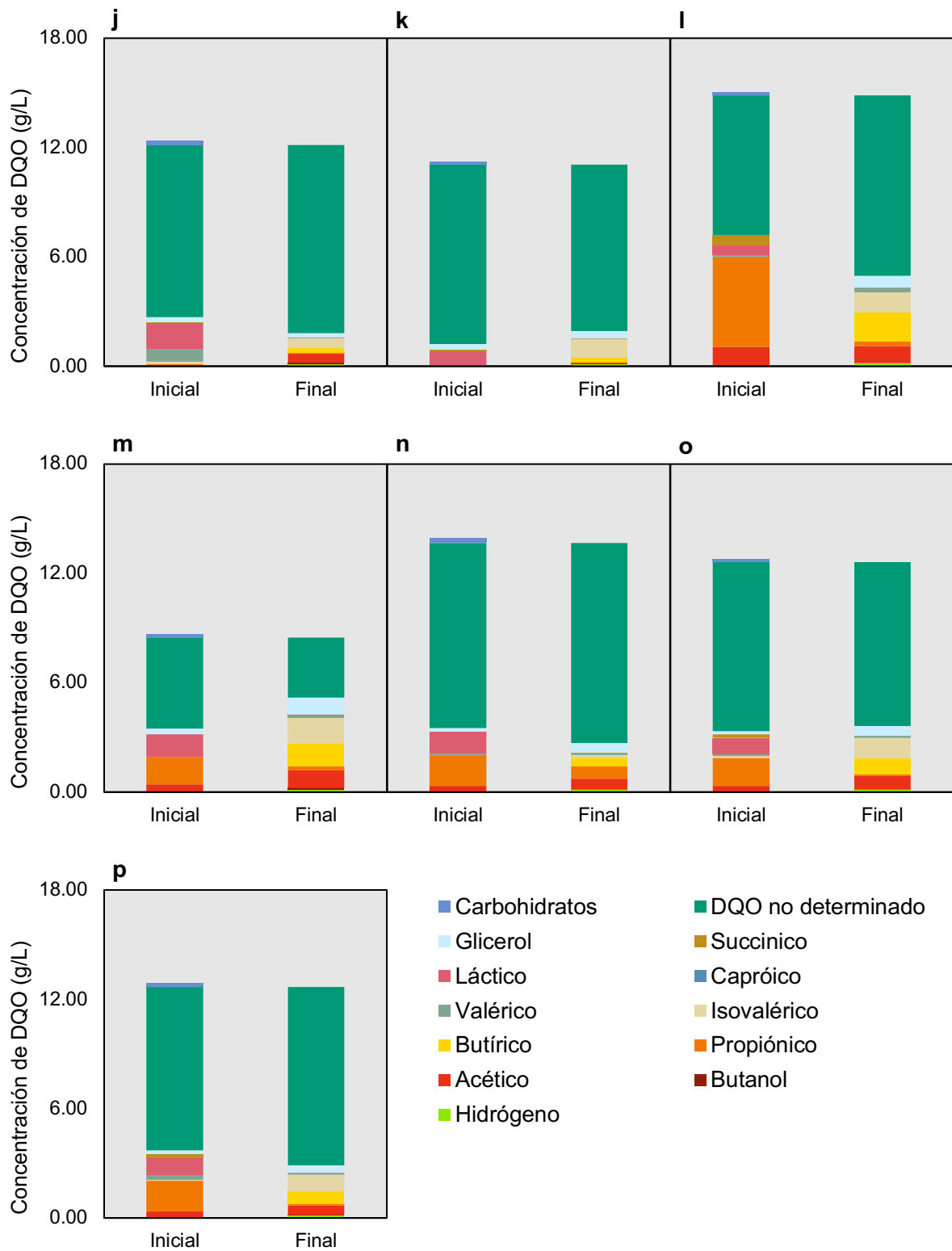


Figura 17-2. Composiciones iniciales y finales de los sustratos: semana 5, vino tinto, rosa y blanco (j) (k) (l); mezclas, semana 0, semana 2, semana 3, semana 5 (m) (n) (o) (p).

13. CONCLUSIONES

Las composiciones de los efluentes evaluados, vinazas de vino tinto, blanco y rosa; particularmente, sus concentraciones de los compuestos analizados no experimentaron un efecto significativo por el factor del tiempo de almacenamiento. Aun cuando en el caso del ácido láctico la prueba ANOVA tuvo como resultado un valor p próximo a 0.05 (0.064), necesario para poder afirmar que existe una relación significativa entre el tiempo y la concentración de este compuesto, sin embargo, es necesario, y se sugiere realizar un muestreo de este sustrato por más tiempo para poder afirmar o rechazar esta aservación.

No obstante, el tiempo de almacenamiento demostró tener un efecto significativo sobre el potencial de producción de biohidrógeno de los diferentes sustratos individuales, mientras que en las mezclas de estos efluentes el efecto no fue significativo. Estos resultados sugieren que al utilizar una mezcla de los efluentes como sustrato para la producción de H_2 , en cualquier tiempo de almacenamiento se obtendrá una mayor producción de hidrógeno que al utilizar los sustratos puros, aun considerando el efecto positivo del tiempo de almacenamiento. Se sugiere que los cambios observados en los compuestos tienen relación con el aumento de los potenciales de hidrógeno presentados, debido a que el único factor variable en los ensayos de cada efluente fue el sustrato con distinto tiempo de almacenamiento.

