



**CONACYT**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA  
Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.**



**EFFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS DE VINAZAS TEQUILERAS SOBRE LA  
PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

# **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INNOVACIÓN  
BIOTECNOLÓGICA**

**PRESENTA**

**ING. MANUEL GARCIA BECERRA**

Dr. Gustavo Dávila Vázquez†

Dr. Óscar Aguilar Juárez

Dr. Hugo Óscar Méndez Acosta

Dr. Felipe Alatraste Mondragón

Dr. José René Rangel Méndez

Guadalajara, Jalisco, Enero 2019

---

## AGRADECIMIENTOS

---

A mis padres, María de Lourdes Becerra Barragán y Manuel García Aguilar por todo su amor y apoyo. Por siempre estar ahí como ejemplo, y como una motivación para seguir creciendo tanto personal como profesionalmente. Por todo el trabajo y dedicación que han invertido en mi formación hasta la fecha.

A mis hermanas, Alejandra García Becerra y Adriana García Becerra, por todos los consejos que me dieron durante esta etapa, por siempre impulsarme y animarme a ampliar mis horizontes.

A mi novia, Daniela Quiñonez Zarrabal, por acompañarme durante esta etapa, por siempre apoyarme, y por estar ahí tanto en los buenos momentos, como en los malos momentos.

Al Dr. Gustavo Dávila Vázquez<sup>†</sup>, por abrirme las puertas de esta institución, por todo el apoyo y todo lo que me enseñó el tiempo que tuve el gusto de trabajar con él. Y por ayudarme a sentar las bases del presente proyecto de investigación.

Al Dr. Oscar Aguilar Juárez, por toda la enseñanza que me brindó durante estos dos años, por toda la paciencia y trabajo que invirtió en la dirección de la presente tesis.

Al Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta, por apoyarme con su experiencia en el área de digestión anaerobia, y en la operación de biorreactores.

Al Dr. José René Rangel Méndez, por sus aportaciones en la etapa de evaluación de adsorbentes y por todas sus enseñanzas en el área de adsorción en general.

Al Dr. Felipe Alatríste Mondragón, por prestar toda su experiencia en el área de producción de biohidrógeno, y por todos sus comentarios en la redacción del presente trabajo.

Al Dr. Luís Alberto Arellano, por brindarme su amistad y toda su experiencia, por todos los consejos que me dio durante las pruebas de producción de biohidrógeno en lote y en continuo.

Al Dr. Jesús Bernardino Velázquez por su asesoría en el uso de Matlab, sus correcciones al presente documento, por todos sus comentarios en el área de ecología microbiana, por toda la amistad y apoyo que me ha brindado en este tiempo.

A la Dra. Silvia Maribel Contreras Ramos, por el apoyo y por los invaluable consejos y comentarios que me dio durante mi proceso de formación.

A la Ingeniera Elia Cristina Castellanos López, por su apoyo durante los ensayos de adsorción en lote, y caracterización de vinazas tequileras

Al Ingeniero Rodolfo Ballinas Méndez, por su colaboración durante los ensayos de producción de biohidrógeno en continuo.

A la M. en C. Elizabeth Rodriguez Felix, a la M. en C. Sara Gisela Sánchez Ureña y al Ing. Roberto Emmanuel Bolaños Rosales por su amistad, y por todo lo que me enseñaron cuando recién me iniciaba en la investigación científica.

A mis amigos, M. en C. Froylán Martínez Rabelo y Luis Alfredo Gómez Guzmán, por todos esos momentos que compartimos a lo largo de estos dos años, y por convertirse en dos de los mejores amigos que la vida me ha dado el gusto de conocer.

A Andrea, Diana, Diego y a todos mis compañeros de la unidad de Biotecnología Ambiental, por todos los momentos que compartimos y por todo el apoyo que me brindaron a lo largo de estos dos años.

A todos mis compañeros de la Maestría en Ciencias de la Innovación Biotecnológica, por todo lo que me ayudaron a aprender y por todos los consejos que me dieron durante esta etapa.

El presente trabajo de investigación fue financiado por el proyecto “Clúster biocombustibles gaseosos” propuesta 247006 del Fondo Sectorial CONACyT Secretaria de Energía-Sustentabilidad Energética.

## DEDICATORIA

---

El presente trabajo es dedicado a la memoria del Dr. Gustavo Dávila Vázquez<sup>†</sup>, quien en un principio me dio la oportunidad de entrar a esta institución, y me guio durante mis primeros pasos dentro de la investigación científica.

Una persona que me dejó innumerables enseñanzas a pesar del corto tiempo que tuve el gusto de trabajar con él, y a la cual recordaré siempre como una persona apasionada de su trabajo. Un científico y maestro ejemplar, siempre abierto a opiniones e ideas nuevas y siempre dispuesto a resolver cualquier duda que surgiera en el camino. Pero sobre todo, recordaré al Doctor Gus, gracias a su gran calidad humana, misma que sobresalía de entre sus numerosas virtudes. Estaré eternamente agradecido por todo el apoyo y la fe que depositó en mi persona, ya que nada de esto hubiese sido posible de no ser por él. Hasta donde esté, muchas gracias por todo, Doctor.

## RESUMEN

---

El hidrógeno es una de las alternativas más prometedoras para satisfacer la demanda energética actual. Una sus principales ventajas es que puede ser producido por medio de procesos biológicos, entre los cuales destaca la fermentación oscura debido a sus mayores velocidades volumétricas de producción, su baja inversión energética y a presentar la ventaja de poder utilizar materia orgánica residual a manera de sustrato. Las vinazas tequileras son un sustrato potencial para la producción de biohidrógeno debido a su elevada concentración de azúcares residuales y su elevada tasa de generación (10 a 12 L por litro de tequila producido). La producción de biohidrógeno por fermentación oscura es una alternativa para valorizar las vinazas tequileras. Sin embargo, se han encontrado bajos rendimientos en comparación a sustratos modelo, y se ha confirmado la presencia de compuestos inhibidores en la vinaza tequilera (fenólicos, furfurales y ácidos orgánicos de cadena corta), a los cuales se les pueden atribuir los bajos rendimientos observados.

En la presente investigación, se evaluó un pretratamiento de adsorción como estrategia para remover compuestos fenólicos y furfurales de la vinaza tequilera, y se describió su efecto sobre los rendimientos de producción de biohidrógeno. Se probaron tres adsorbentes, el carbón activado Darco SIGMA Merk, y las resinas de adsorción Amberlite FPX66 y XAD4. Los cuales son reportados para separación de compuestos fenólicos y furfurales.

Se realizaron las cinéticas e isothermas de adsorción en lote a 25°C, pH 3.6 y 100 RPM, y se ajustaron los modelos de pseudo primer y segundo orden a los datos de las cinéticas, y los modelos de Langmuir y Freundlich a los datos de las isothermas. Posteriormente, se realizaron pruebas de retención de azúcares totales. Se realizaron ensayos en columnas de lecho empacado con el mejor de los adsorbentes estudiando el efecto de la longitud del lecho y velocidad de flujo sobre la retención de fenólicos y azúcares totales.

Se evaluó el efecto del pretratamiento sobre la producción de biohidrógeno en pruebas de fermentación en lote utilizando el sistema automático de medición de potencial de metano (AMPTSII por sus siglas en inglés). Por último, se analizó el desempeño a

corto plazo de un reactor agitado en continuo (CSTR por siglas en inglés) alimentado con vinaza cruda y detoxificada.

El carbón activado tuvo mayores porcentajes de remoción de fenoles totales en lote que las resinas FPX66 y XAD4 (62.2, 33.4 y 33.2% respectivamente). El carbón activado tuvo mayor afinidad por los fenoles totales ( $K_L = 17.07$  y  $1/n=0.32$ ) que las resinas XAD4 ( $K_L=6.84$   $1/n=0.36$ ) y FPX66 ( $K_L=2.66$  y  $1/n=0.60$ ) de acuerdo con el ajuste de los modelos de Langmuir y Freundlich.

No se encontraron diferencias significativas entre la retención de azúcares totales entre los 3 adsorbentes, por lo que se eligió al carbón activado para las siguientes etapas. Se alcanzaron remociones hasta del 97% en las pruebas en lecho empacado. No se encontraron diferencias significativas entre la remoción de azúcares totales en los tratamientos estudiados (<15%), por lo que se tomaron las condiciones de 25 cm de longitud de columna y 3 mL/min como el mejor de los tratamientos.

Durante las pruebas de fermentación, se encontró que el pretratamiento aumentó en 22.5% la tasa máxima de producción de biohidrógeno ( $R_{max}$ ), la fase lag se redujo 5.42 h en promedio, e incrementó el rendimiento molar de producción de hidrógeno un 11.32% en comparación con vinaza cruda. Sin embargo, este redujo la producción máxima acumulada de hidrógeno ( $H_{max}$ ) un 13.05% y el rendimiento calculado con base en litro de vinaza alimentada en un 30.66%. Se identificaron los ácidos acético y butírico como principales productos de fermentación.

La vinaza tequilera cruda mantuvo una producción de hidrógeno en continuo, y se identificaron a los ácidos acético, butírico y láctico como principales productos de fermentación. Mientras que, la vinaza detoxificada frenó abruptamente su producción de biohidrógeno después de aproximadamente 48 h de operación en continuo y tuvo como principales productos de fermentación a los ácidos láctico, acético y butírico.

## **ABSTRACT**

---

Hydrogen production is one of the most promising alternatives to fulfill the current energy demand. One of its advantages is that it can be produced by biological



processes. Among them, the dark fermentation has the highest production rate, it needs low energy investment and may use residual organic matter as substrate.

The tequila vinasses are a potential substrate for dark fermentation bio-hydrogen production due to their high concentration of residual sugars and large amount generation as byproduct (10 – 12 L per liter of tequila produced). Thus, biohydrogen production by dark fermentation allow revalorization of tequila vinasses. Nevertheless, low yields have been reported when tequila vinasses are used in comparison with model substrates, probably by inhibitory compounds (phenolics, furans and short chain organic acids), which have been confirmed in tequila vinasses.

In the present work, an adsorption treatment was evaluated as a strategy to remove phenolic and furanic compounds from tequila vinasses, and their effects on the bio-hydrogen production yield were described. Three adsorbents were assayed, activated charcoal (Darco SIGMA-Merck), and the Amberlite FPX66 and XAD4 resins, which are reported for phenolic and furanic compounds removal.

