



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

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**Producción de hidrógeno en sistemas continuos  
a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de  
*Agave tequilana* Weber**

Tesis que presenta

**Carlos Alberto Contreras Dávila**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias Ambientales**

**Codirectores de la Tesis:**

**Dr. Elías Razo Flores**

**Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta**

San Luis Potosí, S.L.P., Octubre de 2015



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Producción de hidrógeno en sistemas continuos a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de Agave tequilana Weber***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Carlos Alberto Contreras Dávila** y aprobada **el dos de octubre de dos mil quince** 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**  
Codirector de la tesis

**Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta**  
Codirector de tesis

**Dr. Felipe Alatraste Mondragón**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., así como en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos (Planta piloto) del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara, bajo la codirección de los doctores Elías Razo Flores y Hugo Oscar Méndez Acosta.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (297027) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto SEP-CONACYT CB 2009 01, 132483 "Producción de biohidrógeno en reactores de alta densidad celular" asignado al Dr. Elías Razo Flores.

Durante el presente trabajo de investigación, el autor realizó una estancia (Julio-Diciembre 2014) en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara, con apoyo de una Beca Mixta CONACYT.



# 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 023 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 2 días del mes de octubre del año 2015, se reunió a las 10:20 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

**Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta**  
**Dr. Felipe Alatríste Mondragón**  
**Dr. Elías Razo Flores**

**Presidente**  
**Secretario**  
**Sinodal**

**UdeG**  
**IPICYT**  
**IPICYT**

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

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

**Carlos Alberto Contreras Dávila**

sobre la Tesis intitulada:

*Producción de hidrógeno en sistemas continuos a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de Agave tequilana Weber*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Elías Razo Flores**  
**Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta (UdeG)**

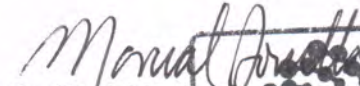
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 12:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 2 días del mes de octubre de 2015.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla Martín**  
Secretario Académico



*Dedicado con amor a papá y mamá, gracias por apoyarme incondicionalmente y en todo momento. A mis hermanos Luis Javier y Sandra.*

*A mis queridos abuelos, especialmente a Engracia<sup>†</sup>. A mis tíos y primos; a mi tía Martha, por todo su apoyo; a mi tío Gustavo, por compartir su pasión por la investigación e impulsarme a seguir preparándome; y a Romina, bienvenida a la familia.*

*A Mariana, compañeros y amigos lejanos y cercanos que me han acompañado durante esta travesía.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Elías Razo Flores por abrirme las puertas en su grupo de trabajo, compartir sus conocimientos, experiencia y liderazgo reflejados en este trabajo. Al Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta por recibirme en su grupo de trabajo, por compartir su experiencia, y por la orientación y paciencia brindadas durante la realización de este trabajo. Al Dr. Felipe Alatríste Mondragón por sus importantes aportaciones y acertados comentarios que sin duda enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Gustavo Dávila Vázquez por la colaboración con los estudios moleculares y su apoyo en todo momento.

A la Dra. Ma de Lourdes Berenice Celis García por su continuo apoyo, ánimo y buena disposición.

A los doctores Luis Arellano García y Jorge Arreola Vargas por la orientación y el apoyo brindados.

A la M. C. Dulce Isela de Fátima Partida Gutiérrez, a la Dra. Angélica Aguilar Aguilar, al M. C. Guillermo Vidriales Escobar y al M. C. Juan Pablo Rodas Ortíz por su invaluable apoyo técnico.

A los profesores del posgrado por compartir sus conocimientos y contribuir de manera importante en mi formación profesional.

## CONTENIDO

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Tabla de contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biomasa como fuente de energía	2
1.1.2 Residuos de la industria tequilera	2
1.2 Materiales lignocelulósicos	3
1.2.1 Composición	3
1.2.2 Pretratamientos	5
1.2.3 Hidrólisis enzimática	7
1.3 Producción de hidrógeno	8
1.3.1 pH	10
1.3.2 Tiempo de residencia hidráulica	11
1.3.3 Carga orgánica volumétrica	11
1.3.4 Presión parcial de hidrógeno	12
1.4 Configuraciones de reactor	12
1.4.1 Reactor de tanque agitado	14
1.4.2 Reactor de filtro percolador	15
CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
2.1 Hipótesis	17
2.2 Objetivo general	17
2.3 Objetivos específicos	17
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Hidrólisis enzimática	18

3.2 Inóculo	18
3.3 Medio mineral	18
3.4 Experimentos en reactor de tanque agitado	18
3.5 Experimentos en reactor de filtro percolador	20
3.6 Evaluación del desempeño en la producción de hidrógeno	22
3.7 Métodos analíticos	24
3.8 Balance de electrones	24
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 Hidrolizados enzimáticos	26
4.2 Producción de hidrógeno en reactor de tanque agitado	27
4.3 Producción de hidrógeno en reactor de filtro percolador	33
4.4 Efecto de la configuración de reactor en la producción de hidrógeno	39
4.5 Balance de electrones	43
4.6 Producción de hidrógeno con hidrolizados enzimáticos	45
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	49
REFERENCIAS	51



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1	Composición en peso seco (%) del bagazo de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul.	5
Tabla 1.2	Velocidades de producción de hidrógeno de acuerdo a la configuración de reactor.	13
Tabla 3.1	Estrategia de operación de CSTR.	19
Tabla 3.2	Estrategia de operación de TBR.	22
Tabla 3.3	Ecuaciones utilizadas para la evaluación del desempeño de los reactores.	23
Tabla 4.1	Desempeño de CSTR en la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.	31
Tabla 4.2	Desempeño de TBR en la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.	38
Tabla 4.3	Desempeño de los reactores CSTR y TBR en función de la COV.	40
Tabla 4.4	Balance de electrones en días específicos (%).	45
Tabla 4.5	Producción de hidrógeno con hidrolizados enzimáticos en diferentes sistemas continuos.	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Esquema de la estructura de los materiales lignocelulósicos.	4
Figura 1.2	Generación de compuestos inhibidores durante pretratamiento.	6
Figura 1.3	Esquema de las rutas metabólicas utilizadas por los microorganismos productores de hidrógeno.	10
Figura 1.4	Diferentes configuraciones de reactores utilizados en la producción de hidrógeno por fermentación oscura. A – Reactor anaerobio de lote secuencial (ASBR); B – Reactor de tanque agitado (CSTR); C – Reactor de tanque agitado con lodo inmovilizado (CIGSB); D – Reactor de lecho empacado (PBR); E – Reactor de lecho fluidificado (FBR); F – Reactor de lecho granular expandido (EGSB); G – Reactor de lecho granular de flujo ascendente (UASB); H – Reactor de filtro percolador (TBR).	14
Figura 3.1	Esquema de CSTR: A – Bomba de alimentación; B – Sensor de conductividad; C – Sensor de pH; D – Bomba de recirculación; E – Bomba de adición de NaOH; F – Medidor de flujo de biogás; G – Puerto de muestreo de gas; H – Chaqueta de agua; I – Termopar; J – Sensor de presión; K – Separador líquido-gas; L – Equipo de control NI-cRIO; M – Computadora.	20
Figura 3.2	Esquema de TBR: A – Bomba de alimentación; B – Sensor de pH; C – Termómetro; D – Aspensor de líquido; E – Tubería de PE; F – Chaqueta de agua; G – Bomba de recirculación; H – Bomba de efluente; I – Puerto de purga; J – Bomba de adición de NaOH; K – Controlador de pH; L – Puerto de muestreo de gas; M – Medidor de volumen de gas.	21

Figura 4.1	Características de los hidrolizados enzimáticos de los distintos lotes de bagazo utilizados en el CSTR.	26
Figura 4.2	Balance de DQO para los hidrolizados utilizados en los reactores CSTR y TBR.	27
Figura 4.3	Desempeño del CSTR durante los distintos periodos de operación. a) Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH), rendimiento molar de hidrógeno (RMH) y pH; b) ácidos grasos volátiles (AGV) y carga orgánica volumétrica (COV).	28
Figura 4.4	Relación entre %Ac <sub>homoacet</sub> y H <sub>2</sub> /(Ac+Bu) observada en CSTR.	32
Figura 4.5	Desempeño del TBR durante los distintos periodos de operación. a) Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH), rendimiento molar de hidrógeno (RMH) y tiempo de residencia hidráulico (TRH); b) ácidos grasos volátiles (AGV) y carga orgánica volumétrica (COV).	35
Figura 4.6	Relación entre %Ac <sub>homoacet</sub> y H <sub>2</sub> /(Ac+Bu) observada en TBR.	37
Figura 4.7	Diagramas de cajas mostrando la producción de hidrógeno en función de la COV para los reactores CSTR (a, c) y TBR (b, d). Dentro de las cajas se recoge el 50% de los datos, la línea divisoria dentro de la caja representa la mediana y los brazos muestran la distribución total de cada serie de datos (valores mínimos y máximos). Los promedios se representan con el símbolo (■).	39
Figura 4.8	Tendencias en la producción de hidrógeno en función de la COV para los reactores CSTR (a, c) y TBR (b, d). *Abreu-Sherrer (2013): 22.3 g DQO/L. **Arreola-Vargas et al. (2014): 5 g DQO/L.	41
Figura 4.9	Balance de electrones para los reactores CSTR (a) y TBR (b).	44

## RESUMEN

**Palabras clave:** hidrógeno, bagazo de agave, hidrólisis enzimática, CSTR, TBR.

Los problemas atribuidos al uso intensivo de los combustibles fósiles han motivado la exploración de nuevas fuentes de energía renovables. El hidrógeno ( $H_2$ ) es considerado un combustible ideal, el cual puede ser producido mediante la fermentación oscura a partir de diversos tipos de residuos, tales como los lignocelulósicos. En este trabajo se evaluó la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave utilizando un reactor de tanque agitado (CSTR) y un reactor de filtro percolador (TBR). Las velocidades (VVPH) y los rendimientos (RMH) de la producción de hidrógeno fueron evaluados en ambos reactores como respuesta a diferentes cargas orgánicas volumétricas (COV). Los máximos VVPH y RMH obtenidos en el CSTR fueron de 2.53 L  $H_2$ /L-d y 1.35 mol  $H_2$ /mol azúcar consumido a una COV de 52.5 y 40.2 g DQO/L-d, respectivamente. Un aumento de COV a 60.3 g DQO/L-d resultó en una severa disminución en la producción de hidrógeno. En el TBR se alcanzaron VVPH y RMH máximos de 3.45 L  $H_2$ /L-d y 1.53 mol  $H_2$ /mol azúcar consumido, ambos obtenidos a una COV de 52.9 g DQO/L-d. El TBR fue más sensible al contenido de sólidos en los hidrolizados en comparación con el CSTR. Los metabolitos predominantes en ambos reactores fueron butirato y acetato, con presencia de lactato y propionato en concentraciones ligeramente mayores en el CSTR en comparación con el TBR, como se pudo observar tanto en los perfiles de producción de metabolitos como en los balances de electrones. La VVPH y el RMH mostraron una respuesta positiva a los aumentos de COV en el TBR. Sin embargo, la VVPH y el RMH mostraron una correspondencia opuesta en el CSTR, debido a que el RMH disminuyó con los incrementos de COV. Los distintos desempeños fueron atribuidos a diferencias en la presión parcial de hidrógeno. Existen pocos trabajos en los que se evalúe la producción continua de hidrógeno a partir de hidrolizados lignocelulósicos. El presente trabajo muestra que la configuración de reactor tiene un efecto importante sobre la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.

## ABSTRACT

**Keywords:** hydrogen, agave bagasse, enzymatic hydrolysis, CSTR, TBR.

Problems associated to the intensive use of fossil fuels have given rise to the research on new alternative and renewable energy sources. Hydrogen ( $H_2$ ) is considered an ideal fuel, which can be produced biologically from a variety of wastes by dark fermentation, including lignocellulosic residues, thus valorizing residues and harvesting energy at the same time. The aim of this work was to evaluate the continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysates of agave bagasse in a continuous stirred tank reactor (CSTR) and a trickling bed reactor (TBR). Hydrogen production rates (VHPR) and yields (HMY) were evaluated under different organic loading rates (OLR). The highest VHPR and HMY attained in the CSTR were 2.53 L  $H_2$ /L-d and 1.35 mol  $H_2$ /mol sugar consumed at an OLR of 52.5 and 40.2 g DQO/L-d, respectively. A drop in hydrogen production was observed at 60.3 g DQO/L-d. Both VHPR and HMY peaked at 52.9 g DQO/L-d in the TBR, corresponding to 3.45 L  $H_2$ /L-d and 1.53 mol  $H_2$ /mol sugar consumed, respectively. The solids content in the hydrolysates affected the operation of the TBR. Butyrate and acetate were the main metabolic products in both reactors, whereas propionate and lactate concentrations were slightly higher in the CSTR compared to the TBR, which was observed in both the metabolite production profiles and the electron balances. The reactor configuration had a strong influence on reactors performance. An upward trend was achieved in both VHPR and HMY with increasing OLR in the TBR. Although the increments on the OLR enhanced VHPR in the CSTR, HMY showed a decreasing tendency with increasing OLR. The different performances observed were attributed to differences in the hydrogen partial pressure. There are few studies on continuous hydrogen production from lignocellulosic hydrolysates. In this study, it is shown that reactor configuration has a relevant impact on the hydrogen production from enzymatic hydrolysates of agave bagasse.

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El uso intensivo de los combustibles fósiles ha resultado en la acumulación de gases de efecto invernadero (GEI) y el agotamiento de estos recursos no renovables, los cuales son dos de los principales problemas actuales a nivel mundial. La acumulación de GEI trae consigo graves problemas de índole ambiental y de escala global como la lluvia ácida, el agotamiento del ozono estratosférico y el cambio ambiental global (Kalogirou, 2004); mientras que el agotamiento ha causado grandes preocupaciones a nivel internacional, debido principalmente a la alta dependencia hacia esta fuente de energía (Capellán-Pérez et al., 2014) ya que alrededor del 78% de la energía global se produce a partir de combustibles fósiles (Alemán-Nava et al., 2014). En México, el 81% de la energía eléctrica se produce a partir de fuentes no renovables (SENER, 2013).

Esta situación ha provocado la exploración de nuevas alternativas para la obtención de energía a partir de fuentes renovables, siendo la biomasa una opción con un potencial muy importante debido a su gran abundancia a nivel mundial. Mientras el aprovechamiento de biomasa se ha enfocado principalmente a la producción de biocombustibles líquidos como el bioetanol o biodiesel, han sido pocos los trabajos sobre la producción de biocombustibles gaseosos como metano e hidrógeno.

La producción de hidrógeno ( $H_2$ ) como acarreador de energía resulta de gran interés principalmente por su alto contenido energético en base másica (122 kJ/g) y debido a que genera vapor de agua como único subproducto de combustión. Sin embargo, uno de los factores que afectan la producción biológica de hidrógeno son las altas presiones parciales de hidrógeno ( $P_{H_2}$ ) que disminuyen significativamente el desempeño del proceso (Angenent et al., 2004). Para ello se ha planteado el uso de diferentes configuraciones de reactores que favorezcan la liberación del  $H_2$  producido hacia la fase gaseosa. En el presente trabajo se propone aprovechar el bagazo de agave de la industria tequilera para la producción de hidrógeno en dos reactores de configuración distinta.

## **1.1 Biomasa como fuente de energía**

La biomasa comprende cualquier material derivado de los organismos vivos como madera, cultivos agrícolas, residuos y subproductos agroindustriales y de la industria alimenticia, biomasa algal, entre otros. Dada la gran riqueza natural del país, se espera que la biomasa cobre importancia en el futuro energético de México. Se estima que el potencial de producción de bioenergía en México a partir de biomasa es de 2635-3771 PJ anuales (Alemán-Nava et al., 2014).

La biomasa lignocelulósica incluye fundamentalmente a los derivados de organismos fotosintéticos superiores. Entre los biocombustibles producidos a partir de materiales lignocelulósicos se encuentran los de primera generación, los cuales se obtienen a partir de cultivos agrícolas (maíz, trigo, caña de azúcar) que podrían ser utilizados como alimentos o que compiten por espacio y agua contra cultivos destinados para la producción de alimentos.

Debido a esta controversia la producción de biocombustibles se ha enfocado recientemente hacia la utilización de residuos agroindustriales (hojas, tallos, rastrojos, bagazos), dando lugar a los biocombustibles de segunda generación. Estos residuos lignocelulósicos representan una alternativa muy atractiva como materia prima de bajo costo para la producción de biocombustibles debido a su gran abundancia. Se estima que a nivel mundial la producción anual de este tipo de residuos supera  $220 \times 10^9$  toneladas (Ren et al., 2009), de las cuales alrededor de  $76 \times 10^6$  toneladas en peso seco se generan en el país (Valdez-Vazquez et al., 2010).

### **1.1.1 Residuos de la industria tequilera**

Una de las agroindustrias más importantes del país es la industria tequilera, la cual ha duplicado su producción de 104.3 millones de litros producidos en 1995 a 242.4 millones de litros/año producidos durante 2014 (CNIT, 2015). Entre los principales residuos de esta industria se encuentran las vinazas tequileras y el bagazo de agave. Las vinazas tequileras son los residuos líquidos que permanecen en el fondo de los alambiques después de la destilación del mosto

fermentado, mientras que el bagazo de agave es el residuo lignocelulósico acumulado después de la extracción de los jugos contenidos en la piña cocida. Se sabe que por cada litro de tequila producido, se generan 10-12 litros de vinazas y 1.4 kg de bagazo de agave (López-López et al., 2010). Como consecuencia del crecimiento de esta industria, actualmente se generan alrededor de  $3.6 \times 10^5$  toneladas anuales en peso seco de bagazo de agave (Caspeta et al., 2014), las cuales cuentan con un alto potencial de valorización para la obtención de energía.

## **1.2 Materiales lignocelulósicos**

### **1.2.1 Composición**

La lignocelulosa es un compuesto natural bastante complejo que constituye la mayor parte de la pared celular de las plantas. La lignocelulosa está conformada en diferentes proporciones por celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 1.1). La proporción de estos biopolímeros es diferente para cada especie, además de que puede variar dentro de la misma especie de acuerdo a la edad de la planta, la región y el clima del área de cultivo.

La lignina es un polímero tridimensional altamente estable formado por unidades fenil-propanoides unidas por enlaces carbono-carbono y de tipo éter que unen los componentes de la pared celular brindándole soporte y rigidez a la planta. La lignina, provee de resistencia a patógenos e insectos (Rubin, 2008) y puede llegar a constituir hasta un 34% de la biomasa en maderas. La lignina también interviene en el transporte de agua, nutrientes y metabolitos a través del sistema vascular (Prinsen, 2013).

La hemicelulosa es el segundo componente más abundante en los residuos lignocelulósicos, comprendiendo entre el 20-35% de la biomasa en peso seco (Lynd, 1996). Es un biopolímero heterogéneo, no cristalino, conformado por hexosas ( $\beta$ -D-manosa,  $\beta$ -D-glucosa,  $\alpha$ -D-galactosa), pentosas ( $\beta$ -D-xilosa,  $\alpha$ -L-arabinosa) y/o ácidos urónicos (ácidos  $\alpha$ -D-glucorónico,  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturónico y  $\alpha$ -D-galacturónico), siendo los xilanos los compuestos hemicelulósicos más abundantes en los residuos agroindustriales (Girio et al., 2010). Las



hemicelulosas, al enlazarse covalentemente con la lignina, proveen de una matriz de soporte para la celulosa proporcionando rigidez a la pared celular.