Como resultado la caracterización de las aguas residuales, se reafirma la postura de otros autores en la literatura sobre la elevada cantidad de DQO desconocida en estos efluentes. Así mismo, se reconoce la relativamente baja concentración de carbohidratos en los sustratos, por lo que se hace la propuesta de que las rutas metabólicas de producción a partir ácidos volátiles como el ácido butírico, ácido acético o ácido láctico son las principales responsables de la producción de biohidrógeno al utilizar efluentes vitivinícolas.

Este trabajo cumple con el objetivo de evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la producción de hidrógeno a partir de efluentes residuales y con base en los

resultados, se propone el uso de esta técnica como una estrategia práctica y accesible para mejorar el rendimiento del proceso en los casos donde se utiliza como sustrato un tipo de efluente proveniente de un solo tipo de vino, en cambio para los procesos que utilizan diferentes lotes de efluentes se propone utilizar como sustrato una mezcla de estos, de forma que no es necesario invertir en su almacenamiento y podrá dárseles un tratamiento inmediato a los efluentes residuales sin comprometer la producción de hidrógeno y optimizando el proceso.

14. PRODUCTOS ACADÉMICOS

Los resultados de esta tesis complementaron un estudio integral para la valorización de efluentes vitivinícolas mediante la producción de biocombustibles gaseosos en dos etapas, producción de biohidrógeno y metano.

Estos resultados se presentaron en un congreso internacional:

Assessing the impact of storage of winery wastewater for enhanced hydrogen production.

Denise Barrales-Ordoñez, Marcela Zavala-Méndez, Ana Chango-Cañola, Julián Carrillo-Reyes. *XIV Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion*. Querétaro, Mexico, October 23 to 27 2023. Poster presentation.

Y son parte de un artículo científico internacional ISI-JCR en preparación:

Unlocking the Potential of Winery Wastewater: Exploring the Influence of Storage Conditions on Hydrogen and Methane Production by Native Bacteria.

Ana Paola Chango-Cañola, **Denise Barrales-Ordoñez**, Marcela del Carmen Zavala-Méndez, José de Jesús Montoya-Rosales, Julián Carrillo-Reyes. *A someterse a la revista Energy Conversion and Management*

14. REFERENCIAS

- Abdelkareem, M. A., Ayoub, M., Al Najada, R. I., Alami, A. H., & Olabi, A. G. (2024). Hydrogen from waste metals: Recent progress, production techniques, purification, challenges, and applications. *Sustainable Horizons*, 9, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.horiz.2023.100079>
- Agilent Technologies. (2023). Agilent 1260 Infinity HPLC Front End [Aparato].
- Akhlaghi, N., & Najafpour-Darzi, G. (2020). A comprehensive review on biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(43), 22492-22512. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.182>
- Amor, C., Marchão, L., Lucas, M. S., & Peres, J. A. (2019). Application of Advanced Oxidation Processes for the Treatment of Recalcitrant Agro-Industrial Wastewater: A Review. *Water*, 11(2), 205. <https://doi.org/10.3390/w11020205>
- del Angel-Acosta, Y. A., Alvarez, L. H., Garcia-Reyes, R. B., Carrillo-Reyes, J., Garcia-Gonzalez, A., & Meza-Escalante, E. R. (2021). Co-digestion of corn (nejayote) and brewery wastewater at different ratios and pH conditions for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(54), 27422-27430. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.05.208>
- APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC. Disponible en: https://beta.static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/technical-documents/white-papers/apha-water-testing-standard-methods-introduction-white-paper.pdf
- Arregi, A., Amutio, M., Lopez, G., Bilbao, J., & Olazar, M. (2018). Evaluation of thermochemical routes for hydrogen production from biomass: A review. *Energy Conversion and Management*, 165, 696-719. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.03.089>
- Arsad, S. R., Ker, P. J., Hannan, M. A., Tang, S. G. H., R S, N., Chau, C. F., & Mahlia, T. M. I. (2023). Patent landscape review of hydrogen production methods: Assessing technological updates and innovations. *International Journal of Hydrogen Energy*, S0360319923046505. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.09.085>
- Artz, J. H., Zadvornyy, O. A., Mulder, D. W., King, P. W., & Peters, J. W. (2017). Structural Characterization of Poised States in the Oxygen Sensitive Hydrogenases and Nitrogenases. En *Methods in Enzymology* (Vol. 595, pp. 213-259). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.07.005>
- Aydin, M. I., Karaca, A. E., Qureshy, A. M. M. I., & Dincer, I. (2021). A comparative review on clean hydrogen production from wastewaters. *Journal of Environmental Management*,

279, 111793. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111793>

- Azwar, M. Y., Hussain, M. A., & Abdul-Wahab, A. K. (2014). Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 158-173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022>
- Baeyens, J., Zhang, H., Nie, J., Appels, L., Dewil, R., Ansart, R., & Deng, Y. (2020). Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 110023. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110023>
- Bagyinka, C. (2014). How does the ([NiFe]) hydrogenase enzyme work? *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(32), 18521-18532. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.009>
- Barelli, L., Bidini, G., Gallorini, F., & Servili, S. (2008). Hydrogen production through sorption-enhanced steam methane reforming and membrane technology: A review. *Energy*, 33(4), 554-570. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2007.10.018>
- Blackburn, J., Liang, Y., & Das, D. (2009). Biohydrogen from complex carbohydrate wastes as feedstocks—Cellulose degraders from a unique series enrichment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7428-7434. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.04.014>
- Boyles, D. T. (1984). *Bio-energy: Technology, Thermodynamics, and Costs*. Ellis Horwood.
- Budiman, P. M., & Wu, T. Y. (2018). Role of chemicals addition in affecting biohydrogen production through photofermentation. *Energy Conversion and Management*, 165, 509-527. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.01.058>
- Buitrón, G., Muñoz-Páez, K. M., Quijano, G., Carrillo-Reyes, J., & Albarrán-Contreras, B. A. (2020). Biohydrogen production from winery effluents: Control of the homoacetogenesis through the headspace gas recirculation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(3), 544-552. <https://doi.org/10.1002/jctb.6263>
- Buitrón, G., Prato-Garcia, D., & Zhang, A. (2014). Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. *Water Science and Technology*, 70(12), 1919-1925. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.433>
- Bundhoo, Z. M. A. (2019). Potential of bio-hydrogen production from dark fermentation of crop residues: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(32), 17346-17362. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.098>
- Carrillo-Reyes, J., Albarrán-Contreras, B. A., & Buitrón, G. (2019). Influence of Added Nutrients and Substrate Concentration in Biohydrogen Production from Winery Wastewaters Coupled to Methane Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(1), 140-151. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2812-5>

- Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Tapia-Rodríguez, A. C., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar-Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Braga, A. F. M., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Etchebehere, C., Fuentes, L., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H. O., Ruiz-Filippi, G., Tapia-Venegas, E., ... Zaiat, M. (2020). Standardized protocol for determination of biohydrogen potential. *MethodsX*, 7, 100754. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.027>
- Cherwoo, L., Gupta, I., Flora, G., Verma, R., Kapil, M., Arya, S. K., Ravindran, B., Khoo, K. S., Bhatia, S. K., Chang, S. W., Ngamcharussrivichai, C., & Ashokkumar, V. (2023). Biofuels an alternative to traditional fossil fuels: A comprehensive review. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 60, 103503. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2023.103503>
- Choiron, M., Tojo, S., & Chosa, T. (2020). Biohydrogen production improvement using hot compressed water pretreatment on sake brewery waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(35), 17220-17232. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.199>
- Cortez-Cervantes, J. F. (2019). *Producción de biohidrógeno a altas cargas orgánicas a partir de efluentes vitivinícolas en sistemas de biomasa fija* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Darvishi Harzevili, F., & Hiligsmann, S. (Eds.). (2018). *Microbial fuels: Technologies and applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Das, D. (2001). Hydrogen production by biological processes: A survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1), 13-28. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(00)00058-6)
- Dincer, I., & Zamfirescu, C. (2016). Hydrogen Production by Biochemical Energy. En *Sustainable Hydrogen Production* (pp. 393-409). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801563-6.00006-6>
- DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Elorza Vázquez, A., Borrego Pérez, N. C., Herrera García, A. F., & Sánchez Osorio, E. (2022). *La industria vitivinícola mexicana en el siglo XXI: Retos económicos, ambientales y sociales*. (1a ed.). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., 2022.
- El-Shafie, M. (2023). Hydrogen production by water electrolysis technologies: A review. *Results in Engineering*, 20, 101426. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101426>
- Feng, S., Hao Ngo, H., Guo, W., Woong Chang, S., Duc Nguyen, D., Thanh Bui, X., Zhang, X., Ma, X. Y., & Ngoc Hoang, B. (2023). Biohydrogen production, storage, and delivery: A comprehensive overview of current strategies and limitations. *Chemical Engineering Journal*, 471, 144669. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.144669>

- Fernandes, B. S., Saavedra, N. K., Maintinguer, S. I., Sette, L. D., Oliveira, V. M., Varesche, M. B. A., & Zaiat, M. (2013). The Effect of Biomass Immobilization Support Material and Bed Porosity on Hydrogen Production in an Upflow Anaerobic Packed-Bed Bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(6), 1348-1366. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0262-7>
- Ferraz Júnior, A. D. N., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2015). High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. *Bioresource Technology*, 186, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.035>
- Franco Bodek, D., & Castillo Blum, S. E. (2013). Ferredoxinas. *Educación Química*, 24(4), 426-430. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)72497-2](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72497-2)
- Fuentes-Santiago, V., Valdez-Vazquez, I., Vital-Jácome, M., Zavala-Méndez, M., Razo-Flores, E., & Carrillo-Reyes, J. (2023). Carbohydrates/acid ratios drives microbial communities and metabolic pathways during biohydrogen production from fermented agro-industrial wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(3), 110302. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110302>
- Gallon, J. R. (1992). Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. *New Phytologist*, 122(4), 571-609. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb00087.x>
- García-Depraect, O., Muñoz, R., Van Lier, J. B., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., & León-Becerril, E. (2020). Three-stage process for tequila vinasse valorization through sequential lactate, biohydrogen and methane production. *Bioresource Technology*, 307, 123160. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123160>
- García-Depraect, O., Rene, E. R., Gómez-Romero, J., López-López, A., & León-Becerril, E. (2019). Enhanced biohydrogen production from the dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Novel insights into ecological regulation by pH. *Fuel*, 253, 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.147>
- García-Depraect, O., Valdez-Vázquez, I., Rene, E. R., Gómez-Romero, J., López-López, A., & León-Becerril, E. (2019). Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. *Bioresource Technology*, 282, 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.100>
- Grause, G., Igarashi, M., Kameda, T., & Yoshioka, T. (2012). Lactic acid as a substrate for fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(22), 16967-16973. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.08.096>
- HACH, C. (2000). *Manual de análisis de agua*. (2da ed.), HACH Company, Loveland, Colorado, EE.UU. Disponible en: <https://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639984469>

