



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS

**“Producción continua de hidrógeno y metano en dos
etapas a partir de la fermentación de suero de leche”**

Tesis que presenta

Ciria Berenice Cota Navarro

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Aplicadas

En la opción de

Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

Dr. Elías Razo Flores

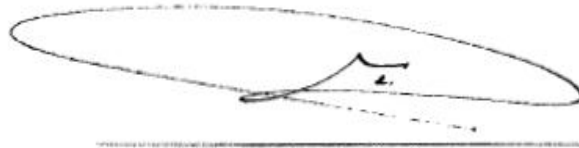
Asesores:

Dr. Felipe Alatraste Mondragón

Dr. Gustavo Dávila Vázquez

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2010.

La tesis "Producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas a partir de la fermentación de suero de leche" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Ciria Berenice Cota Navarro** y aprobada el **11 enero de 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



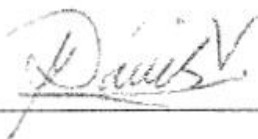
Dr. Elías Razo Flores

Director de la tesis, IPICYT



Dr. Felipe Alatraste Mondragón

Asesor de la tesis, IPICYT



Dr. Gustavo Dávila Vázquez

Asesor de la tesis, CIATEJ



Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales y en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Elías Razo Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**211818**) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Esta tesis fue financiada como parte del proyecto FMSLP-2005-C01-23 del Fondo Mixto San Luis Potosí - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, asignado al Dr. Elías Razo Flores.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 030 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 25 días del mes de enero del año 2010, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Felipe Alatríste Mondragón	Presidente	IPICYT
Dr. Gustavo Dávila Vázquez	Secretario	CIATEJ
Dr. Elías Razo Flores	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS
EN LA OPCIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES**

sustenta la C.

Ciria Berenice Cota Navarro

sobre la Tesis intitulada:

Producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas a partir de la fermentación de suero de leche

que se desarrolló bajo la dirección de

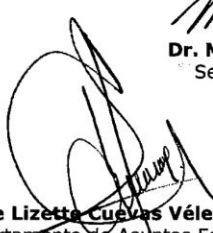
Dr. Elías Razo Flores

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dandose por terminado el acto a las 12:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 25 días del mes de enero de 2010.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares


Dr. Marcial Bórnila
Secretario Académico



Con todo mi amor y cariño a mis padres, hermanas y a mi sobrinito que está por llegar.

Al Dr. Rolando Félix Armendáriz[†], mi inspiración y ejemplo para seguir adelante en esta aventura.

Con amor a Ricardo de la Vega Flores y a mis queridos amigos Berenice Flores y Luis Manuel Rosales.

Agradecimientos

Al Dr. Elías Razo Flores por su valioso apoyo, por compartir sus conocimientos, por su visión y atinados comentarios la elaboración de este documento y por confiar en mi. A mi maestro el Dr. Gustavo Dávila Vázquez por ser mi guía, por su entrega, experiencia y tantos conocimientos compartidos. Al Dr. Felipe Alatríste Mondragón por compartir su experiencia y conocimientos, y por su gran aportación en mi formación profesional.

Al IPICYT y al CONACYT por la beca de posgrado otorgada.

A todos los maestros del IPICYT, un agradecimiento especial a la Dra. Sonia Arriaga y al Dr. Joel Flores por animarme a lograr esta meta y a la Dra. Berenice Celis por todo su apoyo académico, por su disposición y siempre buena actitud.

Al Dr. Antonio de León Rodríguez por aceptarme a mi y a mis reactores en su laboratorio. A la M. en C. Dulce Partida, M. en C. Guillermo Vidriales y al M. B. Gabriel Ordóñez por su invaluable apoyo técnico y por su amistad. A Julián Carrillo por su eficiente apoyo en el laboratorio.

Al Dr. Luciano Castro, Dr. Pablo Gortarez y al Dr. Francisco Cervantes por alentarme a continuar con mi preparación profesional.

A mis compañeros y amigos del IPICYT a Kitzia, Alma y Raúl, Marisol, Angélica Acosta, Laurita, Azu, Reyes, Luz, Flor, Josue, Olga, Arturo, Jorge, Ana, Rayo, Faby, Alberto, Juanito, Gaby y Esri, Zazil, Javier, Armando, Bernardo y Omar.

A la Familia Salguero Félix por su incondicional e infinito apoyo y amor.

A toda mi familia, en especial mi mamá Chila[†] y Luis, Christian Encinas, Manuel Maldonado y a las familias Pérez Navarro, Faz Navarro y Félix Cota. A mis consentidos Jesús Eduardo, Rubencito, Siria, Ammy, Sinaí, Estephany, Teresita, Marisela y al bebé.

Y a las bellas personas que encontré en San Luis Potosí que me brindaron su amor, apoyo y me hicieron sentir como en casa: Fam. De la Vega Flores y Faz Aguilar, Sra. Martha Gallegos y Ade.

Contenido

Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Digestión anaerobia	2
1.2 La biomasa como fuente de energía	4
1.2.1 Suero de leche	4
1.3 Aspectos generales de la producción fermentativa de hidrógeno	5
1.3.1 Factores que afectan la producción de hidrógeno	5
1.3.1.1 Inóculo	5
1.3.1.2 pH	6
1.3.1.3 Tiempo de retención hidráulico (TRH)	6
1.3.1.4 Concentración de sustrato y carga orgánica.	7
1.3.1.5 Presión parcial de hidrógeno	8
1.3.2 Rendimiento de hidrógeno	9
1.4. Aspectos generales de la producción biológica de metano	10
1.4.1 Producción de metano en reactores de flujo ascendente	10
1.4.2 Metano a partir de ácidos grasos volátiles	10
1.5. Sistemas de producción de hidrógeno y metano en dos etapas	11
1.6 Justificación	13
1.7 Objetivos	14
1.8 Hipótesis	15
Capítulo 2. Materiales y métodos	17
2.1. Producción de hidrógeno	17
2.1.1 Inóculo	18
2.1.2 Medio de cultivo	18
2.1.3 Experimentos en tanque agitado	19
2.2 Producción de metano	21
2.2.1 Inóculo	21
2.2.2 Medio de cultivo	22
2.2.3 Experimento en el reactor UASB	23
2.3 Conservación de las muestras de efluente	23
2.4 Métodos analíticos	24
2.4.1 Composición del gas	24
2.4.2 Cuantificación de etanol	25
2.4.3 Análisis de ácidos grasos volátiles (AGVs) y lactosa	25
2.4.4 Determinación de DQO, SSV y alcalinidad	26

Capítulo 3. Resultados y discusión	27
3.1 Producción continua de hidrógeno en CSTR	27
3.1.1 Experimento H(A): evaluación del efecto del TRH y carga orgánica	27
3.1.2 Experimentos L - SLP y SLP - L: evaluación del efecto del sustrato	33
3.1.3 Experimento H(B)	41
3.2 Producción continua de metano en reactor UASB a partir de AGVs	45
3.3 Producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas	50
Capítulo 4. Conclusiones y perspectivas	53
Capítulo 5. Bibliografía	57
Anexo A	63

Lista de Tablas

Tabla 1.1	Reacciones químicas involucradas en el proceso de digestión anaerobia partiendo de glucosa.	4
Tabla 1.2	Estudios de producción de metano a partir de AGVs en reactores UASB.	11
Tabla 1.3	Sistemas de producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas con diferentes sustratos y parámetros de operación.	12
Tabla 2.1	Composición del medio mineral de fosfatos 10X.	19
Tabla 2.2	Composición de la alimentación.	22
Tabla 2.3	Composición de la solución de elementos traza 1000X.	22
Tabla 2.4	Composición del medio basal 10X.	23
Tabla 3.1	Desempeño del reactor CSTR en el experimento H(A) para la producción de hidrógeno bajo diferentes periodos operacionales utilizando suero de leche en polvo como sustrato.	29
Tabla 3.2	Desempeño del reactor CSTR para la producción de hidrógeno en el experimento L - SLP en comparación con la condición 2 del experimento H(A).	35
Tabla 3.3	Desempeño del reactor CSTR para la producción de hidrógeno en el experimento SLP - L en comparación con la condición 2 del experimento H(A).	39
Tabla 3.4	Características del efluente del CSTR en el experimento H(B).	42
Tabla 3.5	Resultados de procesos continuos y semicontinuos para la producción de hidrógeno con suero de leche o lactosa como sustrato.	44
Tabla 3.6	Desempeño del reactor UASB para la producción de metano durante el periodo I utilizando una mezcla sintética de AGVs como sustrato.	47
Tabla 3.7	Desempeño del reactor UASB para la producción de metano durante los periodos II - V utilizando el efluente del experimento H(B) como alimentación.	48
Tabla 3.8	Estudios de producción de metano a partir de ácidos grasos volátiles en reactores UASB.	49
Tabla 3.9	Sistemas de producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas que utilizan suero de leche como sustrato.	51

Lista de Figuras

Figura 1.1	Esquema de la digestión anaerobia. a - e representan los diferentes grupos de microorganismos que trabajan de manera sintrófica para convertir los sustratos complejos en metano y dióxido de carbono. a: bacterias fermentativas, b: acetogénicas, c: homoacetogénicas, d: metanogénicas hidrogenotróficas, e: metanogénicas acetoclásticas.	3
Figura 1.2	Efecto de la presión parcial de hidrógeno sobre la producción biológica de hidrógeno. (a): la oxidación del NADH para la producción de hidrógeno es termodinámicamente favorable si la presión parcial de hidrógeno es menor a 60 Pa, (b): con presiones parciales de hidrógeno superiores a los 60 Pa se pueden formar otros productos de fermentación. Reacciones (a) y (b): 1, metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis o la vía Entner-Doudoroff (deshidrogenación de la triosa fosfato); 2, descarboxilación oxidativa del piruvato; 3, formación de hidrógeno por una hidrogenasa; 4, fermentación a butirato.	9
Figura 2.1.	Sistema de producción de hidrógeno. A: dispositivo de medición de ORP, B: sistema de control ADI 1030, C: control de agitación, D: NaOH 10M, E: antiespumante, F: reactor (CSTR), G: alimentación, H: dispositivo de medición de gas	20
Figura 2.2	Sistema de producción de metano. A: alimentación, B: bomba peristáltica, C: reactor UASB, D: dispositivo de medición de gas.	24
Figura 3.1	Desempeño del reactor CSTR en el experimento H(A) bajo las condiciones operacionales 1 - 9 (los detalles se muestran en la tabla 3.1). a) lactosa residual (○) y VVPH (●). b) producción de AGVs: acetato (■), propionato (◇) y butirato (□). c) etanol (△) y SSV en el reactor (▲).	28
Figura 3.2	Distribución promedio de los ácidos grasos volátiles generados en el reactor CSTR en el experimento H(A) para la producción de hidrógeno bajo diferentes periodos operacionales evaluados.	31
Figura 3.3	Velocidades volumétricas de producción de hidrógeno obtenidas en el experimento H(A) en los diferentes periodos operacionales evaluados.	32
Figura 3.4	Desempeño del reactor CSTR en el experimento L - SLP (los detalles se muestran en la Tabla 3.2). a) lactosa residual (○) y VVPH (●). b) producción de AGVs: acetato (■), propionato (◇) y butirato (□). c) etanol (△) y SSV en el reactor (▲).	34
Figura 3.5	Distribución promedio de los ácidos grasos volátiles generados en el reactor CSTR en el experimento L - SLP para la producción de hidrógeno durante la operación con lactosa y SLP como sustratos.	36
Figura 3.6	Desempeño del reactor CSTR en el experimento SLP - L (los detalles se muestran en la tabla 3.3). a): lactosa residual (○) y VVPH (●). b)	38

producción de AGVs: acetato (■), propionato (◇) y butirato (□). c) etanol (△) y SSV en el reactor (▲).

- Figura 3.7** Distribución promedio de los ácidos grasos volátiles generados en el reactor CSTR en el experimento SLP - L para la producción de hidrógeno durante la operación con SLP y lactosa como sustratos. 40
- Figura 3.8** Distribución promedio de los productos metabólicos obtenidos en el experimento H(B). 42
- Figura 3.9** Desempeño del reactor UASB en los periodos I - V (los detalles se presentan en las Tablas 3.6 y 3.7). a) VVPM (●); b) carga orgánica (◇); c) TRH (▲) y pH del afluente (△); d) eficiencia de remoción de DQO (◆). 46

Cota Navarro, Ciria Berenice (2010). Producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas a partir de la fermentación de suero de leche. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí, México.

Resumen

La mayor parte de la energía que se consume en el mundo proviene de los combustibles fósiles, los cuales son recursos no renovables. El hidrógeno (H_2) es una prominente alternativa a los combustibles fósiles. Cuando el H_2 es producido por medios biológicos, a partir de sustratos provenientes de biomasa o subproductos, como el suero de leche, se le considera una fuente de energía renovable y sustentable. En la producción biológica de H_2 por la vía fermentativa, la mayor parte del sustrato alimentado al sistema es transformado en ácidos grasos volátiles (AGVs) y/o solventes, lo cual hace necesaria la aplicación de un proceso complementario para su eliminación. Puesto que los AGVs son compuestos precursores de la metanogénesis, resulta conveniente acoplar la producción de metano (CH_4) a la de H_2 . En el presente trabajo se estudió la factibilidad de integrar la producción biológica de H_2 y CH_4 , en un sistema de dos etapas, utilizando cultivos mixtos y suero de leche en polvo (SLP) como sustrato. Se evaluó el efecto de la carga orgánica y el tiempo de retención hidráulico (TRH) sobre la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) y de metano (VVPM), además se comparó la producción de H_2 usando SLP y lactosa como sustrato. La VVPH más alta fue de 1046 mmol H_2 /L/d (31.6 L H_2 /L/d), obtenida en un reactor continuo de tanque agitado a condiciones estables de operación, con un TRH de 6 h y carga orgánica volumétrica de 142.2 g lactosa/L/d. Adicionalmente, se logro producir H_2 (539 mmol H_2 /L/d \approx 16.3 L H_2 /L/d) aún a TRH de 3.5 h y carga orgánica de 162.5 g lactosa/L/d, sin embargo, la operación del reactor no fue estable. La producción de hidrógeno en la operación con SLP, resultó ser 2.57 veces más alta que en la operación con lactosa. En cuanto a la producción CH_4 en un reactor UASB, el efluente acidificado proveniente de la etapa de producción de hidrógeno, permitió la aplicación de cargas orgánicas de 20 g DQO/L/d a un TRH de 6 h, obteniendo una eficiencia de remoción de DQO superior al 90%. El TRH global de las etapas de fermentación y metanogénesis fue de 15 horas. Para el tratamiento continuo de la totalidad del efluente generado en el reactor productor de H_2 , se requiere un reactor metanogénico 5 veces mayor al volumen del reactor de hidrógeno, en las condiciones evaluadas. En este estudio se demostró que la producción de CH_4 puede ser eficientemente acoplada a la producción de H_2 y que el SLP es un sustrato adecuado para los procesos de producción de biocombustibles gaseosos.

Cota Navarro, Ciria Berenice (2010). Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation. M.Sc. Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí, México.

Abstract

A high percentage of the energy consumed worldwide is obtained from non-renewable fossil fuels. Hydrogen (H_2) is feasible alternative for the future, mainly when is produced by biological means using biomass or agricultural by-products, such as cheese whey. During hydrogen producing dark fermentation the organic substrate is biotransformed into mainly volatile fatty acids (VAFs), making necessary the application of an additional process for the stabilization of the organic matter. As VFAs are the natural substrates for methanogens, it is convenient coupling the methane (CH_4) production to the hydrogen production. The objective of this work was to study the feasibility of integrating the biological H_2 and CH_4 production in a two-stage process using mixed cultures and cheese whey powder (CWP) as substrate. The effect of operational parameters such as hydraulic retention time (HRT) and organic loading rate (OLR) on the volumetric hydrogen (VHPR) and methane (VMPR) production rate was assessed. Additionally, the VHPR using CWP and pure lactose as substrates was compared. The highest VHPR was 1046 mmol H_2 /L/d (31.6 L H_2 /L/d), obtained during stable operation in a continuous stirred tank reactor at HRT and OLR of 6 h and 142.2 g lactose/L/d, respectively. Moreover, H_2 (539 mmol H_2 /L/d \approx 16.3 L H_2 /L/d) was produced even at HRT as low as 3.5 h and OLR of 162.5 g lactose/L/d, nonetheless, the reactor operation was not stable. Noteworthy, VHPR with CWP was 2.57 times higher when using pure lactose as substrate. Regarding methane production in an UASB reactor, the acidified effluent coming from the hydrogen production was efficiently treated obtaining COD removal above 90% at OLR and HRT of 20 g COD/L/d and 6h, respectively. The global HRT for the fermentation and methanogenesis stages was 15 h. In order to treat the whole effluent produced during hydrogen production, the methanogenic reactor should be at least 5 times the volume of the fermenting reactor under the conditions here applied. This study has demonstrated that H_2 production can be efficiently coupled to CH_4 production in a two-stage system and that CWP is an adequate substrate for energy production.

Capítulo 1. Introducción

En la actualidad, la mayor parte de la energía que se utiliza en el mundo (84.8% [1]) se obtiene de las fuentes primarias tipo fósil (petróleo, carbón y gas natural) ocasionando una serie de problemas de carácter social, económico y ambiental, alcanzando este último, niveles de orden global. El consumo desmedido de combustibles fósiles presenta una limitante importante que radica en su nula capacidad de renovación, lo cual impacta directamente en el agotamiento de reservas a corto y mediano plazo. Así, el establecimiento de una sociedad sustentable requiere de una reducción en la dependencia de combustibles fósiles además de una disminución en la contaminación que éstos generan [2]. Las energías renovables (ER) representan una respuesta importante a la demanda generalizada de un modelo sustentable de progreso que no afecte a las generaciones futuras. Así mismo, su eficaz aprovechamiento contribuirá a la conservación y uso eficiente de los recursos energéticos no renovables existentes. El notable incremento en los precios de los combustibles fósiles observado en los últimos años ha mejorado la posición competitiva de las ER, permitiendo mayores posibilidades de uso [3]. Entre las ER se encuentra el uso de la biomasa para la generación de biocombustibles tales como el hidrógeno, metano, diesel y etanol.

El hidrógeno (H_2) que es producido a partir de biomasa, es una prominente alternativa a los combustibles fósiles y se considera una fuente de energía sustentable [4, 5]. Existen dos principales rutas por las cuales se puede producir H_2 partiendo de biomasa, los métodos termoquímicos y biológicos [6]. Dentro de los métodos biológicos se encuentra la producción fermentativa que es la que se aborda en este estudio. La producción fermentativa de H_2 ha sido considerada un método viable y efectivo [7], siendo este proceso potencialmente atractivo especialmente cuando se utilizan aguas residuales ricas en materia orgánica o bien subproductos agroindustriales como materia prima [8, 9].