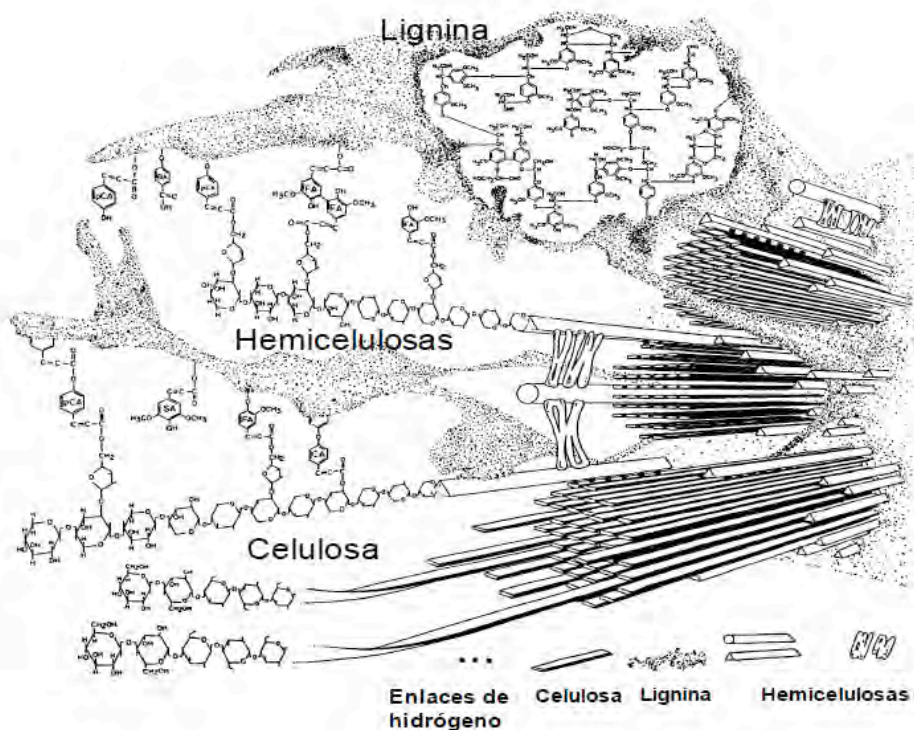


Figura 1.1 Esquema de la estructura de los materiales lignocelulósicos (Prinsen, 2013).

La celulosa es el componente principal de este tipo de materiales, la cual tiene la función de brindar resistencia mecánica y estabilidad química a la planta (Singh et al., 2014). La celulosa es un polímero lineal de glucosa compuesto por unidades de celobiosa articuladas mediante enlaces  $\beta$ -(1-4)-glucosídicos. Su estructura fuertemente empaçada y altamente cristalina le da la propiedad de ser insoluble en agua y resistente a la despolimerización tanto química como biológica (Taherzadeh y Karimi, 2008). La celulosa junto con la hemicelulosa (holocelulosa), al ser polímeros de carbohidratos, representan una fuente potencial de azúcares que pueden ser sometidos a procesos de fermentación para obtener diversos productos de interés, entre ellos los biocombustibles (Kumar et al., 2015; Ren et al., 2009).

El bagazo generado por la industria tequilera representa el 40% en masa de las piñas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) procesadas (Cedeño-Cruz y Alvarez-Jacobs, 1999) y está constituido principalmente por ~44% celulosa, ~21% hemicelulosa y ~16% lignina (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Composición en peso seco (%) del bagazo de *Agave tequilana* Weber var. azul.

<b>Celulosa</b>	<b>Hemicelulosa</b>	<b>Lignina</b>	<b>Fuente</b>
45.6	22.8	19.3	(Perez-Pimienta et al., 2013)
43	19	15	(Cedeño-Cruz y Alvarez-Jacobs, 1999)
42	20	15	(Saucedo-Luna et al., 2011)
44.19	22.56	14.86	(Abreu-Sherrer, 2013)

Estas propiedades hacen del bagazo de agave una materia prima atractiva para la producción de biocombustibles ya que presenta una mayor proporción de celulosa y un menor contenido de lignina en comparación con otros residuos lignocelulósicos como la paja de avena que contiene 37% de celulosa (Nkemka y Murto, 2013) o bagazo de caña de azúcar que generalmente presenta 20-30% de lignina (Rai et al., 2014). Además de que las agavaceas presentan resistencia a sequías debido a su alta eficiencia en el uso del agua y una alta tasa de crecimiento, lo que les brinda ventajas particulares con respecto a otros cultivos (Li et al., 2012).

### 1.2.2 Pretratamientos

Hoy en día se cuenta con una gran variedad de estrategias desarrolladas con el fin de atacar la lignina presente en la biomasa lignocelulósica y/o la solubilización de la hemicelulosa. Para el caso de los biocombustibles, el uso de estas estrategias pretende disminuir la recalcitrancia de la lignina para así aumentar la digestibilidad de la holocelulosa. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y severidad del pretratamiento, junto con los azúcares solubilizados se suelen generar diversos compuestos tales como fenoles, derivados de furanos y/o ácidos orgánicos (Figura 1.2), los cuales han sido reportados como inhibitorios (Monlau et al., 2014). Los

pretratamientos se pueden dividir en tres grandes grupos: térmicos, químicos y fisicoquímicos.

Entre los pretratamientos térmicos se encuentran la pirólisis, pretratamiento con vapor y explosión con vapor. Por lo general estas técnicas demandan grandes cantidades de energía para alcanzar presiones de 0.7-4.8 MPa y temperaturas de 160-300°C. Sin embargo, las altas presiones y temperaturas utilizadas en estos procesos pueden llegar a hidrolizar la hemicelulosa y parte de la celulosa amorfa, modificar la lignina, así como disminuir el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa (Singh et al., 2014).

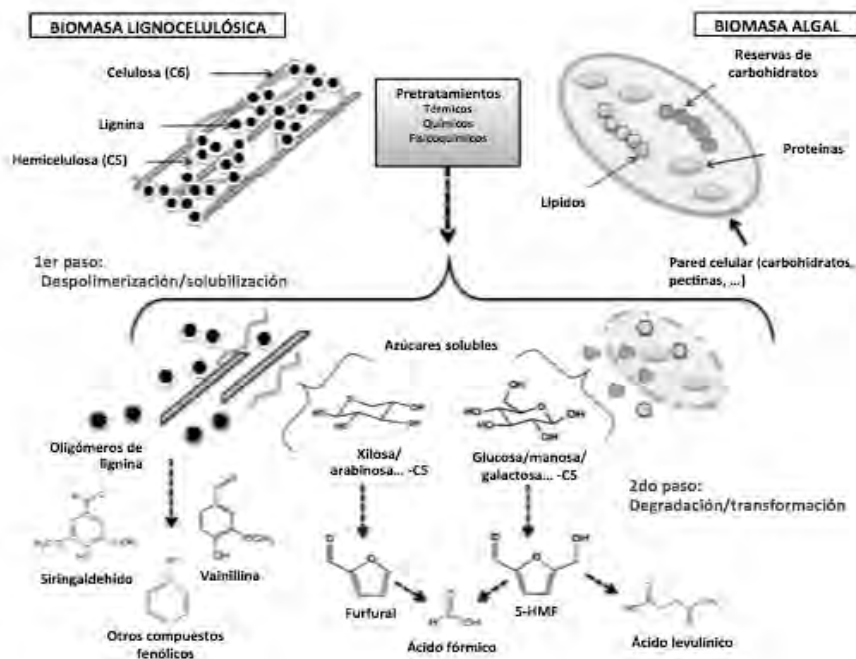


Figura 1.2 Generación de compuestos inhibidores durante pretratamiento. Adaptada de Monlau et al. (2014).

Los pretratamientos químicos incluyen el uso de soluciones ácidas, alcalinas, entre otras. Los pretratamientos ácidos atacan principalmente a la hemicelulosa, aunque también pueden alterar la estructura de la lignina y aumentar el área superficial accesible (Mosier et al., 2005). Las soluciones ácidas diluidas son ampliamente utilizadas debido a que permiten alcanzar altos rendimientos de

azúcares provenientes de la hemicelulosa (75-90% de xilosa) resultando en fracciones líquidas ricas en xilosa (Singh et al., 2014). La hidrólisis alcalina saponifica los enlaces éster entre las hemicelulosas y la lignina, además de que se hidrolizan los acetatos y ácidos urónicos de la hemicelulosa (desacetilación), por lo que disuelve parcialmente la hemicelulosa y lignina, aumentando así la porosidad de la matriz, la superficie específica, la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas y la digestibilidad de los carbohidratos (Prinsen, 2013; Hernández-Salas et al., 2009). Sin embargo, la formación de compuestos inhibitorios como derivados de furanos y compuestos fenólicos son la principal desventaja de los pretratamientos químicos (Monlau et al., 2013). Finalmente, la oxidación húmeda, irradiación con microondas y explosión de fibras con amonio (AFEX) son ejemplos de los pretratamientos fisicoquímicos. Algunos de estos pretratamientos pueden alterar la estructura y cristalinidad de la celulosa al modificar o remover los puentes de hidrógeno que unen las cadenas de celulosa (Mosier et al., 2005).

La naturaleza del tratamiento tiene un efecto significativo sobre los procesos de hidrólisis de la celulosa, así como durante la fermentación en la producción de biocombustibles. En este sentido, los mayores rendimientos en la producción de hidrógeno (2.84-3.0 mol H<sub>2</sub>/mol hexosa) se han obtenido utilizando hidrólisis ácida y explosión con vapor en medio ácido (Nissilä et al., 2014).

### 1.2.3 Hidrólisis enzimática

Una vez que el arreglo natural de la matriz lignocelulósica ha sido desestabilizado en la etapa de pretratamiento, la celulosa se encuentra más accesible para su hidrólisis por medio de enzimas celulasas. Las celulasas son una mezcla de enzimas endoglucanasas, exoglucanasas y celobiohidrolasas que actúan sinérgicamente en la fragmentación de la celulosa hasta celobiosa. En la mayoría de las mezclas comerciales se suelen agregar  $\beta$ -glucosidasas a este conjunto de enzimas para completar la hidrólisis de celobiosa a glucosa ayudando también a evitar una inhibición por producto.

La hidrólisis enzimática presenta ciertas ventajas como un alto rendimiento de azúcares, condiciones moderadas de operación y despreciable o nula generación

de inhibidores (Ren et al., 2009). Sin embargo, el pretratamiento de la lignocelulosa suele ser necesario para una eficiente hidrólisis enzimática, ya que el contenido de lignina, el grado de acetilación y el índice de cristalinidad (ICr) han sido relacionados con la digestibilidad de la lignocelulosa (Chang y Holtzapfle, 2000; Mosier et al., 2005). La deslignificación y la desacetilación disminuyen las barreras físicas que limitan la difusión de las enzimas en la matriz lignocelulósica, así como la adsorción de enzimas a superficies no productivas, por lo que ambos impactan en el rendimiento final de azúcares; el ICr tiene un mayor impacto en la efectividad de las enzimas adsorbidas en la celulosa, disminuyendo principalmente la velocidad inicial de hidrólisis pero no el rendimiento final (Chang y Holtzapfle, 2000).

### **1.3 Producción de hidrógeno**

El hidrógeno ( $H_2$ ) se puede obtener por medios termoquímicos, electroquímicos y biológicos, siendo actualmente los procesos termoquímicos los más utilizados; se estima que alrededor del 48% del hidrógeno producido a nivel mundial es generado a partir de gas natural, 30% de petróleo, 18% de carbón y tan sólo 4% por la electrólisis del agua (Koniczny et al., 2008).

Las tecnologías termoquímicas han sido ampliamente utilizadas desde los años sesentas y continúan liderando el mercado debido a su bajo costo de producción en comparación con su obtención a partir de biomasa (Balat y Balat, 2009). Sin embargo, estos procesos demandan altas presiones y/o temperaturas de operación (hasta  $1300^{\circ}C$ ), lo que se traduce en un gran consumo de energía (Züttel, 2004). En este sentido, la producción de hidrógeno por medios biológicos representa una alternativa muy atractiva ya que demanda una menor cantidad de energía debido a que se lleva a cabo bajo presiones y temperaturas muy cercanas a las ambientales, además de que se pueden utilizar una gran variedad de residuos como materia prima (Singh y Wahid, 2015).

La fermentación oscura es una de las vías biológicas de producción de hidrógeno que ha recibido gran atención por la comunidad científica, ya que con este proceso se han obtenido velocidades volumétricas de producción de hidrógeno (VVPH) de

hasta 15 L H<sub>2</sub>/L-h (Wu et al., 2006), superando hasta por tres órdenes de magnitud a aquellas obtenidas con el resto de los procesos biológicos (Hallenbeck et al., 2012).

La producción de hidrógeno por fermentación oscura se lleva a cabo principalmente a partir de la degradación de carbohidratos (azúcares), ya que se ha reportado que los sustratos ricos en lípidos y/o proteínas no son adecuados para la producción de hidrógeno (Yasin et al., 2013). Los azúcares son oxidados por la vía glucolítica hasta piruvato, este intermediario central es utilizado para formar otros intermediarios involucrados en la generación de H<sub>2</sub>. Los microorganismos facultativos transforman el piruvato a formiato por la ruta piruvato-formiato liasa (PFL) sin generar equivalentes reductores, el cual es posteriormente convertido a H<sub>2</sub> bajo ambientes moderadamente ácidos permitiendo un rendimiento molar de hidrógeno (RMH) de 2 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa para este tipo de fermentación (Hallenbeck, 2009).

Los anaerobios estrictos a través de la vía piruvato-ferredoxina oxido reductasa (PFOR) convierten el piruvato a acetil-CoA y CO<sub>2</sub>, generando a su vez ferredoxina reducida (Fd<sub>red</sub>) que transfiere H<sup>+</sup> a las enzimas Fe-Fe o Ni-Fe hidrogenasas para la formación de 2 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa consumida (Figura 1.3). Adicionalmente, bajo condiciones particulares éstos microorganismos pueden acoplar la oxidación del NADH producido durante la glucólisis a la reducción de Fd<sub>ox</sub> para la producción de H<sub>2</sub> por la vía NADH-ferredoxina oxido reductasa (NFOR) produciendo 2 mol H<sub>2</sub> extras, para un rendimiento máximo teórico de 4 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa para los anaerobios estrictos (Hallenbeck, 2009; Hallenbeck et al., 2012).

En este sentido, la ruta metabólica que más favorece la producción de H<sub>2</sub> es a través de la generación de acetato, ya que la formación de otros metabolitos consume poder reductor que pudiera ser utilizado para la producción de H<sub>2</sub>; la producción de propionato, butirato, etanol, entre otros, consume NADH y previene la formación de Fd<sub>red</sub> y/o formiato, lo que resulta en rendimientos por debajo del máximo teórico (Lee et al., 2008). Es importante resaltar que la producción de H<sub>2</sub>

depende de diversos aspectos ambientales, algunos de los cuales se detallan en las siguientes secciones.

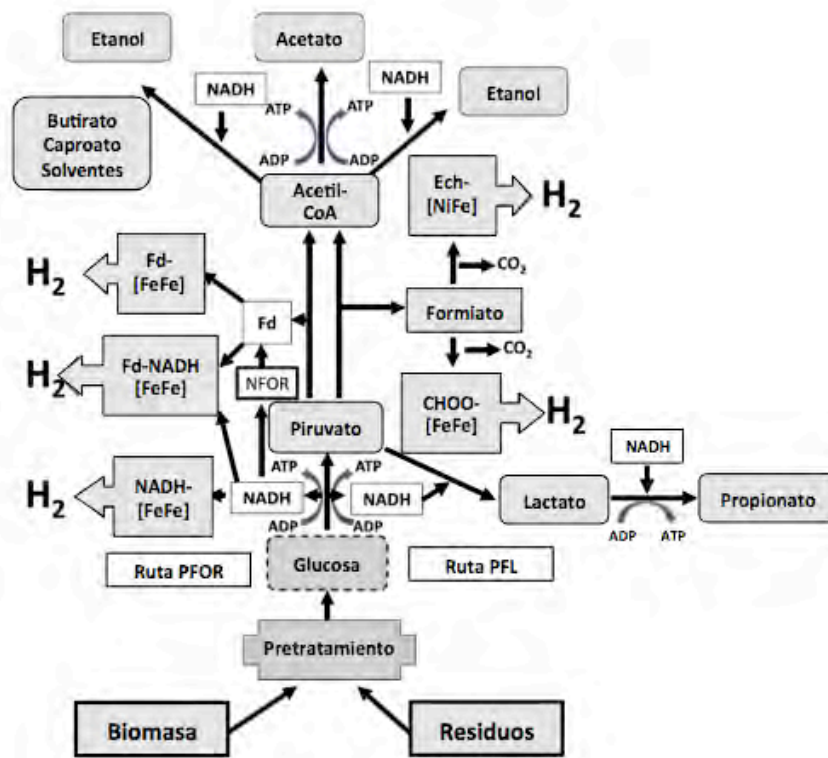


Figura 1.3 Esquema de las rutas metabólicas utilizadas por los microorganismos productores de hidrógeno. Modificada de Hallenbeck et al. (2012).

### 1.3.1 pH

El pH es uno de los factores más importantes en la fermentación oscura dado que el valor óptimo para cada proceso depende de la comunidad microbiana presente, además de que impacta en el grado de reducción de los metabolitos producidos y por tanto del hidrógeno generado, así como sobre la actividad y especies de hidrogenasas (Dinamarca y Bakke, 2011; Mohammadi et al., 2012). Las bacterias producen  $H_2$  durante la fase exponencial de su crecimiento provocando una acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) y una caída en el pH. Se ha observado que el pH óptimo para la producción de hidrógeno se encuentra en el intervalo de 5.0-6.0 (Davila-Vazquez et al., 2008; Yasin et al., 2013).

No obstante las condiciones de operación a las que se llevan a cabo estos procesos, se ha observado la producción de metano ( $CH_4$ ) incluso a valores de pH

por debajo de 5.0 (Kim et al., 2004), por lo que se ha propuesto operar a  $\text{pH} \leq 4.5$  para evitar este tipo de problemas. Además, a estos valores de pH se induce la ruta acetato-etanol que se ha sugerido puede aumentar la VVPH y la estabilidad del proceso con respecto a la fermentación acetato-butirato (Ren et al., 2007). Sin embargo, en un reactor UASB se observó una disminución de ~60% en la VVPH al disminuir el pH de 5.0 a 4.5 sin reducir la producción de  $\text{CH}_4$  (Carrillo-Reyes et al., 2014). La producción de etanol se favorece a pH 4.0-4.5 mientras que el butirato es más abundante a un pH ligeramente mayor; a pH alcalinos (pH 10) la producción de  $\text{H}_2$  no es termodinámicamente favorable (Lee et al., 2008), mientras que condiciones muy ácidas (pH <4.0) pueden dar pie a la solventogénesis, disminuyendo la producción de  $\text{H}_2$  debido al aumento en la proporción de ácidos no disociados y la disminución de ATP (Grupe y Gottschalk, 1992).

### 1.3.2 Tiempo de residencia hidráulico

El tiempo de residencia hidráulico (TRH) es inversamente proporcional a la tasa de dilución ( $D$ ). Se define como el tiempo en el que es desplazado el volumen de operación del reactor y está determinado por la relación volumen de reactor ( $V_R$ )/flujo de entrada ( $Q_{in}$ ). En sistemas de biomasa suspendida, el TRH influye en la composición de la microflora presente de acuerdo a las características cinéticas de cada grupo de microorganismos, en la que solamente permanecen las especies con una velocidad de crecimiento mayor o igual a la tasa de dilución ( $\mu_{max} \geq D$ ). La  $\mu_{max}$  de las metanogénicas acetoclásticas e hidrogenotróficas se encuentra entre  $0.0125\text{-}0.058 \text{ h}^{-1}$  y  $0.019\text{-}0.144 \text{ h}^{-1}$  (Demirel y Scherer, 2008; Rittmann y McCarty, 2001), respectivamente. Mientras que para cultivos productores de  $\text{H}_2$  se ha determinado una  $\mu_{max}$  de  $0.172\text{-}0.5 \text{ h}^{-1}$  (Chen et al., 2001; Show et al., 2010). Generalmente la producción de  $\text{H}_2$  se favorece a  $D$  cercanas a la  $\mu_{max}$  (TRH~6h), mientras que la operación a  $\text{TRH} \leq 4 \text{ h}$  puede llevar a un lavado celular (Davila-Vazquez et al., 2009; Arooj et al., 2008).