- Hoàng, T. Y., Khoo, K. S., Ngọc, H. L. T., Thu, Q. T. T., Thị, T. Đ., Thu, H. Đ. T., Hoàng, H. C., Chinthapathi, S., Lay, C.-H., & Show, P. L. (2021). Sustainable cultivation via waste soybean extract for higher vaccenic acid production by purple non-sulfur bacteria. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 23(1), 103-112. <https://doi.org/10.1007/s10098-020-01966-0>
- Hohn, K. L., & Lin, Y. (2009). Catalytic Partial Oxidation of Methanol and Ethanol for Hydrogen Generation. *ChemSusChem*, 2(10), 927-940. <https://doi.org/10.1002/cssc.200900104>
- IEA. (2023). *Global Hydrogen Review 2023*. <https://www.iea.org/reports/global-hydrogen-review-2023>
- Incer-Valverde, J., Korayem, A., Tsatsaronis, G., & Morosuk, T. (2023). “Colors” of hydrogen: Definitions and carbon intensity. *Energy Conversion and Management*, 291, 117294. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2023.117294>
- Ivanenko, A. A., Laikova, A. A., Zhuravleva, E. A., Shekhurdina, S. V., Vishnyakova, A. V., Kovalev, A. A., Kovalev, D. A., Trchounian, K. A., & Litti, Y. V. (2023). Biological production of hydrogen: From basic principles to the latest advances in process improvement. *International Journal of Hydrogen Energy*, S0360319923059244. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.11.179>
- Johnson, M. B., & Mehrvar, M. (2020). Winery wastewater management and treatment in the Niagara Region of Ontario, Canada: A review and analysis of current regional practices and treatment performance. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98(1), 5-24. <https://doi.org/10.1002/cjce.23657>
- Kim, D.-H., & Kim, M.-S. (2011). Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18), 8423-8431. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.113>
- Kundu, D., Dutta, D., Samanta, P., Dey, S., Sherpa, K. C., Kumar, S., & Dubey, B. K. (2022). Valorization of wastewater: A paradigm shift towards circular bioeconomy and sustainability. *Science of The Total Environment*, 848, 157709. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157709>
- Latessa, S. H., Hanley, L., & Tao, W. (2023). Characteristics and practical treatment technologies of winery wastewater: A review for wastewater management at small wineries. *Journal of Environmental Management*, 342, 118343. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118343>
- Laurinavichene, T., Tekucheva, D., Laurinavichius, K., & Tsygankov, A. (2018). Utilization of distillery wastewater for hydrogen production in one-stage and two-stage processes involving photofermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 110, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.11.009>

- Lee, H.-S., Vermaas, W. F. J., & Rittmann, B. E. (2010). Biological hydrogen production: Prospects and challenges. *Trends in Biotechnology*, 28(5), 262-271. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.01.007>
- Levene, J. I., Mann, M. K., Margolis, R. M., & Milbrandt, A. (2007). An analysis of hydrogen production from renewable electricity sources. *Solar Energy*, 81(6), 773-780. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2006.10.005>
- Lubitz, W., & Ogata, H. (2013). Hydrogenases, Structure and Function. En *Encyclopedia of Biological Chemistry* (pp. 562-567). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00205-X>
- Martínez, V. L., Salierno, G. L., García, R. E., Lavorante, M. J., Galvagno, M. A., & Cassanello, M. C. (2022). Biological Hydrogen Production by Dark Fermentation in a Stirred Tank Reactor and Its Correlation with the pH Time Evolution. *Catalysts*, 12(11), 1366. <https://doi.org/10.3390/catal12111366>
- Martínez-Mendoza, L. J., Lebrero, R., Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2022). Influence of key operational parameters on biohydrogen production from fruit and vegetable waste via lactate-driven dark fermentation. *Bioresource Technology*, 364, 128070. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128070>
- Mejía-Saucedo, C., Buitrón, G., León-Galván, Ma. F., & Carrillo-Reyes, J. (2022). Biomass purge strategies to control the bacterial community and reactor stability for biohydrogen production from winery wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(9), 5891-5900. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.12.007>
- Microsoft Math Solver* (16.84). (2024). [Software]. Microsoft.
- Moreno-Andrade, I., Moreno, G., Kumar, G., & Buitrón, G. (2015). Biohydrogen production from industrial wastewaters. *Water Science and Technology*, 71(1), 105-110. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.471>
- Muñoz-Páez, K. M., & Buitrón, G. (2022). Bioconversion of H₂ and CO₂ from dark fermentation to methane: Effect of operating conditions on methane concentration. *Chemosphere*, 308, 136305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136305>
- Nanda, S., & Sarangi, P. K. (Eds.). (2022). *Biohydrogen: Developments and prospects* (First edition). Apple Academic Press.
- Narnaware, S. L., & Panwar, N. L. (2001). Catalysts and their role in biomass gasification and tar abatement: A review. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01981-1>
- Nikolaidis, P., & Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67, 597-611. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044>