En la producción fermentativa de H_2 la mayor parte de la materia orgánica o sustrato alimentado al sistema es transformado en ácidos grasos volátiles (AGVs) y/o solventes, haciendo necesario un paso complementario para su eliminación. Teniendo en cuenta que los AGVs son los compuestos precursores de la metanogénesis, una alternativa para utilizar estos subproductos de fermentación es transformarlos en una forma útil de energía mediante la producción de metano (CH_4) [10]. El CH_4 es una fuente de energía disponible que puede ser usada para generar calor o energía eléctrica en celdas de combustible.

El presente trabajo está enfocado a la producción biológica de H_2 y CH_4 partiendo de suero de leche en polvo (SLP) como sustrato y cultivos anaerobios mixtos en un sistema de dos etapas. Adicionalmente, se comparó el potencial de producción de hidrógeno con SLP y lactosa pura como sustrato.

1.1 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso biológico que tiene lugar en ausencia de oxígeno. Es una tecnología usada para recuperar energía a partir de desechos orgánicos, además de ser un sistema biotecnológicamente simple y efectivo para la reducción y estabilización de materia orgánica [11]. En este proceso, la biomasa es biológicamente convertida en dióxido de carbono (CO_2) y metano [12] como productos finales, produciéndose hidrógeno como producto intermediario. El uso de la digestión anaerobia separando la fermentación (acidogénesis) de la

metanogénesis permite obtener H_2 y CH_4 de manera simultánea. En la Figura 1.1 se esquematiza el proceso de digestión anaerobia [2]. La digestión anaerobia involucra tres fases: hidrólisis/acidificación, acetogénesis y metanogénesis. En este proceso, los compuestos orgánicos complejos son hidrolizados y posteriormente fermentados a AGVs y alcoholes. Estos productos son transformados a acetato, CO_2 e H_2 en la etapa de acetogénesis; finalmente en la metanogénesis son convertidos a CH_4 y CO_2 . En la Tabla 1.1 se presentan las reacciones químicas involucradas en las etapas mencionadas [2].

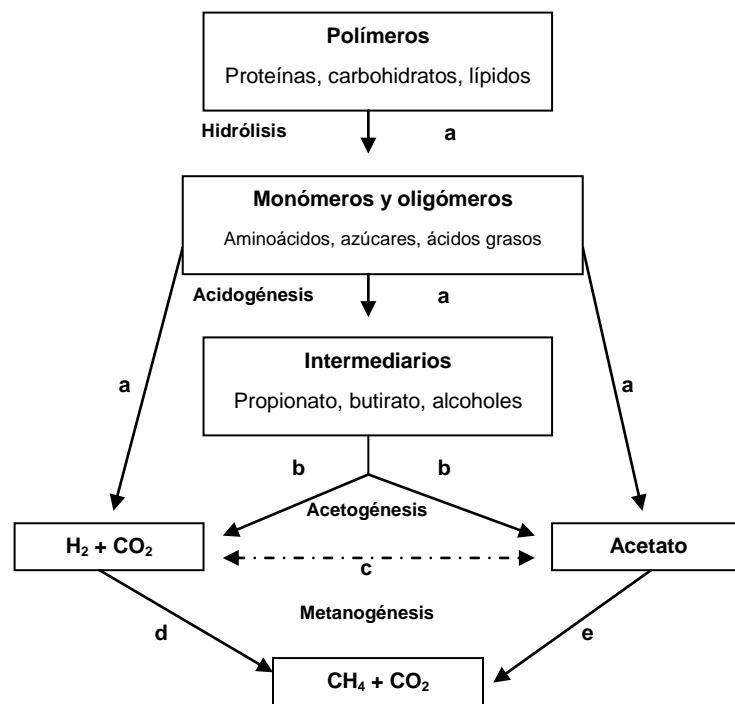


Figura 1.1 Esquema de la digestión anaerobia. a - e representan los diferentes grupos de microorganismos que trabajan de manera sintrófica para convertir los sustratos complejos en metano y dióxido de carbono. a: bacterias fermentativas, b: acetogénicas, c: homoacetogénicas, d: metanogénicas hidrogenotróficas, e: metanogénicas acetoclásticas [2].

Tabla 1.1 Reacciones químicas involucradas en el proceso de digestión anaerobia partiendo de glucosa [2].

Proceso	Reacción	Letra en la Figura 1.1
Fermentación a hidrógeno y ácido acético	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CH_3COOH + 2CO_2$	a
Fermentación a hidrógeno y ácido butírico	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2H_2 + CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2$	a
Fermentación a etanol	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$	a
Producción de ácido propiónico con hidrógeno	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	a
Producción de etanol con hidrógeno	$CH_3COOH + H_2 \rightarrow CH_3CH_2OH + H_2O$	
Oxidación sintrófica del ácido propiónico	$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$	b
Oxidación sintrófica del ácido butírico	$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$	b
Oxidación sintrófica del ácido acético	$CH_3COOH + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CO_2$	c
Metanogénesis hidrogenotrófica	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	d
Metanogénesis acetoclástica	$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$	e
Formación de metano con glucosa	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_4 + 3CO_2$	a, b, c, d, e

1.2 La biomasa como fuente de energía

La biomasa es considerada la cuarta fuente de energía en el mundo [13] e incluye desechos orgánicos de animales, plantas de tratamiento de aguas, residuos industriales, así como cultivos energéticos los cuales pueden ser utilizados para la generación de biocombustibles [14]. La biomasa tiene el potencial para lograr que el H_2 llegue a ser un combustible principal en el futuro [6].

1.2.1 Suero de leche

El suero de leche es el principal subproducto en la manufactura de queso. Contiene nutrientes como lactosa (4.5 - 5% p/v), proteínas solubles (0.6 - 0.8% p/v), lípidos (0.4 - 0.5% p/v), sales minerales (4.5 - 5% p/v) [15] y vitaminas [16]. Debido a su contenido de lactosa y la presencia de nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano [17], el suero de leche es un sustrato potencial para los procesos fermentativos [18] tanto para la producción de hidrógeno [4, 19] como de

metano [20]. El SLP se obtiene por secado del suero de leche y representa una fuente barata (0.3 USD/kg [20]) y concentrada de lactosa (>61% p/p) [21]. En algunos estudios previos se ha reportado el uso de SLP para la producción de hidrógeno [21-23].

1.3 Aspectos generales de la producción fermentativa de hidrógeno

1.3.1 Factores que afectan la producción de hidrógeno

La producción de hidrógeno es un proceso complejo influenciado por muchos factores [8, 24], entre ellos se incluyen el inóculo, pH, tiempo de retención hidráulico (TRH), concentración de sustrato, carga orgánica y presión parcial de hidrógeno, entre otros. Estos factores se consideran los más importantes para efectos de este estudio y se abordan a continuación.

1.3.1.1 Inóculo

La producción fermentativa de hidrógeno a partir de carbohidratos, ha sido estudiada utilizando tanto cultivos puros como mixtos. En cuanto a los cultivos puros, los géneros *Clostridium* y *Enterobacter* son los que se utilizan más frecuentemente [25, 26]. Sin embargo el uso de cultivos puros resulta complicado ya que es necesario mantener condiciones asépticas [4, 27].

Las bacterias capaces de producir H₂ se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes ambientes y, de manera especial, en lodo anaerobio granular usado en procesos metanogénicos, el cual representa un buen ejemplo de cultivo mixto [28, 29]. Sin embargo, el empleo de este tipo de fuente de inóculo, al igual que cualquier otro de origen metanogénico, requiere un tratamiento adicional previo a su uso, ya que en los cultivos mixtos coexisten organismos consumidores de H₂, tales como los metanógenos. Un método efectivo para eliminar del inóculo a los organismos metanogénicos es la aplicación de tratamiento térmico [30]. Las temperaturas/tiempos que han sido reportados para el tratamiento térmico del inóculo son muy variados, 105°C por 1.5 h [31], 100°C por 45 min [32], 110°C por 10 min [33]. Adicionalmente, el tratamiento térmico permite seleccionar a las

bacterias que pueden formar endoesporas, tales como *Clostridium*, *Bacillus* y *Thermoanaerobacterium* [34]. Las bacterias del género *Clostridium* son las que se asocian directamente con la producción de H₂ en los sistemas continuos [22, 35].

1.3.1.2 pH

El pH influye en la actividad de las bacterias productoras de H₂ y en la producción fermentativa de H₂, al afectar la actividad de las hidrogenasas [36], e inducir al desvío de rutas metabólicas [25] que no conducen a la producción de H₂.

Durante el proceso de digestión anaerobia la producción de hidrógeno ocurre en la etapa acidogénica y, por esta razón, el pH es uno de los factores que afecta de manera importante a la producción de hidrógeno [27]. Los efectos adversos de los AGVs (generados durante la producción fermentativa de hidrogeno) sobre las bacterias fermentativas están asociados directamente con el pH [28]. Se presume que a valores de pH ácidos, las formas no disociadas de los AGVs pueden penetrar libremente la pared celular cambiando el pH interno de la célula [37] y, dependiendo de la concentración de AGVs presentes en el sistema, se puede producir una inhibición severa de la fermentación [28]. En general se ha visto que el pH óptimo para la producción fermentativa de hidrogeno esta entre 5 y 6 [38].

1.3.1.3 Tiempo de retención hidráulico (TRH)

El tiempo de retención hidráulico, en un quimiostato, es igual al tiempo de retención celular (inverso de la tasa de dilución) y está directamente relacionado con la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos [39]. Así, el TRH es un factor de selección microbiano en los sistemas de producción de hidrógeno. Chang y col. [32] observaron que la velocidad de producción de hidrógeno se vio incrementada al disminuir el TRH de 12 a 3 h, utilizando melaza como sustrato y lodos activados tratados térmicamente como inóculo en un quimiostato. En el mismo estudio se demostró que la composición de la comunidad microbiana fue afectada por el TRH, este efecto también fue observado en el estudio realizado por Davila-Vazquez y col. [22].

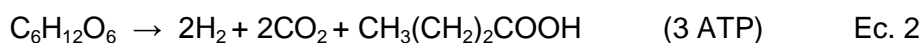
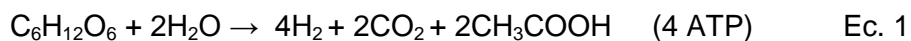
En la producción fermentativa de hidrógeno se ha demostrado que el TRH tiene efectos en la distribución de AGVs y en las velocidades de producción de H₂. En un estudio en el que se evaluó el efecto del TRH en la producción de AGVs en un quimiostato alimentado con suero de leche, se encontró que con el incremento del TRH por encima de 10 h, disminuyó la producción de butirato, incrementándose significativamente la producción de propionato [40] el cual se relaciona con baja producción de H₂ [41]. Chang y col. [42] estudiaron el efecto del TRH sobre el rendimiento y velocidad de producción de hidrógeno, encontrando que el rendimiento fue independiente del TRH en el rango de 8 a 20 h; sin embargo, la velocidad volumétrica y específica de producción de H₂ resultaron ser dependientes del TRH.

1.3.1.4 *Concentración de sustrato y carga orgánica*

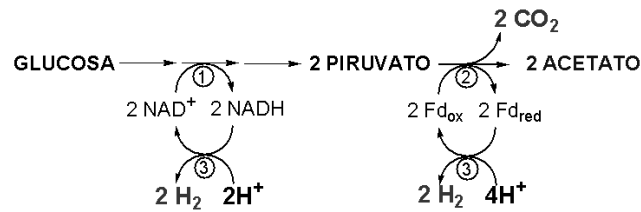
Estudios reportados en la literatura han mostrado que la concentración de sustrato tiene un efecto considerable sobre la distribución de productos de fermentación. Se ha observado que las bacterias productoras de hidrógeno del género *Clostridium* producen acetato y butirato a bajas concentraciones de sustrato [29]. Se encuentra demostrado que el rendimiento de H₂ esta en función de la concentración de sustrato, los rendimientos más altos han sido obtenidos a bajas concentraciones. Kyazze y Col. 2005 [33], obtuvieron un rendimiento de 1.7 mol/mol glucosa con la aplicación de una concentración de sustrato de 10 g sacarosa/L mientras que, con 50 g sacarosa/L, el rendimiento fue de sólo 0.8 mol/mol de glucosa. En contraparte, ha sido documentado que la velocidad de producción de hidrógeno aumenta con el incremento de la carga y la concentración de sustrato. Davila-Vazquez y col.(2008) [22] encontraron que con el aumento de la concentración de sustrato (23 a 34 g Lactosa/L) y de la carga orgánica (92 a 138 g lactosa/L/d), se vio duplicada la velocidad de producción de hidrógeno .

1.3.1.5 Presión parcial de hidrógeno

La principal limitación para obtener altos rendimientos en la producción fermentativa de hidrógeno es la presión parcial de H₂ debido a su efecto inhibitorio. Si la concentración de H₂ disuelto en la fase líquida aumenta, la transferencia de electrones de la glucosa al H₂ es cada vez más desfavorable [43]. El nicotinamida adenina dinucleótido [NADH, potencial de óxido reducción (ORP) = -320 mV] es el acarreador de electrones que está involucrado en la transferencia de electrones desde la deshidrogenación de la triosa fosfato hacia el H₂ (Figura 1.2, ①) mientras que la ferredoxina (Fd, ORP = -400 mV), Figura 1.2, ②, es el acarreador de electrones involucrado en la transferencia de electrones del piruvato al H₂ (ORP_{H₂} = -414 mV) [44]. Diversos estudios han mostrado que ORP es un factor importante en la producción de hidrógeno [45-47], Kyazze y col., observaron una producción constante de H₂ (12 L/L/d) a un ORP de -445mV [33]. El ORP del NADH es superior al del H₂, por esta razón, la deshidrogenación de la triosa fosfato para producir 2 moles de H₂ puede ocurrir sólo cuando la concentración de H₂ es menor que 6 x 10⁻⁴ atm (60 Pa), mientras que la producción de H₂ vía oxidación del piruvato y ferredoxina pueden generar 2 moles de H₂ a altas concentraciones de H₂ por arriba de 0.3 atm (3 x 10⁴ Pa) (Figura 1.2) [2]. Cuando todo el NAD⁺ se encuentra en forma de NADH, debido a la desfavorable transferencia de electrones hacia el H₂, algunas bacterias (*C. pasteurianum*) desvían los electrones del NADH hacia la producción de butirato (Figura 1.2, ④) y energía resultando en una disminución del rendimiento de H₂ y la producción de 3 moles de ATP (Ec. 2) [48].



(a) $P_{pH_2} < 60$ Pa:



(b) $P_{pH_2} > 60$ Pa:

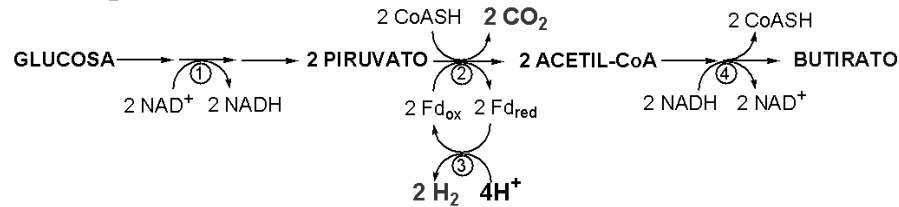


Figura 1.2 Efecto de la presión parcial de hidrógeno sobre la producción biológica de hidrógeno. (a): la oxidación del NADH para la producción de hidrógeno es termodinámicamente favorable si la presión parcial de hidrógeno es menor a 60 Pa, (b): con presiones parciales de hidrógeno superiores a los 60 Pa se pueden formar otros productos de fermentación. Reacciones (a) y (b): 1, metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis o la vía Entner-Doudoroff (deshidrogenación de la triosa fosfato); 2, descarboxilación oxidativa del piruvato; 3, formación de hidrógeno por una hidrogenasa; 4, fermentación butírica. (Modificado de Angenent y col., 2004).

1.3.2 Rendimiento de hidrógeno

Con la fermentación de la glucosa a acetato se logra el rendimiento máximo teórico de 4 moles de H₂/mol de glucosa (Ec. 1) y con la conversión a butirato (Ec. 2) se producen únicamente 2 moles de H₂/mol de glucosa [49]. En la práctica se reporta la producción de una mezcla de acetato y butirato [50] lo que favorece la producción de hidrógeno según las Ecs. 1 y 2. Dependiendo de las condiciones de cultivo aplicados en los sistemas fermentativos de producción de hidrógeno, se pueden producir otros productos de fermentación (ej. etanol, propionato, formiato, lactato, fumarato, succinato, acetona) y para lograr óptimos rendimientos de H₂ se debe evitar principalmente la producción de etanol, propionato, lactato y otros compuestos que consumen H₂ durante su generación [4]

Un rendimiento adicional de energía se puede obtener al aplicar una segunda etapa seguida a la producción fermentativa de H₂. Algunas de las opciones son:

producir más hidrógeno mediante la fotofermentación o producir metano por el proceso de digestión anaerobia [24, 51, 52].

1.4 Aspectos generales de la producción biológica de metano

1.4.1 Producción de metano en reactores de flujo ascendente

La digestión anaerobia de alta tasa es aplicada en reactores anaerobios de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de una gran variedad de aguas residuales. El éxito de este tipo de reactores radica en el establecimiento de una densa cama de lodo, del orden de 30-50 Kg de sólidos suspendidos volátiles (SSV)/m³, lo que permite el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de materia orgánica soluble [53].

1.4.2 Metano a partir de ácidos grasos volátiles

Los AGVs son compuestos precursores de la metanogénesis en el proceso de digestión anaerobia, por lo tanto pueden ser fácilmente convertidos a metano. Se ha reportado que las velocidades de conversión de distintos sustratos en metano varían según el siguiente orden: **acetato>etanol>butirato>propionato** [54]. Diversos estudios mencionan que el propionato puede conducir a la inhibición de las bacterias metanogénicas y llevar a una supresión de la fermentación [55-57].

En los procesos de metanogénesis se ha demostrado que la alimentación con efluentes acidificados permite la aplicación de altas cargas con TRH relativamente cortos [58] con respecto a los efluentes no acidificados. En la Tabla 1.2 se muestran algunos estudios realizados a partir de efluentes acidificados en reactores UASB para la producción de CH₄.

Tabla 1.2 Estudios de producción de metano a partir de AGVs en reactores UASB.

Sustrato	Inóculo	Carga orgánica (g DQO/L/d)	Velocidad de producción de CH ₄ (L/L/d)	Remoción de DQO (%)	Condiciones de operación [TRH(h), pH, Temperatura(°C)]	Ref.
Acetato-propionato-butirato (2:1:1)*	Lodo anaerobio floculento	24	9	97-99	10-12.5, 6-6.5, 37	[59]
Mezcla AGV y de alcoholes (1.5:1)*	Lodo anaerobio parcialmente granular	12.9	4.1	96	12, 6.7, 37	[9]

* Relaciones en base a la DQO

El rendimiento teórico de metano se establece en base a la demanda química de oxígeno (DQO) y se reporta que por cada gramo de DQO consumida en el sistema se generan 0.35 L de CH₄, a temperatura y presión estándar [39].