En los reactores de alta tasa, los microorganismos se adhieren a un material de soporte o bien crecen en forma de gránulos, por lo que el tiempo de retención celular (TRS) y el TRH se encuentran desacoplados. Esta diferencia permite



aplicar TRH más cortos ( $D > \mu_{max}$ ) sin experimentar lavado celular. Sin embargo, aumentar el TRS puede favorecer la aparición de microorganismos de lento crecimiento como metanogénicas y bacterias del ácido propiónico (Hawkes et al., 2007). Las mayores velocidades de producción de  $H_2$  en reactores de alta tasa se han obtenido a TRH de 0.25-2 h (Jung et al., 2011).

### 1.3.3 Carga orgánica volumétrica

La carga orgánica volumétrica (COV) define la cantidad de sustrato alimentado a un cierto volumen de reactor por unidad de tiempo, la cual se ve modificada mediante la variación del TRH y de la concentración de sustrato en la alimentación. La velocidad de producción de  $H_2$  está directamente relacionada con la cantidad de sustrato disponible. Sin embargo, COV altas pueden provocar inhibición por sustrato o por producto. La acumulación de AGV no disociados puede inhibir la producción de  $H_2$  durante la fermentación oscura. Grupe y Gottschalk (1992) observaron una concentración de 46 mM de ácidos no disociados durante el cambio a solventogénesis en un cultivo continuo de *Clostridium acetobutylicum*, mientras que en cultivos mixtos este cambio de ruta se ha presentado a concentraciones de 19 mM de ácidos no disociados (Van Ginkel y Logan, 2005).

### 1.3.4 Presión parcial de hidrógeno

Un factor clave en la fermentación oscura es la presión parcial de hidrógeno ( $P_{H_2}$ ), ya que limita termodinámicamente la reacción de la hidrogenasa. El  $H_2$  se forma mediante la transferencia de electrones desde  $Fd_{red}$  (PFOR) y NADH (NFOR) hacia la enzima hidrogenasa que cataliza la reducción de  $H^+$  para dar lugar al hidrógeno molecular. La producción espontánea de  $H_2$  por la vía NFOR requiere concentraciones bajas de  $H_2$  ( $P_{H_2} < 60$  Pa) a diferencia de la producción por PFOR (Angenent et al., 2004). A  $P_{H_2} > 60$  Pa existe un cambio de ruta metabólica hacia la generación de butirato (Angenent et al., 2004) lo que disminuye el RMH a 2 mol  $H_2$ /mol glucosa.

Además,  $P_{H_2} > 500$  Pa favorecen la actividad homoacetogénica en reactores anaerobios (Demirel y Scherer, 2008), por lo que se han evaluado diversas

estrategias para disminuir la  $P_{H_2}$  como agitación alta, implementación de vacío, burbujeo de  $N_2$  y/o  $CO_2$ . Sin embargo, éstas solo permiten mejorar ligeramente (40-70%) el RMH (Kim et al., 2006; Kraemer y Bagley, 2006) e implican un incremento en los costos de producción.

#### 1.4 Configuraciones de reactor

Los reactores más comúnmente utilizados en la fermentación oscura son los reactores de tanque agitado (CSTR) y de lote secuencial (ASBR). Sin embargo, como se puede ver en la Tabla 1.2, la configuración del reactor tiene un gran impacto en el desempeño del proceso, por lo que recientemente ha crecido la investigación sobre la evaluación de diferentes configuraciones de reactores de alta tasa, ya que permiten retener altas concentraciones de biomasa y operar a TRH cortos.

Tabla 1.2 Velocidades de producción de hidrógeno reportadas en la literatura\* de acuerdo a la configuración de reactor.

Reactor	VVPH típica (L H <sub>2</sub> /L-d)	VVPH máxima (L H <sub>2</sub> /L-d)
ASBR	1.2-4.0	6.7
CSTR	0.9-10.8	28.2
CIGSB	7.3-8.5	189.36
PBR	31.7-38.4	40.56
UASB	0.7-6.0	11.6
EGSB	1.6-4.2	17.0
FBR	2.3-56.7	182.4

\*Datos obtenidos de Jung et al., 2011; Davila-Vazquez et al., 2008; Show et al., 2011.

ASBR: reactor anaerobio de lote secuencial. CSTR: reactor de tanque agitado. CIGSB: reactor de tanque agitado con lodo inmovilizado. PBR: reactor de lecho empacado. UASB: reactor de lecho granular de flujo ascendente. EGSB: reactor de lecho granular expandido. FBR: reactor de lecho fluidificado.

Entre los reactores de alta tasa más utilizados en la producción de  $H_2$  se encuentran los reactores de lecho granular de flujo ascendente (UASB), reactores de lecho granular expandido (EGSB), reactores de lecho empacado (PBR), de lecho fluidificado (FBR), los reactores de tanque agitado con lodo inmobilizado (CIGSB), entre otros. Otras configuraciones menos estudiadas son los reactores de filtro percolador (TBR) (Sección 1.4.2), los reactores anaerobios de baffles (ABR) (Li et al., 2007) y otros desarrollados recientemente (reactor anaerobio de disco) como esfuerzos para disminuir la inhibición por altas  $P_{H_2}$  (Hilgsmann et al., 2014). Los reactores enlistados en la Tabla 1.2, además del TBR, se muestran en la Figura 1.4.

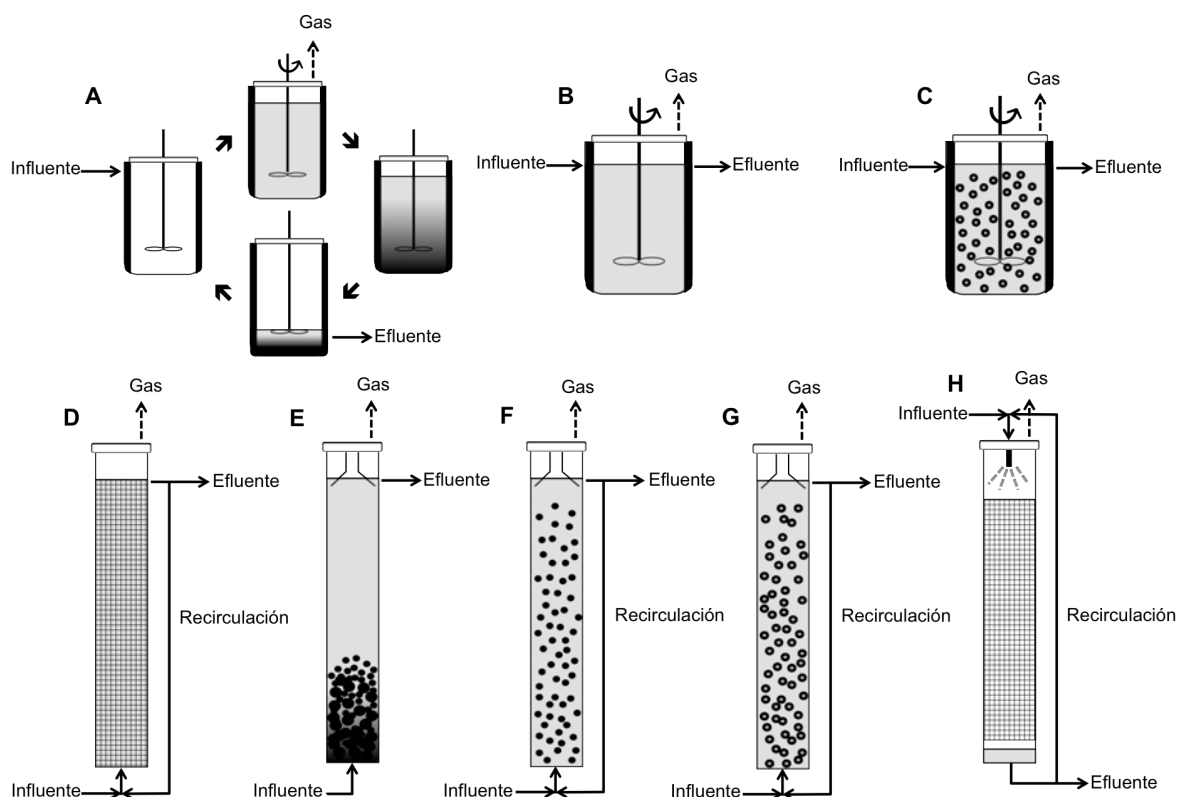


Figura 1.4 Diferentes reactores utilizados en la producción de hidrógeno por fermentación oscura. A – Reactor anaerobio de lote secuencial (ASBR); B – Reactor de tanque agitado (CSTR); C – Reactor de tanque agitado con lodo inmobilizado (CIGSB); D – Reactor de lecho empacado (PBR); E – Reactor de lecho granular de flujo ascendente (UASB); F – Reactor de lecho granular expandido (EGSB); G – Reactor de lecho fluidificado (FBR); H – Reactor de filtro percolador (TBR).

#### 1.4.1 Reactor de tanque agitado

De los sistemas en continuo, el CSTR es el más utilizado para la producción de hidrógeno. Estos sistemas se encuentran completamente agitados, lo que facilita la disponibilidad del sustrato para los microorganismos y permite estudiar aspectos cinéticos de los cultivos productores de  $H_2$ . Con esta configuración se han obtenido VVPH máximas de 26.9 L  $H_2$ /L-d y 33.6 L  $H_2$ /L-d a partir de glucosa y suero de leche en polvo, respectivamente (Show et al., 2011; Davila-Vazquez et al., 2009). Algunos autores han promovido la formación de gránulos durante la operación de CSTR, lo que ha resultado en VVPH superiores (76.8 L  $H_2$ /L-d) (Zhang et al., 2007).

#### 1.4.2 Reactor de filtro percolador

El reactor de filtro percolador (trickling bed reactor; TBR) es un reactor en donde los microorganismos se adhieren a un soporte colocado a lo largo de una columna. El sustrato es asperjado desde la parte superior del reactor, formando una delgada capa sobre la biopelícula lo que permite una rápida liberación del  $H_2$  producido hacia la fase gas, disminuyendo así el efecto negativo ocasionado por las altas presiones parciales de  $H_2$  en comparación con otros sistemas. Recientemente se demostró que la transferencia de masa puede ser casi 4 veces mayor en un TBR en comparación con un CSTR burbujeado con  $N_2$  (Orgill et al., 2013). Existen pocos estudios sobre la producción de hidrógeno en este tipo de reactores. No obstante, se ha observado que esta configuración permite la obtención de altas VVPH (252 L  $H_2$ /L-d) (Jeon et al., 2008) y corrientes gaseosas con contenidos de  $H_2$  de hasta 74-83% (Zhang et al., 2006; Puhulwella et al., 2014).

Sin embargo, Arriaga et al. (2011) observaron que un crecimiento excesivo de biomasa puede afectar la producción de  $H_2$  en este tipo de reactores, aumentando la  $P_{H_2}$  y desviando la ruta hacia la producción de propionato. Arreola-Vargas et al. (2014) probaron que un arreglo vertical de tubería de polietileno permitió operar por largos periodos de tiempo sin observar problemas de taponamiento.

## CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El crecimiento de la industria tequilera trae consigo un aumento en la generación de residuos lignocelulósicos, alrededor de  $3.6 \times 10^5$  ton/año de bagazo de agave con un alto contenido de azúcares solubilizables, amplia disponibilidad y bajos costos de obtención, por lo que se considera una materia prima muy atractiva para la producción de biocombustibles.

Hasta el momento el aprovechamiento de este recurso se ha estudiado principalmente en pruebas en lote encaminadas a la producción de bioetanol (Hernández-Salas et al., 2009; Saucedo-Luna et al., 2011; Arrizon et al., 2012; Caspeta et al., 2014). Sin embargo, a pesar de que la producción de bioetanol es un proceso comprobado, los microorganismos utilizados no son capaces de utilizar azúcares de las hemicelulosas (Gírio et al., 2010) a diferencia de las bacterias productoras de hidrógeno (Ren et al., 2009).

Hasta el momento, el único reporte disponible sobre el aprovechamiento del bagazo de agave para la producción de  $H_2$  es el trabajo realizado por Abreu-Sherrer (2013). Este autor realizó pruebas de potencial de producción de  $H_2$  a partir de diferentes hidrolizados de bagazo de agave, en las que observó un efecto negativo de los pretratamientos sobre el proceso de fermentación, obteniendo mayores producciones de  $H_2$  a partir de los hidrolizados enzimáticos del bagazo sin pretratamiento, por lo que concluyó que el tratamiento térmico que reciben las piñas de agave durante su cocción fue suficiente para acondicionar las fibras para la hidrólisis enzimática y la fermentación oscura, lo cual puede ser favorable para el balance energético y económico de la producción de  $H_2$  a partir de este residuo.

Por otra parte, la implementación de procesos en continuo para la producción de  $H_2$  resulta de gran interés para aplicaciones prácticas, ya que las rutas metabólicas podrían cambiar y por tanto mejorarse las producciones de  $H_2$  con respecto a aquellas observadas en los procesos en lote y discontinuos (Kumar et al., 2015). Además, la configuración del reactor puede llegar a tener un papel importante en el desempeño del proceso.

En este sentido, Abreu-Sherrer (2013) obtuvo VVPH de 1.74 L H<sub>2</sub>/L-d y RMH de 0.76 mol H<sub>2</sub>/mol sustrato al emplear hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave en un CSTR. No obstante, se han observado RMH (1.6 y 2.9 mol H<sub>2</sub>/mol hexosa consumida) y VVPH (1.95 L H<sub>2</sub>/L-d) superiores al utilizar otras configuraciones, como el TBR, a partir de hidrolizados lignocelulósicos (Arriaga et al., 2011; Arreola-Vargas et al., 2015), lo que puede deberse a una menor P<sub>H<sub>2</sub></sub>. Sin embargo, no es posible hacer una comparación directa entre estos estudios debido a diferencias sustanciales en la fase experimental. En consecuencia, resulta necesario llevar a cabo experimentos bajo condiciones análogas para poder comparar el desempeño en la producción de H<sub>2</sub> de reactores con diferente configuración.

## **2.1 Hipótesis**

La alta transferencia de masa líquido-gas del reactor de filtro percolador (TBR) permitirá obtener mayores producciones de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave, en comparación con el reactor de tanque agitado (CSTR).

## **2.2 Objetivo general**

Estudiar la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave en sistemas continuos con configuraciones de reactor y capacidades de transferencia de masa líquido-gas distintas.

## **2.3 Objetivos específicos**

1. Estudiar el efecto de la carga orgánica volumétrica en la producción de hidrógeno en reactores CSTR y TBR alimentados con hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.
2. Analizar y comparar el desempeño de ambos reactores en función de la carga orgánica volumétrica.

## **CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Hidrólisis enzimática**

El bagazo de agave fue obtenido de Casa Herradura (Amatitán, Jalisco). El bagazo fue secado y reducido a un tamaño de fibra de 2-4 cm de longitud. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo de acuerdo a Abreu-Sherrer (2013): el bagazo fue suspendido al 4% (w/v) en una solución buffer de citratos 50 mM (6.7 g  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  y 5.3 g  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) ajustando el pH a 4.5 con NaOH. Subsecuentemente, se añadieron 0.82 ml de mezcla enzimática (Celluclast 1.5L) por cada gramo de bagazo y se colocó en agitación continua a 100 rpm y 45°C durante 10 h.

### **3.2 Inóculo**

El inóculo utilizado fue lodo anaerobio de un reactor escala piloto utilizado en el tratamiento de vinazas tequileras (CUCEI-Universidad de Guadalajara). Dicho lodo fue tratado térmicamente a 105°C por 12 horas, disgregado con ayuda de un mortero y sometido por segunda ocasión al tratamiento térmico para asegurar la eliminación de microorganismos no esporulantes. El contenido de sólidos del lodo inicial fue de 26.9 g SST/L y 19.9 g SSV/L.

### **3.3 Medio mineral**

El medio mineral utilizado fue modificado de Arreola-Vargas et al. (2013), el cual estuvo compuesto por (g/L):  $NH_4H_2PO_4$ , 4.5;  $Na_2HPO_4$ , 0.635;  $K_2HPO_4$ , 0.125;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.1;  $ZnCl_2$ , 0.075;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.025;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.009;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.005.

### **3.4 Experimentos en reactor de tanque agitado**

Se utilizó un CSTR de PVC con un volumen total de 3 L y un volumen de reactor ( $V_R$ ) de 2.8 L, operando con mezclado hidráulico a un flujo de recirculación de 8 L/min. El reactor se operó en lote durante el arranque, inoculándose con 4.5 g SSV/L de lodo tratado térmicamente y añadiendo una solución de hidrolizados enzimáticos a una concentración de demanda química de oxígeno (DQO) de 10

g/L ajustando el pH inicial a 7 con NaOH. La operación en continuo se inició una vez que los azúcares fueron consumidos. El aumento de COV se realizó a un TRH constante de 6 horas mediante el aumento de la concentración de sustrato en el alimento. El CSTR se operó durante 68 días en siete periodos bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.1, utilizando tres lotes de bagazo de agave distintos (todos provenientes de Casa Herradura) para la obtención de los hidrolizados.

Tabla 3.1 Estrategia de operación de CSTR.

Periodo	Días	Concentración de sustrato		COV		pH	Lote de bagazo
		(g DQO/L)	(g AT/L)	(g DQO/L-d)	(g AT/L-d)		
I	1-19	10	2.3	39.9	9.2	4.6	
II	20-22	15	3.5	60.3	14	4.6	1
III	23-29	10	2	40.2	8.6	4.6	
IV	30-44	10	2.2	40.4	8.1	4.6	2
V	45-60	11	2.1	44.1	9.1	5.5	
VI	61-63	11	3.7	44.1	14.8	5.5	3
VII	64-68	13	4.2	52.2	16.6	5.5	

El proceso fue instrumentado para el seguimiento en línea de la conductividad, pH, temperatura y ORP en la fase líquida, además del flujo ( $\mu$ Flow, Bioprocess Control) y contenido de H<sub>2</sub> (BCP-H2, Bluesens) del gas producido (Figura 3.1). Estos datos fueron recolectados por medio del software LabView 2009 y almacenados en un equipo NI cRIO 9074 (National Instruments). El pH se controló entre 4.6-5.5 mediante la adición automatizada de NaOH con una bomba dosificadora (DDA, Grunfos Alldos). La temperatura se controló en 37°C con una chaqueta de agua y el flujo de alimentación se mantuvo en 7.8 ml/min para conservar un TRH constante de 6 horas.