Adsorption batch experiments (adsorption kinetics and isotherms) were carried out at 25 °C, 3.6 pH and 100 RPM. Experimental data were modeled to pseudo-first and pseudo-second order kinetic models and Langmuir and Freundlich equations. Afterwards, retention assay of total sugar was performed. Fixed bed column assays were carried out with the best of the adsorbents in order to study the effect of the bed length and flow velocity upon retention of total phenolics and sugars.

The effect of the adsorption treatment on the bio-hydrogen production was evaluated in batch fermentation tests, which were carried out in the automatic methane potential test system (AMPTS II). Finally, the performance of a continuous stirred tank reactor (CSTR) feeded with raw and detoxified tequila vinasses was studied.

The activated charcoal removes more phenolic compounds than the FPX66 and XAD4 resins (62.2, 33.4, and 33.2% of total phenolic removal, respectively). The activated charcoal have higher affinity for phenolic compounds ( $K_L=17.07$  and  $1/n=0.32$ ) than the XAD4 ( $K_L=6.84$  and  $1/n=0.36$ ) and FPX66 ( $K_L=2.66$  and  $1/n=0.60$ ) resins according to the Langmuir and Freundlich models.

There was no significant difference among the total sugar retention of the three adsorbents. Because of that, activated charcoal was selected for the following stages

of the work. Removal up to 97% of total phenolics were achieved in the fixed bed adsorption tests. There was no significant difference on the total sugars removal among the treatments (<15%). Therefore, 25 cm column length and 3 mL/min flow rate were chosen as the best conditions for the following steps.

In batch fermentation tests, the adsorption treatment increased the maximum bio-hydrogen production rate ( $R_{max}$ ) by 22.5%, the lag phase was reduced in 5.42 h average and bio-hydrogen molar yield was increased by 11.32% compared to raw (untreated) vinasses. Nevertheless, treatment reduced the maximum cumulative bio-hydrogen production ( $H_{max}$ ) by 13.05% and the yield, measured as hydrogen volume per vinasses volume (L/L), was reduced by 30.66%. Acetic and butyric acid were identified as the main volatile fatty acids produced by fermentation.

Raw tequila vinasses maintained a hydrogen production in continuous operation. Acetic, butyric and lactic acids were identified as main fermentation products. In contrast, detoxified tequila vinasses abruptly arrest its production about 48 h after the beginning of the continuous operation and produced mainly lactic, acetic and butyric acids.

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1 Comparativo de distintos vectores energéticos. Adaptado de Cipriani et al., (2014).....	3
Tabla 2 Comparativo de rendimientos de producción de biohidrógeno.....	7
Tabla 3 Parámetros y metodologías de la caracterización fisicoquímica. ....	13
Tabla 4 Características de los adsorbentes utilizados. ....	14
Tabla 5 Diseño experimental de las pruebas de producción de H <sub>2</sub> en lote. ....	17
Tabla 6 Composición de la solución de nutrientes. ....	18
Tabla 7 Parámetros medidos de la caracterización de las vinazas tequileras.....	23
Tabla 8 Comparativo de concentraciones de inhibidores presentes en la vinaza. ....	24
Tabla 9 Constantes obtenidas a partir del ajuste de los modelos de pseudo primer y segundo orden. ....	25
Tabla 10 Constantes calculadas a partir de los ajustes de las isotermas a los modelos de Langmuir y Freundlich. ....	27
Tabla 11 Concentraciones iniciales de inhibidores presentes en la vinaza tequilera.	29
Tabla 12 Caracterización de las vinazas tequileras estudiadas en las pruebas de producción de hidrógeno.....	31
Tabla 13 Constantes promedio calculadas a partir del ajuste del modelo de Gompertz a los datos experimentales.....	33
Tabla 14 Comparativo de distintos reactores en continuo para la producción e hidrógeno utilizando vinazas como sustrato.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Ilustración 1 Principales vías biológicas para la producción de hidrógeno adaptado de: (Arimi et al., 2015).....	4
Ilustración 2 Diagrama esquemático del proceso de digestión anaerobia. Diferentes grupos tróficos: (a) bacterias fermentativas, (b) bacterias acetogénicas, (c) bacterias homoacetogénicas, (d) arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, (e) arqueas metanogénicas acetoclásticas (Dávila-Vázquez y Razo-Flores, 2007).....	5
Ilustración 3 Diagrama de la configuración del reactor.....	19
Gráfica 1 Cinéticas de adsorción de fenoles totales para cada adsorbente a 25° C, pH de 3.6 y 100 RPM.....	25
Gráfica 2 Isotermas de adsorción de fenoles totales para los 3 adsorbentes a 25°C, pH3.6 y 100RPM.....	27
Gráfica 3 Retención de azúcares para cada adsorbente. ....	28
Gráfica 4 Curvas de ruptura en la columna empacada con 25 cm de C.A. a 3 mL de velocidad de flujo, temperatura ambiente y pH 3.6. ....	30
Gráfica 5 Porcentajes de remoción después de 5 horas 30 minutos de operación para azúcares totales y fenoles totales, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), $n=3$ . ....	31
Gráfica 6 Cinéticas de producción de hidrógeno y ajustes al modelo de Gompertz. Arriba: relación I/S=2.7, abajo: relación I/S=7.5. ....	33
Gráfica 7 Comparativo de rendimiento molar y por litro de vinaza de los diferentes tratamientos.....	38
Gráfica 8 Producción de ácido acético y ácido butírico para relación I/S=2.7 las barras representan desviación estándar, $n=3$ . ....	39
Gráfica 9 producción de ácido acético y ácido butírico para la relación I/S=7.5 las barras representan desviación estándar, $n=3$ . ....	39
Gráfica 10 Comparativo entre las relaciones Acético/Butírico para todos los tratamientos, las barras representan desviación estándar, $n=3$ . ....	40
Gráfica 11 Ajuste del modelo de Gompertz a los datos de producción en lote de los reactores CSTR.....	41

Gráfica 12 Comportamiento de la producción de hidrógeno en el reactor alimentado con vinaza cruda, las flechas indican los puntos en los que se purgó el reactor debido a la colmatación. ....	42
Gráfica 13 Producción de AGV en el reactor de vinaza cruda. ....	44
Gráfica 14 Comportamiento de la producción de biohidrógeno en el reactor alimentado con vinaza detoxificada. ....	46
Gráfica 15 Producción de AGV durante el segundo ensayo con vinaza detoxificada. ....	47
Gráfica 16 Producción de AGV en el segundo reactor alimentado con vinaza detoxificada. ....	48
Gráfica 17 Comportamiento de la producción de biohidrógeno en la tercera corrida del reactor alimentado con vinaza detoxificada.....	49
Gráfica 18 Producción de AGV durante el tercer ensayo con vinaza detoxificada. ....	50
Gráfica 19 Comparativa del comportamiento del reactor alimentado con vinaza cruda, y la tercera prueba alimentada con vinaza detoxificada. ....	51

# CONTENIDO

---

Agradecimientos .....	i
Dedicatoria .....	iii
Resumen .....	v
Abstract .....	vi
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras .....	x
1 Introducción .....	1
2 Antecedentes .....	2
2.1 Los subproductos de la industria tequilera .....	2
2.2 La producción biológica de hidrógeno .....	2
2.2.1 Factores importantes en la producción continua de biohidrógeno por la vía fermentativa .....	5
2.3 Los inhibidores de la producción biológica de hidrógeno .....	7
2.3.1 Compuestos fenólicos .....	8
2.3.2 Derivados del furfural.....	8
2.3.3 Ácidos orgánicos débiles .....	8
2.4 La adsorción como tecnología para la detoxificación de sustratos.....	9
2.4.1 Adsorbentes para detoxificación de sustratos complejos .....	9
3 Planteamiento del problema .....	12
4 Justificación .....	12
5 Hipótesis .....	12
6 Objetivos .....	12
6.1 Objetivo general .....	12
6.2 Objetivos específicos .....	13
7 Metodología .....	13
7.1 Muestreo y caracterización de vinazas tequileras .....	13
7.2 Adsorbentes estudiados.....	14

7.3	Cinéticas de adsorción .....	14
7.4	Isotermas de adsorción .....	15
7.5	Pruebas de adsorción en columna .....	16
7.6	Ensayos en lote de producción de biohidrógeno .....	17
7.7	Ensayos de producción continua de biohidrógeno .....	19
7.8	Montaje del reactor.....	19
7.9	Condiciones experimentales .....	20
7.10	Métodos analíticos .....	20
7.10.1	Análisis de compuestos inhibidores individuales .....	20
7.10.2	Análisis de los efluentes .....	21
7.10.3	Análisis del gas generado.....	21
7.10.4	Análisis de la cinética de producción gaseosa.....	21
7.10.5	Métodos estadísticos .....	22
8	Resultados .....	23
8.1	Caracterización de las vinazas tequileras .....	23
8.2	Cinéticas de adsorción .....	25
8.3	Isotermas de adsorción .....	26
8.3.1	Pruebas de retención de azúcares totales.....	28
8.4	Pruebas de adsorción en columnas de lecho fijo .....	29
8.4.1	Efecto de la velocidad de flujo y longitud de lecho en la adsorción de fenoles y azúcares totales.....	30
8.4.2	Pruebas de producción de hidrógeno en lote .....	32
8.4.3	Efecto del pretratamiento sobre la producción máxima de hidrógeno (Hmax) en lote.....	34
8.4.4	Efecto del pretratamiento sobre la tasa máxima de producción de hidrógeno (Rmax).....	35
8.4.5	Efecto del pretratamiento sobre la fase lag.....	36
8.4.6	Efecto del pretratamiento sobre el rendimiento de producción de hidrógeno .....	36
8.4.7	Efecto del pretratamiento en el perfil de AGV .....	38

8.5	Pruebas de producción de biohidrógeno en continuo .....	41
8.5.1	Arranque en lote de los reactores CSTR .....	41
8.5.2	Desempeño de los reactores en continuo .....	42
9	Conclusiones .....	53
10	Prospectivas .....	55
11	Bibliografía.....	56
12	Anexo 1 técnicas de caracterización fisicoquímica.....	65
12.1	Demanda química de oxígeno .....	65
12.1.1	Materiales .....	65
12.1.2	Procedimiento.....	65
12.2	Fenoles totales por Folin-Ciocalteu.....	66
12.2.1	Materiales y reactivos .....	66
12.2.2	Procedimiento.....	66
12.3	Fenoles totales por 4-aminoantipirina .....	67
12.3.1	Materiales y reactivos .....	67
12.3.2	Procedimiento.....	67
12.4	Fósforo total .....	69
12.4.1	Materiales y reactivos .....	69
12.4.2	Procedimiento.....	69
12.5	Nitrógeno total.....	70
12.5.1	Materiales y reactivos .....	70
12.5.2	Procedimiento.....	70
12.6	Azúcares totales .....	70
12.6.1	Materiales y reactivos .....	70
12.6.2	Procedimiento.....	71
12.7	Azúcares reductores .....	71
12.7.1	Materiales y reactivos .....	71