1.5 Sistemas de producción de hidrógeno y metano en dos etapas

Los sistemas anaerobios de dos etapas permiten incrementar la eficiencia de conversión de energía conduciendo a su vez, a la estabilización de la materia orgánica al generar continuamente H₂ y CH₄ en reactores separados. Los productos solubles del reactor de producción de hidrógeno (AGVs) proporcionan el sustrato adecuado para la producción de metano. Este tipo de sistemas son particularmente deseables para aguas que contienen altas concentraciones de sólidos orgánicos suspendidos, tal como los efluentes de la industria de alimentos y agroindustriales [60]. En la tabla 1.3 se presentan algunos ejemplos en los cuales se ha estudiado la producción de hidrógeno y metano de forma continua usando diferentes tipos de sustrato; en la lista destaca el proyecto de una planta piloto que opera a partir de desechos de alimentos y papel [11].

Tabla 1.3 Sistemas de producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas con diferentes sustratos y parámetros de operación.

Sustrato	Reactor productor de hidrógeno						Reactor productor de metano					Ref.	
	Tipo de reactor	Inóculo	Carga orgánica (g DQO soluble /L/d)	Velocidad de producción de H ₂ (L / L / d)	Rendimiento (mol H ₂ /mol glucosa)	Condiciones de operación [TRH(d), pH, Temperatura (°C)]	Tipo de reactor	Inóculo	Carga orgánica (g DQO soluble /L/d)	Velocidad de producción de CH ₄ (L / L / d)	Remoción de DQO soluble (%)		Condiciones de operación [TRH(d), pH In*, Temperatura (°C)]
Agua residual sintética	AcSBBR	Lodo anaerobio, TT y TA	4.7	8.5 mmoles/L d	2.12	1, 6, 28	AnSBBR	Lodo anaerobio	1.8	7 moles/ Kg DQO removida	54	1, 7, 28	[7]
Pulpa de oliva	CSTR	Lodo anaerobio, TT	46.3 g ST/d	0.4	0.13 moles H ₂ /kg ST	0.6, 5.35, 35	CSTR	Lodo anaerobio (preadaptado)	1.7	1.13	45	10, 7.5, 35	[61]
Residuos de alimentos y papel. PP	CSTR	Lodo activado adaptado	97 g DQOtotal /L/d	5.4	2.4	1.2, 5.8-6, 60	IRPR	Lodo anaerobio termófilico	15.7g DQOtotal /L/d	6.1	79.3 remoción de DQO total	6.8, 5.8-6, 55	[11]
Suero de leche	CSTR	Microflora de suero de leche	52.1	2.9	0.78	1, 5.2, 35	CSTR	Lodo anaerobio	49.1	0.33	95.3	20, 5, 35	[62]
Suero de leche	CSTR	Microflora de suero de leche	47.4	2.51	0.9	1, 5.2, 35	PABR	Lodo anaerobio	46.2	5	94	4.4, 4.8, 35	[49]

PP: planta piloto, **CSTR:** reactor de tanque agitado de flujo continuo, **AcSBBR:** reactor acidogénico secuenciado de biopelícula, **AnSBBR:** reactor anaerobio secuenciado de biopelícula, **IRPR:** reactor de lecho empacado con recirculación interna, **PABR:** reactor anaerobio compartimentalizado con baffles, **TT:** tratamiento térmico, **TA:** tratamiento ácido, **pH In*:** pH del afluente, **ST:** sólidos totales.

1.6 Justificación

El deterioro ambiental causado por la combustión de fósiles y el eventual agotamiento de este tipo de combustibles ha generado la necesidad de encontrar nuevas fuentes de energía que puedan utilizarse en un futuro cercano. Para tales efectos, la biomasa es una fuente alternativa de energía renovable y sustentable. Un aspecto ambientalmente importante respecto al uso de biomasa en la producción de biocombustibles, como el hidrógeno, es que el dióxido de carbono (CO_2) liberado, ya sea durante la producción y/o el aprovechamiento, no contribuye al calentamiento global ya que forma parte del ciclo natural del carbono [52]. La utilización de H_2 , vía combustión o celdas de combustible para producir electricidad resulta en agua pura [63]. Teniendo en cuenta que actualmente el 98% del H_2 que se produce proviene de la conversión de combustibles fósiles [64], resulta aún más atractivo el uso de biomasa para producirlo. Otro punto a favor de la producción y uso del H_2 es que posee un alto rendimiento energético (122 KJ/g) [65], 2.7 veces mayor que cualquier otro hidrocarburo [38], lo que hace al H_2 un producto de alto valor.

Una limitante en el proceso fermentativo de producción de H_2 es que, típicamente, del 80 a 90% de la DQO inicial permanece en forma de AGVs y solventes, como el acetato, propionato, butirato y etanol [10]. Puesto que los AGVs son sustratos para la metanogénesis, resulta conveniente acoplar la producción de hidrógeno y CH_4 . Por otro lado, la producción biológica de metano mediante el proceso de digestión anaerobia, es una tecnología ampliamente desarrollada. Así los sistemas de dos etapas permiten obtener H_2 y CH_4 de manera simultánea en reactores separados. Un buen argumento para el uso de estos sistemas es que la separación de las etapas (acidogénesis y metanogénesis) facilita la optimización de cada proceso separadamente [66], además de que se garantiza una considerable reducción de la DQO residual proveniente de la etapa de producción de hidrógeno.

El enfoque de producción de energía a partir del uso de desechos orgánicos es de vital importancia. El suero de leche es un subproducto orgánico que se genera en

la industria de lácteos. En 1998 la producción mundial de suero de leche se estimó en 138 millones de toneladas [16] y se reporta que partiendo de 10 L de leche se producen 9 kg de suero y 1 kg de queso [67]. Aproximadamente el 47% del suero de leche producido mundialmente es descargado en el ambiente [68] y debido al contenido de materia orgánica que posee (60-80 g DQO/ L) se le considera un contaminante importante [69]. La alta concentración de materia orgánica presente en el suero de leche ocasiona que el tratamiento por el método convencional aerobio (lodos activados) sea muy costoso [20]. El SLP se obtiene de la deshidratación del suero de leche y es una fuente barata y abundante de nutrientes (lactosa, vitaminas, proteínas, minerales). La lactosa es un compuesto de fácil degradación biológica, lo que hace al SLP un sustrato apto para usarse en procesos fermentativos.

En la actualidad existe un número muy limitado de estudios en donde se utiliza al SLP como sustrato para la producción de bioenergía [20-22]. A la fecha no hay reportes en donde se estudie la producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas con SLP como sustrato.

1.7 Objetivos

General

Estudiar la producción biológica de hidrógeno y metano en dos etapas, utilizando suero de leche en polvo y cultivos mixtos en procesos continuos.

Específicos:

- a) Producir H_2 de manera continua en una primera etapa.
- b) Usar los subproductos de fermentación generados en la primera etapa para producir CH_4 en una segunda etapa.
- c) Evaluar el efecto del TRH y la carga orgánica sobre la velocidad de producción de hidrógeno y metano.

d) Evaluar el potencial de producción de hidrógeno con SLP haciendo un comparativo con lactosa pura como sustrato.

1.8 Hipótesis

a) La manipulación de parámetros de operación (TRH y carga orgánica) conducirá al aumento de la velocidad de producción de hidrógeno y metano en los reactores biológicos.

b) La velocidad de producción de hidrógeno con SLP será superior a la obtenida con lactosa.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Producción de hidrógeno.

Se efectuaron un total de 4 experimentos en los que se utilizó como inóculo lodo granular metanogénico tratado térmicamente. La alimentación continua al reactor estuvo compuesta por el sustrato y un medio mineral a base de fosfatos. El primer experimento H(A), consistió en evaluar el efecto de la carga orgánica y el TRH sobre la velocidad de producción de hidrógeno usando SLP como sustrato. Del experimento H(A) se seleccionó la mejor condición operacional para ser aplicada en los experimentos posteriores. En el segundo (L - SLP) y tercer experimento (SLP - L) se evaluó el efecto del sustrato sobre la velocidad de producción de hidrógeno. En el experimento L - SLP se inició la fermentación usando lactosa como sustrato, la cual fue sustituida en un tiempo determinado por SLP. El experimento SLP - L se efectuó de manera inversa al anterior. El cuarto experimento H(B) consistió en reproducir las mejores condiciones operacionales seleccionadas en el experimento H(A), y el efluente generado se utilizó para alimentar un reactor metanogénico con el fin de producir metano y disminuir la DQO del efluente.

En esta serie de experimentos se determinó la velocidad volumétrica de producción de H₂ (VVPH) y el % de hidrógeno en el gas generado. Se analizó el

consumo de sustratos y del efluente se analizaron los AGVs producidos, etanol, SSV, DQO y el sustrato residual. Se midió automáticamente el ORP, mientras que el pH y la temperatura de operación se controlaron automáticamente a 5.9 y 37°C, respectivamente.

2.1.1 Inóculo

El inóculo empleado fue lodo granular anaerobio obtenido de un reactor UASB de la planta de tratamiento de aguas residuales de la empresa Ricolino, ubicada en la Ciudad de San Luis Potosí, S.L.P. México. En total se utilizaron 3 diferentes lotes de lodo, cuyo contenido de SSV estuvo entre 5 y 7%. Antes de su uso el lodo fue tratado térmicamente a ebullición por 40 minutos con la finalidad de eliminar a las bacterias metanogénicas y a cualquier otro microorganismo consumidor de hidrógeno [21]. La concentración inicial de inóculo en los experimentos fue de 4.5 g SSV/L [22], con excepción del experimento H(B) donde se utilizaron 9 g SSV/L.

2.1.2 Medio de cultivo

En los experimentos H(A), L - SLP y SLP - L el sustrato utilizado fue SLP adquirido de Gossner Foods Inc. (Utha, USA), cuyo contenido de lactosa soluble fue de 79% con un 12% de proteína. Además de SLP, en los experimentos L - SLP y SLP - L se empleó lactosa grado reactivo como sustrato (J.T. Baker). En el experimento H(B) se utilizó SLP obtenido de Grande Custom Ingredients Group® (Wisconsin, USA), cuyo contenido de lactosa soluble y proteína fue de 73% y 11.5%, respectivamente. La solución de alimentación fue suplementada con medio mineral tal como lo reportó Wang y col. [70], cuya composición se muestra en la Tabla 2.1. La concentración final del medio mineral en la alimentación fue de 1X. Cuando se requirió controlar el nivel de espuma en el reactor se añadió de 2 a 10 mL/L de una solución de antiespumante (Silicona 0.3%) directamente al reactor o bien en la alimentación. La solución de alimentación se mantuvo en agitación constante.

Tabla 2.1 Composición del medio mineral de fosfatos 10X.

Reactivo	Concentración (mg/ L)
Na ₂ HPO ₄	11867
NH ₄ H ₂ PO ₄	4500
K ₂ HPO ₄	125
MgCl ₂ · 6H ₂ O	100
MnSO ₄ · 6H ₂ O	15
FeSO ₄ · 7H ₂ O	25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	3
ZnCl ₂	0.75
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	12.5

2.1.3 Experimentos en tanque agitado

Se utilizó un reactor de tanque agitado en continuo (CSTR, por sus siglas en inglés) marca Applikon® equipado con un sistema de control (ADI 1030) y un programa de adquisición de datos (BioXpert 1.3) tal como se muestra en la Figura 2.1. En los experimentos H(A) y H(B) se usó un reactor de 3 L de volumen total y un volumen de trabajo 2 L con una velocidad de agitación de 250 rpm. En los experimentos L - SLP y SLP - L se utilizó un reactor de 1 L de volumen total y un volumen de trabajo 0.7 L con una velocidad de agitación de 150 rpm. La temperatura se mantuvo constante a 37°C usando una chaqueta eléctrica Applikon®. Tanto la temperatura, el ORP y el pH fueron monitoreados en línea (AppliSens, Schiedam, The Netherlands). Los 4 experimentos iniciaron en lote con un pH inicial de 7.5 [21] y la operación en continuo inició cuando el pH disminuía hasta 5.9 y se registraba producción de gas. El pH de operación en continuo fue controlado a 5.9 mediante la adición de NaOH 10 M. La producción de gas se cuantificó mediante un dispositivo basado en el desplazamiento de líquido (Figura 2.1, H), los volúmenes se reportan a 0.81 atm y 25°C.

En el experimento H(A), la operación inicial en lote tuvo una duración de 12 h, utilizando una concentración de SLP de 30 g/L. Posteriormente inició la operación en continuo y en total se evaluaron 9 condiciones operacionales las cuales se muestran en la Tabla 3.1. Los parámetros de los periodos operacionales 1 a 4

fueron planteados en base a una investigación previa [22]. La variación de las cargas orgánicas ensayadas se estableció en base al aumento en la concentración de sustrato o a la disminución del TRH. Las cargas orgánicas aplicadas estuvieron en el rango de 94.8 a 162.5 g lactosa /L /d y el TRH de 6 a 3.5 h.

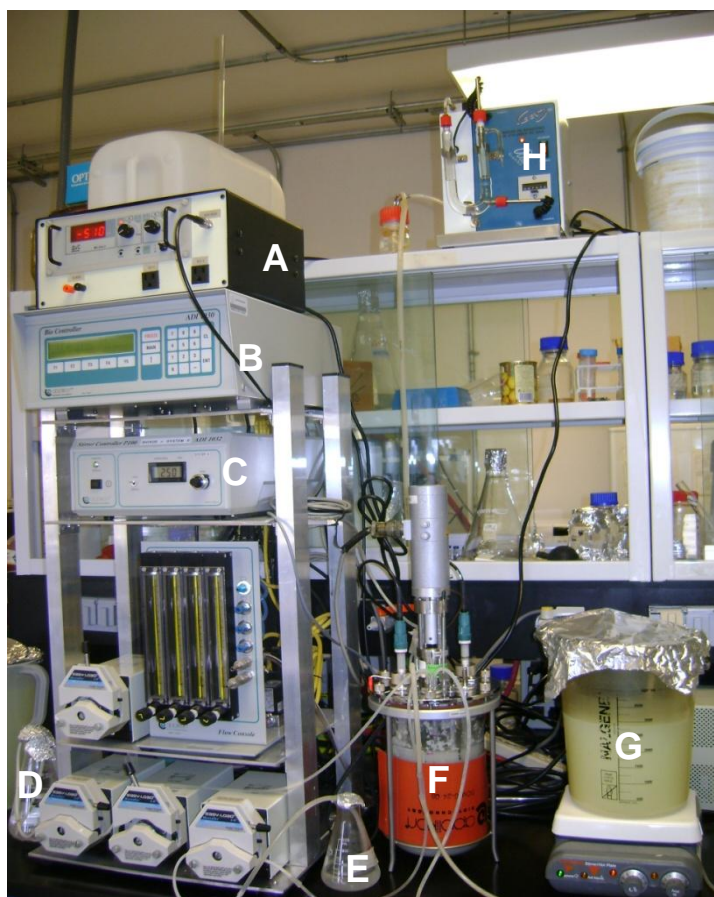


Figura 2.1 Sistema de producción de hidrógeno. A: dispositivo de medición de ORP, B: sistema de control ADI 1030, C: control de agitación, D: NaOH 10M, E: antiespumante, F: reactor (CSTR), G: alimentación, H: dispositivo de medición de gas.

Los experimentos L - SLP y SLP - L se iniciaron en lote con 45 g SLP/L y tuvieron una duración de 15 y 10.5 h, respectivamente. Para la operación en continuo se aplicaron los parámetros de la condición 2 del experimento H(A): 142 g lactosa/L/d y TRH 6 h. En el experimento L - SLP el sustrato inicial fue lactosa y después de una operación en continuo de al menos 8 TRHs, se sustituyó por SLP (Tabla 3.2).

En el experimento SLP - L el sustrato inicial fue SLP, el cual se remplazó por lactosa después de al menos 6 TRHs de operación en continuo (Tabla 3.3).

El experimento H(B) consistió en reproducir las condiciones de operación 2 del experimento H(A) con la finalidad de producir un efluente rico en AGVs que posteriormente sería alimentado al reactor metanogénico. Sin embargo, las condiciones de la operación en continuo y lote se modificaron como consecuencia del cambio en el lote de inóculo (ver anexo A). En el experimento H(B) la operación en lote inició con una concentración de 40 g SLP/L y ésta tuvo una duración de 7 h.

2.2 Producción de metano

Se realizó un experimento para producir metano a partir de AGVs como sustrato y lodo granular metanogénico como inóculo. El experimento estuvo dividido en cinco periodos (I - V). De manera general, se pretendió reducir en lo posible el TRH, maximizar la carga orgánica alimentada y llevar a 5.9 el pH de alimentación. En el periodo I, el reactor se alimentó con una mezcla sintética de AGVs y medio mineral. Las proporciones de AGVs usadas en este periodo fueron similares a las encontradas en el efluente de la condición seleccionada en el experimento H(A). Posteriormente, en los periodos II – V, se alimentó el reactor directamente con el efluente del experimento H(B), previa centrifugación (14000 g por 15 min) para eliminar sólidos suspendidos.

En este experimento se determinó la velocidad volumétrica de producción de metano (VVPM) y el % de metano en el gas generado. Al afluente y efluente del reactor se le cuantificó DQO. La alcalinidad se le determinó al efluente y periódicamente se determinaron SSV y AGVs remanentes. El experimento se efectuó a temperatura ambiente (25 - 30 °C).

2.2.1 Inóculo

El inóculo fue lodo granular metanogénico de un reactor UASB obtenido de la industria papelera Eerbeek, Holanda. El contenido de SSV fue de 11.55% y la

actividad metanogénica acetoclástica específica fue de 0.47 g DQO (CH₄)/g SSV/d (25°C y 0.81 atm). El reactor se inoculó con 20 g SSV/L.

2.2.2 Medio de cultivo

El experimento se dividió en cinco periodos (I - V). En el periodo I el sustrato consistió de una mezcla sintética de AGVs en las proporciones correspondientes al efluente de la condición 2 del experimento H(A): acetato 4.7 g/L (5 g DQO/L), propionato 4 g/L (6 g DQO/L) y butirato 9.4 g/L (17 g DQO/L), en relación 0.83:1:2.83 en base a DQO, respectivamente. La composición general del medio de alimentación se muestra en la Tabla 2.2. En las Tablas 2.3 y 2.4 se presenta la composición de elementos traza y del medio basal respectivamente.

Tabla 2.2 Composición de la alimentación.

Reactivo	Cantidad
Medio basal 10X	100 mL/L
Sol. elementos traza 1000X	1 mL/L
NaHCO ₃	2 g/L
Mezcla AGV sintético	Dependiente de la carga orgánica
Extracto de levadura	1 g/L

Tabla 2.3 Composición de la solución de elementos traza 1000X.

Reactivo	Cantidad (mg/L)
FeCl ₂ ·4H ₂ O	1500
MnCl ₂ ·2H ₂ O	100
EDTA	500
H ₃ BO ₃	62
ZnCl ₂	70
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	36
AlCl ₃ ·6H ₂ O	40
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24
CoCl ₂ ·6H ₂ O	70
CuCl ₂ ·6H ₂ O	20
Na ₂ SeO ₃	100
HCl 36%	1 mL/L
Resazurina 500X	2 mL/L

Tabla 2.4 Composición del medio basal 10X.