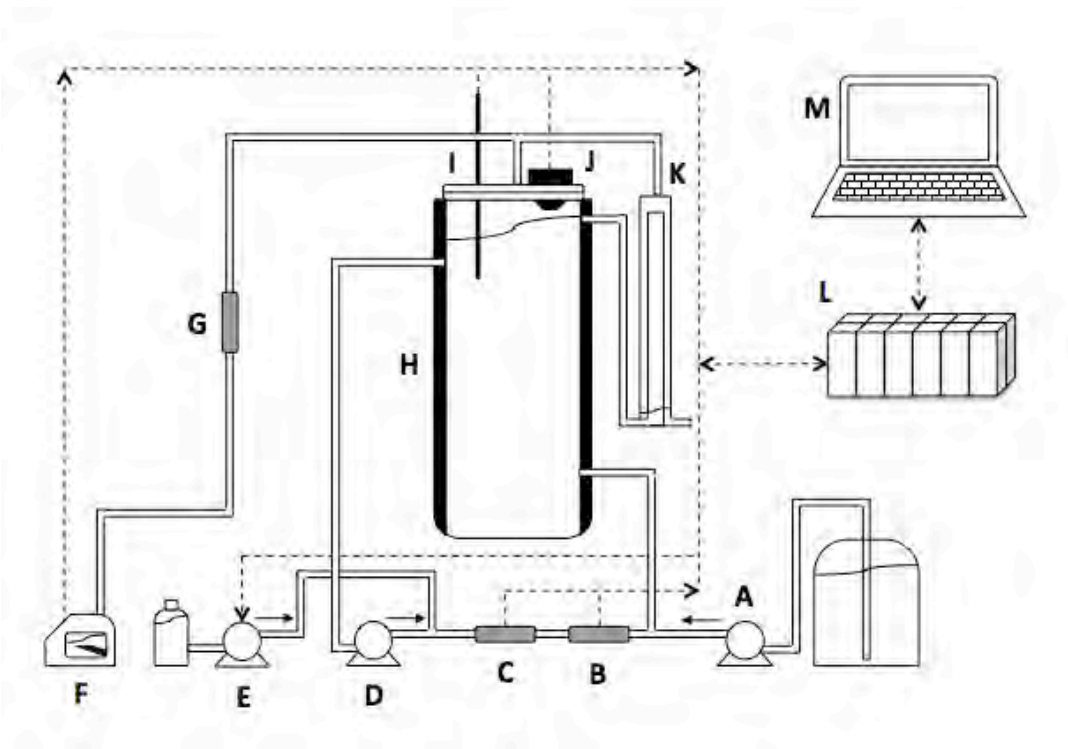


Figura 3.1 Esquema de CSTR: A – Bomba de alimentación; B – Sensor de conductividad; C – Sensor de pH; D – Bomba de recirculación; E – Bomba de adición de NaOH; F – Medidor de flujo de biogás; G – Puerto de muestreo de gas; H – Chaqueta de agua; I – Termopar; J – Sensor de presión; K – Separador líquido-gas; L – Equipo de control NI-cRIO; M – Computadora.

### 3.5 Experimentos en reactor de filtro percolador

Se utilizó un TBR de acrílico conformado por tres módulos, los cuales contaban con un diámetro interno ( $D_{in}$ ) de 6.5 cm y 30 cm de longitud, además de un recipiente de almacenamiento con capacidad de 500 ml, sumando un volumen total de 3.5 L. Los módulos se empacaron con tubería de polietileno (PE) organizada verticalmente tal como se puede ver en la Figura 3.2, ya que este arreglo permite operar por largos periodos de tiempo sin observar acumulación excesiva de biomasa (Arreola-Vargas et al., 2015). La tubería tuvo un  $D_{in}$  de 10 mm, la cual fue seccionada a longitudes de 10.7 (módulo I) y 27.5 cm (módulos II y III) resultando en un volumen empacado de 2.17 L y un volumen efectivo (fracción vacía,  $\epsilon=0.69$ ) de 1.5 L, éste último fue considerado como el volumen de reactor ( $V_{R^*}$ ).

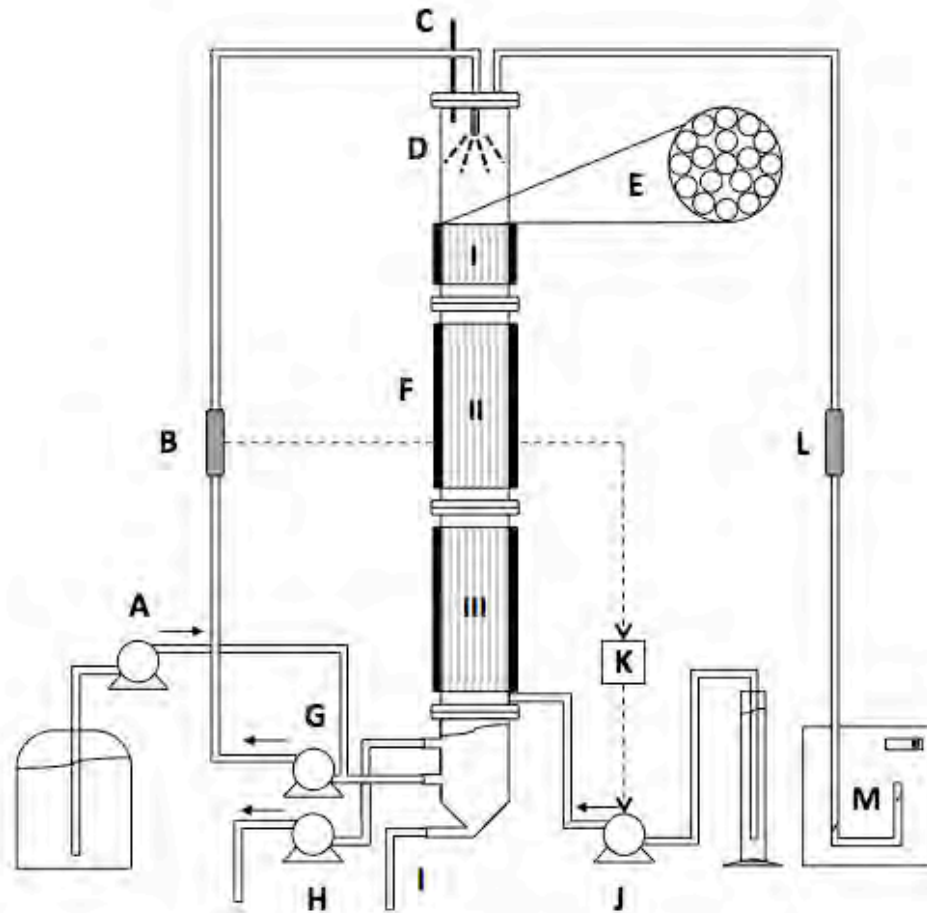


Figura 3.2 Esquema de TBR: A – Bomba de alimentación; B – Sensor de pH; C – Termómetro; D – Aspersor de líquido; E – Tubería de PE; F – Chaqueta de agua; G – Bomba de recirculación; H – Bomba de efluente; I – Puerto de purga; J – Bomba de adición de NaOH; K – Controlador de pH; L – Puerto de muestreo de gas; M – Medidor de volumen de gas.

El TRH se estableció mediante la prueba de determinación de tiempos de residencia (DTR) utilizada anteriormente en un biofiltro (Arellano-García et al., 2014), con la que se estimó un volumen de hold-up de 60 ml, para un volumen total de líquido ( $V_{liq}$ ) de 665 ml. La prueba de DTR se realizó a flujos de alimentación y de recirculación de 4.4 ml/min y 180 ml/min, respectivamente, resultando en un TRH experimental de 2.57 h, muy cercano al TRH de 2.52 h calculado teóricamente dividiendo el volumen total de líquido entre el flujo de alimentación ( $V_{liq}/Q_{in}$ ). Durante la operación, el flujo de recirculación se fijó en 180 ml/min y la alimentación en 1.8, 2.8 y 5.5 ml/min para los TRH de 6, 4 y 2 horas,

antes de ser recirculado mediante la adición automatizada de NaOH con una bomba peristáltica (Masterflex) controlada por un equipo HANNA Instruments HI 8710E y un temporizador. La temperatura se mantuvo en 37°C con una chaqueta de agua.

El arranque se realizó en lote, inundando completamente el empaque del reactor con una solución que contenía medio mineral e hidrolizado a una concentración inicial de 10 g DQO/L y ajustando a pH 7 con NaOH. Se inoculó con 2.265 g SSV/L de lodo tratado térmicamente. La operación en continuo se inició una vez que los azúcares fueron consumidos, se drenó el líquido de los módulos y se comenzó a regar el lecho. El TBR se operó durante 87 días en diez periodos bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.2, controlando el pH en 5.5.

Tabla 3.2 Estrategia de operación de TBR.

Periodo	Días	Concentración de sustrato		COV		TRH (h)
		(g DQO/L)	(g AT/L)	(g DQO/L-d)	(g AT/L-d)	
I	1-17	10	2.7	17.3	4.7	
II	18-29	12.5	3.9	21.6	6.7	
III	30-36	15	4.4	26	7.6	6
IV	37-49	20	5.4	34.6	9.3	
V	50-61	30	7.4	52.9	12.8	
VI	62-68	20	5	34.6	8.6	
VII	69-72	20	4.9	52.9	13.2	4
VIII	73-75	10	3	52.9	16.1	2
IX	76-83	20	6	34.6	10.4	6
X	84-87	20	5.5	34.6	9.5	

### 3.6 Evaluación del desempeño en la producción de hidrógeno

La evaluación del desempeño de cada reactor se realizó en base a los RMH y VVPH como variables de respuesta en relación a la COV. En la Tabla 3.3 se presentan las ecuaciones utilizadas para calcular la producción de H<sub>2</sub>, el TRH y la COV.

La principal diferencia entre los reactores es con respecto a V<sub>R</sub> y V<sub>liq</sub>, por lo que no se pueden utilizar las ecuaciones (3) y (5) para el TBR. Las ecuaciones correspondientes a la producción de H<sub>2</sub> tienen implicados flujos másicos (1) y volumétricos (2) independientes del volumen de líquido y/o volumen de trabajo.

Tabla 3.3 Ecuaciones utilizadas para la evaluación del desempeño de los reactores.

$$\text{RMH} = \left[ \frac{\text{mol H}_2 \text{ prod} / \text{t}}{\text{mol AT}_{\text{cons}} / \text{t}} \right] \times 0.6 \quad (1)$$

Donde:

- t=tiempo.
- 1 mol AT=1 mol glucosa.
- 0.6 es la corrección para la aportación de la enzima y citratos.
- V<sub>H<sub>2</sub>prod</sub>=volumen a condiciones estándar (0°C y 1 atm).
- V<sub>R</sub>=volumen de reactor CSTR.
- V<sub>R\*</sub>=volumen de reactor TBR.
- V<sub>liq</sub>=volumen total de líquido TBR.
- S<sup>0</sup>=concentración de sustrato en el alimento.
- Q<sub>in</sub>=flujo de alimentación.

$$\text{VVPH} = \frac{V_{\text{H}_2 \text{ prod}} / \text{t}}{V_R} \quad (2)$$

Para CSTR:

Para TBR:

$$\text{TRH} = \frac{V_R}{Q_{\text{in}}} \quad (3) \quad \text{TRH} \cong \frac{V_{\text{liq}}}{Q_{\text{in}}} \quad (4)$$

Debido a que V<sub>R</sub> ≠ V<sub>liq</sub> para TBR:

$$\text{COV} \neq \frac{S^0}{\text{TRH}} \quad (5) \quad \therefore \text{COV} = \frac{S^0 \times Q_{\text{in}}}{V_{R*}} \quad (6)$$

Aunque en algunos periodos de operación se alimentó la misma concentración de sustrato ( $S^0$ ) en ambos reactores, la COV fue diferente. Los RMH reportados están corregidos para la aportación (40%) hacia la producción de  $H_2$  por parte de la mezcla enzimática Celluclast 1.5L y el buffer de citratos (Abreu-Sherrer, 2013). Las VVPH se reportan en condiciones estándar ( $0^\circ C$  y 1 atm).

La ec. 4 se utilizó para estimar los diferentes TRH ensayados durante la operación del TBR, ecuación que fue validada mediante la prueba de DTR. Para calcular la COV en el TBR (ec. 6) se utilizó el volumen de reactor ( $V_{R^*}$ ) definido anteriormente como la fracción vacía del volumen empacado (Sección 3.5), sin sustituir el TRH (ec. 4) en dicha ecuación.

De manera adicional, el seguimiento de los reactores se realizó mediante el análisis rutinario de la composición del biogás. Asimismo, se tomaron muestras diarias del efluente para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), demanda química de oxígeno (DQO), azúcares totales y sólidos suspendidos.

### **3.7 Métodos analíticos**

La determinación de DQO, sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) se realizó por métodos estándar (APHA, 1998), mientras que la determinación de azúcares totales (AT) se realizó por el método fenol-sulfúrico (DuBois et al., 1956).

Para el CSTR, la composición del gas producido se midió mediante cromatografía de gases en un equipo GC Perkin-Elmer Autosystem XL equipado con un detector de conductividad térmica, mientras que los AGV se determinaron por medio de un equipo HPLC Waters 600, ambos métodos descritos anteriormente (Méndez-Acosta et al., 2011).

En el caso del TBR, la composición del gas se midió con un equipo GC 6890N Network GC System Agilent Technology equipado con un detector de conductividad térmica como se ha descrito anteriormente (Carrillo-Reyes et al., 2012) y los AGV determinados mediante electroforesis capilar con un equipo Agilent 1600A con el método descrito anteriormente (Davila-Vazquez et al., 2008).

### 3.8 Balance de electrones

El balance de equivalentes de electrones (eq e<sup>-</sup>) en ambos reactores se calculó a partir de flujos máxicos (eq e<sup>-</sup>/d) mediante la ec. (7) modificada de Carrillo-Reyes et al. (2012):

$$e^{-}(\text{DQO}_{\text{in}}) = e^{-}(\text{metabolitos}) + e^{-}(\text{gas}) + e^{-}(\text{azúcares residuales}) + e^{-}(\text{biomasa}) + e^{-}(\text{N. D.}) \quad (7)$$

Donde: eq e<sup>-</sup>(DQO<sub>in</sub>) = eq e<sup>-</sup> provenientes de la alimentación (considerando 8 g DQO/eq e<sup>-</sup>); eq e<sup>-</sup>(metabolitos) = suma de los eq e<sup>-</sup> de cada metabolito producido; eq e<sup>-</sup>(gas) = eq e<sup>-</sup> del H<sub>2</sub> producido; eq e<sup>-</sup>(azúcares residuales) = eq e<sup>-</sup> de los azúcares totales medidos en el efluente; eq e<sup>-</sup>(biomasa) = eq e<sup>-</sup> de la biomasa medida como SSV; eq e<sup>-</sup>(N. D.) = eq e<sup>-</sup> no determinados, que resulta de la diferencia entre los eq e<sup>-</sup>(DQO<sub>in</sub>) y el resto de los términos de la ecuación.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Hidrolizados enzimáticos

Los hidrolizados enzimáticos utilizados durante la operación del CSTR se obtuvieron de tres lotes diferentes de bagazo de agave, los valores de  $DQO_{sol}$  y AT para los hidrolizados obtenidos de cada lote de bagazo se presentan en la Figura 4.1. En promedio, estos hidrolizados presentaron una  $DQO_{sol}$  de  $43.7 \pm 4.41$  g/L y AT de  $11 \pm 3.7$  g/L. En el caso del TBR, se utilizó un solo lote de bagazo de agave durante toda la operación, cuyos hidrolizados tuvieron concentraciones de  $41.5 \pm 3.1$  g  $DQO_{sol}$ /L y  $12.47 \pm 2.3$  g AT/L.

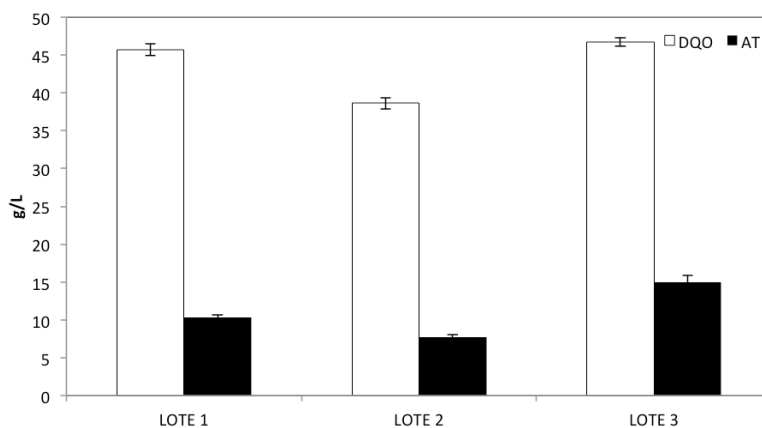


Figura 4.1 Características de los hidrolizados enzimáticos de los distintos lotes de bagazo utilizados en el CSTR.

Una de las principales diferencias encontradas entre los hidrolizados empleados en ambos reactores fue su contenido de AGV: mientras que para los hidrolizados utilizados en el CSTR la concentración de AGV totales fue de  $2.55 \pm 1.85$  g/L, en los correspondientes al TBR se detectaron  $0.31 \pm 0.1$  g/L. La presencia de concentraciones mayores de AGV en los hidrolizados utilizados en el CSTR indica que posiblemente el bagazo sufrió una ligera fermentación antes de ser sometido a la hidrólisis enzimática. De acuerdo a la Figura 4.2, los AGV representaron el 9% y el 1% de la DQO para los hidrolizados del CSTR y TBR, respectivamente. Los azúcares presentes en los hidrolizados representaron el 22-28% de la DQO, de la

cual la mayor parte (~60%) fue aportada por la mezcla enzimática utilizada para realizar la hidrólisis. Finalmente, los hidrolizados enzimáticos presentaron un contenido de sólidos de  $21.6 \pm 2.34$  g SST/L y  $15.5 \pm 1.7$  g SSV/L.

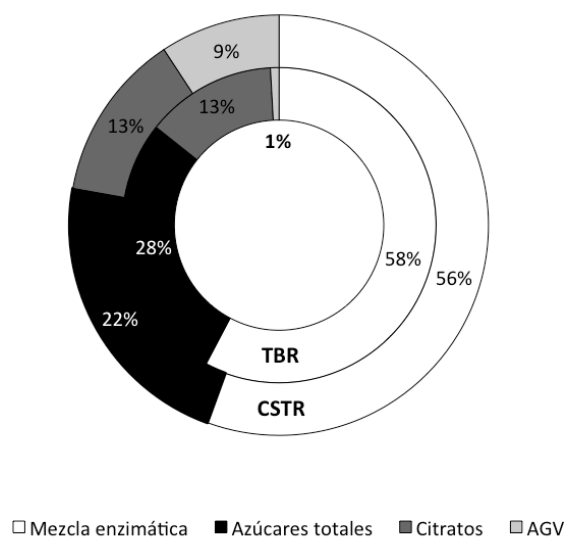


Figura 4.2 Balance de DQO para los hidrolizados utilizados en los reactores CSTR y TBR.

#### 4.2 Producción de hidrógeno en reactor de tanque agitado

El CSTR se arrancó en lote y después de 14 horas los azúcares llegaron a una concentración residual de 0.78 g/L, momento en el que se dio inicio a la operación en continuo manteniendo el pH en 4.6, esto último debido a que en arranques previos se observó la presencia de actividad metanogénica. El CSTR se operó durante 68 días en siete periodos bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.1. La remoción de azúcares promedio fue de  $77 \pm 7.2$ ,  $77 \pm 4.2$  y  $93 \pm 1\%$  para los hidrolizados obtenidos de los lotes 1, 2 y 3, respectivamente. La concentración de biomasa durante la operación del reactor fue de  $3.98 \pm 0.81$  g SSV/L y los AGV predominantes fueron acetato y butirato, metabolitos asociados a la producción de  $H_2$ , con presencia de lactato y propionato (<700 ppm) los cuales se producen mediante rutas que previenen la formación de  $H_2$  (Lee et al., 2008).

Durante el periodo I, la VVPH alcanzó un valor máximo de 2.49 L  $H_2$ /L-d en el día 11 (Figura 4.3a). Se consideró que el estado estacionario se alcanzaba al



observar al menos tres mediciones de VVPH consecutivas con una variación  $\leq 10\%$ . Bajo condiciones de estado estacionario se alcanzó una VVPH de 1.98 L H<sub>2</sub>/L-d, un RMH de 1.35 mol H<sub>2</sub>/mol azúcar consumido y un contenido de 35% de H<sub>2</sub> en balance con CO<sub>2</sub> en el gas. Los AGV predominantes durante este periodo fueron butirato (828 mg/L) y acetato (692 mg/L), mientras que el lactato y el propionato estuvieron presentes en bajas concentraciones (~100 mg/L).