12.7.2	Procedimiento.....	71
12.8	Sólidos Totales .....	72
12.8.1	Materiales .....	72
12.8.2	Procedimiento.....	72
12.9	Sólidos suspendidos totales.....	73
12.9.1	Materiales .....	73
12.9.2	Procedimiento.....	73
12.10	Sólidos disueltos totales (SDT) .....	73
12.11	Sólidos totales volátiles.....	73
12.11.1	Material.....	73
12.11.2	Procedimiento .....	74
12.12	Sólidos sedimentables .....	74
12.12.1	Material.....	74
12.12.2	Procedimiento .....	74
13	Anexo 2 Scripts utilizados en matlab .....	76
13.1	Ajuste de modelo de Gompertz a archivos generados en AMPTSII .....	76
13.2	Ajuste de modelos cinéticos de adsorción .....	77
13.2.1	Modelo de pseudo-primer orden.....	77
13.2.2	Modelo de pseudo-segundo orden. ....	77
13.3	Ajustes a modelos de isothermas de adsorción.....	77
13.3.1	Modelo de Freundlich .....	77
13.3.2	Modelo de Langmuir .....	78

# Capítulo I

## 1 INTRODUCCIÓN

---

En la actualidad, existe una gran demanda energética derivada del constante crecimiento demográfico y tecnificación de la sociedad. Demanda que es abastecida casi enteramente por medio de la utilización de combustibles fósiles, recursos no renovables, cuya utilización genera diversos problemas ambientales, sociales y económicos (Dávila-Vázquez *et al.*, 2008 (1); Arimi *et al.*, 2015).

Ante esta problemática, se han buscado alternativas renovables y ambientalmente limpias, siendo el biohidrógeno una de las opciones más atractivas debido a sus características, elevado valor energético por unidad de masa, la factibilidad de ser producido a partir de materia orgánica residual y efluentes agroindustriales con elevada carga orgánica, y la posibilidad de utilizarse en celdas de combustible, en las cuales solo se obtiene agua como emisión (Dávila-Vázquez *et al.*, 2008(1); Buitrón y Carvajal, 2010; Lázaro *et al.*, 2014; Arimi *et al.*, 2015).

La producción de biohidrógeno a partir de vinazas tequileras resulta una opción tentadora para valorizar este efluente. Sin embargo, se han encontrado bajos rendimientos de producción en comparación con otros sustratos (Moreno-Andrade *et al.*, 2011; Buitrón *et al.*, 2014; Lazaro *et al.*, 2014). Los bajos rendimientos de producción asociados a la aplicación de vinazas tequileras podrían deberse a la presencia de compuestos inhibitorios. Por eso, la aplicación de un pretratamiento enfocado a disminuir la concentración de estos compuestos podría aumentar el rendimiento de producción de biohidrógeno y la rentabilidad el proceso (Myoung *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Bundhoo y Mohee, 2016; Rodríguez-Félix *et al.*, 2017).

La adsorción puede considerarse una de las principales alternativas para realizar un pretratamiento a las vinazas tequileras previamente centrifugadas ya que presenta una baja inversión energética en comparación a otros tratamientos

fisicoquímicos, además de tener la gran ventaja de poder recuperar y concentrar los compuestos removidos, si es que alguno demostrase tener algún valor comercial como antioxidante o compuesto bioactivo (Soto *et al.*, 2011; Lee y Park, 2016).

## **2 ANTECEDENTES**

---

### **2.1 LOS SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA TEQUILERA**

La industria tequilera es uno de los sectores productivos con mayor crecimiento en el país. En la actualidad, la industria tequilera en México produce cerca de 273.2 millones de litros de tequila al año, generando 70,000 empleos y una derrama económica sustancial en los estados que componen el área de denominación de origen (Cámara Nacional De la Industria Tequilera, 2017).

Este sector productivo trae consigo la generación de residuos de difícil tratamiento o disposición final como lo son el bagazo de agave y las vinazas tequileras. El bagazo de agave es un residuo compuesto por las fibras de agave sobrantes del proceso de extracción de los azúcares del agave, mientras que las vinazas tequileras son el residuo líquido procedente de la destilación del tequila (Alemán-Nava *et al.*, 2018). Por su naturaleza, su tratamiento resulta un reto técnico y económico, por lo cual, un gran porcentaje de estas es vertido en campos de cultivo y cuerpos de agua donde tienen efectos nocivos debido a su elevada carga orgánica y a la presencia de compuestos recalcitrantes. Se estima que por cada litro de tequila producido se generan aproximadamente 1.4 kg de bagazo y de 10 a 12 litros de vinaza (López-López *et al.*, 2010; Moran-Salazar *et al.*, 2016; Alemán-Nava *et al.*, 2018).

### **2.2 LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO**

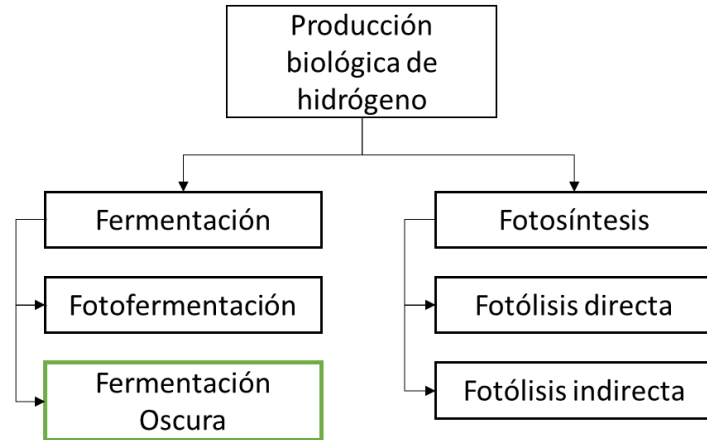
La creciente necesidad energética de la población global es abastecida casi en su totalidad por medio del uso de los combustibles fósiles. Su sobre explotación trae consigo diversos problemas sociales, económicos y ambientales (Dávila-Vázquez *et al.*, 2008).

Se le ha dado importancia a la aplicación del hidrógeno como vector energético debido a su elevada carga energética másica, y a que no produce gases de efecto invernadero. Sin embargo, uno de sus principales desventajas es que en la actualidad la mayor parte del hidrógeno consumido se produce a partir de métodos que requieren una gran inversión energética como la electrólisis del agua, o que requieren de hidrocarburos como materia prima y además, emiten gases de efecto invernadero como la reformación de metano con vapor y la oxidación parcial (Cipriani *et al.*, 2014).

*Tabla 1 Comparativo de distintos energéticos. Adaptado de Cipriani et al., (2014).*

<i>Acarreador energético</i>	<i>Manera de almacenamiento</i>	<i>Densidad energética por masa (KWh/Kg)</i>	<i>Densidad energética por volumen (KWh/L)</i>
Hidrógeno	Gas (30 MPa)	33.3	0.53
Gas natural	Gas (30 MPa)	13.9	3.38
Gas licuado (propano)	Gas (30MPa)	12.9	7.5
Metanol	Gas (30 MPa)	5.6	4.42
Gasolina	Líquido	12.7	8.7
Diésel	Líquido	11.6	9.7

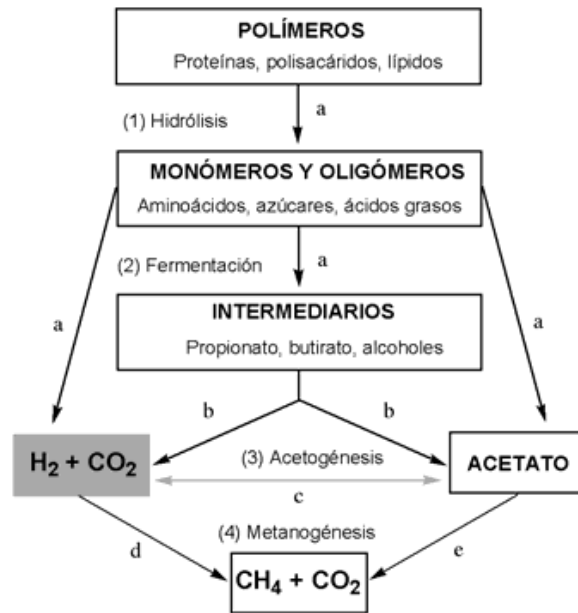
Ante esto, ha surgido interés en los distintos procesos biológicos que producen hidrógeno. Entre estos, destaca la fermentación oscura (como es conocida para diferenciarla de la fotofermentación) debido a que, entre todos los métodos biológicos de producción de hidrógeno, es el que a la fecha ha reportado mayores velocidades volumétricas de producción (Arimi *et al.*, 2015; Dávila-Vázquez y Razo-Flores, 2007).



*Ilustración 1. Principales vías biológicas para la producción de hidrógeno adaptado de: Arimi et al., 2015.*

Se puede definir a la fermentación oscura como un proceso anaerobio en el cual un conjunto de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos (principalmente pertenecientes al género *Clostridia*), convierten la materia orgánica rica en carbohidratos presente en el medio en un conjunto de ácidos grasos volátiles (AGV), otros ácidos orgánicos y etanol produciendo hidrógeno como un subproducto (Dávila-Vázquez y Razo-Flores, 2007; Marino-Marmolejo et al., 2015; Cabrol et al., 2017).

La fermentación oscura es un proceso truncado de digestión anaerobia debido a que, de seguir el proceso, los AGV serían consumidos por arqueas metanogénicas, utilizando el H<sub>2</sub> producido en la etapa previa para reducirlos en metano como se muestra en la Ilustración 2 (Dávila-Vázquez y Razo-Flores, 2007). Es por este motivo que, en los sistemas de producción de hidrógeno por fermentación, se toman medidas preventivas para evitar la proliferación de microorganismos metanogénicos. Una práctica común en estos sistemas es tratar el inóculo térmicamente con el objetivo de favorecer a las bacterias productoras de hidrógeno capaces de esporular, y usualmente operan a tiempos de retención hidráulica bajos, lo que elimina a las arqueas de lento crecimiento celular.