- Nunes Ferraz Júnior, A. D., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2015). Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. *Anaerobe*, 34, 94-105. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.008>
- Organización Internacional de la Viña y el Vino, O. (2023). *Estadísticas de los países* [dataset]. <https://www.oiv.int/es/what-we-do/country-report?oiv>
- Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Applied Energy*, 198, 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.04.051>
- Parthasarathy, P., & Narayanan, K. S. (2014). Hydrogen production from steam gasification of biomass: Influence of process parameters on hydrogen yield – A review. *Renewable Energy*, 66, 570-579. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.025>
- Pérez-Rangel, M., Barboza-Corona, J. E., & Valdez-Vazquez, I. (2023). Effect of the organic loading rate and temperature on hydrogen production via consolidated bioprocessing of raw lignocellulosic substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, S0360319923027441. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.05.329>
- Policastro, G., Carraturo, F., Compagnone, M., Guida, M., & Fabbricino, M. (2022). Enhancing hydrogen production from winery wastewater through fermentative microbial culture selection. *Bioresource Technology Reports*, 19, 101196. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101196>
- Policastro, G., Luongo, V., & Fabbricino, M. (2020). Biohydrogen and poly- β -hydroxybutyrate production by winery wastewater photofermentation: Effect of substrate concentration and nitrogen source. *Journal of Environmental Management*, 271, 111006. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111006>
- Porrás Cerrón, J. C. (2016). Comparación de pruebas de normalidad multivariada. *Anales Científicos*, 77(2), 141. <https://doi.org/10.21704/ac.v77i2.483>
- Rabenstein, G., & Hacker, V. (2008). Hydrogen for fuel cells from ethanol by steam-reforming, partial-oxidation and combined auto-thermal reforming: A thermodynamic analysis. *Journal of Power Sources*, 185(2), 1293-1304. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2008.08.010>
- Rajput, M., Amandeep, B., Vivekanand, V., & Nidhi, P. (2022). Recent Advancements in Biohydrogen Production: Thermochemical and Biological Conversion Routes. En S. Nanda & P. K. Sarangi (Eds.), *Biohydrogen: Developments and Prospects* (First edition). Apple Academic Press.
- RStudio (4.3.0). (2023). [Software].

- Rubinsin, N. J., Karim, N. A., Timmiati, S. N., Lim, K. L., Isahak, W. N. R. W., & Pudukudy, M. (2023). An overview of the enhanced biomass gasification for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, S0360319923046098. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.09.043>
- Saravanan, A., Senthil Kumar, P., Khoo, K. S., Show, P.-L., Femina Carolin, C., Fetcia Jackulin, C., Jeevanantham, S., Karishma, S., Show, K.-Y., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2021). Biohydrogen from organic wastes as a clean and environment-friendly energy source: Production pathways, feedstock types, and future prospects. *Bioresource Technology*, 342, 126021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126021>
- Schlapbach, L., & Züttel, A. (2010). Hydrogen-storage materials for mobile applications. *MATERIALS FOR SUSTAINABLE ENERGY*, 414.
- Schropp, E., Campos-Carriedo, F., Iribarren, D., Naumann, G., Bernäcker, C., Gaderer, M., & Dufour, J. (2024). Environmental and material criticality assessment of hydrogen production via anion exchange membrane electrolysis. *Applied Energy*, 356, 122247. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2023.122247>
- Sen, U., Shakdwipee, M., & Banerjee, R. (2008). Status of Biological hydrogen production. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67, 980-993.
- Shafaat, H. S. (2021). [NiFe] Hydrogenases: A Paradigm for Bioinorganic Hydrogen Conversion. In *Comprehensive Coordination Chemistry III* (pp. 707-730). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102688-5.00056-8>
- Shanmugam, S., Krishnaswamy, S., Chandrababu, R., Veerabagu, U., Pugazhendhi, A., & Mathimani, T. (2020). Optimal immobilization of *Trichoderma asperellum* laccase on polymer coated Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles for enhanced biohydrogen production from delignified lignocellulosic biomass. *Fuel*, 273, 117777. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117777>
- Sharma, A., Hussain Mehdi, S. E., Pandit, S., Eun-Oh, S., & Natarajan, V. (2024). Factors affecting hydrogen production in microbial electrolysis cell (MEC): A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 61, 1473-1484. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2024.02.193>
- Sharma, P., Jain, A., Bora, B. J., Balakrishnan, D., Show, P. L., Ramaraj, R., Ağbulut, Ü., & Khoo, K. S. (2023). Application of modern approaches to the synthesis of biohydrogen from organic waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(55), 21189-21213. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.03.029>
- Shiva Kumar, S., & Lim, H. (2022). An overview of water electrolysis technologies for green hydrogen production. *Energy Reports*, 8, 13793-13813. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2022.10.127>

- Skjeldal, L., Krane, J., & Ljones, T. (1989). *Proton n.m.r of ferredoxin from Clostridium pasteurianum*.
- Spiegel R., M., Schiller, J., & Srinivasan, R. A. (2006). *Probabilidad y estadística* (2a ed.). McGraw-Hill.
- SRI Instruments. (2023). 8610 Gas Chromatograph [Aparato].
- Tomar, S., Agarwal, S., Singh, H., Kumar, R., Qureshi, K. A., Jaremko, M., Emwas, A.-H., & Rai, P. K. (2023). Microalgae: A promising source for biofuel production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 53, 102877. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102877>
- Vignais, P. M., & Billoud, B. (2007). Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chemical Reviews*, 107(10), 4206-4272. <https://doi.org/10.1021/cr050196r>
- Vlotman, D. E., Key, D., & Bladergroen, B. J. (2022). Technological Advances in Winery Wastewater Treatment: A Comprehensive Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*. <https://doi.org/10.21548/43-1-4931>
- Wang, J., & Yin, Y. (2017). *Biohydrogen Production from Organic Wastes*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4675-9>
- Yan, B., Jia, X., Li, J., Li, Z., Che, Y., Zhou, Z., Zhao, J., Zhou, S., & Chen, G. (2024). In-situ elimination of biomass gasification tar based on the understanding of tar formation process: A review. *Journal of the Energy Institute*, 112, 101477. <https://doi.org/10.1016/j.joei.2023.101477>
- Yörüklü, H. C., Filiz, B. C., Figen, A. K., & Özkaya, B. (2022). Screening of biohydrogen production based on dark fermentation in the presence of nano-sized Fe₂O₃ doped metal oxide additives. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(34), 15383-15396. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.03.148>
- Zahuantitla Razo, I. (2020). *Producción de biohidrógeno a partir de vinazas vitivinícolas: Potencial de componentes del sustrato y comunidad microbiana asociada*. [Tesis de Licenciatura]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Zainal, B. S., Ker, P. J., Mohamed, H., Ong, H. C., Fattah, I. M. R., Rahman, S. M. A., Nghiem, L. D., & Mahlia, T. M. I. (2024). Recent advancement and assessment of green hydrogen production technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 189, 113941. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113941>
- Zavala Méndez, M. del C. (2020). *Implementación de una estrategia de control automático y escalamiento de la producción de biohidrógeno a partir de efluentes vitivinícolas*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Zavala-Méndez, M., Vargas, A., & Carrillo-Reyes, J. (2022). Maximization of bio-hydrogen production from winery vinasses using on-line feedback control. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(78), 33259-33271. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.07.196>