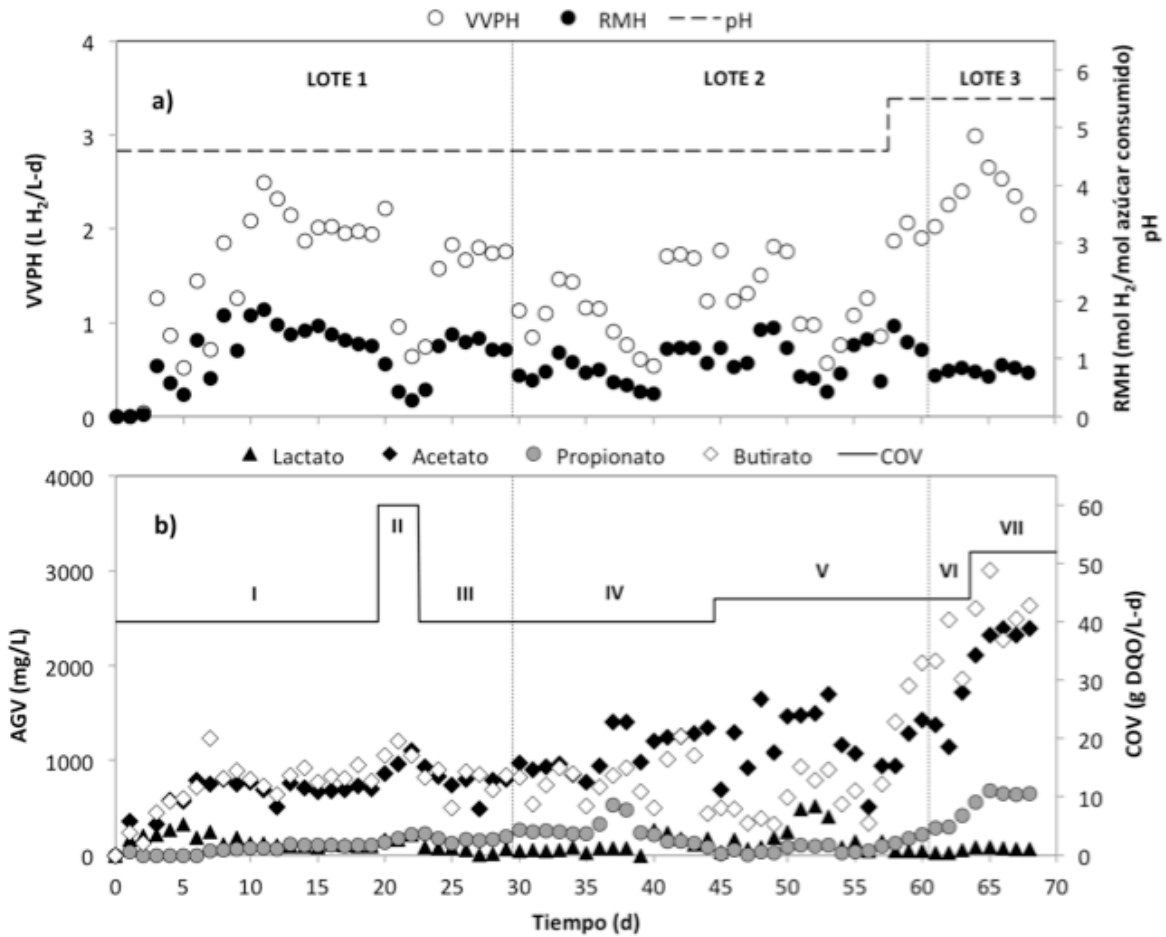


Figura 4.3 Desempeño del CSTR durante los distintos periodos de operación. a) Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH), rendimiento molar de hidrógeno (RMH) y pH; b) ácidos grasos volátiles (AGV) y carga orgánica volumétrica (COV).

Durante el periodo II se aumentó la COV a 60.3 g DQO/L-d, lo cual resultó en una disminución del 70% en la VVPH y 80% en el RMH con respecto al periodo I (0.64 L H<sub>2</sub>/L-d y 0.29 mol H<sub>2</sub>/mol azúcar consumido, respectivamente) en el día 22. El H<sub>2</sub>

representó el 15.4% del gas producido en este día. La Figura 4.3b muestra que a pesar de estas observaciones, los metabolitos predominantes durante este periodo fueron butirato y acetato, con una relación molar butirato/acetato (Bu/Ac) de 0.74, la cual fue similar a 0.82 del periodo I. Esta relación molar ha sido utilizada como indicador de la producción de  $H_2$  (Kim et al., 2006).

Teóricamente se producen 2 moles de  $H_2$  por cada mol de acetato o butirato producido, por lo que algunos autores han propuesto la relación molar  $H_2/(Ac+Bu)$  como un indicador de consumo de  $H_2$  en cultivos mixtos (Motte et al., 2014), en donde relaciones  $H_2/(Ac+Bu)$  menores a 2 sugieren la presencia de otras rutas metabólicas que consumen  $H_2$ . En este sentido, la relación  $H_2/(Ac+Bu)$  fue de 1.07 para el periodo I, lo que indica cierto consumo de  $H_2$ , mientras que en el periodo II cayó a 0.24 para el día 22. Esto sugiere que la disminución observada en los RMH y VVPH pudo deberse a un incremento abrupto en el consumo de  $H_2$  más que una inhibición en la generación del mismo.

Es preciso mencionar que durante los días 20-22 del periodo II se realizó la determinación de etanol y acetona, encontrándose en concentraciones menores a 150 mg/L (no se muestran los datos). Lo anterior debido a que el pH de operación (4.6) y el aumento en la concentración de ácidos no disociados pueden propiciar un cambio en la ruta metabólica hacia la solventogénesis (Van Ginkel y Logan, 2005; Kyazze et al., 2005). Sin embargo, las concentraciones de estos solventes fue muy baja.

Dados estos resultados, en el periodo III se decidió regresar a las condiciones iniciales obteniendo producciones similares al periodo I (1.74 L  $H_2$ /L-d y 1.24 mol  $H_2$ /mol azúcar consumido). En el periodo IV se alimentaron hidrolizados obtenidos de un segundo lote de bagazo de agave, los cuales mostraron un cambio en su composición lo que se vio reflejado en el desempeño del reactor provocando un comportamiento inestable. No obstante, durante los días 41-43 se obtuvieron producciones comparables a las obtenidas con el lote de bagazo inicial (1.59 L  $H_2$ /L-d y 1.12 mol  $H_2$ /mol azúcar consumido). Debido a la inestabilidad observada, resulta importante caracterizar más ampliamente los hidrolizados debido a que las

variaciones entre lotes de bagazo afectan considerablemente el desempeño del proceso.

Durante el periodo V se aplicó un aumento del 10% en la COV (44.1 g DQO/L-d) sin observar una mejora en el desempeño del reactor después de 12 días de operación. Es comúnmente aceptado que valores de pH entre 5.0 y 6.0 favorecen la producción de H<sub>2</sub> (Jung et al., 2011; Show et al., 2011; Davila-Vazquez et al., 2008), especialmente en el intervalo de 5.2-5.8 (Hawkes et al., 2007), por lo que en el día 58 se decidió incrementar el pH a 5.5. Este aumento de pH permitió una operación más estable en la que se observó un aumento en el contenido de H<sub>2</sub> de 27 a 33%, los RMH y VVPH fueron muy similares al periodo I. La producción de butirato incrementó durante los días 58-60 con concentraciones superiores a los periodos III y IV (1739 mg/L), tal como se observa en la Figura 4.3b. En la Tabla 4.1 se presentan las producciones de hidrógeno y AGV para cada periodo, en donde se puede observar que la concentración de acetato se mantuvo constante para los periodos IV y V, mientras que el butirato aumentó considerablemente, lo que se reflejó en un incremento en la relación Bu/Ac de 0.5 a 0.98, respectivamente.

En el periodo VI se utilizaron hidrolizados enzimáticos obtenidos de un tercer lote de bagazo, con los que se incrementó la VVPH a 2.23 L H<sub>2</sub>/L-d y se observó una disminución del RMH a 0.79 mol H<sub>2</sub>/mol azúcar consumido. El aumento en la VVPH estuvo acompañado de un incremento en la concentración de acetato y butirato, con una relación Bu/Ac de 1.08, similar a la del periodo V. Un último aumento de COV en el periodo VII propició una VVPH máxima de 2.99 L H<sub>2</sub>/L-d en el día 64 la cual disminuyó hasta 2.15 L H<sub>2</sub>/L-d en el último día de operación, resultando en un valor promedio de 2.53 L H<sub>2</sub>/L-d para el periodo VII. El RMH se mantuvo constante y la relación Bu/Ac disminuyó a 0.77, tal como se observa en la Tabla 4.1. Durante este periodo se observó un incremento en la producción de AGV, con el acetato en concentraciones similares al butirato, lo que indica que el aumento en la VVPH se debió a un incremento en la producción de AGV (acetato y butirato), más que a un aumento en la relación Bu/Ac como fue el caso del periodo VI.

Tabla 4.1 Desempeño de CSTR en la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.

Periodo	COV	AGV (mg/L)				Bu/Ac	Producción de H <sub>2</sub>		
	g DQO/L-d	Lactato	Acetato	Propionato	Butirato		H <sub>2</sub> (%)	VVPH (L H <sub>2</sub> /L-d)	RMH (mol H <sub>2</sub> /mol azúcar consumido)
I <sup>d</sup>	40.2	99 ± 11	692 ± 24	103 ± 4	828 ± 75	0.82	35.3	1.98 ± 0.04	1.35 ± 0.14
II <sup>a</sup>	60.3	191 ± 36	1030 ± 101	201 ± 28	1131 ± 106	0.76	18.1	0.8 ± 0.23	0.35 ± 0.1
III <sup>c</sup>	40.2	34 ± 29	721 ± 157	171 ± 19	816 ± 86	0.81	33.5	1.74 ± 0.05	1.24 ± 0.1
IV <sup>c</sup>	40.2	177 ± 49	1281 ± 46	127 ± 27	938 ± 348	0.5	32.1	1.59 ± 0.24	1.12 ± 0.13
V <sup>b</sup>	44.1	45 ± 3	1215 ± 250	174 ± 49	1739 ± 313	0.98	31.9	1.95 ± 0.11	1.34 ± 0.2
VI <sup>b</sup>	44.1	39 ± 17	1412 ± 290	333 ± 71	2128 ± 323	1.08	34.2	2.23 ± 0.19	0.79 ± 0.07
VII <sup>d</sup>	52.2	76 ± 11	2307 ± 117	637 ± 44	2601 ± 266	0.77	32.5	2.53 ± 0.32	0.79 ± 0.08

Valores promedio (± desviación estándar), a: n=2; b: n=3; c: n=4; d: n=5.

Aunque el butirato y el acetato predominaron durante toda la operación, la producción de hidrógeno no corresponde a la cantidad producida de estos metabolitos ( $H_2/(Ac+Bu) < 2$ ) lo que podría deberse a la producción de otros metabolitos más reducidos que no fueron contemplados en este estudio como propanol, ácido caprónico y/o valérico (Saady, 2013). Otras posibles explicaciones son la reducción de  $CO_2$  mediante la utilización de  $H_2$ , ya sea para formar acetato por homoacetogénesis o  $CH_4$  por metanogénesis hidrogenotrófica. Sin embargo, no se detectó  $CH_4$  en el gas producido, lo cual apuntaría hacia la homoacetogénesis. En reactores productores de  $H_2$  se puede realizar una estimación de la incidencia de la actividad homoacetogénica mediante las ecs. (8) y (9) planteadas por Luo et al. (2011):

$$Ac_{homoacet} = (2[Ac] + 2[Bu] - [Pro] - H_2)/6 \quad (8)$$

$$\% Ac_{homoacet} = \left( \frac{Ac_{homoacet}}{Ac_{total}} \right) \times 100 \quad (9)$$

Estas estimaciones presentaron una correspondencia ( $R^2=0.86$ ) con las relaciones  $H_2/(Ac+Bu)$  observadas en los diferentes periodos de operación (Figura 4.4), indicando la probabilidad de que esta ruta metabólica sea la causante del consumo de  $H_2$ . Aunque la presencia de homoacetogénesis en este tipo de reactores ha sido reportada a pH 4.5 y >5 (Hussy et al., 2003), es necesario realizar los estudios moleculares correspondientes para confirmar esta hipótesis.

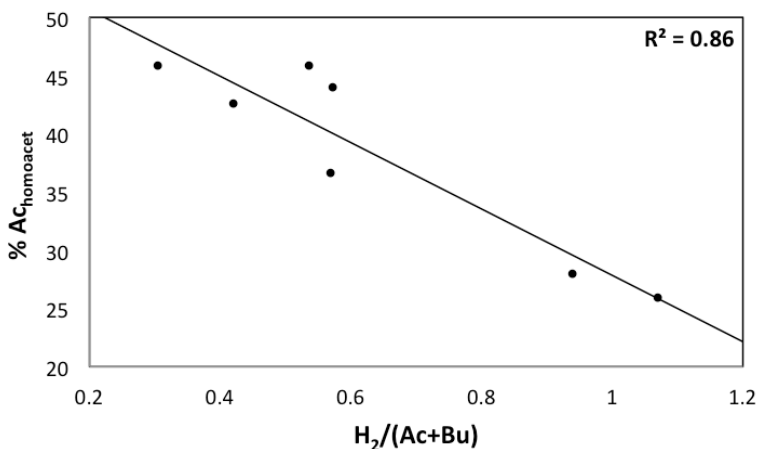


Figura 4.4 Relación entre  $\%Ac_{homoacet}$  y  $H_2/(Ac+Bu)$  observada en CSTR.

### 4.3 Producción de hidrógeno en reactor de filtro percolador

Durante el arranque, el TBR fue inundado y operado en lote durante 20 horas hasta que los azúcares alcanzaron una concentración residual de 1 g/L. Posteriormente, se vació la columna y se comenzó la operación en continuo. El TBR se operó durante 87 días en diez periodos bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.2, controlando el pH a 5.5. Durante la operación, la remoción de azúcares fue de  $82 \pm 7.5\%$ , el contenido de  $H_2$  en la fase gas estuvo entre 20-52% y la concentración de sólidos en el efluente fue de  $1.05 \pm 0.52$  g SSV/L. Las variaciones en el desempeño de los días 23-26 y 39-42 fueron causadas por fallos operacionales.

Durante el periodo I, la VVPH alcanzó valores máximos de 2.26 L  $H_2$ /L-d y un RMH de 2.69 mol  $H_2$ /mol azúcar consumido en el tercer día de operación (Figura 4.5a). El estado estacionario se considero al observar al menos tres mediciones de VVPH con una variación  $\leq 10\%$ . Bajo condiciones de estado estacionario, se obtuvieron VVPH y RMH de 0.28 L  $H_2$ /L-d y 0.34 mol  $H_2$ /mol azúcar consumido, respectivamente. Los AGV predominantes fueron acetato (2000 mg/L) y butirato (1718 mg/L), con una relación molar Bu/Ac de 0.59 y el propionato presente a una concentración de 118 mg/L sin detectarse lactato.

A diferencia de otros estudios en donde el arranque de este tipo de reactores ha requerido desde 10 hasta 89 días (Jeon et al., 2008; Arreola-Vargas et al.c 2015; Oh et al., 2004; Arriaga et al., 2011), en estos experimentos se observó una producción inmediata de biogás al comenzar la operación en continuo, con un contenido de  $H_2$  de 44-51% en la fase gas, en balance con  $CO_2$ . El crecimiento de la biopelícula sobre el soporte se hizo apreciable a partir de los días 3-6, lapso en el que se comenzó a observar una disminución en la biomasa planctónica de 1.34 a 0.58 g SSV/L en el efluente de los días 6 y 14, respectivamente. En reactores empacados arrancados de forma similar, usualmente se presentan altas producciones de  $H_2$  en los primeros días de operación como se observó en el TBR. En dos PBR independientes, Carrillo-Reyes (2013) observó una alta VVPH

después de la etapa de arranque. Sin embargo, ésta mostró una disminución después de 5 días de operación.

Durante el periodo II se incrementó la COV a 21.6 g DQO/L-d resultando en una VVPH de 0.57 L H<sub>2</sub>/L-d, equivalente al doble de la obtenida en el periodo I y el RMH incrementó a un valor de 0.47 mol H<sub>2</sub>/mol azúcar consumido. Sin embargo, la concentración de AGV fue menor al periodo I, probablemente debido a que el reactor se vació debido a una falla operacional y se tuvo que reemplazar el líquido con alimento fresco.

Para el periodo III se obtuvieron valores de VVPH y RMH de 0.82 L H<sub>2</sub>/L-d y 0.59 mol H<sub>2</sub>/mol azúcar consumido, respectivamente, en donde la producción de acetato y butirato fue muy similar (2172 y 2092 mg/L, respectivamente) y presentaron una relación molar de Bu/Ac 0.63. Se detectó propionato en concentraciones muy bajas (20 mg/L).

En el periodo IV, se logró obtener una VVPH de 1.68 L H<sub>2</sub>/L-d, la cual duplica a la obtenida en el periodo III y es 5 veces mayor a la velocidad obtenida en el periodo inicial. El valor promedio del RMH durante el periodo IV fue de 1.02 mol H<sub>2</sub>/mol azúcar consumido. En este periodo la concentración de butirato superó a la concentración del acetato, tal como se observa en la Figura 4.5b, y la relación molar Bu/Ac fue más cercana a la unidad (0.85) en comparación con los periodos anteriores. También se puede observar en la Figura 4.5b que el propionato comenzó a presentar concentraciones alrededor de los 500 mg/L al final del periodo IV.

Durante el periodo V se realizó un siguiente aumento en la concentración de hidrolizados enzimáticos a 30 g DQO/L, por consiguiente la COV se incrementó a 52.9 g DQO/L-d aumentando también la VVPH a 2.9 L H<sub>2</sub>/L-d. Sin embargo, en este periodo la operación del reactor presentó variaciones importantes debido a fallas operacionales causadas por el contenido de sólidos en los hidrolizados. Cuando la operación se estabilizó, el valor promedio de la VVPH fue de 2.81 L H<sub>2</sub>/L-d. La relación Bu/Ac mostró un valor extremo de 1.59 para este periodo.