*Ilustración 2. Diagrama esquemático del proceso de digestión anaerobia. Diferentes grupos tróficos: (a) bacterias fermentativas, (b) bacterias acetogénicas, (c) bacterias homoacetogénicas, (d) arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, (e) arqueas metanogénicas acetoclásticas (Dávila-Vázquez y Razo-Flores, 2007)*

Otra de las ventajas de la fermentación oscura como un método para producir hidrógeno es la posibilidad de utilizar efluentes residuales como sustrato. Uno de los efluentes más estudiados son las vinazas producidas en los procesos de destilación, debido a su elevada concentración de azúcares residuales y su elevada tasa de producción (Moreno-Andrade *et al.*, 2011; Lázaro *et al.*, 2014).

## **2.2.1 Factores importantes en la producción continua de biohidrógeno por la vía fermentativa**

Se ha estudiado el efecto de factores como el tiempo de retención hidráulica (TRH), concentración inicial del sustrato, pH y temperatura sobre la producción de hidrógeno en distintas configuraciones de reactor utilizando sustratos complejos (Dávila-Vázquez *et al.*, 2008(1); Buitrón y Carvajal, 2010; Lázaro *et al.*, 2014).

### **2.2.1.1 pH y temperatura**

El pH juega un papel vital en la producción de biohidrógeno. Por un lado, el pH tiene un efecto directo sobre las rutas metabólicas por las cuales se produce

hidrógeno. Si bien valores bajos de pH pueden inhibir a las arqueas metanogénicas, también pueden llevar a que la fermentación siga la ruta productora de butirato, misma que tiene un menor rendimiento de producción de hidrógeno (2 moles de H<sub>2</sub> por mol de hexosa reducida) con respecto a la ruta productora de ácido acético (4 moles de H<sub>2</sub> por mol de hexosa reducida) (Dávila-Vázquez y Razo-Flores, 2007; Arimi *et al.*, 2015).

La temperatura tiene un rol crucial en la producción biológica de hidrógeno. Si bien los microorganismos mesófilos productores de hidrógeno tienen su temperatura óptima entre 30 y 40 °C, se ha investigado la posibilidad de incrementar la temperatura del proceso hacia condiciones termofílicas (44- 55 °C) cuando se tiene como objetivo tratar un agua residual que se produce a altas temperaturas como las vinazas de caña azucarera y tequileras (Arimi *et al.*, 2015). Esto con el objetivo de reducir el costo operacional que significaría enfriar las vinazas, además de tener el beneficio de inhibir competidores. Sin embargo, los rendimientos a estas condiciones son bajos. Diversos autores mencionan que puede deberse a la desnaturalización de las enzimas metabólicas involucradas en el proceso (Lázaro *et al.*, 2014; Arimi *et al.*, 2015).

#### **2.2.1.2 Tiempo de retención hidráulica**

El TRH se define como el tiempo que tarda el volumen de operación del reactor en ser desplazado. En reactores completamente agitados, el TRH está acoplado al tiempo de retención de sólidos del reactor.

TRH bajos han demostrado mejorar el rendimiento de producción de hidrógeno debido a que se eliminan competidores y organismos consumidores de hidrógeno (Arimi *et al.*, 2015). Sin embargo, TRH demasiado bajos pueden producir un lavado de la biomasa adaptada teniendo un efecto negativo sobre el rendimiento del reactor (Buitrón y Carvajal, 2010; Buitrón, *et al.*, 2014(1); Arimi *et al.*, 2015).

#### **2.2.1.3 Carga orgánica aplicada**

La carga orgánica aplicada se define como la cantidad de sustrato que se suministra por unidad de volumen de reactor por unidad de tiempo. En

biorreactores para la producción de hidrógeno el sustrato es metabolizado hacia ácidos grasos volátiles, lo que acidifica el medio y disminuye la producción de biohidrógeno a altos niveles de carga orgánica (Arimi *et al.*, 2015). Este efecto es indeseable cuando se utilizan efluentes con una elevada carga orgánica como las vinazas tequileras.

#### 2.2.1.4 Tipo de reactor

Como se ha mencionado anteriormente, dos de los factores de mayor peso sobre el rendimiento de un biorreactor utilizado para la producción de hidrógeno son el TRH y la carga orgánica aplicada. Una configuración ideal de reactor para efluentes como las vinazas tequileras sería aquella en la cual se mantenga una producción y rendimiento estables cuando se trabaje a bajos TRH y elevadas concentraciones de sustrato (Arimi *et al.*, 2015).

El tipo de biorreactor más ampliamente estudiado es el reactor completamente agitado en continuo (CSTR por sus siglas en inglés). Sin embargo, este tipo de reactor presenta inconvenientes debido, entre otros factores, a su incapacidad para acumular biomasa aclimatada a bajos TRH (Buitrón *et al.*, 2014; Arimi *et al.*, 2015).

### 2.3 LOS INHIBIDORES DE LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO

Las vinazas tequileras se han estudiado con anterioridad como sustrato para la producción de hidrógeno. Sin embargo, los rendimientos de producción son bajos en comparación a sustratos modelo. Algunos autores han propuesto que estos bajos rendimientos pudieran deberse a la presencia de compuestos inhibitorios producidos durante la hidrólisis de los azúcares del agave (Buitrón *et al.*, 2014; Rodríguez-Félix *et al.*, 2017).

*Tabla 2 Comparativo de rendimientos de producción de biohidrógeno.*

Sustrato	tipo de reactor	Rendimiento reportado	Referencia
Vinaza tequilera	Lecho Fluidizado	1.3 molH <sub>2</sub> /mol glucosa	Buitrón et al. (2014)
Suero de leche en polvo	Lote	3.1 mol H <sub>2</sub> /mol lactosa	Dávila Vazquez et al. (2008)
lactosa	Lote	3.6 molH <sub>2</sub> /mol lactosa	
Glucosa	Lotes secuenciales	3.09 molH <sub>2</sub> /mol glucosa	Buitrón y Carvajal (2010)



Los compuestos considerados como inhibidores de la fermentación oscura pueden generarse en los procesos de hidrólisis, a partir de la lignina presente en las fibras del agave, o de la posterior hidrólisis de los azúcares fermentables. Se dividen en tres grupos, compuestos fenólicos, furanos y ácidos orgánicos de cadena corta (Sainio, *et al.*, 2011; Quéméneur *et al.*, 2012; Siqueira y Reginatto, 2015; Bundhoo y Mohee, 2016).

### **2.3.1 Compuestos fenólicos**

Estos incluyen compuestos como la vainillina y el siringaldehído, derivados de la lignina. Son producidos durante el proceso de cocimiento de las piñas del agave en la producción de tequila. Estos compuestos tienen un efecto sobre la permeabilidad de la membrana celular. Ello deja a la célula vulnerable a la entrada de otros compuestos tóxicos o a la pérdida de compuestos internos, lo que reduce el crecimiento celular o cambia las rutas metabólicas de la fermentación (Bundhoo y Mohee, 2016).

### **2.3.2 Derivados del furfural**

Compuestos como el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF) son producidos a partir de la degradación de los azúcares bajo condiciones de temperatura y presión elevadas. Los derivados del furfural pueden inhibir la actividad de enzimas participantes en reacciones de fermentación, también causan daños en el ADN y mutaciones en muchas bacterias. Ello produce una baja en el crecimiento celular tanto como cambios en las vías principales de fermentación (Monlau *et al.*, 2014; Bundhoo y Mohee, 2016; Lee y Park, 2016).

### **2.3.3 Ácidos orgánicos débiles**

Ácidos como el ácido levulínico y el ácido fórmico pueden ser producidos a partir de una mayor degradación del furfural. Estos ácidos influyen en la presencia de las formas oxidadas de acarreadores de electrones como el  $\text{NAD}^+$ , lo que cambia las vías metabólicas por las cuales se sigue la fermentación (González-Cabaleiro *et al.*, 2015; Bundhoo y Mohee, 2016).

## 2.4 LA ADSORCIÓN COMO TECNOLOGÍA PARA LA DETOXIFICACIÓN DE SUSTRATOS

Debido a la naturaleza no polar de los compuestos fenólicos y furfurales, se ha intentado removerlos utilizando adsorbentes neutros como el carbón activado y las resinas poliméricas de adsorción (Lee y Park, 2016; Soto *et al.*, 2016; Ghafari *et al.*, 2019).

La adsorción es uno de los procesos de separación más aplicados en la industria en la actualidad. Los compuestos de interés (adsorbatos) son separados debido a que son atraídos en mayor o menor manera hacia la superficie de un sólido (adsorbente) (Wankat, 2012).

Una de las grandes ventajas de la adsorción frente a otros procesos de separación es su bajo requerimiento energético (Bernardo *et al.*, 2009). Gracias a esto, se le ha prestado particular interés como una tecnología para la detoxificación de sustratos debida a la presencia de inhibidores.

Se estudió el uso de carbón activado en el trabajo de Lee y Park, (2016). Dichos autores lograron remover el 99% de vainillina, ácido 4-hidroxibenzoico y furfural, de un hidrolizado de biomasa simulado. En otro trabajo realizado por Cheng *et al.*, (2015), se realizó una detoxificación utilizando carbón activado en conjunto con adaptación bacteriana para mejorar la producción de hidrógeno y metano con hidrolizados de lirio de agua como sustrato. Los autores reportan que el rendimiento de producción de hidrógeno aumentó de 104 a 134.9 ml H<sub>2</sub>/gSVT y la velocidad volumétrica de producción aumentó de 48.3 mL/L/h a 89.2 mL/L/h cuando se aplicaron 0.5 g de carbón activado a 20 ml de hidrolizado ácido y se utilizaron bacterias adaptadas al sustrato.

### 2.4.1 Adsorbentes para detoxificación de sustratos complejos

Se han realizado distintos trabajos para eliminar compuestos inhibitorios de los procesos de fermentación para distintos objetivos, producción de etanol (Myoung *et al.*, 2010), xilitol (Carvalho *et al.*, 2005), e hidrógeno (Cheng *et al.*, 2015). Inclusive, se ha estudiado la aplicación de adsorbentes con el

objetivo de aislar estos compuestos, ya que algunos son de interés comercial (Soto *et al.*, 2016).