Reactivo	Concentración (g/L)
NH ₄ Cl	3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.15
KH ₂ PO ₄	2
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.98
KCl	2.5

En los periodos II – IV se usaron como sustrato los AGVs contenidos en la fracción soluble del efluente del experimento H(B): acetato 5.8 g/L (6.1 g DQO/L), propionato 4.4 g/L (6.6 g DQO/L) y butirato 14.1 g/L (25.5 g DQO/L), cuya relación en base a DOQ fue de 0.92:1:3.8, respectivamente. Durante todo el experimento la alimentación se mantuvo a una temperatura de 4°C.

2.2.3 Experimento en el reactor UASB

El experimento se llevó a cabo en un reactor UASB de 1 L empleando un volumen de trabajo de 0.79 L tal como se muestra en la Figura 2.2. La producción de gas fue cuantificada mediante un dispositivo basado en el desplazamiento de líquido (Figura 2.2, D). El sistema operó a temperatura ambiente (25 - 30°C). Todos los volúmenes de gas son reportados a 0.81 atm y 25°C.

La operación del reactor inició en lote (5 g DQO/L a pH de 7) y tuvo una duración de tres días. Posteriormente inició la operación en continuo (periodo I) aplicando un TRH de 24 h, una carga orgánica de 5 g DQO/L/d a pH de 7. Durante el periodo I se aplicaron: aumentos graduales de cargas orgánicas que fueron de 5 hasta 19 g DQO/L/d; disminuciones en el TRH y el pH, de 24 a 12 h y de 7 a 5.9, respectivamente (Tabla 3.5). El periodo II inició con una carga 14 g DQO/L/d, TRH de 12 h y pH de 5.9. Durante los periodos II – V (Tabla 3.6) se probaron aumentos de carga orgánica (14 a 20 g DQO/L/d) y disminuciones de TRH (12 a 6 h).

2.3 Conservación de las muestras de efluente

En los experimentos de producción de hidrógeno y metano se recolectaron muestras de efluente diariamente. Se tomaban 10 mL y se les adicionaba 200 µL

de una solución de HgCl_2 (16 g/L) con la finalidad de disminuir la actividad microbiana [71]. Las muestras se almacenaban en tubos Falcon® a -10°C hasta su análisis. En el caso del efluente del reactor de producción de hidrógeno se analizaban los AGVs producidos, lactosa residual, etanol, DQO y SSV. Al efluente del reactor metanogénico se le cuantificaba DQO y alcalinidad. Para analizar la alcalinidad se tomaban 20 mL de efluente y se cuantificaba inmediatamente.

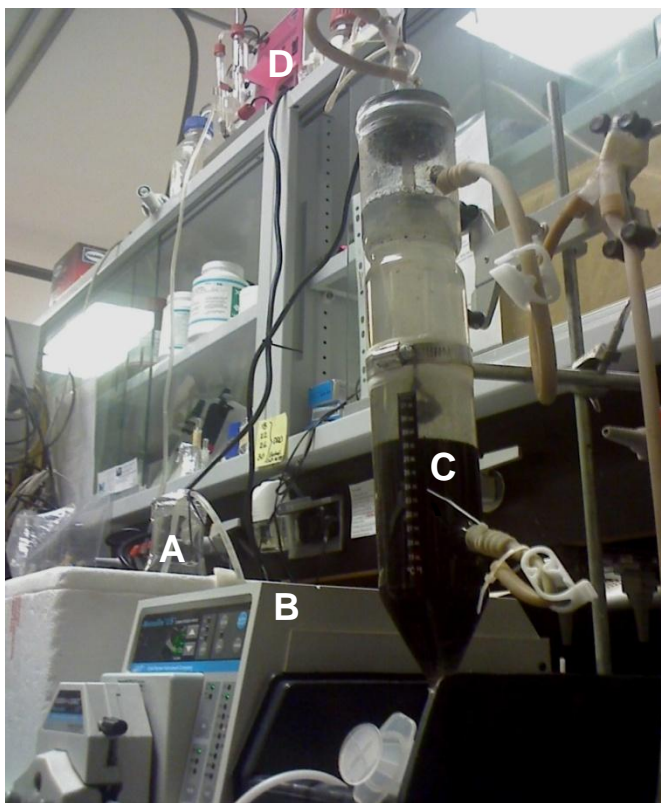


Figura 2.2 Sistema de producción de metano. A: alimentación, B: bomba peristáltica, C: reactor UASB, D: dispositivo de medición de gas.

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Composición del gas

La composición química del gas generado tanto en los experimentos de producción de hidrógeno (H_2 , CO_2), como en el de metano (CH_4 , CO_2), se

determinó mediante cromatografía de gases. El equipo cromatográfico usado, GC 6890N Network GC System, Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), estaba equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). Las muestras se comparaban con gases estándar de alta pureza (MathesonTri-Gas, Ohio, USA). La columna usada fue una Hayesep D (Alltech, Illinois, USA) con las siguientes dimensiones: 10'x 1.8"x 0.085". Las temperaturas del puerto de inyección, horno y detector fueron de 250, 60 y 250 °C, respectivamente. Como gas acarreador se utilizó nitrógeno a un flujo de 8 mL/ min. Las muestras de gas de los reactores de producción de hidrógeno y metano fueron analizadas diariamente.

2.4.2 Cuantificación de etanol

La muestra líquida, previamente centrifugada a 6610g por 15 min [71] y filtrada en membrana de 0.22 µm, se inyectaba en un cromatógrafo de gases (6890N) equipado con un automuestreador 7863 (Agilent, Wilmington, USA) y una columna capilar HP-Innowax de 30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm de espesor de película (Agilent, Wilmington, USA). El volumen de inyección fue de 1 µL. El gas acarreador fue helio a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. Las temperaturas del inyector y del detector de ionización de flama (FID) fueron 220 y 250°C, respectivamente. Se utilizó una relación de Split de 1:0.1 y un programa de temperatura de 35°C por 2 minutos, incrementando 10°C por minuto hasta 80°C y manteniendo esta temperatura por 15 minutos.

2.4.3 Análisis de ácidos grasos volátiles (AGVs) y lactosa.

La lactosa y los AGVs (acetato, propionato y butirato) se cuantificaron de manera simultánea mediante comparación con estándares de alta pureza usando electroforesis capilar [72] (Agilent 1600A, Waldbronn, Germany). Para el análisis el equipo contaba con una columna capilar de sílica fundida (Agilent, id = 50 µm, L = 80.5 cm, longitud efectiva = 72 cm). La temperatura y el voltaje fueron de 20° C y - 30 kV, respectivamente. La solución de corrida fue un buffer de aniones básico (Agilent, pH = 12.1). Las muestras previamente diluidas, centrifugadas a 6610g por 15 min [71] y filtradas en membrana de 0.22 µm fueron inyectadas a una

presión de 300 mbar por 6 segundos. La determinación de analitos se realizó mediante detección indirecta UV usando un detector de diodo. La señal de longitud de onda fue fijada a 350 nm con una referencia a 230 nm. Un buffer de flujo fue corrido durante 4 min a 1 bar antes de cada inyección de muestra.

2.4.4 Determinación de DQO, SSV y alcalinidad

Para determinar la concentración de materia orgánica presente en afluente y efluente de los reactores se llevó a cabo la cuantificación de la DQO mediante el método de reflujó. La capacidad de amortiguamiento del pH del efluente del reactor metanogénico se determinó mediante la alcalinidad total. La concentración de SSV fue determinada tanto en los inóculos empleados como en los efluentes generados en los reactores. Estas determinaciones se llevaron a cabo conforme a lo establecido en los Métodos Estándar [73].

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1. Producción continua de hidrógeno en CSTR

3.1.1 Experimento H(A): evaluación del efecto del TRH y carga orgánica

El reactor se operó durante 48 días bajo 9 condiciones operacionales. El desempeño del reactor se muestra en la Figura 3.1 y los detalles de las condiciones de operación evaluadas y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.1. Durante todo el experimento, el contenido de hidrógeno en el gas generado fue de 50 a 54.5 % (v/v), el resto estuvo constituido por CO₂ y no se detectó en ningún caso la presencia de metano. En los periodos 1 - 3 se mantuvo constante el TRH (6 h) y el incremento de la carga orgánica se dio por el aumento en la concentración de sustrato alimentado. En el periodo 1 se obtuvo una media de 762 mmol H₂/L/d equivalente a 23 L H₂/L/d durante 6 días de operación, con un rendimiento de 2.82 moles H₂/mol de lactosa. El aumento en la concentración de sustrato y la carga orgánica, en las condiciones 2 - 3, condujo a un incremento de la velocidad de producción de H₂ alcanzando un promedio de 35.5 L H₂/L/d en el periodo 3. Esto, a su vez, resultó en una duplicación de la concentración de SSV. Kyazze y col. [33] observaron un efecto similar al aumentar la concentración de sustrato de 10 a 40 g de sacarosa/L (TRH 12 h y pH 5.3), la VVPH se triplicó y los SSV aumentaron en un 150%.

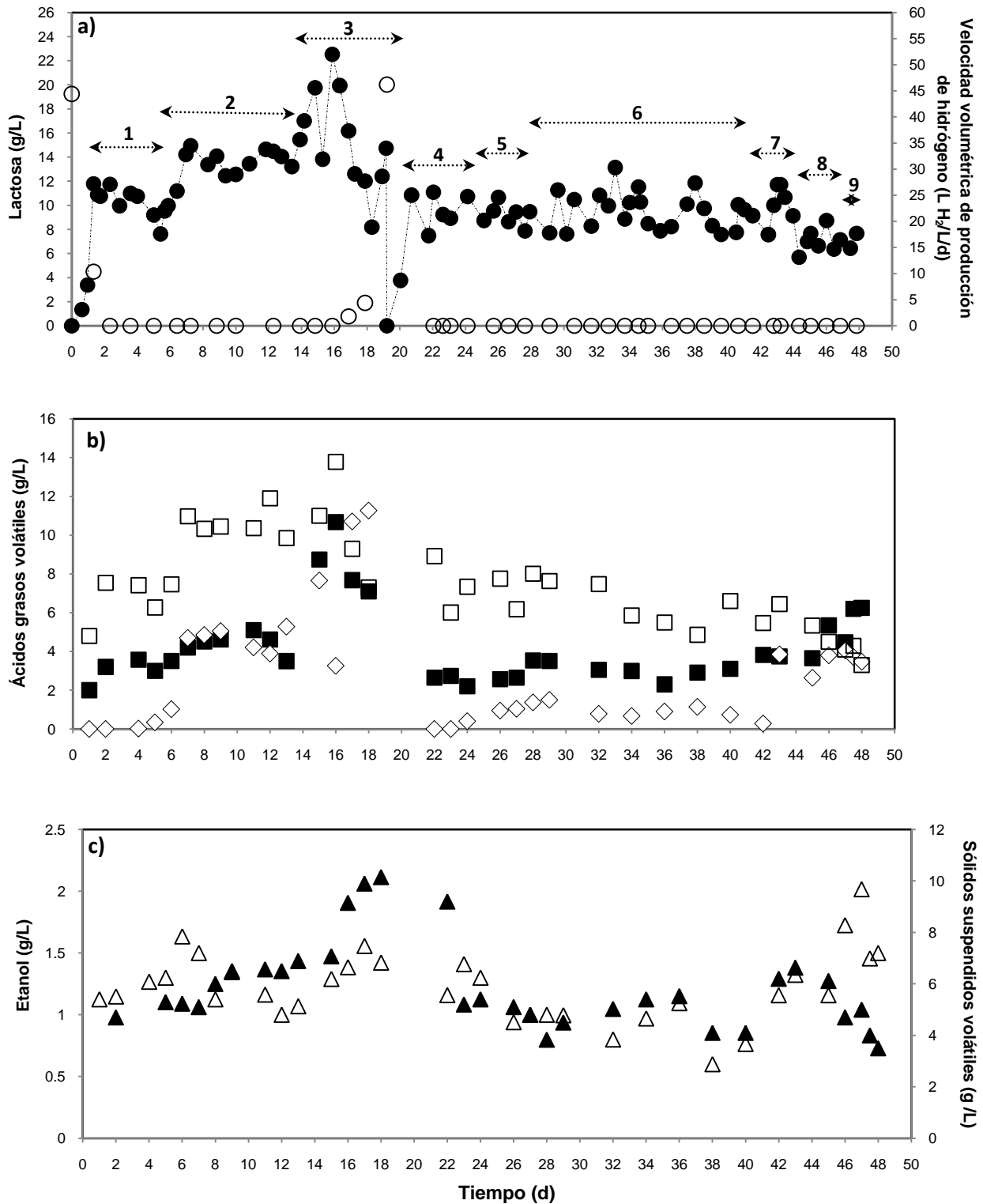


Figura 3.1 Desempeño del reactor CSTR en el experimento H(A) bajo las condiciones operacionales 1 - 9 (los detalles se muestran en la tabla 3.1). a) lactosa residual (○) y VVPH (●). b) producción de AGVs; acetato (■), propionato (◇) y butirato (□). c) etanol (△) y SSV en el reactor (▲).

Tabla 3.1 Desempeño del reactor CSTR en el experimento H(A) para la producción de hidrógeno bajo diferentes periodos operacionales utilizando suero de leche en polvo como sustrato.

Parámetro	Periodos operacionales								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Duración (d)	6	8	5	5	4	13	3	3	1
Carga orgánica (g lactosa/L/d)	94.8	142.2	189.6	94.8	103.4	113.7	126.4	142.2	162.5
Concentración de sustrato (g lactosa/L)	23.7	35.5	47.4	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7
TRH (h)	6	6	6	6	5.5	5	4.5	4	3.5
Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (mmol H ₂ /L/d)	762 ^a ± 92	1046 ^b ± 89	1175 ^a ± 304	742 ^c ± 108	688 ^d ± 73	728 ^e ± 116	703 ^d ± 131	558 ^d ± 80	539 ^f ± 66
(L H ₂ /L/d)	23 ^a ± 2.7	31.6 ^b ± 2.7	35.5 ^a ± 9.2	22.4 ^c ± 3.3	20.7 ^d ± 2.2	21.9 ^e ± 3.5	21.2 ^d ± 4	17 ^d ± 2.5	16.3 ^f ± 2
AGVs producidos (g/L)	10.02	19.73	27.10	10.38	11.80	9.77	11.74	13.49	13.02
Relación A_{Bu} /A_{Ac}	2.10	2.40	1.2	2.93	2.89	2.12	1.54	0.80	0.60
Etanol (g/L)	1.29 ^g ± 0.2	1.20 ^c ± 0.2	1.41 ⁱ ± 0.1	1.20 ^k ± 0.2	0.99 ^k ± 0.2	0.84 ^c ± 0.2	1.21 ^f ± 0.1	1.73 ^k ± 0.3	1.50 ^f ± 0.2
Sustrato residual (mg Lactosa /L/d)	0	0	1.61 ⁱ ± 0.6	0	0	0	0	0	0
Rendimiento molar de H₂ (mol H ₂ /mol Lactosa)	2.82	2.50	2.17	2.67	2.29	2.19	1.9	1.34	1.13
ORP (mV)	-533 ^a ± 30	-532 ^b ± 4	-514 ^a ± 33	-532 ^c ± 33	-516 ^d ± 18	-511 ^e ± 20	-532 ^d ± 5	-537 ^d ± 4	-521 ^f ± 3.5
H₂ en el gas (%)	54 ^g ± 0.5	53 ^h ± 1	51.6 ^g ± 1.3	53 ⁱ ± 1.5	53.4 ⁱ ± 0.5	51 ^j ± 0.8	51	50	50
SSV (g SSV/L)	5.1 ^k ± 0.64	6.7 ^c ± 0.32	9.7 ⁱ ± 0.52	5.2 ^k ± 0.15	4.7 ^k ± 0.57	4.89 ^c ± 0.9	5.75 ^f ± 1.0	4.16 ^k ± 0.8	3.6 ^f ± 0.1
DQO_{soluble} afluente (g DQO/L)	29.3 ^f ± 4.3	45.5 ^f ± 2.4	61.3 ^f ± 3.2	29.3 ^f ± 4.3	29.3 ^f ± 4.3	29.3 ^f ± 4.3	29.3 ^f ± 4.3	29.3 ^f ± 4.3	29.3 ^f ± 4.3
DQO_{soluble} efluente (g DQO/L)	21.3 ^g ± 1.9	35.37 ^c ± 3	44 ⁱ ± 2	21.4 ^k ± 5	22.6 ^k ± 3.6	22 ^c ± 2.4	23 ^f ± 2.62	23.31 ^k ± 4	24.3 ^f ± 1.3
DQO Teórica efluente* (g DQO/L)	19.08	33.51	43	18.7	19.6	17.6	20.4	21.49	21.9
Remoción DQO_{soluble} (%)	27.30	22.2	28.22	26.96	23	25	21.5	20.44	17

Valores promedio (± desviación estándar), a: n=11; b: n=13; c: n=6; d: n=7; e: n=23; f: n=2; g: n=5; h: n=8; i: n=4; j: n=10; k: n=3. * DQO teórica correspondiente a los valores promedio de AGVs, etanol y lactosa (expresados en DQO) detectados en el efluente de cada condición.