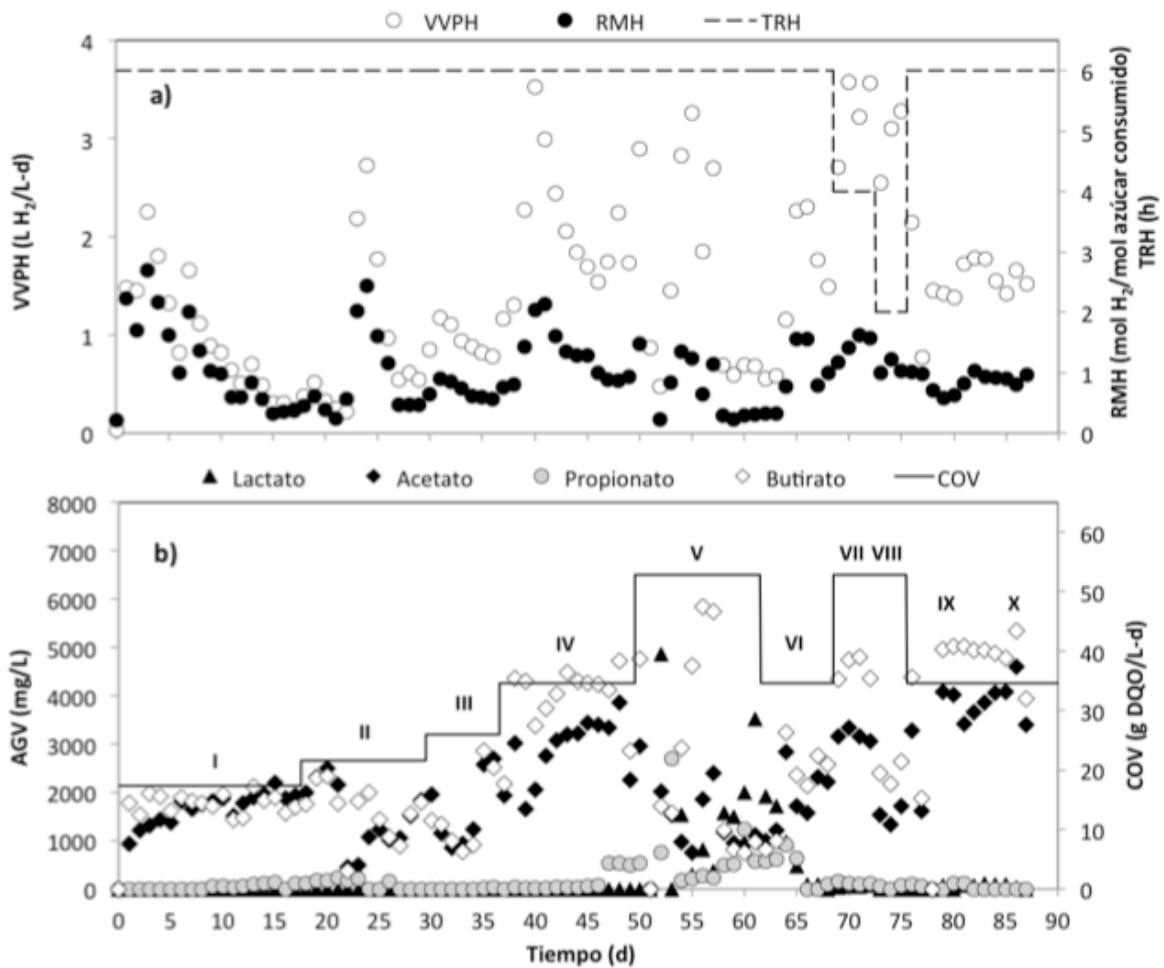


Figura 4.5 Desempeño del TBR durante los distintos periodos de operación. a) Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH), rendimiento molar de hidrógeno (RMH) y tiempo de residencia hidráulico (TRH); b) ácidos grasos volátiles (AGV) y carga orgánica volumétrica (COV).

Se ha propuesto que los reactores de tanque agitado al igual que los reactores de biopelícula no son afectados por la presencia de material particulado (Hawkes et al., 2007). Sin embargo, el modo de alimentación del TBR, en donde usualmente el sustrato es distribuido por aspersion, lo hace más sensible a fallas por taponamiento debido a los altos contenidos de sólidos. Recientemente, se ha utilizado el TBR para la producción en lote de hidrógeno a partir de residuos alimenticios (Choi y Ahn, 2014).



Para el periodo VI el líquido del reactor fue reemplazado por alimento fresco, burbujeando con  $N_2$  durante el proceso para evitar la entrada de aire al reactor y se retomaron las condiciones del periodo IV. Las producciones de hidrógeno en el periodo VI fueron de 1.62 L  $H_2$ /L-d y 0.89 mol  $H_2$ /mol azúcar consumido.

Una de las ventajas de los reactores de biomasa fija es que permiten operar a TRH cortos sin presentar lavado celular (Sección 1.3.2), por lo que en los periodos VII y VIII se evaluó el efecto de la disminución del TRH manteniendo una COV de 52.9 g DQO/L-d. Los mejores resultados de toda la operación del TBR se obtuvieron a un TRH de 4 h en el periodo VII, en el que la VVPH fue de 3.45 L  $H_2$ /L-d, 12 veces la obtenida en el periodo I. Como se observa en la Tabla 4.2, durante el periodo VII se presentaron concentraciones de butirato similares a las del periodo V a pesar de la diferencia de TRH, lo que quiere decir que hubo un incremento en la producción de butirato, así como de acetato.

La operación a TRH de 2 h durante el periodo VIII resultó en una disminución en el RMH y la VVPH, con valores de 1.08 mol  $H_2$ /mol azúcar consumido y 2.98 L  $H_2$ /L-d, respectivamente, la disminución en las concentraciones de AGV fue debido a que se disminuyó la concentración de sustrato para mantener la misma COV del periodo VII. Una observación importante es que en los periodos VII y VIII se obtuvieron las concentraciones más altas de  $H_2$  en el gas (40-42%), una de las ventajas que presenta este tipo de reactor (Puhulwella et al., 2014; Zhang et al., 2006).

En el periodo IX se regresó a un TRH de 6 h y una COV de 34.6 g DQO/L-d con el objetivo de verificar la reproducibilidad de los datos, obteniendo producciones de hidrógeno similares a los periodos IV y VI (1.76 L  $H_2$ /L-d y 0.92 mol  $H_2$ /mol azúcar consumido) en los que se aplicaron las mismas condiciones de operación. Posteriormente, dada la sensibilidad mostrada por el TBR en el periodo V a la presencia de material particulado, en el periodo X se procedió a evaluar la producción de  $H_2$  a partir de los hidrolizados enzimáticos clarificados. Los hidrolizados se centrifugaron durante 15 minutos a 3700 rpm para su clarificación. Para el periodo X, el desempeño del reactor no presentó grandes cambios con

respecto al periodo IX; el RMH y los AGV en ambos periodos fueron muy similares, tal como se observa en la Tabla 4.2. Sin embargo, se pudo advertir una ligera disminución en la VVPH a 1.53 L H<sub>2</sub>/L-d en el periodo X, lo que podría indicar que la DQO particulada contribuyó aproximadamente con un 13% del H<sub>2</sub> producido en el periodo IX.

Cabe mencionar que las relaciones Bu/Ac durante toda la operación, con excepción del periodo V, mostraron una correlación positiva con los aumentos en la COV ( $R^2=0.89$ ) y con la VVPH ( $R^2=0.88$ ). El %Ac<sub>homoacet</sub> y la relación H<sub>2</sub>/(Ac+Bu) presentaron valores entre 41-52% y 0.14-0.86, respectivamente, sin observarse ninguna tendencia ( $R^2=0.38$ ), como se muestra en la Figura 4.6.

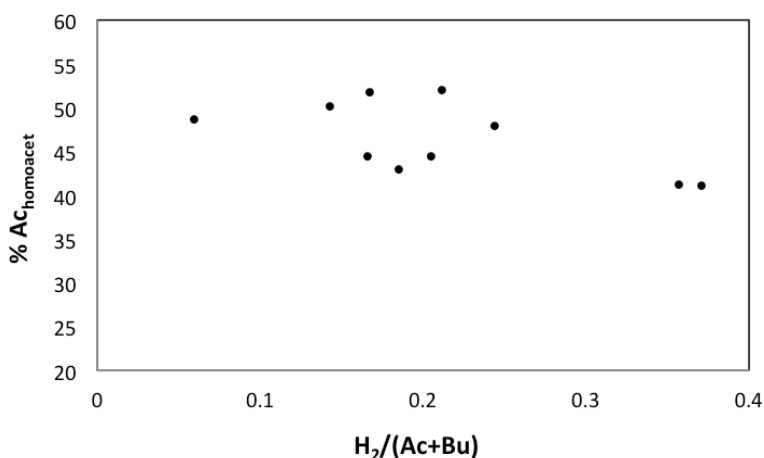


Figura 4.6 Relación entre %Ac<sub>homoacet</sub> y H<sub>2</sub>/(Ac+Bu) observada en TBR.

Durante la operación del TBR no se observaron problemas en el desempeño del reactor causados por taponamiento o crecimiento excesivo de biomasa; la fracción vacía al final del experimento ( $\epsilon=0.56$ ) fue equivalente al 81% de la fracción vacía inicial ( $\epsilon=0.69$ ), lo que corrobora la efectividad de la configuración del soporte para evitar taponamiento, como fue observado por Arreola-Vargas et al. (2014).

Tabla 4.2 Desempeño de TBR en la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.

Periodo	COV (g DQO/L-d)	AGV (mg/L)				Bu/Ac	Producción de H <sub>2</sub>		
		Lactato	Acetato	Propionato	Butirato		H <sub>2</sub> (%)	VVPH (L H <sub>2</sub> /L-d)	RMH (mol H <sub>2</sub> /mol azúcar consumido)
I <sup>b</sup>	17.3	N.D.	2000 ± 175	118 ± 5	1718 ± 157	0.59	25.9	0.28 ± 0.04	0.34 ± 0.02
II <sup>b</sup>	21.6	N.D.	1467 ± 396	N.D.	1412 ± 471	0.65	27.7	0.57 ± 0.04	0.47 ± 0.01
III <sup>b</sup>	25.9	N.D.	2172 ± 818	20 ± 2	2092 ± 1037	0.63	29.9	0.82 ± 0.05	0.59 ± 0.03
IV <sup>c</sup>	34.6	N.D.	3105 ± 566	286 ± 260	3865 ± 681	0.85	35.3	1.68 ± 0.1	1.02 ± 0.18
V <sup>b</sup>	52.9	956 ± 827	2115 ± 1025	306 ± 192	4472 ± 1431	1.59	35.1	2.81 ± 0.1	1.32 ± 0.17
VI <sup>a</sup>	34.6	93 ± 6	2273 ± 69	N.D.	2662 ± 131	0.80	33	1.62 ± 0.19	0.89 ± 0.14
VII <sup>b</sup>	52.9	51 ± 12	3182 ± 140	101 ± 15	4633 ± 266	0.99	39.8	3.45 ± 0.2	1.53 ± 0.11
VIII <sup>b</sup>	52.9	N.D.	1533 ± 187	63 ± 2	2397 ± 232	1.07	41.9	2.98 ± 0.38	1.08 ± 0.12
IX <sup>b</sup>	34.6	90 ± 25	3644 ± 220	N.D.	4968 ± 42	0.93	34.4	1.76 ± 0.03	0.92 ± 0.1
X <sup>c</sup>	34.6	71 ± 28	4034 ± 495	N.D.	4739 ± 583	0.8	33.7	1.53 ± 0.1	0.89 ± 0.06

N. D.=No detectado. Valores promedio (± desviación estándar). a: n=2; b: n=3; c: n=4.

#### 4.4 Efecto de la configuración de reactor en la producción de hidrógeno

En la Figura 4.7 se muestra el desempeño de los reactores mediante diagramas de cajas utilizando los datos de las Tablas 4.1 y 4.2. En esta representación gráfica se distingue la respuesta positiva que tuvo la VVPH a los aumentos de COV, comportamiento que se observó en ambos reactores a cargas de hasta 53 g DQO/L-d. La aplicación de COV superiores no fue explorada en el TBR debido a que éste presentó cierta sensibilidad a la carga de sólidos, mientras que en el CSTR una COV de 60.3 g DQO/L-d tuvo un efecto negativo en el desempeño del reactor, afectando principalmente la VVPH, tal como se puede observar en la Figura 4.7a.

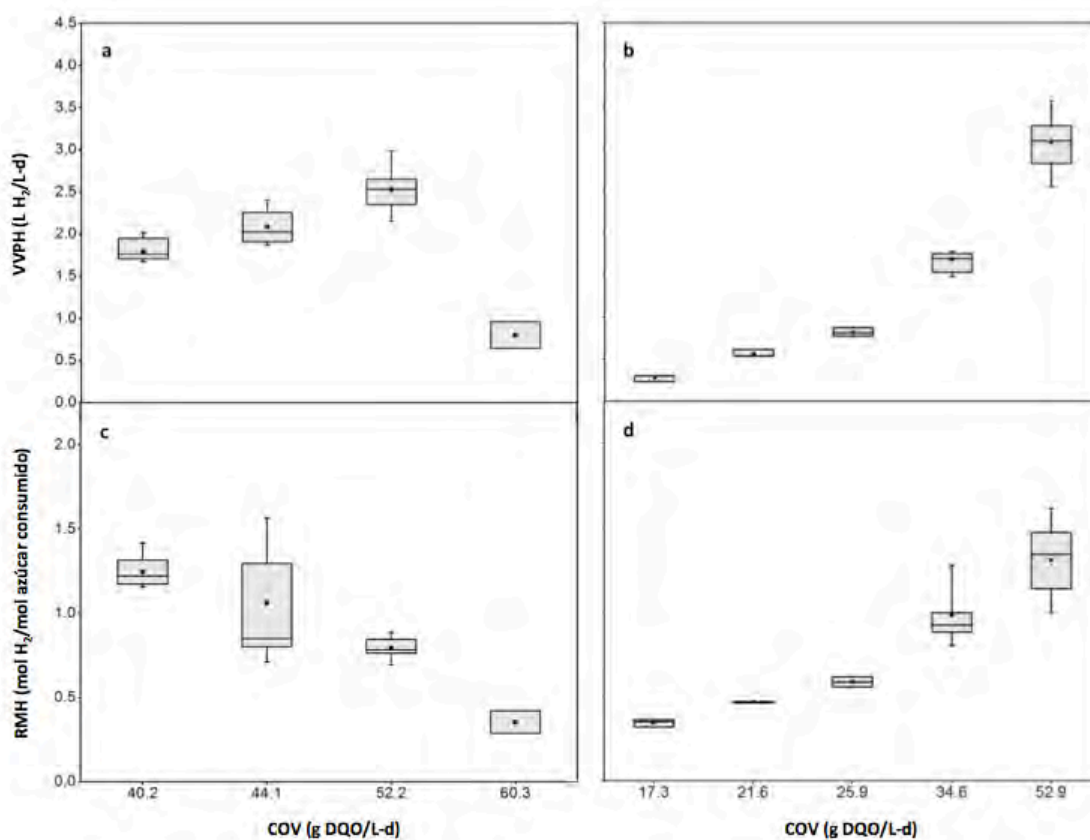


Figura 4.7 Diagramas de cajas mostrando la producción de hidrógeno en función de la COV para los reactores CSTR (a, c) y TBR (b, d). Dentro de las cajas se recoge el 50% de los datos, la línea divisoria dentro de la caja representa la mediana y los brazos muestran la distribución total de cada serie de datos (valores mínimos y máximos). Los promedios se representan con el símbolo (■).

La principal diferencia entre ambos reactores se observó en el comportamiento del RMH cuya tendencia para el caso del TBR fue bastante similar a la observada para la VVPH (Figuras 4.7b y d). El comportamiento opuesto se presentó en el CSTR, en donde el aumento de COV tuvo un efecto negativo sobre el RMH disminuyendo un 70%; de 1.25 mol H<sub>2</sub>/mol azúcar consumido en la carga inicial a 0.35 mol H<sub>2</sub>/mol azúcar consumido en la máxima carga aplicada (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 Desempeño de los reactores CSTR y TBR en función de la COV.

CSTR			TBR		
COV	VVPH	RMH	COV	VVPH	RMH
(g DQO/L)	(L H <sub>2</sub> /L-d)	(mol H <sub>2</sub> /mol azúcar consumido)	(g DQO/L)	(L H <sub>2</sub> /L-d)	(mol H <sub>2</sub> /mol azúcar consumido)
40.2 <sup>f</sup>	1.79 ± 0.21	1.25 ± 0.15	17.3 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.05	0.34 ± 0.01
44.1 <sup>d</sup>	2.09 ± 0.21	1.06 ± 0.33	21.6 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.05	0.47 ± 0.01
52.2 <sup>c</sup>	2.53 ± 0.32	0.79 ± 0.08	25.9 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.03	0.59 ± 0.02
60.3 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.22	0.35 ± 0.01	34.6 <sup>f</sup>	1.64 ± 0.13	0.94 ± 0.08
			52.9 <sup>e</sup>	3.08 ± 0.38	1.31 ± 0.24

Valores promedio (± desviación estándar), a: n=2; b: n=3; c: n=5; d: n=6; e: n=9; f: n=13.

Al relacionar estos resultados con los aumentos en la COV, se observó una respuesta lineal en la VVPH y el RMH para el TBR (Figuras 4.8b y d). Así mismo, en estas figuras se presentan los resultados obtenidos por Arreola-Vargas et al. (2014), quienes utilizaron el mismo empaque (tubería de PE) en un TBR para la producción de H<sub>2</sub> a partir de hidrolizados enzimáticos de paja de avena, obteniendo una VVPH de 0.43 L H<sub>2</sub>/L-d, similar a la obtenida en el periodo II del TBR. No obstante, estos autores obtuvieron un rendimiento muy alto en comparación con los obtenidos en este trabajo a COV comparables, lo que probablemente se debe a las diferencias en el inóculo y los hidrolizados utilizados en cada estudio, además de que en dicho trabajo no se considera la aportación por parte de la mezcla enzimática hacia la producción de H<sub>2</sub>.

La VVPH del CSTR tuvo una respuesta positiva a los aumentos en la COV al pasar de 40.2 a 52.2 g DQO/L-d ( $R^2=0.78$ ). Estas producciones se asemejaron a las obtenidas por Abreu-Sherrer (2013) a TRH más prolongados (12-24 h) (Figura 4.8a), las cuales mostraron una tendencia similar a las de este estudio. Sin embargo, esta respuesta positiva en la VVPH se perdió al aumentar la COV a 60.3 g DQO/L-d.

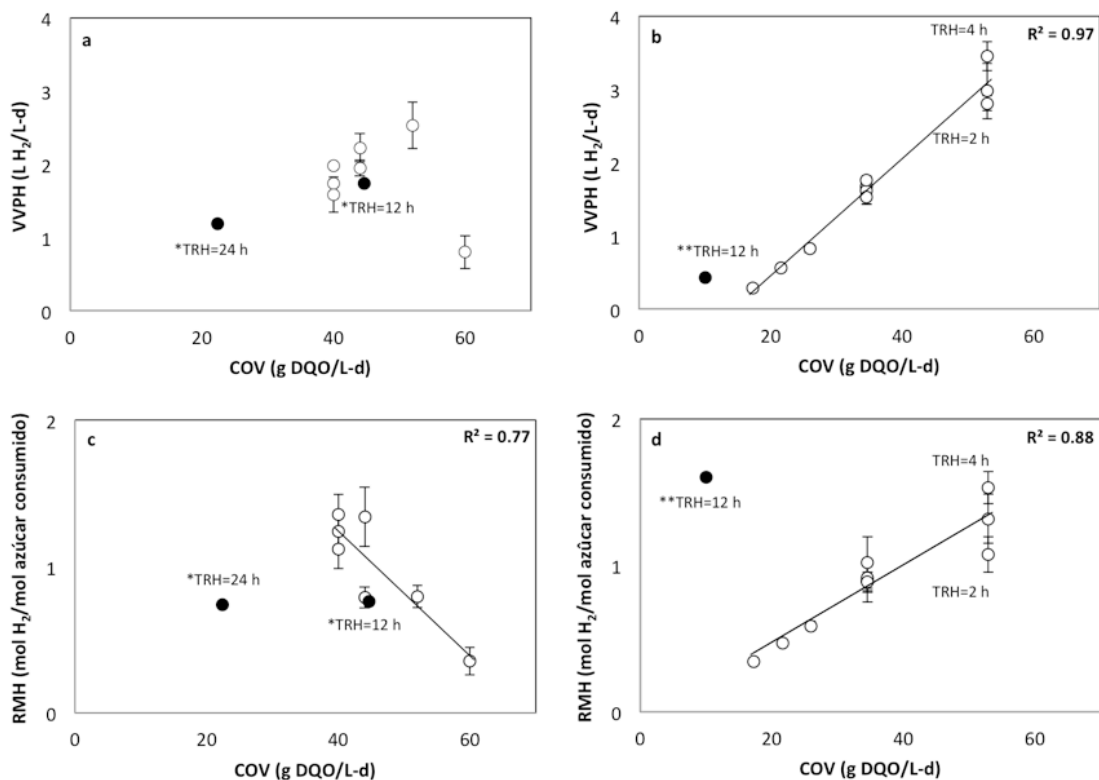


Figura 4.8 Tendencias en la producción de hidrógeno en función de la COV para los reactores CSTR (a, c) y TBR (b, d). \*Abreu-Sherrer (2013): 22.3 g DQO/L. \*\*Arreola-Vargas et al. (2014): 5 g DQO/L.