#### **2.4.1.1 Carbón activado**

Es el adsorbente más ampliamente utilizado debido a su bajo costo, elevada porosidad y área superficial. Consiste básicamente en un esqueleto de carbono con algunos grupos funcionales en su superficie (Wankat, 2012). Su naturaleza hidrófoba le permite adsorber compuestos orgánicos, por lo cual, se le ha propuesto naturalmente como un adsorbente candidato para la detoxificación de sustratos complejos en distintos trabajos (Myoung *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2015; Bernal *et al.*, 2016; Lee y Park, 2016). Una de las desventajas del carbón activado es que su utilización puede conllevar a una pérdida de azúcares fermentables. Además, la elevada afinidad por los compuestos adsorbidos impide que pueda regenerarse sin un gasto energético importante (Soto *et al.*, 2016).

#### **2.4.1.2 Resinas poliméricas neutras de adsorción Amberlite®**

Las resinas neutras de adsorción son polímeros derivados del estireno y son utilizadas para la purificación de compuestos fenólicos debido a su capacidad para ser fácilmente desorbidas. Con ello, se pueden recuperar algunos compuestos de interés comercial (Lin y Juang, 2009; Zagklis y Paraskeva, 2015; Soto *et al.*, 2016; Ghafari *et al.*, 2019).

Gracias a su afinidad a compuestos fenólicos, se ha propuesto a la resina XAD4 como adsorbente para la detoxificación de hidrolizados para la producción de etanol (Hatano *et al.*, 2013). Estos autores reportan una eficiencia de remoción del 99.9% para HMF, furfural y vainillina cuando se pasaron 400 mL de un hidrolizado sintético con concentraciones de 0.20, 0.35 y 0.80 mg/ml respectivamente en una columna empacada con resina XAD4.

Dentro del grupo de estudio del Doctor Gustavo Dávila-Vázquez† se realizaron ensayos no estandarizados de adsorción utilizando la resina Amberlite® FPX-66 empacada en una columna de vidrio. En ese estudio, se pasaron vinazas procedentes de procesos con cocción y sin cocción de la piña de agave, en los

cuales se alcanzaron remociones del 99% de los compuestos fenólicos y furfurales (Rodríguez-Félix *et al.*, 2017).

# Capítulo II

## 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Se han reportado bajos rendimientos de producción de hidrógeno con las vinazas tequileras (Buitrón y Carvajal, 2010; Buitrón, *et al.*, 2014(1); Buitrón, *et al.*, 2014), y se ha confirmado la presencia de compuestos fenólicos, furanos, y ácidos orgánicos débiles en estas (Rodríguez-Félix *et al.* 2017), mismos a los que se les pueden atribuir los bajos rendimientos observados.

## 4 JUSTIFICACIÓN

---

Debido a su polaridad y aromaticidad, es posible utilizar procesos de adsorción con carbón activado y resinas no polares para separar compuestos fenólicos y furanos de sustratos similares a las vinazas tequileras.

La aplicación de un pretratamiento de adsorción enfocado a disminuir las concentraciones de estos compuestos en las vinazas podría mejorar el rendimiento de producción de biohidrógeno.

## 5 HIPÓTESIS

---

La aplicación de un pretratamiento de adsorción a las vinazas tequileras podría incrementar el rendimiento de producción de hidrógeno debido a que se removerán compuestos inhibitorios.

## 6 OBJETIVOS

---

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un pretratamiento de adsorción sobre el rendimiento de producción de hidrógeno utilizando vinazas tequileras.

## 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la afinidad del carbón activado y las resinas de adsorción Amberlite® por los compuestos fenólicos y determinar el mejor adsorbente para las vinazas tequileras mediante experimentos de adsorción en lote.
2. Implementar un protocolo de detoxificación en columnas de lecho fijo aplicable a las vinazas tequileras.
3. Evaluar el efecto de la detoxificación de vinazas tequileras sobre la producción de hidrógeno en lote y continuo.

## 7 METODOLOGÍA

---

### 7.1 MUESTREO Y CARACTERIZACIÓN DE VINAZAS TEQUILERAS

Se muestrearon vinazas procedentes del proceso de producción con cocción de la piña de agave en la localidad de Tequila, Jalisco y se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

Se clarificó la vinaza tequilera utilizando un separador centrífugo Gea Westfalia® y, posteriormente, se midieron los siguientes parámetros (Tabla 3), ver Anexo 1.

Tabla 3 Parámetros y metodología de la caracterización fisicoquímica.

Parámetro	Método
DQO	Standard methods (APHA, 1999)
pH	Potenciometría
Fenoles totales	Folin-Ciocalteu 4-aminoantipirina
Fósforo total	Método 10127 HATCH
Nitrógeno total	Método 10072 HATCH
Carbohidratos totales	Fenol-sulfúrico
Sólidos totales	
Sólidos suspendidos totales	
Sólidos disueltos totales	NMX-AA-034-SCFI-2001-12/13
Sólidos volátiles totales	
Sólidos suspendidos	NMX-AA-004-SCFI-2013
Sólidos sedimentables	NMX-AA-004-SCFI-2013

## 7.2 ADSORBENTES ESTUDIADOS

Los adsorbentes empleados en el presente estudio fueron el carbón activado marca Darco® (SIGMA ALDRICH) (Lee y Park, 2015) y las resinas de adsorción Amberlite® FPX66 (Buran, *et al.*, 2014) y XAD4 (Standford, *et al.*, 2018). Estos están previamente reportados para separar compuestos fenólicos y furanos de hidrolizados simulados, vinazas tequileras e hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave respectivamente. Las características de los adsorbentes se presentan en la Tabla 4.

*Tabla 4 Características de los adsorbentes utilizados.*

<i>Característica</i>	<i>Adsorbente</i>		
	Carbón activado	FPX66	XAD4
<i>Tamaño de partícula</i>	0.42 a 0.84 mm	0.60 a 0.75 mm	0.49 a 0.69 mm
<i>Densidad</i>	0.4 g/mL	1.02 g/mL	2.0 g/mL
<i>Porosidad</i>	750 mL/g	1.4 mL/g	0.68 mL/g
<i>Origen</i>	bituminoso	sintético	sintético
<i>Área específica</i>	600 m <sup>2</sup> /g	700 m <sup>2</sup> /g	700 m <sup>2</sup> /g

## 7.3 CINÉTICAS DE ADSORCIÓN

Se realizaron los experimentos para determinar las cinéticas de adsorción de fenoles totales en vinazas tequileras clarificadas, con el objetivo de estudiar la velocidad con la cual se adsorben los compuestos fenólicos. De manera concreta, el procedimiento fue el siguiente: Se colocó 1 g de adsorbente en viales de vidrio con 50 mL de vinaza tequilerá clarificada y se dejaron en contacto durante varios tiempos de exposición (3, 6, 12, y 24 h). La temperatura y agitación se mantuvieron constantes utilizando una incubadora con agitación orbital a 25 °C y 100 RPM.

Una vez alcanzado el tiempo de contacto deseado se separó el adsorbente de la fase líquida por medio de centrifugación (5 min, 10,000 RPM) se recolectó el sobrenadante y se congeló a -25 °C previo a su análisis para fenoles totales.

Se ajustaron los modelos cinéticos de pseudo-primer orden y pseudo-segundo orden a los datos experimentales. Ambos modelos son ampliamente utilizados en la literatura para estudiar los procesos de adsorción en lote (ecuaciones 1 y 2) (Li *et al.*, 2013; Soto *et al.*, 2016; Ghafari *et al.*, 2019).

$$q_t = q_c * (1 + e^{-k_1*t})$$

*Ecuación 1. Modelo cinética de pseudo-primer orden, donde:  $q_t$  (mg/g) es la carga en el adsorbente a un tiempo  $t$ ,  $q_c$  (mg/g) es la carga en el adsorbente en el equilibrio y  $K_1$  es la constante cinética de primer orden (Stanford *et al.*, 2018).*

$$q_t = \frac{q_e^2 K_2 t}{1 + q_e K_2 t}$$

*Ecuación 2. Modelo cinético de pseudo-segundo orden donde:  $q_t$  (mg/g) es la carga en el adsorbente a un tiempo  $t$ ,  $q_e$  (mg/g) es la carga en el adsorbente en el equilibrio y  $K_2$  es la constante cinética de segundo orden (Stanford *et al.*, 2018).*

#### 7.4 ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

Con el objetivo de estudiar el proceso de adsorción en el equilibrio, se determinaron las isotermas de adsorción de fenoles totales de cada adsorbente. El procedimiento fue el siguiente. Se prepararon soluciones de vinaza tequilera a distintas diluciones (20, 40, 60, 80 y 100%). Se tomaron 50 mL de cada solución y se les puso en contacto con 1 g de cada adsorbente, se mantuvieron en temperatura y agitación constantes (25 °C, 100 RPM) por 24 h. Posteriormente, se separaron los sólidos por medio de centrifugación a 10,000 RPM y los sobrenadantes se analizaron para fenoles totales. Se obtuvo la concentración en la fase sólida mediante un balance de masa (Ecuación 3).

$$q_e = V * \frac{c_i - c_f}{m}$$

*Ecuación 3, balance de masa utilizado, donde:  $q_e$  (mg/g) es la cantidad de inhibidor adsorbida sobre la cantidad de adsorbente agregado dosificado  $m$ , (g),  $V$  es el volumen empleado,  $c_i$  es la concentración inicial de fenoles (mg/L),  $c_f$  es la concentración final de fenoles (mg/L).*

Para evaluar numéricamente los resultados, se modelaron los datos de acuerdo a las ecuaciones de Langmuir (Ecuación 4) y Freundlich (Ecuación 5).



$$q_{eq} = q_m \frac{k_L C_{eq}}{1 + k_L C_{eq}}$$

*Ecuación 4. Modelo de Langmuir donde:  $C_{eq}$  (mg/L) es la concentración en equilibrio,  $q_{eq}$  (mg/g) es la carga en equilibrio en el adsorbente,  $q_m$  (mg/g) es la capacidad máxima de adsorción y  $k_L$  (L/mg) es la constante de Langmuir y se le relaciona con la energía neta de entalpía de la adsorción (Chen, 2015; Lee y Park, 2016; Soto et al., 2016).*

$$q_{eq} = k_f C_{eq}^{1/n}$$

*Ecuación 5. Modelo de Freundlich donde  $k_f$  (mg/g) indica la capacidad de adsorción y  $1/n$  es un indicativo de su intensidad (Stanford et al., 2018).*

## 7.5 PRUEBAS DE ADSORCIÓN EN COLUMNA

Se realizó un diseño experimental factorial completo  $2^2$  tomando como variables la velocidad de flujo (10 y 3 mL/min) y la longitud de lecho empacado (15 y 25 cm) con el objetivo de evaluar el desempeño de una columna de adsorción en lecho fijo.