15. ANEXOS

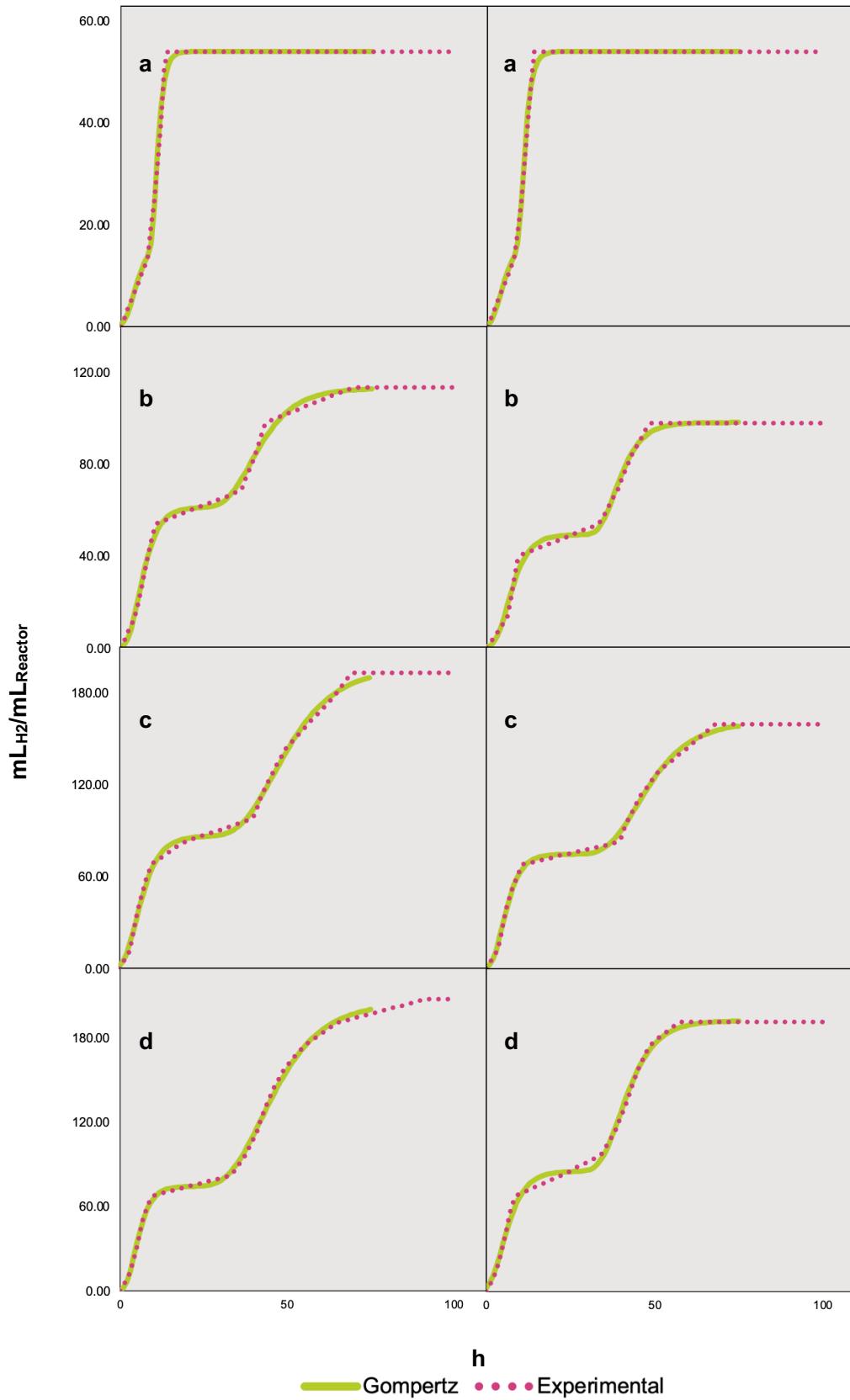


Figura 18. Cinéticas de producción de hidrógeno de los sustratos en la semana 0 por duplicado: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c), mezcla(d).