El aumento de la carga tuvo un efecto inverso en el rendimiento de H_2 ya que disminuyó un 23% del periodo 1 al 3. Diversos estudios han reportado que el rendimiento de H_2 esta en función de la carga orgánica y los rendimientos más altos se han obtenidos a cargas bajas [33, 38]. La caída en la VVPH observada el día 19 corresponde a una falla en la operación del reactor lo que provocó el reinicio del experimento desde el estado en lote. En los periodos 4 - 9 la concentración de sustrato en el afluente permaneció constante (23.7 g Lactosa/L) y el incremento de la carga orgánica fue debido a la reducción del TRH. Las condiciones operacionales del periodo 4 fueron las mismas que se aplicaron en el periodo 1 (TRH 6 y 94.8 lactosa/L/d) observándose una gran similitud en los resultados, lo que pone de manifiesto la reproducibilidad de los resultados. En los periodos 4 - 7, la reducción del TRH (de 6 a 3.5) acoplado al aumento de la carga orgánica (94.8 a 126.4 g lactosa/L/d) no tuvieron un efecto importante en los valores promedio de la VVPH que se mantuvo entre 21.7 y 22.4 L H_2 /L/d, situación similar para la biomasa en el sistema que se mantuvo entre 5.2 y 5.7 g SSV/L. En los periodos 8 y 9 se observó una reducción del 20% en la VVPH con respecto a lo obtenido en el periodo 7, lo cual estuvo acompañado por una disminución de los SSV en el sistema a 3.6 g SSV/L en el periodo 9. Es importante resaltar que no se presentó lavado del reactor a un TRH de 3.5. Davila-Vazquez y col. [22] observaron el lavado del reactor a un TRH de 4 h y 138 g lactosa/L/d, utilizando SLP como sustrato. La remoción de DQO durante todos los periodos de operación no fue superior a 29%, ya que la mayor parte permanece como productos solubles de fermentación [62] como lo son los AGVs. La Figura 3.2 muestra el perfil en la distribución de AGVs generados en cada una de las condiciones operacionales evaluadas. La concentración de AGVs aumentó como consecuencia del incremento de la concentración de sustrato. Del periodo 1 a 2 la concentración total aumentó en un 95% y un 37% en el periodo 2 al 3. La relación A_{Bu}/A_{Ac} en el periodo 1 fue de 2.10 y aumentó a 2.4 en el periodo 2. Sin embargo, en el periodo 3 esta relación disminuyó a 1.2, es decir, aumentó la concentración de acetato. En cuanto al propionato, su producción en el periodo 1 fue mínima, en cambio en el periodo 2 se generaron un promedio 4.6 g/L, duplicándose este valor en el periodo

3. El incremento sustancial en la producción de propionato en los periodos 2 al 3 fue el responsable de la caída de la VVPH, causando a su vez una disminución en la relación ABu/AAc

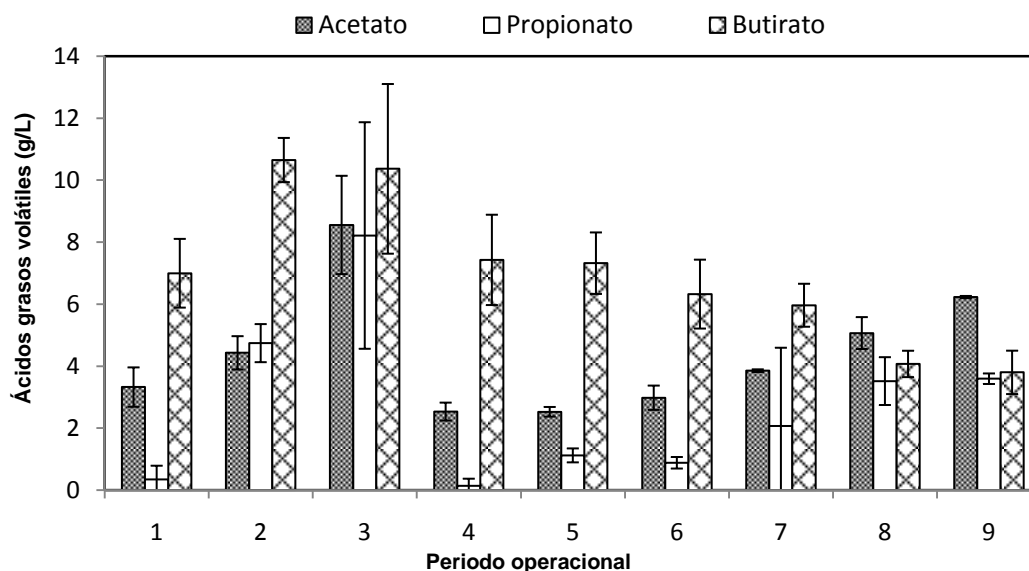


Figura 3.2 Distribución promedio de los ácidos grasos volátiles generados en el reactor CSTR en el experimento H(A) para la producción de hidrógeno bajo diferentes periodos operacionales evaluados.

En el día 16 (Figura 3.1) se observó una caída en la concentración de propionato lo que coincide con la VVPH más alta del periodo 3. Se ha documentado que las altas VVPH están asociadas con la producción de acetato y butirato, y la inhibición de la producción de hidrógeno ha sido relacionada con la formación de propionato [46, 74]. En la fermentación propiónica el sustrato se emplea para la formación de propionato sin pasar por la producción de hidrógeno. Durante los periodos 4 a 7 la relación ABu/AAc se mantuvo entre 1.54 a 2.93, mientras que en los periodos 8 y 9 se registraron las más bajas relaciones ABu/AAc de todo el experimento, 0.8 y 0.6 respectivamente. La relación ABu/AAc ha sido propuesta por algunos autores como un indicador del rendimiento de hidrógeno, con valores reportados entre 2.1 y 5.9 [75]. Usualmente altos rendimientos están acompañados con altas relaciones ABu/AAc [76, 77], lo que se confirma en este estudio. En todos los periodos se detectó la presencia de etanol en concentraciones promedio de 0.99 a 1.73 g/L, encontrándose los valores más

altos en los periodos 8 y 9. El ORP durante todo el experimento se mantuvo entre -511 y -537 mV, valores similares fueron obtenidos por Kataoka y col. [78] (-500 a -550mV) durante la producción fermentativa de hidrógeno con *Clostridium butyricum* SC-E1 a partir de glucosa.

La VVPH fue el parámetro de referencia para efectos de seleccionar la mejor condición operacional. Este parámetro ha sido propuesto como base en la optimización del proceso fermentativo de producción de H₂ [22]. Como se muestra en la Figura 3.3, aunque la mayor VVPH se obtuvo en el periodo 3 en éste también se presentó la mayor variabilidad en la VVPH, además, se detectó la presencia de sustrato residual, lo que sugiere una potencial inhibición por sobrecarga del sistema y/o por producto de fermentación [33]. La VVPH en el periodo 2 fue de 1046 mmol H₂/L/d (31.6 LH₂/L/d) que es comparable al valor reportado por Davila-Vazquez y col. [22] quienes obtuvieron 1118 mmol H₂/L/d (33. LH₂/L/d) aplicando una carga de 138 g lactosa/L/d, con un TRH de 6 h, utilizando SLP como sustrato. En base a lo anterior, la condición 2 se escogió como la más adecuada para la producción continua de hidrógeno.

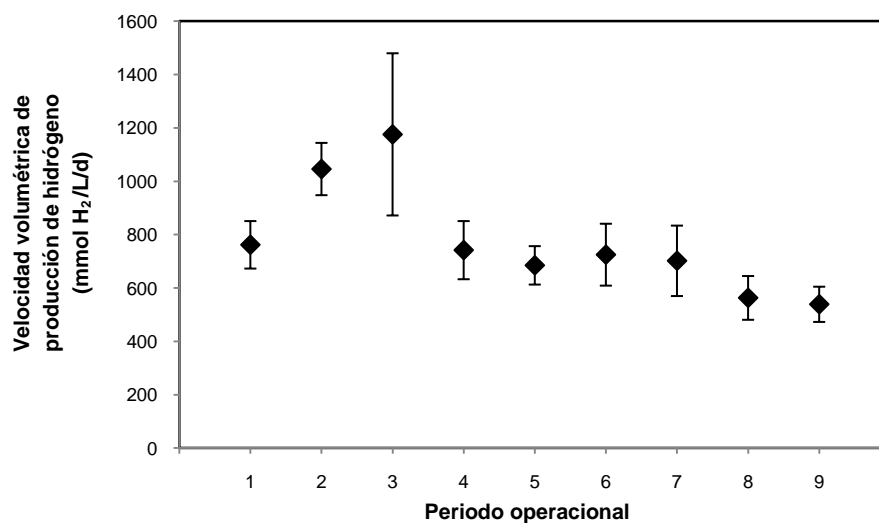


Figura 3.3 Velocidades volumétricas de producción de hidrógeno obtenidas en el experimento H(A) en los diferentes periodos operacionales evaluados.

3.1.2 Experimentos L - SLP y SLP - L: evaluación del efecto del sustrato.

Para estos ensayos se utilizaron los parámetros del periodo operacional 2 del experimento H(A). El experimento **L - SLP** tuvo una duración de 128 h. En la Figura 3.4 se muestra el desempeño del reactor y en la Tabla 3.2 se presentan los detalles de la operación con lactosa y SLP en comparación con la condición seleccionada en el experimento H(A). En la Figura 3.5 se muestra la distribución promedio de los AGVs generados en el experimento. La operación con lactosa tuvo una duración de 50 h (Figura 3.4). Se tuvo un máximo de 18.2 L H₂/L/d a las 26 horas, siendo el butirato el metabolito presente en mayor proporción. De la hora 30 a 50 se registró una disminución de butirato y de la relación ABu/AAc, lo cual coincidió con la caída de la VVPH a 7 LH₂/L/d y la disminución en un 16% de los SSV. Durante la operación con lactosa el consumo del sustrato no fue superior al 60%. Comparando las VVPH promedio del periodo 2 H(A) y la operación con lactosa (Tabla 3.2), se observa que con este sustrato se obtuvo sólo 35% de la VVPH obtenida en el periodo de referencia. La relación ABu/AAc fue de 1 y el rendimiento de 1.1 mol de H₂/mol de lactosa lo que contrasta con los 2.5 mol de H₂/mol lactosa y la relación ABu/AAc de 2.4 obtenidos en el periodo de referencia. El cambio de sustrato de lactosa a SLP se llevó a cabo a las 50 h (Figura 3.4). En la operación con SLP también se registró una gran variabilidad en la VVPH. A las 62 h se generaron 14 L H₂/L/d, cayendo a 2 L H₂/L/d a las 125 h, mientras que la máxima VVPH (17 L H₂/L/d) se obtuvo a las 87 h de operación. En cuanto a los AGVs, el butirato presentó tendencia a la disminución lo cual se puede observar en los periodos de las 62 a las 70 h y de las 94 a 130 h, esta tendencia concuerda con las disminuciones en la VVPH encontradas. A su vez, se observó un notable aumento en la concentración de propionato de la hora 55 (2.9 g /L) a la 125 (12.5 g/L) y de acetato de 4 a 12 g/L de las 55 a las 124 h, respectivamente. El aumento en la concentración de acetato y propionato acoplada al consumo de la totalidad del sustrato observado durante la operación con SLP, indica que, las nuevas condiciones de cultivo, favorecieron el desarrollo de bacterias productoras de acetato y propionato y/o, probablemente, el desvío de rutas metabólicas hacia la producción de éstos. La producción de etanol estuvo desacoplada a la VVPH, en

el periodo de las 94 a las 130h se puede apreciar una clara tendencia al aumento en la producción de etanol. Por otra parte los SSV disminuyeron hasta 1.9 g/L a las 128 h, lo cual se relaciona con el lavado de bacterias productoras de hidrógeno, reflejándose a su vez en la disminución de la concentración de butirato.

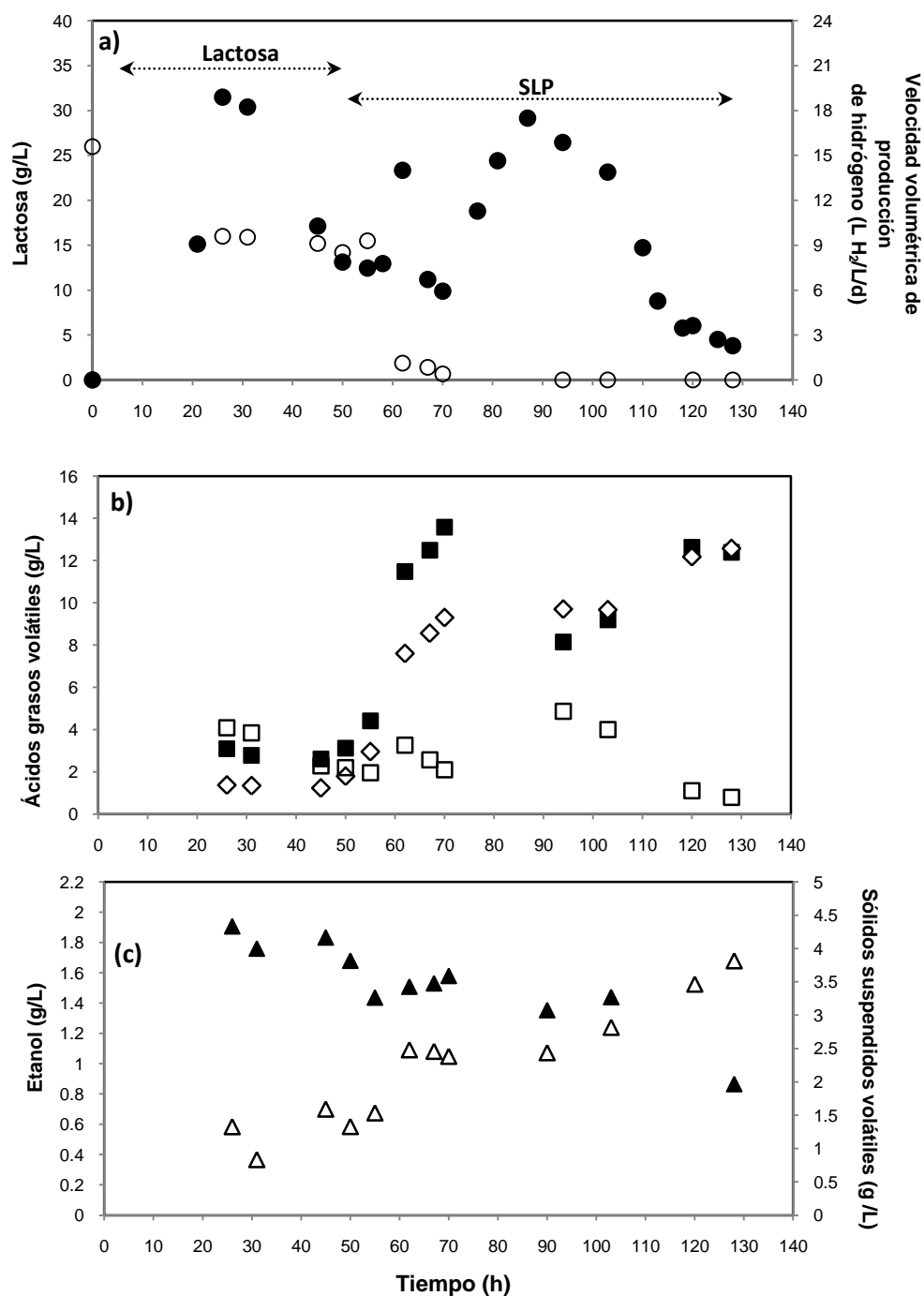


Figura 3.4 Desempeño del reactor CSTR en el experimento L - SLP (los detalles se muestran en la Tabla 3.2). a) lactosa residual (○) y VVPH (●). b) producción

de AGVs: acetato (■), propionato (◇) y butirato (□). c) etanol (△) y SSV en el reactor (▲).

Tabla 3.2 Desempeño del reactor CSTR para la producción de hidrógeno en el experimento L - SLP en comparación con la condición 2 del experimento H(A).

Parámetro	Sustratos		Experimento H(A) SLP (condición 2)
	Lactosa	SLP	
Duración (h)	50	78	192
Carga orgánica (g lactosa/ L/ d)	142.2	142.2	142.2
Concentración de sustrato (g lactosa/ L)	35.5	35.5	35.5
TRH (h)	6	6	6
Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (mmol H ₂ /L /d)	396.54 ^a ± 172	317 ^b ± 173	1046 ^c ± 89
(L H ₂ /L/d)	11.95 ^a ± 5.26	9.667 ^b ± 5.2	31.6 ^c ± 2.7
AGVs producidos (g /L)	7.31	25.331	19.73
Relación ABu /AAc	1	0.23	2.40
Etanol (g /L)	0.55 ^d ± 0.13	1.24 ^e ± 0.25	1.20 ^f ± 0.2
Sustrato residual (g lactosa /L/d)	15.2 ^d ± 1	0	0
Rendimiento molar de H ₂ (mol H ₂ /mol lactosa)	1.10	0.77	2.50
ORP (mV)	-536 ^a ± 18	-404 ^b ± 63	-532 ^c ± 4
H ₂ en el gas (%)	53 ^g ± 1.5	47 ^a ± 5.2	53 ^h ± 1
SSV (g SSV/ L)	4.07 ^d ± 0.21	3.23 ^e ± 0.52	6.7 ^f ± 0.32
DQO _{soluble} afluente (g DQO/L)	19.10 ^g ± 2.61	45.5 ^g ± 2.36	45.5 ^g ± 2.4
DQO _{soluble} efluente (g DQO/L)	16.40 ^d ± 1.65	32.5 ^e ± 3.53	35.37 ^f ± 3
DQO _{Teórica} efluente* (g DQO/L)	19.73	34.96	33.51
Remoción DQO _{soluble} (%)	14.13	28.57	22.2

Valores promedio (± desviación estándar), a: n=5; b: n=16; c: n=13; d: n=4; e: n=7; f: n=6; g: n=2; h: n=8. * DQO teórica correspondiente a los valores promedio de AGVs, etanol y lactosa detectados en efluente de la operación con lactosa y SLP.

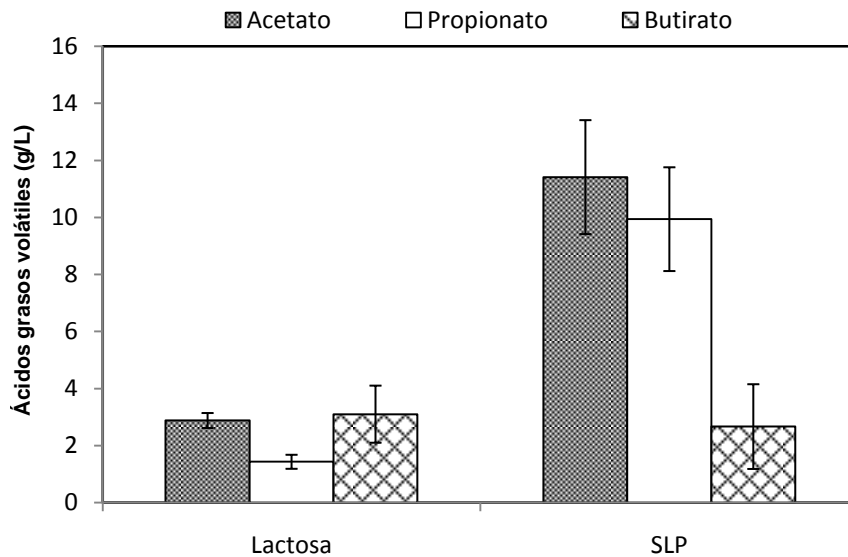


Figura 3.5 Distribución promedio de los ácidos grasos volátiles generados en el reactor CSTR en el experimento L - SLP para la producción de hidrógeno, durante la operación con lactosa y SLP como sustratos.