Se empacó una columna de vidrio con 1.7 cm de diámetro interno con carbón activado granular marca Darco (Sigma Aldrich) malla 20-40 (tamaño de partícula de 0.42 a 0.84 mm), se utilizaron 13 y 24 g de carbón activado para empacar la columna a 15 y 25 cm respectivamente. El adsorbente se empacó por arrastre utilizando agua destilada para evitar la formación de burbujas de aire en el lecho empacado y se le compactó por medio de vibración utilizando un vórtex.

Se ajustaron las velocidades de flujo y se inició a circular vinaza tequilera, se desecharon los primeros 100 mL del eluyente (cantidad correspondiente al volumen de agua destilada presente en el sistema previo a que se iniciara a alimentar vinaza clarificada) correspondientes al agua destilada con la que se empacó el lecho. Posteriormente, se recolectó el eluyente en un matraz volumétrico hasta que se circuló exactamente 1 L de vinaza tequilera o el equivalente a 1 hora 40 minutos para 10 mL/min y 5 horas 33 minutos para el flujo a 3 mL/min de tiempo de operación. El eluyente acumulado se analizó para fenoles totales (Anexo 1-12.3), utilizando el método de la 4-aminoantipirina con

ácido gálico como estándar, y para azúcares totales (Anexo 1-12.6) utilizando el método de fenol-sulfúrico.

## 7.6 ENSAYOS EN LOTE DE PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO

Se realizaron experimentos en lote de producción de biohidrógeno utilizando el sistema automático de prueba de potencial de metano AMPTS II (por sus siglas en inglés), Bioprocess Control™, Suecia. Se dio seguimiento a la tasa de producción de gas hasta que esta se igualó a 0.

El diseño experimental fue en bloques completamente aleatorios considerando el pretratamiento de detoxificación como variable estudiada y la concentración inicial de DQO (Anexo 1-12.1) como variable de bloque. El diseño experimental se muestra en la Tabla 5

*Tabla 5 Diseño experimental de las pruebas de producción de H<sub>2</sub> en lote.*

<i>Inóculo/sustrato</i> (gSVT <sub>inóculo</sub> /gSVT <sub>sustrato</sub> )	<i>Vinaza</i>	<i>C. inicial</i> (gDQO/L)
2.7	Cruda	5
		15
		30
	Detoxificada	5
		15
		30
7.5	Cruda	5
		15
		30
	Detoxificada	5
		15
		30

Se establecieron los niveles de la concentración inicial de DQO en 5, 15 y 30 gDQO/L. La concentración inicial de 5 gDQO/L se estableció para cumplir con lo establecido en el protocolo de producción de biohidrógeno específica de la Red Latinoamericana de Producción de Biohidrógeno. Se estudió la concentración de 30 gDQO/L para poder comparar el efecto del pretratamiento a la más alta concentración de DQO/L posible considerando la concentración final de la vinaza detoxificada de este lote en específico. Finalmente, se eligió la concentración de 15 gDQO/L para tener un punto central entre los bloques

de concentración inicial de DQO. Se añadió al diseño experimental la relación inóculo/sustrato (I/S) como otra variable experimental. Siguiendo las relaciones 7.5 y 2.7 gSVT<sub>inóculo</sub>/gSVT<sub>sustrato</sub>, respectivamente.

Se evaluaron un total de 12 condiciones, cada condición se probó por duplicado. Se añadió la cantidad de vinaza necesaria para alcanzar cada una de las concentraciones estudiadas y se le adicionaron 22.6 mL de la solución que sirvió a manera de buffer y como medio mineral para satisfacer las necesidades nutricionales de los microorganismos (Tabla 6). Posteriormente, se diluyó hasta 360 mL, el cual fue el volumen operativo en cada uno de los reactores.

*Tabla 6. Composición de la solución de nutrientes.*

<i>Compuesto</i>	<i>Masa por litro de solución</i>
<i>NH<sub>4</sub>Cl</i>	41.6 g
<i>MES (ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico, SIGMA)</i>	19.52 g
<i>MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</i>	2 g
<i>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	1.6 g
<i>CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</i>	40 mg
<i>MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</i>	40 mg
<i>KI</i>	40 mg
<i>NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</i>	8 mg
<i>ZnCl<sub>2</sub></i>	8 mg

Como inóculo, se utilizó un lodo anaerobio procedente de un biodigestor empleado en el tratamiento de vinazas tequileras, al cual se le realizó un pretratamiento térmico. El lodo se colocó a 100 °C durante 24 h con el objetivo de conservar las bacterias productoras de hidrógeno con capacidad de esporular como se reporta en Moreno-Andrade *et al.* (2011).

Se recolectaron muestras del efluente al terminar los ensayos y se guardaron a -13°C previo a su análisis.

Se midió cualitativamente la composición del gas generado diariamente para descartar la presencia de metanogénicos. Las condiciones del cromatógrafo se describen en la sección 7.10.3.

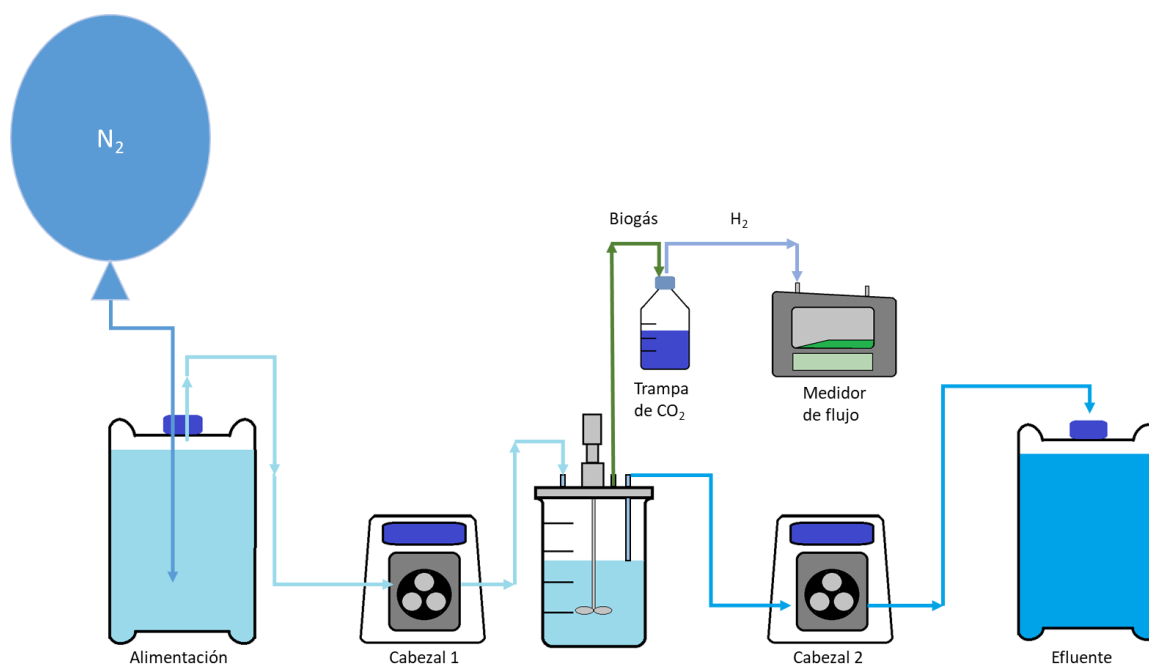
## 7.7 ENSAYOS DE PRODUCCIÓN CONTINUA DE BIOHIDRÓGENO

### 7.8 MONTAJE DEL REACTOR

Para las pruebas de producción de  $H_2$  en continuo, se utilizó un biorreactor marca Applikon® de 3 L, el cual se configuró como un reactor completamente agitado en continuo.

El control del pH, temperatura y agitación (sección 7.9), se realizó por medio de la consola de control del reactor, mientras que el nivel y el flujo se controlaron utilizando una bomba peristáltica de doble cabezal marca Masterflex®.

Para mantener el nivel constante y el flujo, se adaptó una de las entradas para control de pH y antiespumante como entrada de sustrato, y se le conectó al primer cabezal de la bomba. Se introdujo una salida de flujo al nivel deseado de 1.5 L conectada al segundo cabezal, pero en sentido inverso al de la entrada (Ilustración 3).



*Ilustración 3. Diagrama de la configuración del reactor.*

La vinaza alimentada se almacenó en un recipiente de 5 L al cual se le conectó un globo de aproximadamente 12 L de volumen lleno de  $N_2$  con el objetivo de mantener tanto el medio como el reactor en condiciones anaerobias.

Se habilitó una segunda salida en la parte superior del biorreactor para el biogás. Esta se conectó a una trampa de NaOH para atrapar el CO<sub>2</sub> y cuantificar únicamente el H<sub>2</sub> producido. Se instaló un septo entre el biorreactor y la trampa de CO<sub>2</sub> a través del cual se tomaron muestras para realizar análisis de composición por cromatografía de gases para descartar la presencia de metano.

La producción acumulada de H<sub>2</sub> y la velocidad volumétrica de producción de H<sub>2</sub> se midieron utilizando el equipo de medición de flujo  $\mu$ flow<sup>®</sup> (Bioprocess control) y se llevó registro de ambas utilizando una cámara remota con conectividad WiFi apuntada al display del dispositivo de medición. Se tomaron muestras del efluente diariamente y se congelaron a -25 °C para determinar el perfil de AGV generados.

## **7.9 CONDICIONES EXPERIMENTALES**

Se evaluó el desempeño a corto plazo del biorreactor utilizando vinazas tequileras crudas y detoxificadas. Ambos experimentos se llevaron a cabo utilizando una carga orgánica aplicada de 40 g DQO/L\*d y un TRH de 6 h.

Para alimentar el reactor, se prepararon diluciones a 10 gDQO/L de vinaza cruda y detoxificada diariamente, a las que se les añadió solución de nutrientes. Ambos experimentos se consideraron para durar un total de 140 h de operación en régimen continuo, más 71 horas de operación en lote para la vinaza cruda y 43.25 h para la vinaza detoxificada.