El RMH en el CSTR se vio claramente afectado por el incremento en la COV (Figura 4.8c), lo que concuerda con lo propuesto anteriormente por Van Ginkel y Logan (2005) en este tipo de reactores. En reactores CSTR, Davila-Vazquez et al. (2009) y Cota-Navarro et al. (2011) encontraron que los rendimientos de H<sub>2</sub> fueron más sensibles al aumento de COV a través de la disminución del TRH que mediante el aumento en la concentración de sustrato. En contraste, Kyazze et al. (2005) observaron una disminución de aproximadamente el 50% en el RMH a una

concentración de glucosa de 50 g/L (0.8 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa) con respecto al rendimiento obtenido a 10 g/L (1.7 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa). No obstante, en diversos estudios se ha observado una correspondencia inversa entre el RMH y la VVPH (Turcot et al., 2008; Chen et al., 2008).

Dicha correspondencia se observó en el CSTR, excepto para la carga de 60.3 g DQO/L-d (Figuras 4.7a y c). Esto podría explicarse debido a un incremento en la P<sub>H<sub>2</sub></sub> como resultado de una mayor VVPH en cada aumento de COV, siempre que las condiciones de transferencia de masa se mantengan constantes y permitan la acumulación de H<sub>2</sub> en la fase líquida. De hecho, hay reportes que demuestran una saturación de H<sub>2</sub> disuelto en reactores CSTR (Kraemer y Bagley, 2006), y recientemente se ha determinado que las condiciones de transferencia de masa tienen un efecto importante en el RMH (Beckers et al., 2015), aspecto en el que el TBR es superior al CSTR (Orgill et al., 2013). Además, el aumento de la P<sub>H<sub>2</sub></sub> puede favorecer el consumo de H<sub>2</sub> en cultivos mixtos, lo que puede explicar la disminución tanto de la VVPH como del RMH.

Por otra parte, en la operación de un TBR utilizando glucosa como sustrato, Arreola-Vargas et al. (2014) lograron incrementar la velocidad de producción junto con el rendimiento de H<sub>2</sub> al disminuir el TRH de 12 a 6 horas (10-20 g DQO/L-d). Sin embargo, los siguientes aumentos de COV solamente mejoraron las VVPH, mientras que los rendimientos se mantuvieron entre 1.5-1.7 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa, lo cual fue observado también por Zhang et al. (2006) quienes obtuvieron rendimientos de 0.6 a 0.8 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa al pasar de 16.8 a 199.2 g glucosa/L-d. Otros autores han obtenido una respuesta negativa en el RMH al aumentar la concentración de sustrato y/o disminuir el TRH (Oh et al., 2004; Arriaga et al., 2011).

Con estos resultados se puede advertir que a pesar de las diferencias en el desempeño de los reactores, las máximas producciones de H<sub>2</sub> a partir de los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave estuvieron entre 2.5 y 3.5 L H<sub>2</sub>/L-d bajo las condiciones evaluadas en este estudio, en donde la máxima VVPH obtenida en el CSTR fue equivalente al ~75% de la máxima obtenida en el TBR.

Además de que el TBR permitió obtener mayores VVPH, éstas estuvieron acompañadas de altos RMH, a diferencia del CSTR. Adicionalmente, un TRH de 4 h fue el más adecuado para la producción de H<sub>2</sub>, obteniendo una corriente de gas con un mayor contenido de H<sub>2</sub> (40%).

#### **4.5 Balance de electrones**

En la Figura 4.9 se muestra el balance de electrones para los dos reactores estudiados. Los principales sumideros de electrones identificados fueron el butirato y acetato en ambos reactores. Se puede observar en la Figura 4.9a que durante la operación del CSTR a pH 4.6 (días 1-57) los metabolitos solubles y el H<sub>2</sub> explicaron un máximo del 48% de los electrones disponibles, con valores promedio para el butirato y acetato de 13 y 10%, respectivamente. Al operar a pH 5.5 (días 58-68) el porcentaje de electrones presentes en el butirato fue casi tres veces mayor (34%) mientras que el valor para el acetato fue de 16%. A pH 5.5, alrededor del 60% de los electrones se canalizaron a los AGV e H<sub>2</sub>. Los electrones canalizados a H<sub>2</sub> representaron entre 2.4 y 3.5% para los pH 4.6 y 5.5, respectivamente.

En el caso del TBR, el porcentaje de electrones en el butirato y acetato fueron muy similares a los observados en el CSTR al operar a un pH 5.5, con valores promedio de 31 y 15%, respectivamente. El porcentaje de electrones en el H<sub>2</sub> tuvo un promedio de 3.5%, representando el 4.6% durante la máxima producción (Figura 4.9b).

El lactato representó menos del 1% en ambos reactores, mientras que el propionato estuvo presente en el CSTR durante la mayor parte del tiempo de operación alcanzando un máximo de 7.4% de los electrones disponibles en los últimos días de operación. Este último representó alrededor del 1% en el TBR.



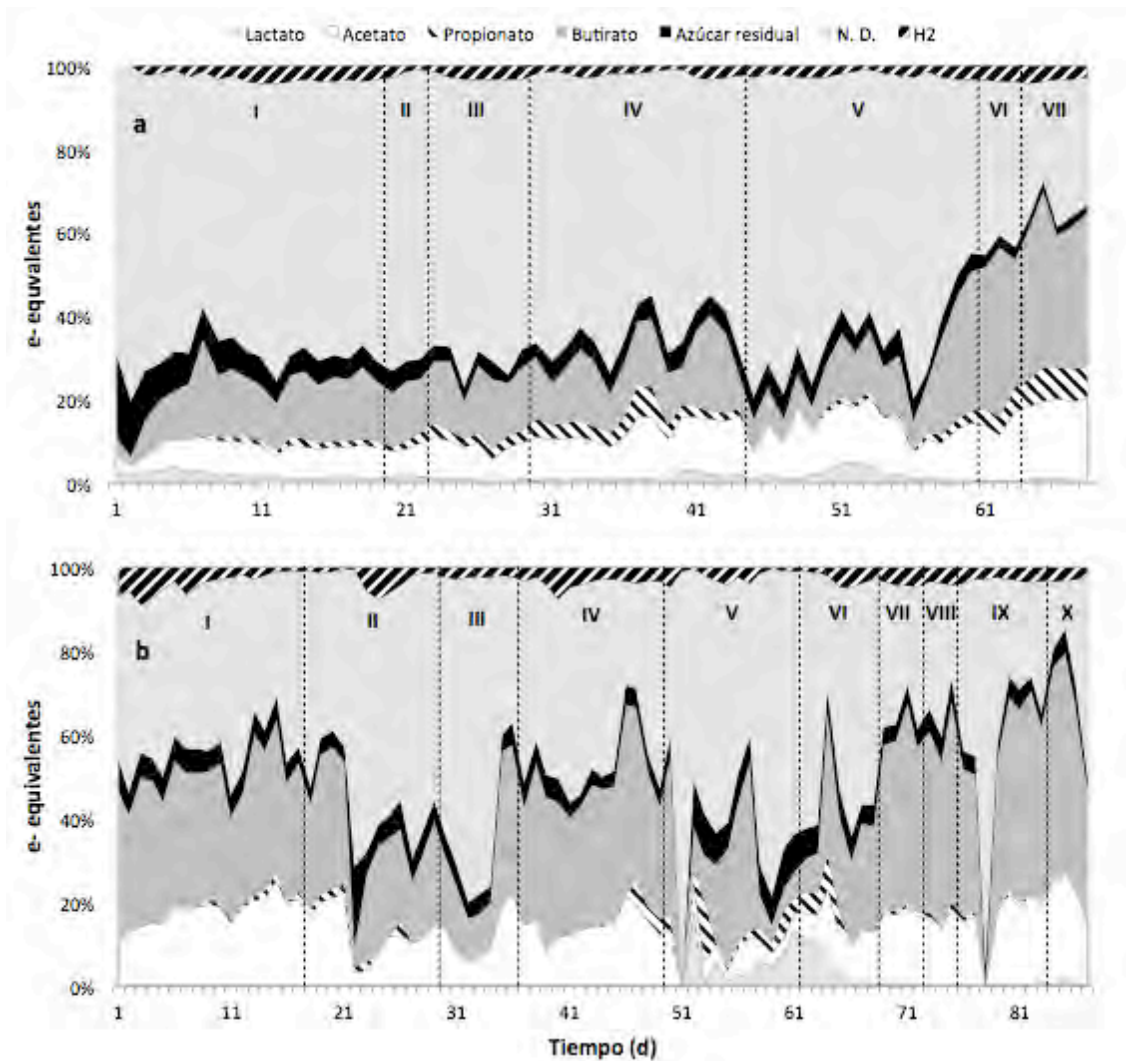


Figura 4.9 Balance de electrones para los reactores CSTR (a) y TBR (b).

Aunque en la Figura 4.9 no se incluye la biomasa, se puede observar en la Tabla 4.4 que el mayor porcentaje de electrones fue destinado al crecimiento de biomasa, medida como SSV, en días específicos. Los balances mayores al 100% se deben probablemente al material particulado presente en los hidrolizados, ya que éste también se cuantifica dentro de los SSV. Por otra parte, los SSV medidos en el efluente y en la purga del TBR representaron un promedio de 12 y 7% de los electrones, respectivamente. Los balances menores al 100% en este caso se deben probablemente a la biomasa retenida en la biopelícula, la cual no fue cuantificada.

Tabla 4.4 Balance de electrones en días específicos (%).

Producto	Periodo (día)										
	CSTR						TBR				
	I (18)	II (22)	IV (44)	V (57)	VI (63)	VII (67)	I (16)	III (36)	VII (72)	IX (82)	X (86)
Lactato	1.0	1.5	1.8	1.4	0.6	0.5	0.0	0.0	0.4	0.5	0.2
Acetato	7.8	7.8	14.2	9.1	16.7	19.0	19.9	11.4	16.3	21.2	22.6
Propionato	1.6	2.2	1.3	1.4	5.7	7.5	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
Butirato	17.4	12.8	8.0	12.4	30.7	34.8	28.6	19.8	39.6	48.8	44.8
Biomasa	76.9	62.3	83.8	89.3	58.3	45.7	13.4	16.2	11.4	30.4	15.2
A. R.	5.2	5.0	5.4	2.5	2.8	2.5	4.8	5.3	4.4	3.0	4.5
H <sub>2</sub>	3.5	0.8	2.2	1.4	3.9	3.2	1.3	1.8	4.7	4.0	3.2
SUMA	113.4	92.5	116.7	117.5	118.7	113.3	68.0	54.6	77.6	107.9	90.5

A. R.: azúcares residuales. Biomasa: SSV en el efluente + SSV en la purga en el caso del TBR.

#### 4.6 Producción de hidrógeno con hidrolizados enzimáticos

En la Tabla 4.5 se muestran los resultados encontrados en la literatura sobre la producción de H<sub>2</sub> con hidrolizados enzimáticos obtenidos de diferentes materias primas y con diversas configuraciones de reactores. Es claro que el CSTR ha sido el reactor más utilizado en estos reportes.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados en estos estudios, incluso son similares a aquellos realizados con cultivos puros bajo condiciones termofílicas, las cuales han sido consideradas más apropiadas para la producción de H<sub>2</sub> (Raj et al., 2012). Pawar et al. (2013) obtuvieron el rendimiento más alto reportado para cualquier hidrolizado lignocelulósico utilizando hidrolizados enzimáticos de paja de avena en un CSTR burbujeado con N<sub>2</sub> bajo condiciones hipertermofílicas.

Las mayores velocidades fueron obtenidas por Chen et al. (2008) a cargas de azúcares de hasta 312 g azúcares/L-d. Cabe mencionar que ellos utilizaron almidón como materia prima a diferencia de este trabajo en el que se utilizó un material lignocelulósico. La máxima VVPH obtenida en el CSTR de este trabajo es comparable a los resultados de Boonsayompoo y Reungsang (2013) quienes utilizaron bagazo de sorgo, mientras que en el TBR se alcanzó una VVPH 8 veces mayor a la obtenida por Arreola-Vargas et al. (2014) con la misma configuración de reactor pero utilizando paja de avena como materia prima. Resulta interesante que los rendimientos obtenidos en el CSTR y TBR (55.7 y 67.2 L H<sub>2</sub>/kg bagazo, respectivamente) son similares a los reportados para hidrolizados enzimáticos de residuos alimenticios.

Tabla 4.5 Producción de hidrógeno con hidrolizados enzimáticos en diferentes sistemas continuos.

Reactor	Materia prima	Inóculo	pH	TRH	VVPH	RMH	Referencia
				(h)	(L H <sub>2</sub> /L-d)	(mol H <sub>2</sub> /mol sustrato)	
CSTR	Almidón <sup>a</sup>	<i>C. butyricum</i> CGS2 <sup>1</sup>	6	2	26.7 <sup>+</sup>	1.5	(Chen et al., 2008)
			6.3	12	8.9 <sup>+</sup>	2.03	
CSTR	Almidón	<i>C. butyricum</i> CGS2 <sup>1</sup>	6.5	12	5.28	1.04	(Lo et al., 2008)
CMISR <sup>+</sup>	Residuos alimenticios <sup>b</sup>	Lodo PTAR <sup>1</sup>	4	6	8.49	58.7 <sup>**</sup>	(Han et al., 2015)
			4	6	4.8	85.6 <sup>**</sup>	
CSTR	Paja de avena <sup>c</sup>	<i>C. saccharolyticus</i> DSM 8903 <sup>3</sup>	6.5	6.7	5.19	2.08	(Pawar et al., 2013)
			6.5	19.9	5.09	3.43	
TBR	Paja de avena <sup>d</sup>	Ensilado de triticale <sup>1</sup>	5.0	12	0.43	1.6	(Arreola-Vargas et al., 2014)
CSTR	Tallo de maíz <sup>b</sup>	<i>T. thermosaccharolyticum</i> W16 <sup>2</sup>	5.5	50	4.52	1.9	(Zhao et al., 2013)
ASBR	Tallo de maíz <sup>b</sup>	<i>T. thermosaccharolyticum</i> W16 <sup>2</sup>	5.8	12	5.16	1.9	(Zhao et al., 2014)

CSTR	Bagazo de sorgo <sup>e</sup>	<i>T. thermosaccharolyticum</i> KKU19 <sup>2</sup>	N. R.	32	2.608	N. R.	(Boonsayompoo y Reungsang, 2013)
CSTR	Bagazo de agave <sup>a</sup>	Lodo anaerobio <sup>1</sup>	5.0	12	1.74	0.76	(Abreu-Sherrer, 2013)
CSTR	Bagazo de agave <sup>a</sup>	Lodo anaerobio <sup>1</sup>	4.6	6	1.98	1.35	<b>Este estudio</b>
			5.5	6	2.53	0.8	
TBR	Bagazo de agave <sup>a</sup>	Lodo anaerobio <sup>1</sup>	5.5	6	3.45	1.53	

N.R.: no reportado. \*reactor empacado continuamente agitado. +Producciones corregidas a condiciones estándar (0°C, 1 atm). \*\*L H<sub>2</sub>/kg bagazo.

Pretratamientos:

a: térmico.

b: biológico.

c: vapor ácido.

d: ácido diluido.

e: microondas asistido con ácido.

Condiciones:

1: mesofílicas.

2: termofílicas.

3: hipertermofílicas.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados confirman que los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave son un sustrato adecuado para la producción de hidrógeno, obteniendo producciones similares a las encontradas en la literatura. Sin embargo, son pocos los estudios que evalúan la producción continua de hidrógeno con hidrolizados lignocelulósicos, especialmente con hidrolizados enzimáticos. Por lo que la investigación de estos sistemas es relevante en vías de la evaluación de su producción a gran escala.

En este trabajo se muestra que la configuración de reactor tiene un efecto importante en la producción de hidrógeno, en donde a COV equivalentes, el TBR permitió obtener VVPH y RMH ligeramente mayores al CSTR, lo que se atribuyó a una menor  $P_{H_2}$ .

En el CSTR, los incrementos de COV tuvieron un efecto negativo en el RMH, mientras que la VVPH se vio favorecida. Sin embargo, a cargas altas (60.3 g DQO/L-d) se observó un consumo sustancial de hidrógeno, probablemente debido a homoacetogénesis, afectando tanto la VVPH como el RMH.

La alta transferencia de masa líquido-gas característica del TBR permitió obtener altas VVPH sin comprometer los RMH, además de obtener mayores concentraciones de hidrógeno (40%) en el gas en comparación con el CSTR, por lo que se puede considerar un sistema más adecuado para la producción de hidrógeno a partir de estos hidrolizados. Además, se confirmó que el arreglo vertical del empaque permitió operar sin problemas de taponamiento durante 87 días. Sin embargo, esta configuración de reactor fue sensible al contenido de sólidos en el sustrato. En el último periodo estudiado se observó que posiblemente estos sólidos contribuyeron un 13% a la producción de hidrógeno en este reactor.

Perspectivas:

- A pesar de que los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave son un sustrato adecuado para la producción de hidrógeno es necesario realizar

una caracterización detallada de su composición, ya que se pueden presentar variaciones en el desempeño del proceso aún cuando éstos presenten valores similares de azúcares y DQO. Esto también podría ayudar a explicar las bajas producciones de hidrógeno obtenidas a partir de sustratos lignocelulósicos en comparación con sustratos modelo y otros residuos fácilmente biodegradables.

- Es importante estudiar las condiciones que favorecen el consumo de hidrógeno en reactores continuos con este tipo de sustratos, debido a que este fenómeno puede reducir de manera dramática la producción de hidrógeno a gran escala.
- De acuerdo al modelo utilizado para estimar la actividad homoacetogénica, ésta estuvo presente en ambos reactores sin mostrar una relación clara con la COV. Sin embargo, la intensidad con la que se manifiesta esta ruta metabólica parece ser más susceptible a las condiciones operacionales en la configuración CSTR que en el TBR, exhibiendo valores de %Ac<sub>homoacet</sub> más estables en el TBR (41-52%) en comparación con el CSTR (26-46%). Por lo tanto, es probable que la configuración de reactor tenga un efecto importante sobre la incidencia de la actividad homoacetogénica. Esto último, junto con el desarrollo de una metodología para la medición de este tipo de metabolismo en reactores productores de hidrógeno, requieren una mayor investigación.
- La alta densidad celular del TBR impulsa a evaluar la aplicación de COV superiores a las estudiadas en estos experimentos, siempre y cuando se puedan evitar los problemas operacionales causados por el material particulado. Se podrían utilizar hidrolizados clarificados u otro tipo de aspersion.
- Finalmente, resulta interesante evaluar diferentes  $V_{R^*}$  con respecto al  $V_{liq}$ , ya que el primero determina la COV y la VVPH, mientras que el último determina el TRH del sistema; mientras más cercano sea  $V_{R^*}$  a  $V_{liq}$  se pueden aplicar mayores COV a un mismo TRH.