El experimento **SLP - L** tuvo una duración de 87 h. En la Figura 3.6 se muestra el desempeño del reactor y en la Tabla 3.3 se presentan los detalles de la operación con lactosa y SLP en comparación con el periodo 2 del experimento H(A). En la Figura 3.7 se muestra la distribución promedio de los AGVs. La operación con SLP como sustrato tuvo una duración de 39 h (Figura 3.6). Como se muestra en la Tabla 3.3, la VVPH con SLP fue similar a la del periodo de referencia (30.72 L H₂/L/d y 31.6 L H₂/L/d, respectivamente). Sin embargo, existieron diferencias en cuanto a la relación ABu/AAc y en la concentración de SSV (Tabla 3.3). Estas diferencias pueden ser atribuidas a que en el experimento H(A) el aumento de la carga se realizó de manera gradual lo cual pudo estar ejerciendo una presión de selección para el desarrollo de microorganismos productores de hidrógeno. El cambio de sustrato se efectuó a las 39 horas, tiempo en el cual la VVPH se mantenía en 30 LH₂/L/d. A las 42 horas (Figura 3.6) se observó la presencia de

sustrato residual y la VVPH tuvo una caída importante a 20 L H₂/L/d con una marcada tendencia a la disminución. Para la hora 63 la VVPH era de 4.8 L H₂/L/d, la cual se sostuvo hasta el final del experimento. En cuanto a los AGVs (Figura 3.7), se observó una tendencia a la disminución en la concentración de butirato, estabilizándose en la parte final del experimento coincidiendo con la caída en la VVPH. La concentración de SSV durante la operación con SLP eran de 4.8 g/L en promedio y en el cambio a lactosa disminuyó a 3.4 g/L en la hora 60, lo anterior puede relacionarse con un lavado de bacterias productoras de hidrógeno reflejándose en la marcada caída en la VVPH. Sin embargo, durante la operación con lactosa, la concentración de SSV se mantuvo entre 3 y 4 g/L y, el análisis de la producción de AGVs indica que se favoreció el desarrollo de bacterias productoras de propionato y acetato y/o el desvío de rutas metabólicas hacia la producción de estos metabolitos, los cuales se encontraron desacoplados a la producción de H₂. La relación ABu/AAc obtenida con lactosa como sustrato fue baja (0.60), presentando un rendimiento promedio de 0.53 molH₂/mol de lactosa.

Existe poca información en la literatura donde se aborde el tema del cambio de sustrato en un sistema continuo de producción de H₂. Zhao y col. [76] estudiaron la producción de H₂ en un reactor UASB realizando un cambio de sustrato, de sacarosa a lactosa, y evaluaron la influencia del sustrato sobre la distribución de los productos acidogénicos. Aunque en este estudio se emplearon diferentes sustratos, que involucran a diferentes enzimas para su degradación, de manera general se puede aproximar a lo obtenido en los experimentos L-SLP y SLP-L. El experimento realizado por Zhao y col. tuvo una duración de 250 h y el cambio de sustrato (a lactosa), se llevo a cabo a las 40 h. Antes del cambio la VVPH fue 4.2 L H₂/L/d y para la hora 150 la VVPH se mantuvo constante en un valor de 0.2 L H₂/L/d hasta el final del experimento con una eficiencia de degradación del sustrato cercana al 100%. El TRH se mantuvo en 12 h alimentando 10 g DQO/L y no hubo control de pH, éste se mantuvo entre 3.9 y 4.5 con el fin, principalmente, de inhibir la actividad de los metanógenos. Antes del cambio de sustrato los productos metabólicos predominantes fueron el caproato y butirato, y una vez realizado el cambio, predominaron el acetato y butirato.

Tanto el estudio de Zhao y col., como en los experimentos L - SLP y SLP - L realizados en esta investigación ponen de manifiesto la alta sensibilidad de las bacterias productoras de hidrógeno ante los cambios en las condiciones de cultivo, en este caso el sustrato. Así, los cambios en los productos de fermentación observados con los diferentes sustratos sugieren desvíos de rutas metabólicas y/o procesos de selección microbiana.

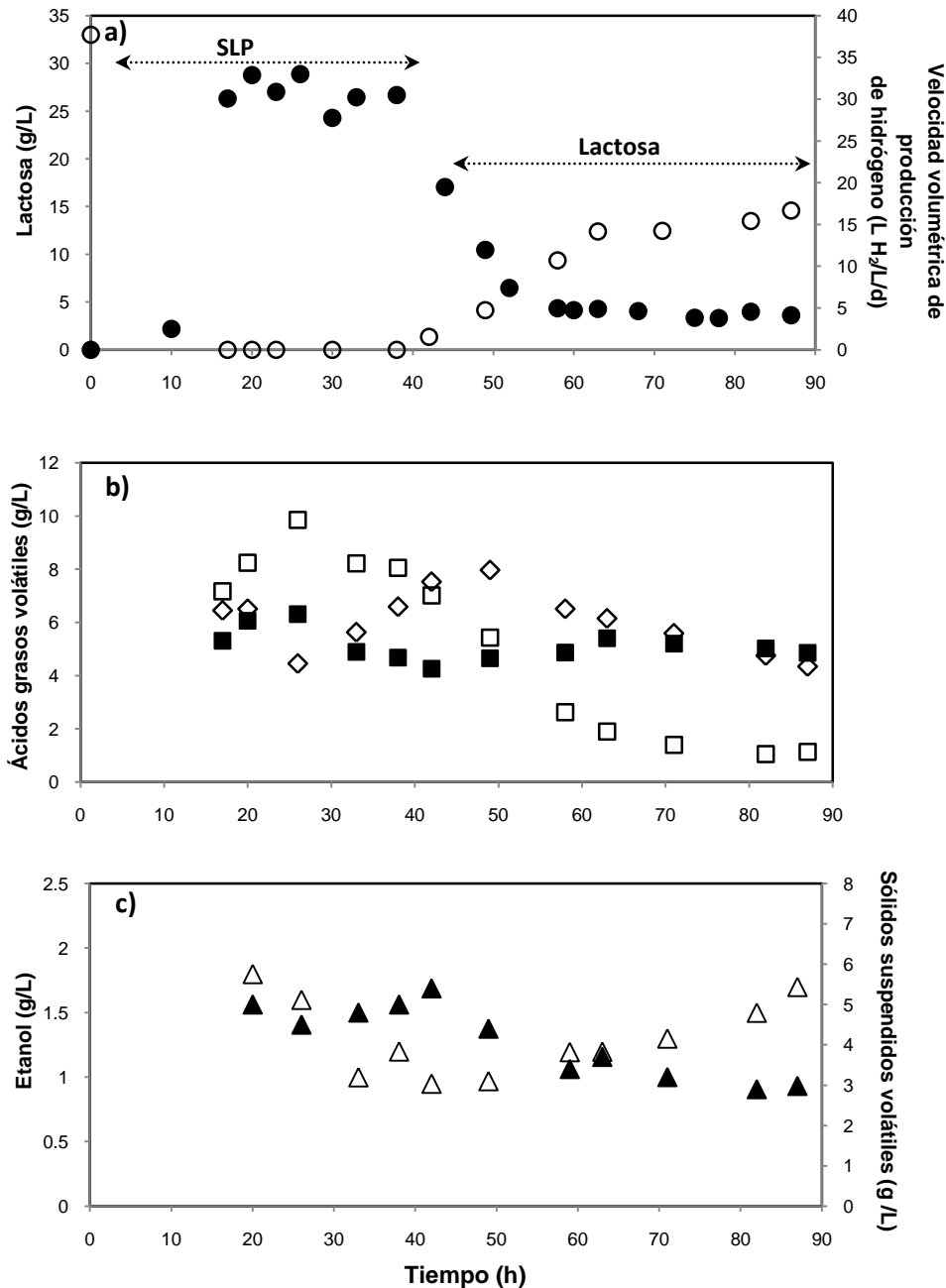


Figura 3.6 Desempeño del reactor CSTR en el experimento SLP - L (los detalles se muestran en la tabla 3.3). a) lactosa residual (○) y VVPH (●). b) producción de AGVs: acetato (■), propionato (◇) y butirato (□). c) etanol (△) y SSV en el reactor (▲).

Tabla 3.3 Desempeño del reactor CSTR para la producción de hidrógeno en el experimento SLP - L en comparación con la condición 2 del experimento H(A).

Parámetro	Sustratos		Experimento H(A) SLP (condición 2)
	SLP	Lactosa	
Duración (h)	39	48	192
Carga orgánica (g lactosa/ L/ d)	142.2	142.2	142.2
Concentración de sustrato (g lactosa/ L)	35.5	35.5	35.5
TRH (h)	6	6	6
Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (mmol H ₂ / L/ d)	1081.34 ^a ± 59.35	223.74 ^b ± 160.13	1046 ^c ± 89
(L H ₂ /L/d)	30.75 ^a ± 1.79	6.75 ^b ± 4.83	31.6 ^c ± 2.7
AGVs producidos (g /L)	19.78	14.02	19.73
Relación ABu /AAc	1.50	0.60	2.40
Etanol (g /L)	1.4 ^d ± 0.31	1.26 ^a ± 0.28	1.20 ^e ± 0.2
Sustrato residual (g Lactosa /L/d)	0	10.01 ^a ± 4.16	0
Rendimiento molar de H ₂ (mol H ₂ /mol Lactosa)	2.41	0.53	2.50
ORP (mV)	-542 ^a ± 34	-538 ^b ± 12	-532 ^c ± 4
H ₂ en el gas (%)	53 ^f ± 1	45 ^g ± 6	53 ^h ± 1
SSV (g SSV/ L)	4.82 ^d ± 0.24	3.73 ^a ± 0.90	6.7 ^e ± 0.32
DQO _{soluble} afluente (g DQO/L)	45.5 ^f ± 2.36	19.01 ^f ± 2.61	45.5 ^f ± 2.4
DQO _{soluble} efluente (g DQO/L)	33.80 ^d ± 1.2	15.8 ^a ± 3	35.37 ^e ± 3
DQO _{Teórica} efluente* (g DQO/L)	29.85	23.46	33.51
Remoción DQO _{soluble} (%)	25.71	16.88	22.2

Valores promedio (± desviación estándar), a: n=7; b: n=11; c: n=13; d: n=4; e: n=6; f: n=2; g: n=3; h: n=8. *DQO teórica correspondiente a los valores promedio de AGVs, etanol y lactosa detectados en efluente de la operación con SLP y lactosa.

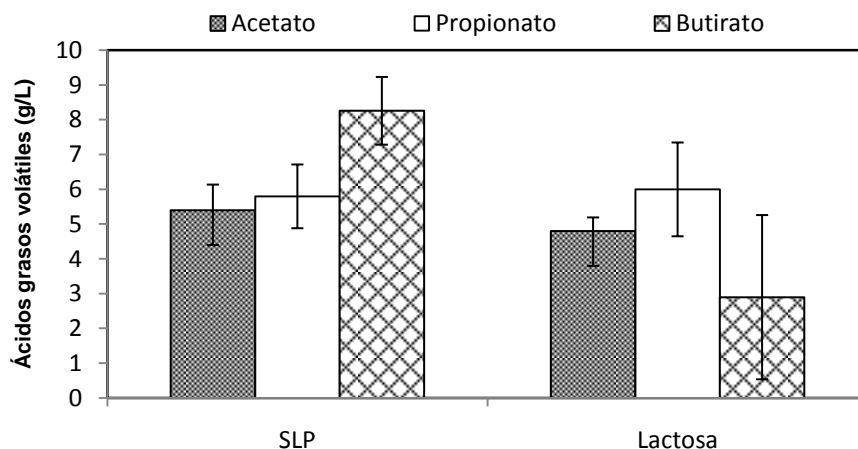


Figura 3.7 Distribución promedio de los ácidos grasos volátiles generados en el reactor CSTR en el experimento SLP - L para la producción de hidrógeno, durante la operación con SLP y lactosa como sustratos.

Por otra parte, se sabe que el SLP es un sustrato complejo y rico en nutrientes, ya que contiene, aparte de la lactosa, otros nutrientes presentes en la leche, como proteínas, vitaminas, minerales y grasas los cuales pudieran estar favoreciendo el crecimiento de bacterias productoras de H_2 . Las bajas VVPH obtenidas en los experimentos L - SLP y SLP - L y la recurrente presencia de sustrato residual durante la operación con lactosa pura, se puede relacionar con la carencia de nutrientes, respecto a cuando se usa SLP, especialmente destaca el caso de la proteína. Se ha reportado que existe interferencia en el flujo de electrones causado por una limitada concentración de nitrógeno durante el crecimiento microbiano a altas concentraciones de sustrato (altas relaciones C/N) [8]. El déficit nutrimental presentado durante la operación con lactosa puede ser minimizado mediante la adición externa de nutrientes al medio de cultivo, tal como se reporta en el estudio de Talabardon y col. [79], quienes evaluaron la producción de acetato, con cultivos puros a partir de lactosa. En este estudio, la alimentación contenía un medio basal enriquecido con extracto de levadura y tripticaseína como fuente de nitrógeno y, adicionalmente, contenía una solución de vitaminas [79].

En resumen, la operación con SLP resultó ser 2.57 veces más alta que la operación con lactosa en cuanto la producción de hidrógeno, en las condiciones evaluadas en este estudio.

3.1.3 Experimento H(B)

En el anexo A se muestra la serie de experimentos (fermentaciones 1 - 14) que se realizaron con el objetivo de reproducir los resultados obtenidos en el periodo 2 del experimento H(A) y obtener un efluente rico en AGVs que posteriormente sería alimentado al reactor metanogénico. No se logró reproducir los resultados del experimento H(A) periodo 2, lo cual se atribuye a problemas con la calidad del inóculo. En el anexo A se enlistan y describen los lotes de inóculo empleados para la producción de hidrógeno. Resulta razonable pensar que los microorganismos responsables de la producción de hidrógeno o bien no se encontraban presentes o quizá su número no era el adecuado y, como consecuencia, esto tuvo un impacto negativo en el proceso de fermentación.

El experimento H(B) tuvo una duración de 9 días (anexo A, fermentación 7). Los resultados presentados corresponden a los primeros 6 días de operación del reactor. El perfil de los productos metabólicos se presenta en la Figura 3.8. En la Tabla 3.4 se muestran las características del efluente generado en el experimento H(B).

El 50.6% (v/v) del gas generado estaba constituido por H_2 y el resto por CO_2 . A partir del día 1 se observaron condiciones estables en cuanto a la VVPH que se mantuvo en un promedio de 21.58 L H_2 /L/d con un rendimiento de 1.74 mol H_2 /mol lactosa. A ese mismo tiempo el 100% de la lactosa alimentada al sistema fue consumida. El metabolito dominante en la fermentación fue el butirato (Figura 3.8), seguido del acetato obteniéndose una relación ABu/AAc de 2.4 (Tabla 3.4). Esta relación fue equivalente a la obtenida en el periodo 2 del experimento H(A).

Tabla 3.4 Características del efluente del reactor CSTR en el experimento H(B).

Parámetro	
AGVs producidos (g /L)	24. 47
Relación ABu /AAc	2.40
SSV (g SSV/ L)	9.73 ^b ± 1.3
DQO _{soluble} efluente (g DQO/L)	39 ^b ± 1.96
pH	5.9

Valores promedio (± desviación estándar), a: n=19; b: n=5.

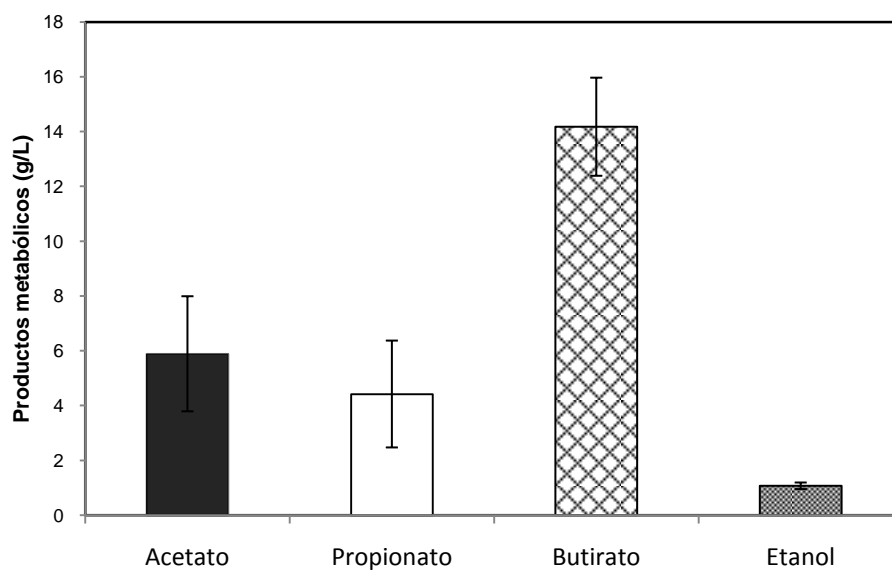


Figura 3.8 Distribución promedio de los productos metabólicos obtenidos en el experimento H(B).

En la Tabla 3.5 se presentan los estudios que han utilizado suero de leche o lactosa en la producción continua de hidrógeno. Como ya se ha mencionado, los resultados obtenidos en el periodo 2 del experimento H(A), presentaron gran similitud a los del estudio de Davila-Vazquez y col.[22]. Sin embargo, en el experimento H(B) sólo se obtuvo 67% de la VVPH obtenida en el periodo 2 del experimento H(A). Además del inóculo, una diferencia importante en los experimentos H (A) y (B) fue el TRH, en el experimento H(A) fue de 6 h y en el H(B) fue de 9 h.

Comparando los resultados obtenidos del experimento H(B) y el estudio de Yang y col. [23] (Tabla 3.5), se tiene que la VVPH obtenida fue 22 veces mayor en el presente trabajo. En el estudio de Yang y col., se probaron tres TRHs (12, 18 y 24 h) obteniendo la mayor VVPH de 1 L H₂/L/d a un TRH de 24 h y carga orgánica de 14 g DQO/L/d. Resulta importante mencionar que, en esas condiciones, los autores reportaron sólo un 30% de H₂ en el biogas generado, detectando la presencia constante de metano. Así mismo, concluyen que la producción de H₂ con SLP no se ve favorecida a un TRH menor a 24 h y reportan que el pH adecuado está en el rango de 4 a 5. En cambio, en los experimentos de producción de H₂ realizados en esta investigación, se destaca que la aplicación de una alta carga orgánica, junto con TRHs bajos, son una combinación efectiva para aumentar la VVPH. Aunque existe una relación inversa entre la carga orgánica y el rendimiento de H₂ (a mayor carga, disminuye el rendimiento) [48], resulta conveniente optimizar la producción de H₂ en base a la VVPH, ya que el rendimiento total se puede incrementar produciendo metano en una segunda etapa [51], tal y como se realizó en este estudio.

Tabla 3.5 Resultados de procesos continuos y semicontinuos para la producción de hidrógeno con suero de leche o lactosa como sustrato.