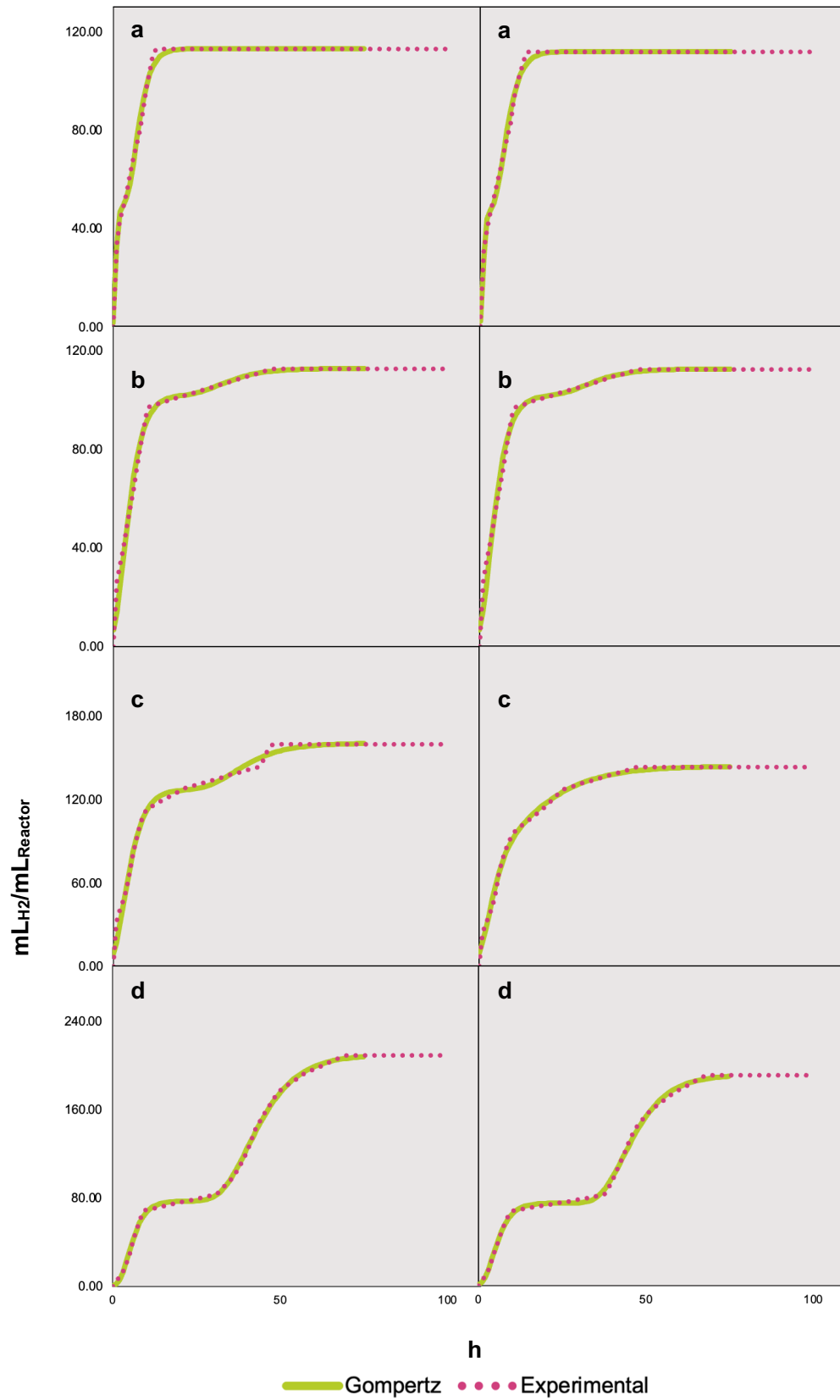


Figura 19. Cinéticas de producción de hidrógeno de los sustratos en la semana 2 por duplicado: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c), mezcla(d).