## **7.10 MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **7.10.1 Análisis de compuestos inhibidores individuales**

La concentración de compuestos inhibitorios individuales se realizó en la unidad de servicios analíticos y metrológicos (USAM), utilizando un sistema UPLC Acquity clase 1, equipado a un sistema de bombeo binario Waters (Milford EUA), y una columna Waters BECH C18 (1000mm x 2.1mm) empacada con partículas de 1.7  $\mu$ m de tamaño. La temperatura de la columna fue de 40 °C. El

sistema se acopló a dos detectores. El primero, un detector UV de Waters a una longitud de onda de 280 nm y el segundo un detector Acquity QDa. El sistema binario de fases fue: metanol / ACN (50:50 v/v) como fase móvil A, y agua/ácido fórmico (99.7:0.3 v/v) como fase móvil B, con un flujo de 0.3 µL/min. El gradiente de elución fue el siguiente: 90% B, como condición inicial, 77% B a los 6 minutos, 30% B al minuto once y 90% B para el minuto 15. Las condiciones para el detector Acquity QDa fueron, voltaje de capilar fue de 1.5 kV (positivo) y 0.8 kV (negativo) y una velocidad de adquisición de 8 puntos/segundo. El modo scan se determinó de modo negativo de 100 – 200 Da y el modo positivo 50 – 600 Da cómo se reporta en Rodríguez-Félix *et al.*, (2017).

#### **7.10.2 Análisis de los efluentes**

Se determinó la formación de ácidos grasos volátiles por cromatografía líquida de alta eficiencia, utilizando un cromatógrafo Varian Prostar modelo 2000 acoplado a un detector de índice de refracción. Se utilizó una columna marca Bio-Rad, AMINEX HPX-87H, la fase móvil fue ácido sulfúrico 5 mM, la temperatura del horno fue 65 °C y el flujo fue 0.6 mL/min.

#### **7.10.3 Análisis del gas generado**

Se analizó la composición del gas generado durante los ensayos utilizando un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (Clarus 580, Perkin Elmer), y una columna HayeSep D (3mx3.2mm, malla 100/120; Perkin Elmer Clarus NOCI). Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron 25, 75 y 120 °C respectivamente. Se utilizó N<sub>2</sub> como gas acarreador a un flujo de 30 mL/min como se describe en García-Depraect y León-Becerril, (2017).

#### **7.10.4 Análisis de la cinética de producción gaseosa**

Los datos de los ensayos en lote se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz (Ecuación 6) con el objetivo de calcular la tasa máxima de producción de H<sub>2</sub> (R<sub>max</sub>).

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

*Ecuación 6. ecuación modificada de Gompertz donde:  $H$  (mL/L) es el volumen de hidrógeno por litro de reactor producido a un tiempo  $t$ ,  $H_{max}$  (mL/L) es la producción máxima acumulada por litro de reactor,  $R_{max}$  (mL/L \*h) es la velocidad máxima de producción, y  $\lambda$  es el tiempo de la fase lag o latencia. (Zwietering et al., 1990; Siqueira y Reginatto, 2015).*

#### **7.10.5 Métodos estadísticos**

Se realizaron los análisis estadísticos utilizando el software STATGRAPHICS Centurión XVI.I. Los ajustes de los modelos a los datos experimentales se realizaron utilizando el software MATLAB R2018a utilizando métodos de optimización iterativos (Anexo 2).

# Capítulo III

## 8 RESULTADOS

### 8.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS VINAZAS TEQUILERAS

La Tabla 6 muestra los resultados de la caracterización fisicoquímica de la vinaza tequilera centrifugada.

*Tabla 7 Parámetros medidos de la caracterización de las vinazas tequileras.*

<i>Parámetro</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
<i>DQO</i>	38.00-61.67
<i>pH</i>	3.5-3.9
<i>Fenoles totales*</i>	0.80-1.64
<i>Fósforo total</i>	0.21-0.27
<i>Nitrógeno total</i>	0.10-0.24
<i>Azúcares totales</i>	14.49-18.02
<i>Glucosa</i>	0.56-0.88
<i>Xilosa</i>	3.00-4.04
<i>Ac. Acético</i>	0.96-1.45
<i>Ac. 3-hidroxibenzoico</i>	$<0.05 \times 10^{-3}$ - $1.0 \times 10^{-3}$
<i>Ac. 4-hidroxibenzoico</i>	$<0.05 \times 10^{-3}$ - $6.0 \times 10^{-3}$
<i>Furfural</i>	$0.9 \times 10^{-3}$ - $1.8 \times 10^{-3}$
<i>HMF</i>	0.11-0.12
<i>Sólidos totales</i>	29.40-40.70
<i>Sólidos volátiles totales</i>	26.66-37.77

*\*medidos por Folin-Ciocalteu, y 4 aminoantipirina. Tres lotes caracterizados.*

Se sabe que la vinaza tequilera es una matriz muy heterogénea. A pesar de compartir algunas características como el pH ácido, la elevada concentración de DQO y azúcares residuales, sus características globales varían en función a factores como la procedencia del agave, el proceso de producción y el tipo de tequila producido (tequila o tequila 100%).



Los resultados de la caracterización fisicoquímica (Tabla 7) de las vinazas tequileras para DQO, Fenoles totales (por método de Folin-Ciocalteu), fósforo total, nitrógeno total, azúcares totales, sólidos totales y sólidos totales volátiles están dentro de lo reportado en la literatura (López-López *et al.*, 2010; Rodríguez-Félix *et al.*, 2016; García-Depraect *et al.*, 2017).

En todos los lotes analizados, únicamente se detectó al ác. 3-hidroxibenzoico, ác. 4-hidroxibenzoico, furfural e HMF por encima del límite de cuantificación del método (Tabla 7). A excepción del HMF, las concentraciones de los compuestos con potencial inhibitorio (Tabla 8) fueron menores que las mínimas reportadas como inhibitorias por Siqueira y Reginatto, (2015). La concentración de furfural encontrada en las vinazas tequileras fue similar a lo reportado por Rodríguez-Félix *et al.*, (2017), para vinazas tequileras procedentes del proceso con cocción de la piña del agave. En el caso del HMF, se cuantificó una concentración menor a lo reportado por Rodríguez-Félix *et al.* (2017).

*Tabla 8 Comparativo de concentraciones de inhibidores presentes en la vinaza.*

<i>Compuesto</i>	<i>Vinaza estudiada (mg/L)*</i>	<i>Concentración mínima inhibitoria (mg/L)**</i>	<i>Vinazas tequileras con cocción (mg/L)***</i>
<i>Ac. 3-hidroxibenzoico</i>	1.0	150	< 0.5
<i>Ac. 4-hidroxibenzoico</i>	6.0	150	< 0.5
<i>Furfural</i>	1.8	250	1.9
<i>HMF</i>	119.0	100	224.3

\*Concentración máxima detectada en la vinaza estudiada.

\*\*Concentración mínima reportada como inhibitoria (Siqueira y Reginatto, 2015).

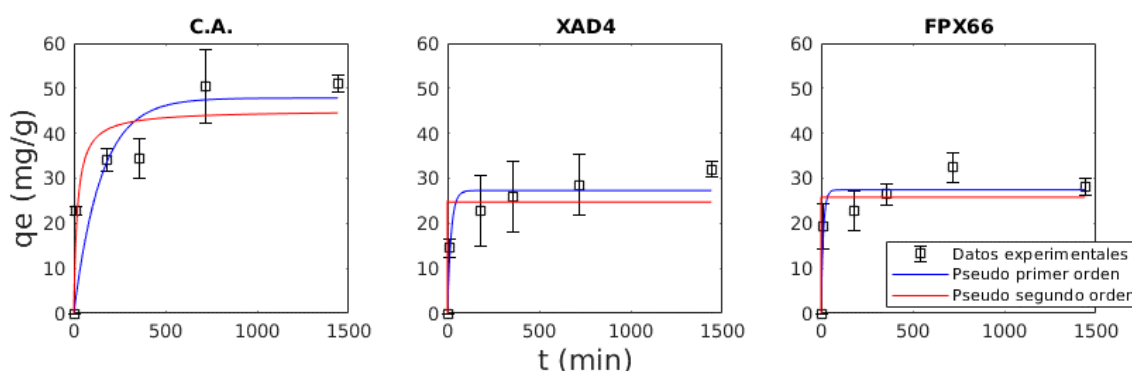
\*\*\* Concentración reportada por Rodríguez-Félix *et al.* (2015) para vinazas tequileras con cocción.  
(mg/L)

## 8.2 CINÉTICAS DE ADSORCIÓN

La Gráfica 1 muestra el ajuste de las cinéticas de adsorción de los fenoles totales a los modelos de pseudo-primero y pseudo-segundo orden (Ecuaciones 1 y 2) para cada uno de los adsorbentes. Las constantes calculadas del ajuste de los modelos a los datos experimentales se muestran en la Tabla 9.

*Tabla 9 Constantes obtenidas a partir del ajuste de los modelos de pseudo primero y segundo orden.*

Adsorbente	Pseudo-primero orden			Pseudo-segundo orden		
	$q_e$ (mg/g)	$K_1$	$r^2$	$q_e$ (mg/g)	$K_2$	$r^2$
C. Activado	47.82	$6.7 \times 10^{-3}$	0.76	45.11	0.001	0.88
XAD4	27.29	0.05	0.93	24.72	$2.7 \times 10^{-3}$	0.74
FPX66	27.4	0.08	0.92	25.80	$6.4 \times 10^3$	0.84



*Gráfica 1. Cinéticas de adsorción de fenoles totales para cada adsorbente a 25° C, pH de 3.6 y 100 RPM. Se muestran los promedios de los valores y las desviaciones estándar. Las líneas representan el modelo ajustado. Los valores de constantes se encuentran en la tabla 9.*

Los valores de  $r^2$  obtenidos del ajuste de los modelos indican que el modelo de pseudo primero orden fue el más adecuado para explicar el proceso de adsorción en las resinas FPX66 y XAD4. No así para el carbón activado, el cual se ajustó de mejor forma al modelo de pseudo segundo orden. El modelo de pseudo primero orden se basa en que a cada molécula de adsorbato se le asigna un sitio de adsorción en la superficie del adsorbente. Esto toma en cuenta únicamente la capacidad total del adsorbente, mientras que el modelo de pseudo segundo orden toma en cuenta dos sitios de adsorción y factores como la difusión en la capa de líquido externa, la adsorción en la superficie del sólido, y difusión