Inóculo	Sustrato	Velocidad volumétrica de producción de H ₂ (mmol H ₂ /L/d)	Rendimiento de H ₂ (mol H ₂ /mol Lactosa)	Condiciones de cultivo [TRH(h), pH, temperatura (°C), carga orgánica (g/L/d)]	Referencia
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Lactosa	67	3	17.2, 7, 58, 13.95	[80]
Composta (lote alimentado)	Lactosa	38.6	3.7	22, 5, 55, 2.2	[81]
		61	3.2	22, 5.3, 55, 2.2	
Lodo anaerobio	Suero de leche	2.5L H ₂ /L/d	22 mmol/g DQO	84, 5.5, 55, 40 gDQO/L/d	[82]
Lodo anaerobio	SLP	1L H ₂ /L/d	1.98 mmol/g DQO	24, 4-5, 35-38, 14 gDQO/L/d	[23]
Lodo granular anaerobio	SLP	1118	2.8	6, 5.9, 37, 138	[22]
		1046	2.5	6, 5.9, 37, 142	Experimento H(A)
Lodo granular anaerobio	SLP	714	1.74	9, 5.9, 37, 142	Experimento H(B)

3.2 Producción continua de metano en reactor UASB a partir de AGVs.

El reactor metanogénico se operó por 151 días y se dividió en cinco periodos (I - V). En la sección 2.2.2 se indican las características de los sustratos empleados en cada etapa. El desempeño del reactor se muestra en la Figura 3.9 y los detalles de cada periodo evaluado se muestran en las Tablas 3.6 y 3.7. Durante todo el experimento, el contenido de metano en el gas generado fue de 72 a 80 % (v/v), el resto estuvo constituido por CO₂. En las condiciones de operación el rendimiento teórico de metano es de 0.47 L CH₄/ g DQO removida. En el periodo I el reactor se alimentó con una mezcla sintética de AGVs y tuvo una duración de 110 días (Tabla 3.6). La operación continua inició con la aplicación de una carga de 5 g DQO/L/d con un TRH de 24 h y pH de 7 en la alimentación y se obtuvieron 0.96 L CH₄/L/d (0.28 L CH₄/g DQO removida) con un 67% de remoción de DQO. A lo largo del periodo I se realizaron aumentos en la carga y disminuciones en el TRH y el pH de la alimentación. En el día 33 se aplicó una carga orgánica de 19 g DQO/L/d y un TRH de 9 h obteniéndose un rendimiento de metano equivalente al 97% del valor teórico. Sin embargo, la operación del reactor no fue estable por mucho tiempo, ya que al día 37 la VVPM tuvo una caída del 79% respecto al día 36. Después de este evento el reactor se operó por 2 días a TRH de 24 h y carga orgánica de 7 g DQO/L/d, con la finalidad de que el reactor se recuperara de la sobrecarga aplicada. El día 40 la carga orgánica fue de 12 y al día 52 se aplicó una reducción en el pH del efluente a un valor de 6.5, el cual condujo a un aumento en la VVPM respecto a la operación a pH 7 obtenida en los días 40-51. El periodo I finalizó con la operación en estado estable por más de un mes. La carga orgánica alimentada al reactor, el TRH y pH de la alimentación al día 110 fueron de 14 g DQO/L/d, 12 h y 5.9, respectivamente. Se obtuvo una VVPM de 3.97 L CH₄/L/d con una eficiencia de remoción de DQO del 92.7% y un rendimiento de 0.3 L CH₄/g DQO removido. El efluente del experimento H(B) que contenía una concentración de 50 g DQO/L fue utilizado como sustrato en los periodos II - V. Cabe mencionar que la VVPM no fue afectada pese al aumento en la proporción de AGVs de la alimentación del periodo I al II. En los periodos II - V también se experimentaron aumentos en la carga orgánica y disminuciones del TRH (Tabla 3.7).

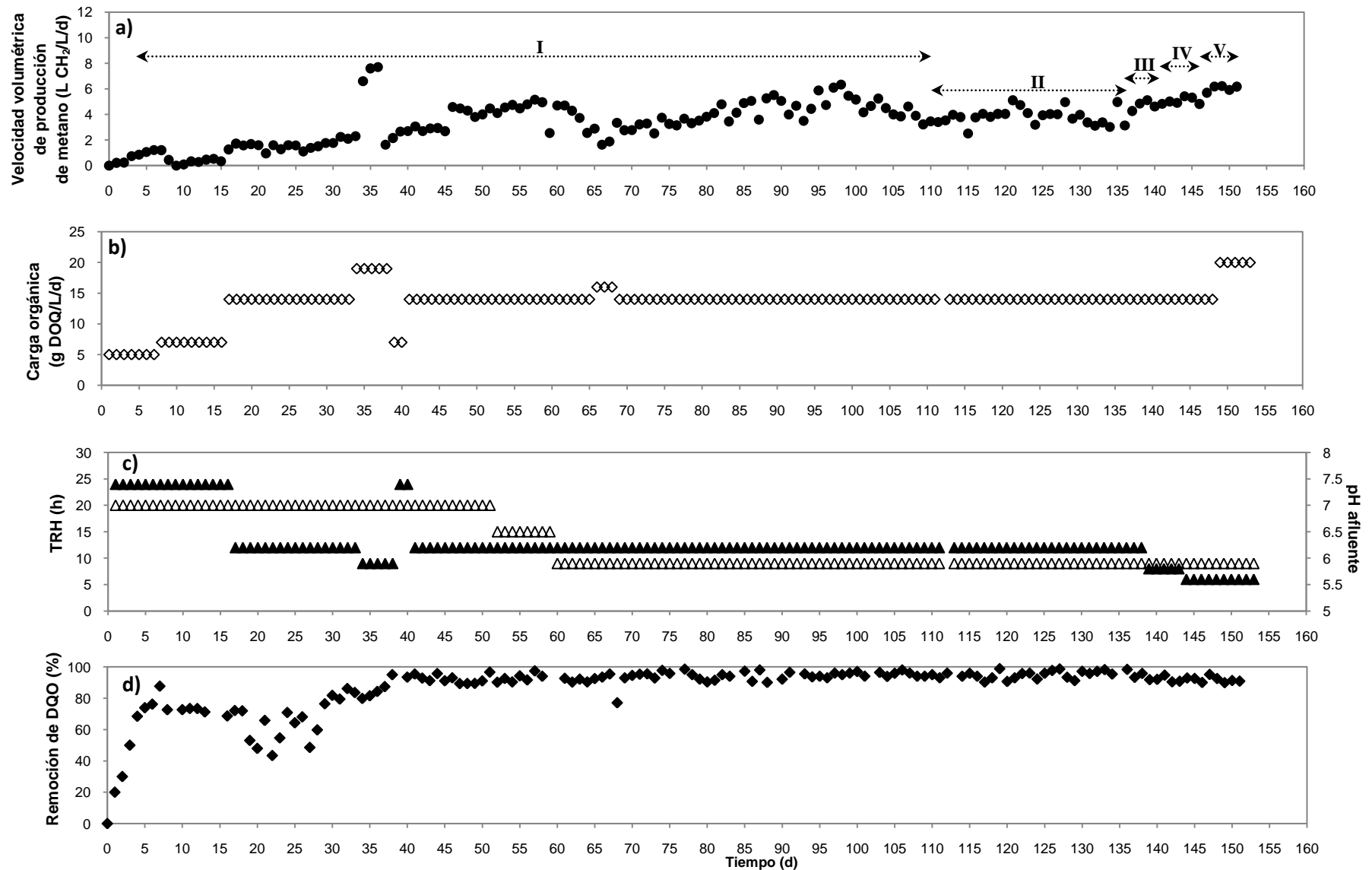


Figura 3.9 Desempeño del reactor UASB en los periodos I - V (los detalles se presentan en las Tablas 3.6 y 3.7). a) VVPM (●). b) carga orgánica (◇). c) TRH (▲) y pH del afluente (△). d) eficiencia de remoción de DQO (◆).

Tabla 3.6 Desempeño del reactor UASB para la producción de metano durante el periodo I utilizando una mezcla sintética de AGVs como sustrato.

Parámetro	Periodo I (días)							
	3 - 6	7 - 15	16 - 32	33 - 37	38 - 39	40 - 51	52 - 58	59 - 110
TRH (h)	24	24	12	9	24	12	12	12
Carga orgánica (g DQO/ L/ d)	5	7	14	19	7	14	14	14
Velocidad producción de metano (mmol CH ₄ /L/d)	31.5 ^a ± 7	13.5 ^b ± 12	54 ^c ± 10	204 ^a ± 75	79 ^d ± 12	117 ^e ± 26	152 ^a ± 11	130 ^f ± 32
(L CH ₄ /L/d)	0.96 ^a ± 0.21	0.41 ^b ± 0.34	1.64 ^c ± 0.3	7.3 ^a ± 0.6	2.41 ^d ± 0.35	3.55 ^e ± 0.78	4.63 ^a ± 0.34	3.97 ^f ± 0.8
CH ₄ en el gas (%)	79 ^d ± 1	80	80	80	0.79	78.5 ^a ± 1	73 ^g ± 3	72 ^g ± 1
pH afluente	7	7	7	7	7	7	6.5	5.9
pH efluente	-	-	-	8 ^d ± 0.3	-	7.6 ^d ± 0.2	7.7	8.05 ^h ± 0.3
Alcalinidad (mg CaCO ₃)	-	-	-	-	-	-	-	355 ^h ± 17
Remoción DQO* (%)	67 ^g ± 11.8	75 ^a ± 6.1	65.4 ^c ± 12.5	83 ⁱ ± 2.9	95	92 ^h ± 2.15	93 ^a ± 2.15	92.7 ^j ± 3.55
Rendimiento de CH ₄ (LCH ₄ /g DQO _{removida})	0.28	0.07	0.18	0.46	0.36	0.27	0.35	0.30

Valores promedio (± desviación estándar), a: n=7; b: n=8; c: n=16; d: n=2; e: n=12; f: n=52; g: n=4; h: n=10; i: n=5; j: n=45.

Se observó que de los periodos II al IV, la VVPH aumentó en un 36% como consecuencia de la reducción del TRH de 12 a 6 h, cuando se mantuvo la carga orgánica constante a 14 g DQO/L/d. Finalmente, en el periodo V se aplicó una carga orgánica de 20 g DQO/L/d con un TRH de 6 horas obteniendo una VVPM de 6.12 L CH₄/L/d alcanzando un rendimiento de 0.33 L CH₄/g DQO, con el 92% de eficiencia en la remoción de DQO.

Tabla 3.7 Desempeño del reactor UASB para la producción de metano durante los periodos II - V utilizando el efluente del experimento H(B) como alimentación.

Parámetro	Periodo operacional			
	II	III	IV	V
Duración (d)	26	5	6	4
TRH (h)	12	8	6	6
Carga orgánica (g DQO/L/d)	14	14	14	20
Velocidad producción de metano (mmol CH₄/L/d)	126 ^a ± 14.4	157 ^b ± 10.2	171 ^c ± 12.5	201 ^b ± 4.2
(L CH₄/L/d)	3.83 ^a ± 0.43	4.78 ^b ± 0.31	5.19 ^c ± 0.38	6.12 ^b ± 0.13
CH₄ en el gas (%)	72 ^d ± 2	73	74 ^e ± 1	74
pH afluente	5.9	5.9	5.9	5.9
pH efluente	7.8 ^f ± 0.2	7.5 ^g ± 0.3	7.7 ^b ± 0.1	7.7 ^h ± 0.05
Alcalinidad (mg CaCO₃)	339 ^f ± 27	237 ^g ± 12	164 ^b ± 39	190 ^h ± 10
Remoción DQO (%)	95 ⁱ ± 1.1	93.5 ^b ± 1.7	91.3 ^c ± 1.2	92 ^b ± 2
Rendimiento de CH₄ (LCH₄/g DQO_{removida})	0.28	0.36	0.4	0.33

Valores promedio (± desviación estándar), a: n=26; b: n=5; c: n=6; d: n=16; e: n=2; f: n=9; g: n=3; h: n=4; i: n=24.

En la Tabla 3.8 se muestran algunos estudios realizados a partir de efluentes acidificados en reactores UASB para la producción de CH₄. En estos reportes se pone de manifiesto la robustez de los sistemas metanogénicos en el tratamiento de AGVs en reactores UASB. Los AGVs utilizados en estos estudios están presentes en proporciones y orígenes diferentes, aún así se alcanzó la estabilización de más del 90% de la materia orgánica. Según los resultados mostrados en la Tabla 3.8 en nuestro estudio se logró reducir a la mitad el TRH empleado en el tratamiento de AGVs para la producción de metano.

Tabla 3.8 Estudios de producción de metano a partir de ácidos grasos volátiles en reactores UASB.

Sustrato	Inóculo	Carga orgánica (g DQO/ L/ d)	Velocidad de producción de CH ₄ (L CH ₄ / L / d)	Remoción de DQO (%)	Condiciones de operación [TRH(h), pH, Temperatura(°C)]	Referencia
Mezcla sintética de AGV acetato- propionato-butirato (2:1:1)	Lodo anaerobio floculento	24	9	97-99	10-12.5, 6-6.5, 37	[59]
Mezcla AGV y alcoholes (1.5:1) de producción fermentativa de H ₂	Lodo anaerobio parcialmente granular	12.9	4.1	96	12, 6.7, 37	[9]
Mezcla sintética de AGV acetato- propionato-butirato (0.83:1:2.83) *	Lodo granular metanogénico	14	3.97	92	12, 5.9, 25-30	Este estudio Periodo I (día 59 a 110)
Mezcla de AGV acetato-propionato- butirato (0.92:1:3.8) de producción fermentativa de H ₂ **		20	6.12	92	6, 5.9, 25-30	Este estudio Periodo V

* Mezcla sintética de AGVs en la proporción detectada en el efluente de la condición 2, experimento H(A).

** AGV obtenidos del experimento H(B)

3.3 Producción de continua de hidrógeno y metano en dos etapas

En la tabla 3.9 se presentan algunos sistemas de producción de H_2 y CH_4 en dos etapas a partir de la fermentación de suero de leche. Cabe hacer mención que esta investigación es la primera en donde se reporta el uso de suero de leche en polvo en la producción continua de hidrógeno acoplada a la producción de metano. Haciendo un comparativo de la VVPH con SLP y suero de leche (Tabla 3.9), se tiene que en este estudio la VVPH se incrementó 7.4 veces respecto al reporte de Venetsaneas y col. [62]. Lo anterior pudo deberse a que en dicho reporte los autores usaron la microflora nativa del suero de leche como inóculo y además utilizaron un TRH alto (1 d). Como se presenta en la Tabla 3.10, el tiempo total de tratamiento, con suero de leche va de 5.4 a 21 días, mientras que con el SLP, en este estudio, es de 0.6 días. Con el uso de SLP y cultivos mixtos como inóculo, en este estudio se logró reducir el TRH global al menos 9 veces respecto a los reportes presentados en la Tabla 3.9.

Para el tratamiento continuo de la totalidad del efluente generado en el reactor CSTR de producción de hidrógeno [experimento H(B)] se necesita un reactor metanogénicos UASB con un volumen de trabajo de 10 L, operando a una carga de 20 g DQO/L/d y un TRH de 6 horas (periodo V de producción de metano).

Tabla 3.9 Sistemas de producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas que utilizan suero de leche como sustrato.

Reactor productor de hidrógeno							Reactor productor de metano						TRH global* (d)	Ref.
Sustrato	Reactor	Inóculo	Carga orgánica (g DQO soluble /L/d)	Velocidad de producción de H ₂ (L / L / d)	Rendimiento (mol H ₂ /mol glucosa)	Condiciones de operación [TRH(d), pH, Temperatura (°C)]	Reactor	Inóculo	Carga orgánica (g DQO soluble /L/d)	Velocidad de producción de CH ₄ (L / L / d)	Remoción de DQO soluble (%)	Condiciones de operación [TRH(d), pH In*, Temperatura (°C)]		
SL	CSTR	Microflora de suero de leche	60	2.9	0.78	1, 5.2, 35	CSTR	Lodo anaerobio	49.1	0.33	95.3	20, 5, 35	21	[62]
SL	CSTR	Microflora de suero de leche	47.4	2.51	0.9	1, 5.2, 35	PABR	Lodo anaerobio	46.2	5	94	4.4, 4.8, 35	5.4	[49]
SLP	CSTR	Lodo granular, TT	133 ^a	21.58 ^a	1,74 mol H ₂ /mol lactosa ^a	(0.37, 5.9, 37) ^a	UASB	Lodo anaerobio	20 ^b	6.12 ^b	92 ^b	(0.25, 5.9, 25- 30) ^b	0.62	Este estudio

SL: suero de leche, **CSTR:** reactor de tanque agitado en continuo, **PABR:** reactor anaerobio compartimentalizado con baffles, **TT:** tratamiento térmico, ***pH In:** pH del afluente, **TRH global*:** suma del TRH de las etapas de producción de hidrógeno y metano. ^a datos obtenidos del experimento H(B). ^b datos obtenidos del periodo V de producción de metano.

Capítulo 4. Conclusiones y perspectivas

El presente estudio estuvo enfocado en acoplar la producción de hidrógeno y metano en un sistema continuo de dos etapas utilizando suero de leche en polvo como sustrato.

Producción de hidrógeno:

- En los experimentos de producción de H₂ realizados en esta investigación, se destaca que la aplicación de una alta carga orgánica (142.2 g lactosa/L/d), junto con la operación a TRH bajo (6 h), son una combinación efectiva para aumentar la VVPH.
- Resulta importante la mejora en la VVPH ya que es un parámetro crítico para la aplicación tecnologías de fermentación a gran escala.
- La complejidad nutricional del SLP provocó que la operación con SLP fuera 2.57 veces más alta que la operación con lactosa para la producción de hidrógeno.

Producción de metano:

- La producción de metano con efluente acidificado, proveniente de la etapa de producción de hidrógeno, permitió la aplicación de altas cargas

orgánicas (20 g DQO/L/d) con reducción considerable del TRH (6 h) y una remoción de DQO mayor al 90%.

- Para el tratamiento continuo de la totalidad del efluente generado en el reactor CSTR de producción de hidrógeno se requiere un reactor metanogénico (UASB) de 10 L.

Producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas:

- En este estudio la producción continua de hidrógeno y metano se llevó a cabo de una manera eficiente aplicando altas cargas orgánicas. Lo anterior resulta relevante ya que a altas cargas disminuye el volumen de reactor necesario para el tratamiento, minimizando los costos del reactor.
- El TRH global de las dos etapas fue relativamente corto (15 h) para un subproducto (SLP) cuya principal característica es la alta concentración de materia orgánica.
- En este reporte se demuestra que la producción de hidrógeno puede ser eficientemente acoplada a la producción de metano y que el SLP es un sustrato adecuado para los procesos de producción de biocombustibles gaseosos.

Perspectivas: para continuar la investigación sobre el tema y a manera de recomendación se sugiere lo siguiente:

- Desarrollar estudios con el fin de garantizar la calidad y homogeneidad de los inóculos empleados en la producción de hidrógeno.
- Realizar un análisis de la ecología microbiana del cultivo utilizando herramientas moleculares que permitan la identificación y cuantificación de los microorganismos involucrados en la producción de hidrógeno.
- Realizar una caracterización del SLP y evaluar el efecto que tienen sus componentes en la velocidad de producción de hidrógeno.

- Evaluar diferentes configuraciones del CSTR para la producción de hidrógeno que permita incrementar considerablemente la densidad celular del sistema.
- Estudiar la producción de hidrógeno empleando reactores de alta densidad celular, tales como UASB, EGSB o lechos fluidificados.