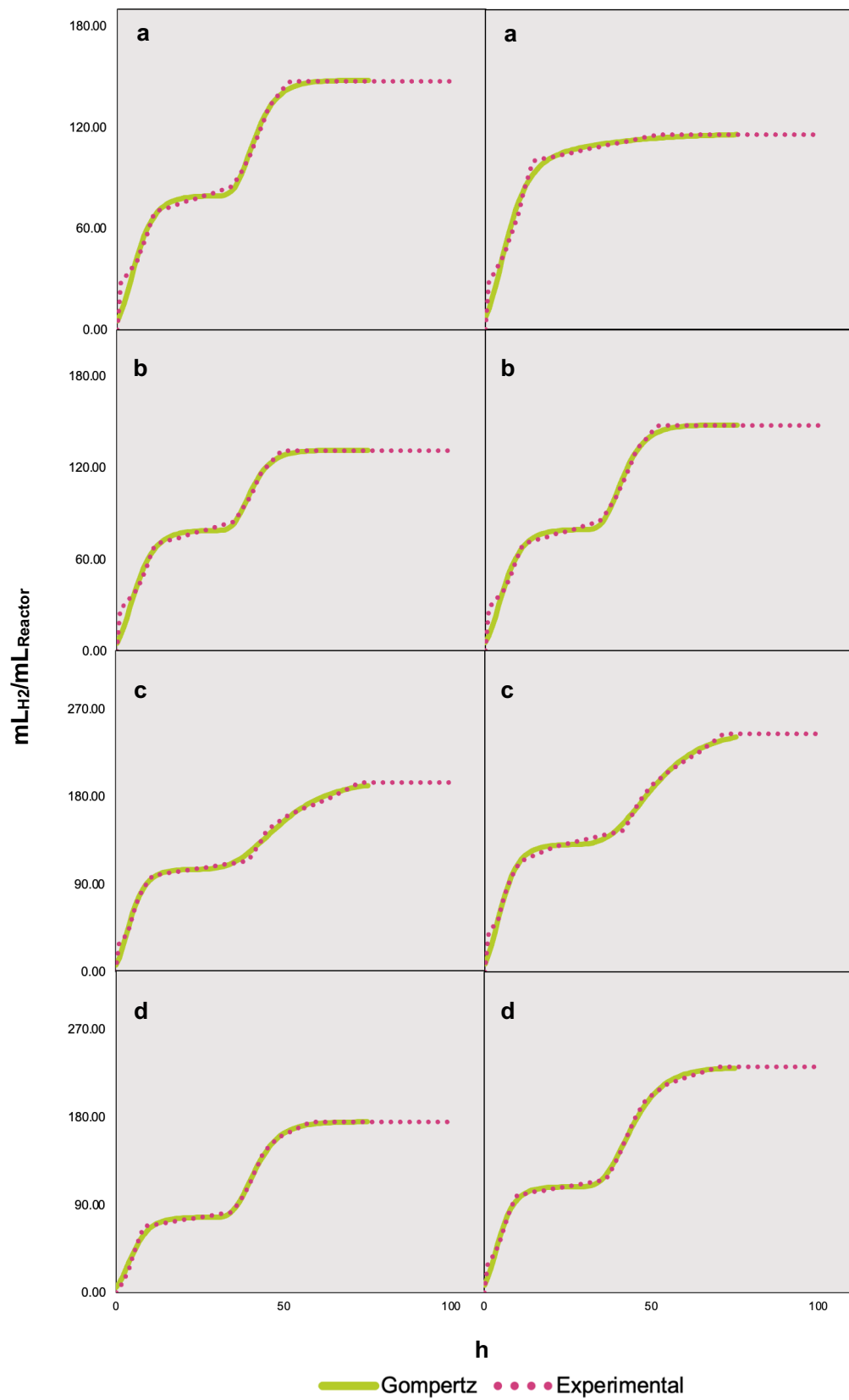


Figura 20. Cinéticas de producción de hidrógeno de los sustratos en la semana 3 por duplicado: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c), mezcla(d).

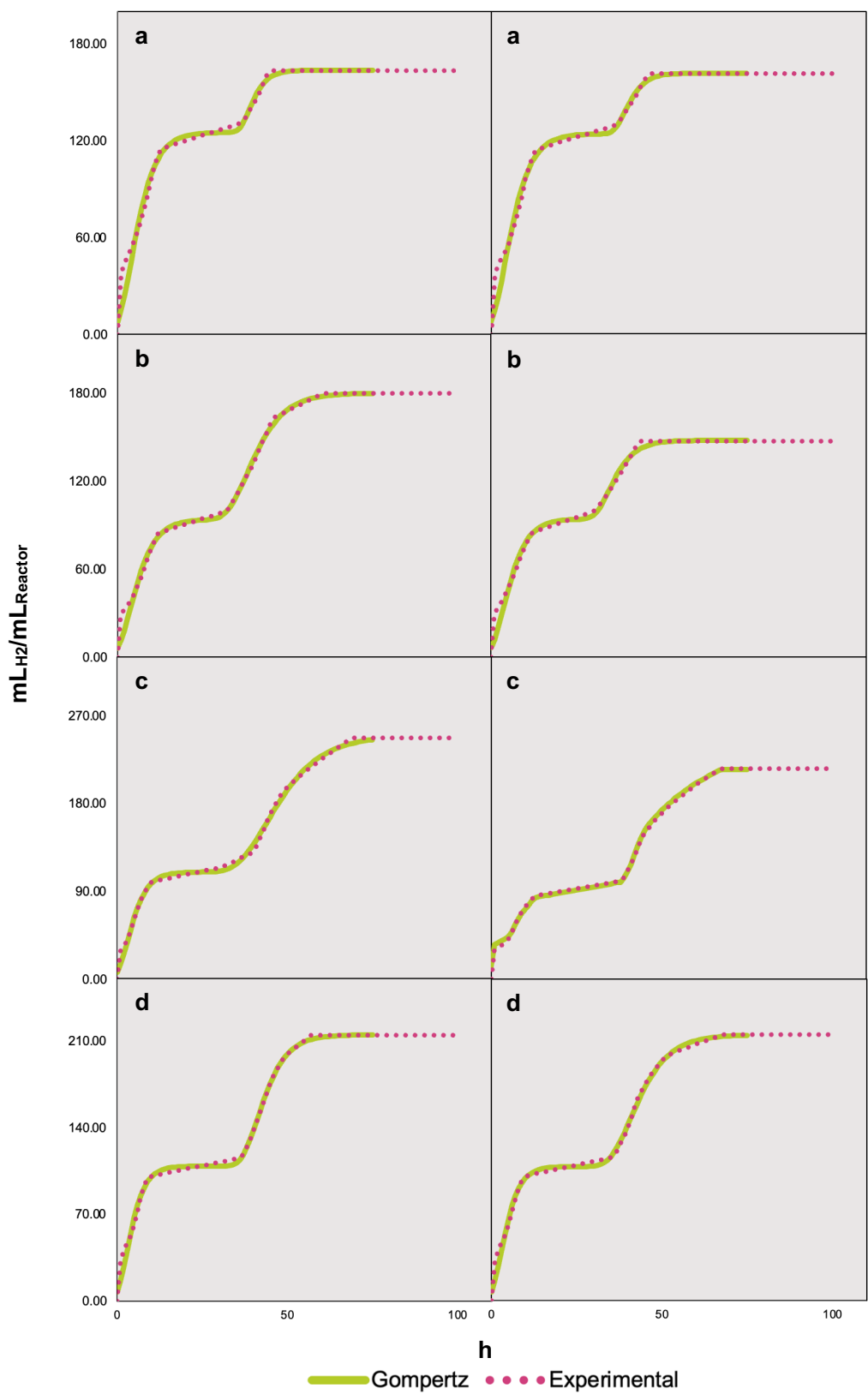


Figura 21. Cinéticas de producción de hidrógeno de los sustratos en la semana 5 por duplicado: Vino tinto (a), vino rosa (b), vino blanco (c), mezcla(d).