## REFERENCIAS

- Abreu-Sherrer, JS. 2013. «Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno.» Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. San Luis Potosí, México.
- Alemán-Nava, GS., VH. Casiano-Flores, DL. Cárdenas-Chávez, R. Díaz-Chavez, N. Scarlet, y J. Mahlkecht. 2014. «Renewable energy research progress in Mexico: A review.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 32. Elsevier: 140-53. doi:10.1016/j.rser.2014.01.004.
- Angenent, LT., K. Karim, MH. Al-Dahhan, BA. Wrenn, y R. Domínguez-Espinosa. 2004. «Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater.» *Trends in Biotechnology* 22 (9): 477-85. doi:10.1016/j.tibtech.2004.07.001.
- APHA. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed. Washington, USA: American Public Health Association American Water Works Association Water Environment Federation.
- Arellano-García, L., AD. Dorado, A. Morales-Guadarrama, E. Sacristan, X. Gamisans, y S. Revah. 2014. «Modeling the effects of biomass accumulation on the performance of a biotrickling filter packed with PUF support for the alkaline biotreatment of dimethyl disulfide vapors in air.» *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-014-5929-7.
- Arooj, MF., SK. Han, SH. Kim, DH. Kim, y HS. Shin. 2008. «Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate.» *International Journal of Hydrogen Energy* 33: 3289-94. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.04.022.
- Arreola-Vargas, J., F. Alatríste-Mondragón, LB. Celis, E. Razo-Flores, A. López-López, y HO. Méndez-Acosta. 2014. «Continuous hydrogen production in a trickling bed reactor by using triticale silage as inoculum: effect of simple and complex substrates.» *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90 (6): 1062-69. doi:10.1002/jctb.4410.
- Arriaga, S., I. Rosas, F. Alatríste-Mondragón, y E. Razo-Flores. 2011. «Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter.» *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (5): 3442-49. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.12.019.
- Arrizon, J., JC. Mateos, G. Sandoval, B. Aguilar, J. Solis, y MG. Aguilar. 2012. «Bioethanol and Xylitol Production From Different Lignocellulosic Hydrolysates By Sequential Fermentation.» *Journal of Food Process Engineering* 35 (3): 437-54. doi:10.1111/j.1745-4530.2010.00599.x.
- Balat, M., y M. Balat. 2009. «Political, economic and environmental impacts of biomass-based hydrogen.» *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (9). Elsevier Ltd: 3589-3603. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.067.
- Beckers, L., J. Masset, C. Hamilton, F. Delvigne, D. Teye, M. Crine, P. Thonart, y S. Hilgsmann. 2015. «Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by the pure strain *Clostridium butyricum* CWB11009.» *Biochemical Engineering Journal* 98. Elsevier B.V.: 18-28. doi:10.1016/j.bej.2015.01.008.



- Boonsayompoo, O., y A. Reungsang. 2013. «Thermophilic biohydrogen production from the enzymatic hydrolysate of cellulose fraction of sweet sorghum bagasse by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KCU19: Optimization of media composition.» *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (35). Elsevier Ltd: 15777-86. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.04.129.
- Capellán-Pérez, I., M. Mediavilla, C. de Castro, O. Carpintero, y L.J. Miguel. 2014. «Fossil fuel depletion and socio-economic scenarios: An integrated approach.» *Energy* 77: 641-66. doi:10.1016/j.energy.2014.09.063.
- Carrillo-Reyes, J. 2013. «Producción de hidrógeno en reactores de biomasa fija, implicaciones de microorganismos hidrogenotróficos.»
- Carrillo-Reyes, J., LB. Celis, F. Alatríste-Mondragón, y E. Razo-Flores. 2012. «Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors.» *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (7): 5591-5601. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.01.004.
- Carrillo-Reyes, J., LB. Celis, F. Alatríste-Mondragón, y E. Razo-Flores. 2014. «Decreasing methane production in hydrogenogenic UASB reactors fed with cheese whey.» *Biomass and Bioenergy* 63 (abril): 101-8. doi:10.1016/j.biombioe.2014.01.050.
- Caspeta, L., MA. Caro-Bermúdez, T. Ponce-Noyola, y A. Martínez. 2014. «Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol.» *Applied Energy* 113 (enero). Elsevier Ltd: 277-86. doi:10.1016/j.apenergy.2013.07.036.
- Cedeño-Cruz, M., y J. Alvarez-Jacobs. 1999. «Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes.» En *The Alcohol Textbook*, editado por K. Jacques, T. P. Lyons, y D. R. Kelsall, 3ra ed., 225-42. Bottingham, UK: Nottingham University Press.
- Chang, VS., y MT. Holtzaple. 2000. «Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity.» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86 (1-9): 5-37.
- Chen, CC., CY. Lin, y JS. Chang. 2001. «Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 (1-2): 56-64. doi:10.1007/s002530100747.
- Chen, SD., KS. Lee, YC. Lo, WM. Chen, JF. Wu, CY. Lin, y JS. Chang. 2008. «Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by *Clostridium* species.» *International Journal of Hydrogen Energy* 33: 1803-12. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.01.028.
- Choi, J., y Y. Ahn. 2014. «Characteristics of biohydrogen fermentation from various substrates.» *International Journal of Hydrogen Energy* 39 (7). Elsevier Ltd: 3152-59. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.12.050.
- CNIT. 2015. «Cámara Nacional de la Industria Tequilera.» [www.tequileros.org](http://www.tequileros.org).
- Cota-Navarro, CB., J. Carrillo-Reyes, G. Davila-Vazquez, F. Alatríste-Mondragón, y E. Razo-Flores. 2011. «Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system.» *Water Science & Technology* 64 (2): 367. doi:10.2166/wst.2011.631.
- Davila-Vazquez, G., F. Alatríste-Mondragón, A. de León-Rodríguez, y E. Razo-Flores. 2008. «Fermentative hydrogen production in batch experiments using

- lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH.» *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (19): 4989-97. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.06.065.
- Davila-Vazquez, G., S. Arriaga, F. Alatríste-Mondragón, A. León-Rodríguez, L. Rosales-Colunga, y E. Razo-Flores. 2008. «Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives.» *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7 (1): 27-45. doi:10.1007/s11157-007-9122-7.
- Davila-Vazquez, G., CB. Cota-Navarro, LM. Rosales-Colunga, A. de León-Rodríguez, y E. Razo-Flores. 2009. «Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate.» *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (10): 4296-4304. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.063.
- Demirel, B., y P. Scherer. 2008. «The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review.» *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7: 173-90. doi:10.1007/s11157-008-9131-1.
- Dinamarca, C., y R. Bakke. 2011. «Process parameters affecting the sustainability of fermentative hydrogen production: A short-review.» *International Journal of Energy and Environment* 2 (6): 1067-78.
- DuBois, M., KA. Gilles, JK. Hamilton, PA. Rebers, y F. Smith. 1956. «Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.» *Analytical Chemistry* 28 (3): 350-56. doi:10.1021/ac60111a017.
- Gírio, FM., C. Fonseca, F. Carvalheiro, LC. Duarte, S. Marques, y R. Bogel-Łukasik. 2010. «Hemicelluloses for fuel ethanol: A review.» *Bioresource Technology* 101 (13). Elsevier Ltd: 4775-4800. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- Grupe, H., y G. Gottschalk. 1992. «Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction.» *Applied and Environmental Microbiology* 58 (12): 3896-3902.
- Hallenbeck, PC. 2009. «Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis.» *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (17). Elsevier Ltd: 7379-89. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.12.080.
- Hallenbeck, PC., M. Abo-Hashesh, y D. Ghosh. 2012. «Strategies for improving biological hydrogen production.» *Bioresource Technology* 110 (abril). Elsevier Ltd: 1-9. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.103.
- Hawkes, FR., I. Hussy, G. Kyazze, R. Dinsdale, y DL. Hawkes. 2007. «Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress.» *International Journal of Hydrogen Energy* 32: 172-84. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.08.014.
- Hernández-Salas, JM., MS. Villa-Ramírez, JS. Veloz-Rendón, KN. Rivera-Hernández, RA. González-César, MA. Plascencia-Espinosa, y SR. Trejo-Estrada. 2009. «Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse.» *Bioresource Technology* 100 (3): 1238-45. doi:10.1016/j.biortech.2006.09.062.
- Hilgsmann, S., L. Beckers, J. Masset, C. Hamilton, y P. Thonart. 2014. «Improvement of fermentative biohydrogen production by *Clostridium*

- butyricum CWBI1009 in sequenced-batch, horizontal fixed bed and biodisc-like anaerobic reactors with biomass retention.» *International Journal of Hydrogen Energy* 39 (13). Elsevier Ltd: 6899-6911. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.02.139.
- Hussy, I., FR. Hawkes, R. Dinsdale, y DL. Hawkes. 2003. «Continuous Fermentative Hydrogen Production from a Wheat Starch Co-Product by Mixed Microflora.» *Biotechnology and Bioengineering* 84 (6): 619-26. doi:10.1002/bit.10785.
- Jeon, BS., YS. Um, SM. Lee, SY. Lee, HJ. Kim, YH. Kim, MB. Gu, y Bl. Sang. 2008. «Performance Analysis of a Proton Exchange Membrane Fuel Cell (PEMFC) Integrated with a Trickle Bed Bioreactor for Biological High-Rate Hydrogen Production.» *Energy & Fuels* 22 (1): 83-86. doi:10.1021/ef700270y.
- Jung, KW., DH. Kim, SH. Kim, y HS. Shin. 2011. «Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production.» *Bioresource Technology* 102 (18). Elsevier Ltd: 8612-20. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.056.
- Kalogirou, SA. 2004. «Solar thermal collectors and applications.» *Progress in Energy and Combustion Science* 30 (3): 231-95. doi:10.1016/j.pecs.2004.02.001.
- Kim, DH., SK. Han, SH. Kim, y HS. Shin. 2006. «Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production.» *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (15): 2158-69. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.02.012.
- Kim, IS., MH. Hwang, NJ. Jang, SH. Hyun, y ST. Lee. 2004. «Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process.» *International Journal of Hydrogen Energy* 29 (11): 1133-40. doi:10.1016/j.ijhydene.2003.08.017.
- Konieczny, A., K. Mondal, T. Wiltowski, y P. Dydo. 2008. «Catalyst development for thermocatalytic decomposition of methane to hydrogen.» *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (1): 264-72. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.07.054.
- Kraemer, JT., y DM. Bagley. 2006. «Supersaturation of dissolved H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> during fermentative hydrogen production with N<sub>2</sub> sparging.» *Biotechnology Letters* 28: 1485-91. doi:10.1007/s10529-006-9114-7.
- Kumar, G., P. Bakonyi, S. Periyasamy, SH. Kim, N. Nemestóthy, y K. Bélafi-Bakó. 2015. «Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 44: 728-37. doi:10.1016/j.rser.2015.01.042.
- Kyazze, G., N. Martinez-Perez, R. Dinsdale, GC. Premier, FR. Hawkes, AJ. Guwy, y DL. Hawkes. 2005. «Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production.» *Biotechnology and Bioengineering* 93 (5): 971-79. doi:10.1002/bit.
- Lee, HS., MB. Salerno, y BE. Rittmann. 2008. «Thermodynamic evaluation on H<sub>2</sub> production in glucose fermentation.» *Environmental Science and Technology* 42 (7): 2401-7.
- Li, H., MB. Foston, R. Kumar, R. Samuel, X. Gao, F. Hu, AJ. Ragauskas, y CE. Wyman. 2012. «Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fast-growing, drought-tolerant biofuels feedstock.» *RSC Advances* 2 (11): 4951. doi:10.1039/c2ra20557b.

- Li, J., B. Li, G. Zhu, N. Ren, L. Bo, y J. He. 2007. «Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR).» *International Journal of Hydrogen Energy* 32 (15 SPEC. ISS.): 3274-83. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.04.023.
- López-López, A., G. Davila-Vazquez, E. León-Becerril, E. Villegas-García, y J. Gallardo-Valdez. 2010. «Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes.» *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 9 (2): 109-16. doi:10.1007/s11157-010-9204-9.
- Luo, G., D. Karakashev, L. Xie, Q. Zhou, y I. Angelidaki. 2011. «Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production.» *Biotechnology and Bioengineering* 108 (8): 1816-27. doi:10.1002/bit.23122.
- Lynd, LR. 1996. «OVERVIEW AND EVALUATION OF FUEL ETHANOL FROM CELLULOSIC BIOMASS: Technology, Economics, the Environment, and Policy.» *Annual Review of Energy and the Environment* 21 (1): 403-65. doi:10.1146/annurev.energy.21.1.403.
- Méndez-Acosta, HO., JP. García-Sandoval, V. González-Álvarez, V. Alcaraz-González, y JA. Jáuregui-Jáuregui. 2011. «Regulation of the organic pollution level in anaerobic digesters by using off-line COD measurements.» *Bioresource Technology* 102 (17): 7666-72. doi:10.1016/j.biortech.2011.05.053.
- Mohammadi, P., S. Ibrahim, MSM. Anuar, S. Ghafari, S. Vikineswary, y AA. Zinatizadeh. 2012. «Influences of Environmental and Operational Factors on Dark Fermentative Hydrogen Production: A Review.» *Clean - Soil, Air, Water* 40 (11): 1297-1305. doi:10.1002/clen.201100007.
- Monlau, F., Q. Aemig, E. Trably, J. Hamelin, JP. Steyer, y H. Carrere. 2013. «Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks.» *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (28): 12273-82. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.07.018.
- Monlau, F., C. Sambusiti, A. Barakat, M. Quéméneur, E. Trably, JP. Steyer, y H. Carrère. 2014. «Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review.» *Biotechnology advances*, abril. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.04.007.
- Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, YY. Lee, M. Holtzapple, y M. Ladisch. 2005. «Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.» *Bioresource Technology* 96 (6): 673-86. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025.
- Motte, JC., E. Trably, J. Hamelin, R. Escudié, A. Bonnafous, JP. Steyer, N. Bernet, JP. Delgenès, y C. Dumas. 2014. «Total solid content drives hydrogen production through microbial selection during thermophilic fermentation.» *Bioresource Technology* 166. Elsevier Ltd: 610-15. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.078.
- Nissilä, ME., CH. Lay, y JA. Puhakka. 2014. «Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates - A review.» *Biomass and Bioenergy* 67: 145-59. doi:10.1016/j.biombioe.2014.04.035.

- Nkemka, VN., y M. Murto. 2013. «Biogas production from wheat straw in batch and UASB reactors: the roles of pretreatment and seaweed hydrolysate as a co-substrate.» *Bioresource technology* 128 (enero). Elsevier Ltd: 164-72. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.117.
- Oh, YK., SH. Kim, MS. Kim, y S. Park. 2004. «Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter.» *Biotechnology and Bioengineering* 88 (6): 690-98. doi:10.1002/bit.20269.
- Orgill, JJ., HK. Atiyeh, M. Devarapalli, JR. Phillips, RS. Lewis, y RL. Huhnke. 2013. «A comparison of mass transfer coefficients between trickle-bed, Hollow fiber membrane and stirred tank reactors.» *Bioresource Technology* 133 (abril). Elsevier Ltd: 340-46. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.124.
- Pawar, SS., VN. Nkemka, AA. Zeidan, M. Murto, y EWJ. van Niel. 2013. «Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* followed by biogas production in a two-step uncoupled process.» *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (22). Elsevier Ltd: 9121-30. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.05.075.
- Perez-Pimienta, JA., MG. Lopez-Ortega, P. Varanasi, V. Stavila, G. Cheng, S. Singh, y B. Simmons. 2013. «Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass.» *Bioresource technology* 127 (enero). Elsevier Ltd: 18-24. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.124.
- Prinsen, P. 2013. «Caracterización química y estructural de lignina y lípidos de materiales lignocelulósicos de interés industrial.» Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla. Universidad de Sevilla.
- Puhulwella, RG., L. Beckers, F. Delvigne, AS. Grigorescu, P. Thonart, y S. Hiligsmann. 2014. «Mesophilic biohydrogen production by *Clostridium butyricum* CWB11009 in trickling biofilter reactor.» *International Journal of Hydrogen Energy* 39 (30). Elsevier Ltd: 16902-13. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.08.087.
- Rai, PK., SP. Singh, RK. Asthana, y S. Singh. 2014. «Biohydrogen production from sugarcane bagasse by integrating dark- and photo-fermentation.» *Bioresource technology* 152. Elsevier Ltd: 140-46. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.117.
- Raj, SM., S. Talluri, y LP. Christopher. 2012. «Thermophilic Hydrogen Production from Renewable Resources: Current Status and Future Perspectives.» *Bioenergy Research* 5 (2): 515-31. doi:10.1007/s12155-012-9184-4.
- Ren, N. Q., H. Chua, S. Y. Chan, Y. F. Tsang, Y. J. Wang, y N. Sin. 2007. «Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors.» *Bioresource Technology* 98 (9): 1774-80. doi:10.1016/j.biortech.2006.07.026.
- Ren, N., A. Wang, G. Cao, J. Xu, y L. Gao. 2009. «Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges.» *Biotechnology Advances* 27 (6). Elsevier B.V.: 1051-60. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.05.007.
- Ren, Nanqi, Aijie Wang, Guangli Cao, Jifei Xu, y Lingfang Gao. 2009. «Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges.» *Biotechnology Advances* 27 (6). Elsevier B.V.: 1051-60. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.05.007.

- Rittmann, BE., y P. McCarty. 2001. *Environmental biotechnology: principles and applications*. Editado por McGraw-Hill. *McGraw-Hill Series in Water Resources & Environmental Engineering*. New York, USA. doi:10.1016/0958-1669(95)80061-1.
- Rubin, EM. 2008. «Genomics of cellulosic biofuels.» *Nature* 454 (7206): 841-45. doi:10.1038/nature07190.
- Saady, NMC. 2013. «Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge.» *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (30). Elsevier Ltd: 13172-91. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.07.122.
- Saucedo-Luna, J., AJ. Castro-Montoya, MM. Martinez-Pacheco, CR. Sosa-Aguirre, y J. Campos-Garcia. 2011. «Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*.» *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 (6): 725-32. doi:10.1007/s10295-010-0853-z.
- SENER. 2013. *Estrategia Nacional de Energía 2013-2027*.
- Show, KY., DJ. Lee, y JS. Chang. 2011. «Bioreactor and process design for biohydrogen production.» *Bioresource Technology* 102 (18). Elsevier Ltd: 8524-33. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.055.
- Show, KY., ZP. Zhang, JH. Tay, DT. Liang, DJ. Lee, N. Ren, y A. Wang. 2010. «Critical assessment of anaerobic processes for continuous biohydrogen production from organic wastewater.» *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (24). Elsevier Ltd: 13350-55. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.11.110.
- Singh, L., y ZA. Wahid. 2015. «Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review.» *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 21. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry: 70-80. doi:10.1016/j.jiec.2014.05.035.
- Singh, R., A. Shukla, S. Tiwari, y M. Srivastava. 2014. «A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 32. Elsevier: 713-28. doi:10.1016/j.rser.2014.01.051.
- Taherzadeh, MJ., y K. Karimi. 2008. «Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review.» *International Journal of Molecular Sciences* 9 (9): 1621-51. doi:10.3390/ijms9091621.
- Turcot, J., A. Bisailon, y PC. Hallenbeck. 2008. «Hydrogen production by continuous cultures of *Escherichia coli* under different nutrient regimes.» *International Journal of Hydrogen Energy* 33: 1465-70. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.09.034.
- Valdez-Vazquez, I., JA. Acevedo-Benítez, y C. Hernández-Santiago. 2010. «Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (7): 2147-53. doi:10.1016/j.rser.2010.03.034.
- Van Ginkel, S., y BE. Logan. 2005. «Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids.» *Environmental Science and Technology* 39 (23): 9351-56. doi:10.1021/es0510515.
- Wu, SY., CH. Hung, CN. Lin, HW. Chen, AS. Lee, y JS. Chang. 2006. «Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in

- high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge.» *Biotechnology and Bioengineering* 93 (5): 934-46. doi:10.1002/bit.
- Yasin, NHM., T. Mumtaz, MA. Hassan, y N. Abd Rahman. 2013. «Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review.» *Journal of Environmental Management* 130 (June 2011). Elsevier Ltd: 375-85. doi:10.1016/j.jenvman.2013.09.009.
- Zhang, H., MA. Bruns, y BE. Logan. 2006. «Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor.» *Water Research* 40 (4): 728-34. doi:10.1016/j.watres.2005.11.041.
- Zhang, ZP., KY. Show, JH. Tay, DT. Liang, DJ. Lee, y WJ. Jiang. 2007. «Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation.» *Biotechnology and Bioengineering* 96 (6): 1040-50. doi:10.1002/bit.
- Züttel, A. 2004. «Hydrogen storage methods.» *Die Naturwissenschaften* 91 (4): 157-72. doi:10.1007/s00114-004-0516-x.