Capítulo 5. Bibliografía

1. Zurawski D., Meyer M. & Stegmann R. *Fermentative production of biohydrogen from biowaste using digested sewage sludge as inoculums. Tenth International Waste Management and Landfill Symposium. Cagliari, Italy. 3-7 oct. , 2005.*
2. Angenent L., Karim K., Al-Dahhan M., Wrenn B. & Domiguez R. *Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. Trends in Biotechnology, 2004. 22(9): p. 477-485.*
3. Secretaría de energía (SENER, 2006). Energías renovables para el desarrollo sustentable en México. <http://www.sener.gob.mx/webSener/portal/index.jsp?id=48>.
4. Venkata M., Lalit Babu V. & Sarma P. *Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. Bioresource Technology, 2008. 99(1): p. 59-67.*
5. Mu Y., Yu H-Q. & Wang G. *A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process. Water Research, 2007. 41(5): p. 1152-1160.*
6. Kalinci Y., Hepbasli A. & Dincer I. *Biomass-based hydrogen production: A review and analysis. International Journal of Hydrogen Energy, 2009. 34(21): p. 8799-8817.*
7. Venkata M., Mohanakrishna G. & Sarma P. *Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. International Journal of Hydrogen Energy, 2008. 33(9): p. 2156-2166.*
8. Lin C. & Lay C. *Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. International Journal of Hydrogen Energy, 2004. 29(1): p. 41-45.*
9. Han S., Kim S. & Shin H. *UASB treatment of wastewater with VFA and alcohol generated during hydrogen fermentation of food waste. Process Biochemistry, 2005. 40(8): p. 2897-2905.*
10. Oh S. & Logan B. *Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. Water Research, 2005. 39(19): p. 4673-4682.*

11. Ueno Y., Fukui H. & Goto M. *Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste*. Environmental Science & Technology, 2007. **41**(4): p. 1413-1419.
12. Demirel B. & Scherer P. *The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review*. Reviews in Environmental Science & Biotechnology, 2008. **7**(2): p. 173-190.
13. Saxena R. , Seala D., Kumar S. & Goyal H. *Thermo-chemical routes for hydrogen rich gas from biomass: A review*. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2008. **12**(7): p. 1909-1927.
14. Antonopoulou G., Gavala H., Skiadas I., Angelopoulos K. & Lyberatos G. *Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass*. Bioresource Technology, 2008. **99**(1): p. 110-9.
15. Gonzales M. *Biotechnológica utilization of cheese whey: a review*. Bioresource Technology, 1996. **57**: p. 1-11.
16. Ferchichi M., Crabbe E., Gil G., Hintz W. & Almadidy A. *Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey*. Journal of Biotechnology, 2005. **120**(4): p. 402-409.
17. Koutinas A., Papapostolou H., Dimitrellou D., Kopsahelisa N., Katechakia E., Bekatorou A. & Bosneaa L. *Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production*. Bioresource Technology, 2009. **100**(15): p. 3734-3739.
18. De León A., Rivera D., Medina E., Flores J., Estrada A., Ordóñez L. & De La Rosa A. *Production of penicillin acylase by a recombinant Escherichia coli using cheese whey as substrate and inducer*. Biomolecular Engineering, 2006. **23**(6): p. 299-305.
19. Castelló E., García C., Iglesias I., Paolino G., Wenzel J., Borzacconi L. & Etchebehere C. *Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance*. International Journal of Hydrogen Energy, 2009. **34**(14): p. 5674-568.
20. Ozmihi S. & Kargi F. *Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: effects of hydraulic residence time*. Bioprocess & Biosystems Engineering, 2007. **30**(2): p. 79-86.
21. Davila-Vazquez G., Alatraste-Mondragón F., De León-Rodríguez A. & Razo-Flores E. *Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH*. International Journal of Hydrogen Energy, 2008. **33**(19): p. 4989-4997.
22. Davila- Vazquez G., Cota-Navarro C., Rosales-Colunga L., De Leon-Rodríguez A. & Razo-Flores E. *Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate*. International Journal of Hydrogen Energy, 2009. **34** (10): p. 4296-4304
23. Yang P., Zhang R., MCGarvey J. & Benemann J. *Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities*. International Journal of Hydrogen Energy, 2007. **32**(18): p. 4761-4771.
24. Davila-Vazquez G., Arriaga S., Alatraste-Mondragón F., De León-Rodríguez A., Rosales-Colunga L. M. & Razo-Flores E. *Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives*. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 2008. **7**(1): p. 27-45.
25. Wang J. & Wana W. *Factors influencing fermentative hydrogen production: A review*. International Journal of Hydrogen Energy, 2009. **34**(2): p. 799-811.
26. Kim D., Kim S., Ko I., Lee C. & Shin H. *Start-up strategy for continuous fermentative hydrogen production: early switchover from batch to continuous operation*. International Journal of Hydrogen Energy, 2008. **33**(5): p. 1532-1541.

27. Cai M., Liu J. & Wei Y. *Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment*. Environmental Science & Technology, 2004. **38**(11): p. 3195-3202.
28. Zheng X. & Yu H. *Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures*. Journal of Environmental Management, 2005. **74**(1): p. 65-70.
29. Mu Y., Wang G. & Yu H. *Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures*. Enzyme & Microbial Technology, 2006. **38**(7): p. 905-913.
30. Kim D., Han S., Kim S. & Shin H. *Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production*. International Journal of Hydrogen Energy, 2006. **31**(15): p. 2158-2169.
31. Wang Y., Mu Y. & Yu H.Q. *Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges*. International Journal of Hydrogen Energy, 2007. **32**(8): p. 1086-1094.
32. Chang J., Wu J., Wen F., Hung K., Chen Y., Hsiao C., Lin C. & Huang C. *Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time*. International Journal of Hydrogen Energy, 2008. **33**(5): p. 1579-1585.
33. Kyazze G., Martinez N., Dinsdale R, Premier G, Hawkes F , Guwy A & Hawkes D. *Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production*. Biotechnology & Bioengineering, 2005 **93**(5): p. 971-979.
34. Kraemer J. & Bagley D. *Improving the yield from fermentative hydrogen production*. Biotechnology Letters, 2007. **29**(5): p. 685-695.
35. Fang H., Zhang T. & Liu H. *Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge*. Applied Microbiology & Biotechnology, 2002. **58**(1): p. 112-118.
36. Khanal S., Chen W., Li L. & Sung S. *Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products*. International Journal of Hydrogen Energy, 2004. **29**(11): p. 1123-1131.
37. Jones D. & Woods D. *Acetone-butanol fermentation revisited*. Microbiological Reviews, 1986. **50**(4): p. 484-524.
38. Van Ginkel S., Sung S. & Lay J. *Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration*. Environmental Science & Technology, 2001. **35**(24): p. 4726-30.
39. Rittmann B. & Mccarty P., *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. 2001, New York, USA: McGraw-Hill Series in Water Resources & Environmental Engineering. 173, 569-570.
40. Bengtsson S., Hallquist J., Werker A. & Welander T. *Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production*. Biochemical Engineering Journal, 2008. **40**(3): p. 492-499.
41. Hussy I., Hawkes F., Dinsdale R. & Hawkes D. *Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora*. Biotechnology & Bioengineering, 2003. **84**(6): p. 619-626.
42. Chang F. & Lin C. *Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor*. International Journal of Hydrogen Energy, 2004. **29**(1): p. 33-39.
43. Ruzicka M. *The effect of hydrogen on acidogenic glucose cleavage*. Water Research, 1996. **30**(10): p. 2447-2451.
44. Thauer R., Jungeman K. & Decker K. *Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria*. Bacteriology Review, 1977. **41**: p. 100 -180.
45. Ren N., Chen X. & Zhao D. *Control of fermentation types in continuous flow acidogenic reactors: effects of pH and redoxpotential*. Journal Harbin Institute Technology (New Series), 2001. **8**(2): p. 116-119.

46. Wang L., Zhou Q. & Li F. T. *Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production*. Biomass & Bioenergy, 2006. **30**(2): p. 177-182.
47. Jianzheng L., Baikun L., Gefu Z., Nanqi R., Lixin B. & Junguo H. *Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR)*. International Journal of Hydrogen Energy, 2007. **32**(15): p. 3274-3283.
48. Van Ginkel S. & Logan B. *Increased biological hydrogen production with reduced organic loading*. Water Research, 2005. **39**(16): p. 3819-3826.
49. Antonopoulou G., Stamatelatos K. & Venetsaneas N. *Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process*. Industrial Engineering Chemistry Research, 2008. **47**(15): p. 5227-5233.
50. Hussy I., Hawkes F., Dinsdale R. & Hawkes D. *Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet*. International Journal of Hydrogen Energy, 2005. **30**(5): p. 471-483.
51. Redwood M., Paterson M. & Macaskie L. *Integrating dark and light biohydrogen production strategies: towards the hydrogen economy*. Reviews in Environmental Science & Biotechnology, 2008. **8**(2): p. 149-185.
52. Hawkes F., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R. & Hawkes D. *Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress*. International Journal of Hydrogen Energy, 2007. **32**(2): p. 172-184.
53. Cervantes F., Pavlostathis S. & Van Haandel A. *Advanced biological treatment processes for wastewaters. Principles and applications*. 2006, London, UK.: Printed by Lightning Source.
54. Ren N., Liu M. , Wang A. , Ding J & Li H. *Organic acids conversion in methanogenic-phase reactor of the two-phase anaerobic process*. Environmental Science, 2003. **24**(4): p. 89-93.
55. Wang Y., Zhang Y., Wang J. & Meng L. *Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria*. Biomass & Bioenergy, 2009. **33**(5): p. 848-853.
56. Yeole T., Gokhale S., S. Hajarnis & Ranade D. *Effect of brackish water on biogas production from cattle dung and methanogens*. Bioresource Technology, 1996. **58**(3): p. 323-325.
57. Demirel B. & Yenigün O. *The effects of change in volatile fatty acid (VFA) composition on methanogenic upflow filter reactor (UFAF) performance*. Environmental Technology, 2002. **10**: p. 1179-1187.
58. Ueno Y., Kitajima Y., Tataru M., Fukui H., Makiuchi T., Miyano Y. & Goto M. *High performance production of hydrogen and methane from organic solid wastes by phase separation of anaerobic process*. in *VIII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion*. 2005. Punta del Este, Uruguay.
59. Fang H., Li Y. & Chui H. *UASB Treatment of Wastewater with Concentrated Mixed VFA*. Journal of Environmental Engineering, 1995. **121**(2): p. 153-160.
60. Demirel B., Yenigün O. & Ona T. *Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review*. Process Biochemistry, 2005. **40**(8): p. 2583-2595.
61. Koutrouli E., Kalfas H., Gavala N., Skiadas V. , Stamatelatos K. & Lyberatos G. *Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp*. Bioresource Technology, 2009. **100**: p. 3718-3723.
62. Venetsaneas N., Antonopoulou G., Stamatelatos K., Kornaros M. & Lyberatos G. *Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches*. Bioresource Technology 2009. **100** p. 3713-3717.
63. Claassen P., Van Lier J., Lopez A., Van Niel E., Sijtsma L., Stams A., De Vries S. & Weusthuis R. *Utilisation of biomass for the supply of energy carriers*. Applied Microbiology & Biotechnology, 1999. **52**(6): p. 741-755.

64. Marban G. & Valdes T. *Towards the hydrogen economy?* International Journal of Hydrogen Energy, 2007. **32**(12): p. 1625-1637.
65. Gavala H., Skiadas L. & Ahring B. *Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems.* International Journal of Hydrogen Energy, 2006. **31**(9): p. 1164-1175.
66. Blonskaja V., Menert A. & Vilu R. *Use of the two-stage anaerobic treatment of distillery waste.* Advances Environmental Research, 2003. **7**(3): p. 671-678.
67. Badui S., *Química de los alimentos.* Tercera edición. 1999, México: Editorial Pearson-education. 609-610.
68. Saddoud A., Hassaïri I. & Sayadi S. . *Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey.* Bioresource Technology, 2007. **98**(11): p. 2102-2108.
69. Gannoun H., Khelifi E., Bouallagui H., Touhami Y. & Hamdi M. *Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter.* Bioresource Technology, 2008. **99**(14): p. 6105-6111.
70. Wang C., Lin P. & Chang J. *Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge.* Process Biochemistry, 2006. **41**(6): p. 1353-1358.
71. Park W., Hyun S., Oh S. E., Logan B. & Kim I. S. *Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production.* Environmental Science & Technology, 2005. **39**(12): p. 4416-4420.
72. Soga T. & Ross G. *Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis.* Journal of Chromatography A, 1999. **837**(1-2): p. 231-239.
73. APHA, AWWA & WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater.* 1998, Washington, USA: American Public Health Association.
74. Oh Y. K., Kim S. H., Kim M. S. & Park S. *Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter.* Biotechnology and Bioengineering, 2004. **88**(6): p. 690-8.
75. Show K., Zhang Z., Tay J., L. Tee, Lee D. & Jiang W. *Production of hydrogen in a granular sludge-based anaerobic continuous stirred tank reactor.* International Journal of Hydrogen Energy, 2007. **32**(18): p. 4744-4753.
76. Zhao Q., Mu Y., Wang Y., Liu X., Dong F. & Yu H. *Response of a biohydrogen-producing reactor to the substrate shift from sucrose to lactose.* Bioresource Technology, 2008. **99**(17): p. 8344-8347.
77. Kim S., Han S. & Shin H. *Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter.* Process Biochemistry, 2006. **41**(1): p. 199-207.
78. Kataoka N., Miya A. & Kiriya K. *Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen producing anaerobic bacteria.* Water Science & Technology, 1997. **36**(6-7): p. 41-47.
79. Talabardon M., Schwitzguébel J.P., Péringer P. & Yang S.T. *Acetic Acid Production from Lactose by an Anaerobic Thermophilic Coculture Immobilized in a Fibrous-Bed Bioreactor.* Biotechnology Progress, 2000. **16**: p. 1008-1017.
80. Collet C., Adler N., Schwitzguebel J. P. & Peringer P. *Hydrogen production by Clostridium thermolacticum during continuous fermentation of lactose.* International Journal of Hydrogen Energy, 2004. **29**(14): p. 1479-1485.
81. Calli B., Schoenmaekers K., Vanbroekhoven K. & Diels L. *Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose-Effects of on-line pH control.* International Journal of Hydrogen Energy, 2008. **33**(2): p. 522-530.

82. Azbar N., Çetinkaya Dokgöz F., Keskin T., Korkmaz K. & Syed H. *Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions*. International Journal of Hydrogen Energy, 2009. **34**(17): p. 7441-7447.

Anexo A

Ensayos de producción de hidrógeno para el acoplamiento a la producción de metano: obtención de efluente.

Fermentación	Lote de lodo*	Duración (d)	Parámetros de operación	Observación
1	1 - 2	9	Lote: Biomasa inicial 4.5 g SSV/L, 30 g SLP/L. Continuo: Carga 142.2 g Lactosa/L/d, TRH 6 h.	Estado en lote 20 h. Máxima VVPH de 37 L H ₂ /L/d obtenida al día 3, con tendencia a la disminución. El día 7 la VVPH fue de 19 L H ₂ /L/d. Se practicó una reinoculación del reactor sin observarse mejoría en la VVPH.
2	1 - 3	3	Lote: Biomasa inicial 4.5 g SSV/L, 30 g SLP/L. Continuo: Carga 142.2 g Lactosa/L/d, TRH 6 h.	Estado en lote 10 h. Máxima VVPH de 27 L H ₂ /L/d obtenida al día 2, con tendencia a la disminución, el día 3 la VVPH fue de 20 L H ₂ /L/d.
3	1 - 3	6	Lote: Biomasa inicial 4.5 g SSV/L, 30 g SLP/L. Continuo: Carga 94.8 g Lactosa/L/d (día 1 al 3) y 142.2 g Lactosa/L/d (día 4 al 6), TRH 6.	Estado en lote 10 h. Gran variabilidad de la VVPH a partir del día 2. En los días 1 - 3 la VVPH fue de 20 ± 6 L H ₂ /L/d; durante los días 4 - 6. Se derramó el contenido del reactor.
4	2	5	Lote: Biomasa inicial 4.5 g SSV/L, 30 g SLP/L. Continuo: Carga 94.8 g Lactosa/L/d (día 1 al 2) y 142.2 g Lactosa/L/d (día 3 al 4), TRH 6.	Estado en lote 10 h. Máxima VVPH de 25 L H ₂ /L/d obtenida al día 2, con tendencia a la disminución. El día 4 la VVPH fue de 7.6 L H ₂ /L/d.
5	2	5	Lote: Biomasa inicial 4.5 g SSV/L, 30 g SLP/L. Continuo: Carga 100 g Lactosa/L/d (día 1 al 2) y 142.2 g Lactosa/L/d (día 3 al 5), TRH 9.	Estado en lote 12 h. Máxima VVPH de 22 L H ₂ /L/d obtenida al día 3, con tendencia a la disminución, el día 5 la VVPH fue de 8 L H ₂ /L/d.
6	3	4	Lote: Biomasa inicial 4.5 g SSV/L, 30 g SLP/L. Continuo: Carga 100 g Lactosa/L/d (día 1 al 2) y 142.2 g Lactosa/L/d (día 3 al 4), TRH 9.	Estado en lote 8 h. Máxima VVPH de 29 L H ₂ /L/d obtenida al día 1, con tendencia a la disminución, el día 4 la VVPH fue de 0.5 L H ₂ /L/d.
7 Experimento H(B)	3	9	Lote: Biomasa inicial 9 g SSV/L, 40 g SLP/L. Continuo: Carga 95 g Lactosa/L/d, TRH 9.	Estado en lote 7 h. VVPH sostenida entre los 20 y 24 L H ₂ /L/d durante los primeros 6 días. Día 7 el pH disminuyó a 4.9 debido a un incidente con el suministro de NaOH. La VVPH en el día 8 fue de 15 L H ₂ /L/d con tendencia a la disminución. El día 9 la VVPH fue de 13 L H ₂ /L/d. Se recolectó efluente de los días 1 - 6.

8 – 13	3	1	Lote: Biomasa inicial 9 g SSV/L, 40 g SLP/L	No se observó una disminución significativa del pH a las 8, 10, 15 o 18 h de operación en lote. pH se mantuvo entre 7 y 7.4 detectándose una producción de gas despreciable. No se inició la alimentación continua
14	3	2	Lote: Biomasa inicial 9 g SSV/L de lodo lote 3 más 9 g SSV/L de biomasa de la fermentación 7, 40 g SLP/L. Continuo: Carga 95 g Lactosa/L/d (día 1 al 2) y 142.2 g Lactosa/L/d (día 3 al 4), TRH 9.	Estado en lote 5 h. Máxima VVPH de 14 L H ₂ /L/d obtenida al día 1, con tendencia a la disminución, el día 2 la VVPH fue de 2 L H ₂ /L/d. Se analizaron los AGVs del efluente del día 2 encontrándose una relación acetato: propionato: butirato de 1 - 6 - 1.

***Lotes de lodo granular**

Lote 1 - 1: Lodo granular obtenido del cárcamo de purga de lodos del UASB de la planta de tratamiento de agua de la empresa Ricolino. Puesto que este inóculo fue empleado en los experimentos H(A), L - SLP y SLP – L no se incluye en la tabla.

Lote 1 - 2: Lodo 1-1 re-hervido.

Lote 1 - 3: Parte residual del Lote 1-1.

Lote 2: Lodo obtenido de la columna de agua del reactor UASB de la planta Ricolino. Este inóculo presentó baja capacidad de sedimentación y con tendencia a flotar.

Lote 3: Lodo obtenido de la cama del reactor UASB de la planta Ricolino.