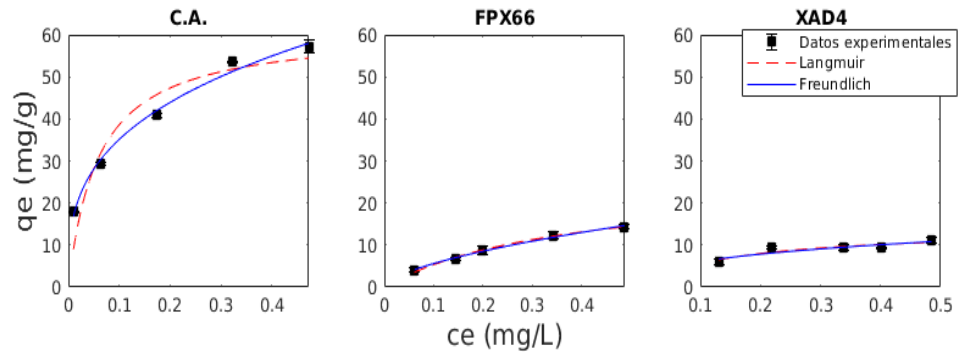
intraparticular (Soto *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Estos factores podrían tener un mayor peso sobre la adsorción de los compuestos fenólicos en el carbón activado, lo que explicaría el mejor ajuste al modelo de pseudo-segundo orden. Al comparar las constantes calculadas para cada modelo, se observa una mayor capacidad en el equilibrio para el carbón activado ( $q_m$ ), que para las resinas. Por su parte, estas mostraron mayores coeficientes de transferencia de masa ( $K_1$  y  $K_2$ ). El tiempo en el que se alcanzó el equilibrio de adsorción en las resinas fue entre 3 y 6 h y en el carbón activado, entre 6 y 12 h.

No se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) al comparar el porcentaje total de fenoles removidos de ambas resinas de adsorción, mas sí al compararlas con el carbón activado siendo: 62.2% para el carbón activado, 33.4% y 33.2% para las resinas XAD4 y FPX66.

### **8.3 ISOTERMAS DE ADSORCIÓN**

Debido a que la concentración en la fase líquida al equilibrio fue mucho menor para el carbón activado que para las resinas de adsorción, se utilizaron otras diluciones de vinaza tequilera (10, 30 y 50%) con el objetivo de compararlas en el mismo intervalo que carbón activado.

La Gráfica 2 muestra los valores de cantidad adsorbida/adsorbente ( $q_e$ ) obtenidos para cada adsorbente, y los ajustes a los modelos de Freundlich y Langmuir (Ecuaciones 4 y 5) obtenidos. Se observa una mayor afinidad del carbón activado por los compuestos fenólicos en comparación a las dos resinas de adsorción. Las isotermas de ambas resinas son muy parecidas entre sí. Estos resultados corroboran lo observado en las cinéticas de adsorción.



Gráfica 2 Isotermas de adsorción de fenoles totales para los 3 adsorbentes a 25°C, pH3.6 y 100RPM

Los coeficientes de correlación muestran que el modelo de Freundlich fue mejor para explicar las isotermas del carbón activado y la resina FPX66. En el caso de la resina XAD4, el modelo de Langmuir fue mejor para explicar los datos experimentales. Sin embargo, esta isoterma mostró bajos coeficientes de correlación a ambos modelos.

Tabla 10 Constantes calculadas a partir de los ajustes de las isotermas a los modelos de Langmuir y Freundlich.

Adsorbente	Isoterma de Freundlich			Isoterma de Langmuir		
	1/n	$K_F$ (mg/g)	$r^2$	$q_m$ (mg/g)	$K_L$ (mL/g)	$r^2$
C.A.	0.32	73.89	0.991	61.23	17.07	0.888
XAD4	0.36	14.07	0.767	13.83	6.84	0.802
FPX66	0.60	22.67	0.995	25.43	2.66	0.993

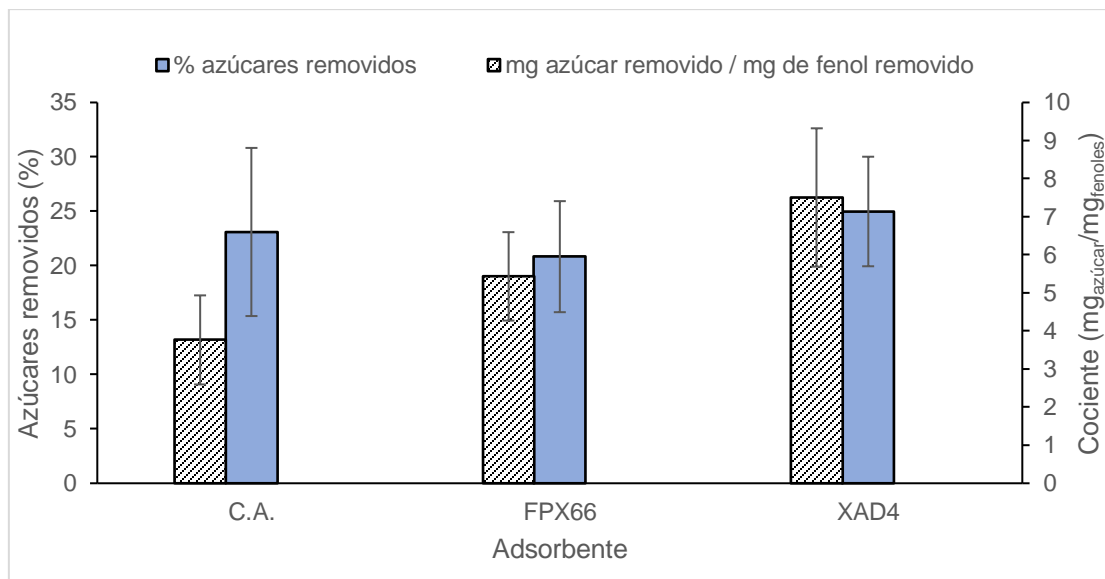
El valor de  $1/n$  en la isoterma de Freundlich es un indicativo de la no linealidad de la isoterma y de si esta es favorable o no. Isotermas con valores  $1/n > 1$  son no favorables (convexas con respecto al eje  $C_e$ ); valores cercanos a 1 indican una isoterma lineal (reversible), e isotermas con valores de  $1/n < 1$  son favorables (cóncavas con respecto al eje  $C_e$ ) (Stanford *et al.*, 2018). Los valores de  $1/n$  encontrados para este modelo indican que todas las isotermas fueron favorables, mostrando el carbón activado una mayor afinidad por los fenólicos en comparación con las resinas de adsorción. Entre estas, la resina XAD4 mostró mayor afinidad que la FPX66. Este comportamiento se corrobora analizando los valores de  $K_L$  en el modelo de Langmuir. Este valor se utiliza

como un indicativo de la intensidad de la adsorción. A mayores valores de  $K_L$  mayor afinidad del adsorbente por el adsorbato.

La capacidad máxima de adsorción es dada por  $K_F$  en el modelo de Freundlich, y por  $q_m$  en el modelo de Langmuir. El carbón activado fue el adsorbente con mayor capacidad de adsorción de compuestos fenólicos, seguido de la resina FPX66, y por último la resina XAD4.

### 8.3.1 Pruebas de retención de azúcares totales

Una de las problemáticas de los sistemas de adsorción empleados en la detoxificación de sustratos es la falta de selectividad de los adsorbentes. Pueden retener cantidades significativas de azúcares importantes en los procesos de fermentación (Lee y Park, 2016; Soto *et al.*, 2016). Por ello, se analizó la concentración en el equilibrio de azúcares totales presentes en la vinaza al 100% y se calculó el cociente mg azúcar removido/mg fenol removido, como un indicativo de la selectividad para cada adsorbente (Gráfica 3).



Gráfica 3. Retención de azúcares para cada adsorbente.

No se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los porcentajes de remoción de azúcares totales ni en las selectividades de los tres adsorbentes. Debido a ello, se eligió el carbón activado debido a su mayor capacidad de adsorción de fenólicos y menor costo.

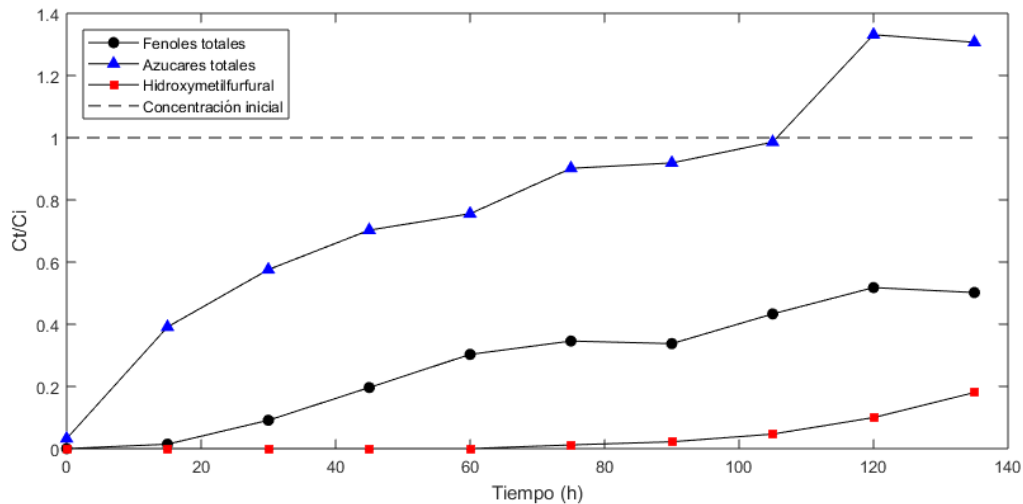
#### 8.4 PRUEBAS DE ADSORCIÓN EN COLUMNAS DE LECHO FIJO

Se realizó un experimento preliminar utilizando una columna de lecho empacado de 1.7 cm de diámetro interno y 25 cm de lecho empacado. Se alimentó vinaza tequilera clarificada a un flujo de 3 mL/min (18.9 min de tiempo de retención) y se tomaron muestras del efluente cada 15 min.

Se realizaron análisis de fenoles totales en equivalentes a ácido gálico y azúcares totales. Además, se analizaron las concentraciones individuales de los compuestos reportados como inhibidores: furfural, HMF, ac. 4-hidroxibenzoico y ac. 3-hidroxibenzoico. Las concentraciones iniciales se muestran en la Tabla 11. Se obtuvieron las curvas de ruptura graficando el cociente de la concentración en el efluente sobre la concentración inicial ( $C_t/C_i$ ), Gráfica 4. Se puede observar de la curva de ruptura de fenoles totales (círculos negros), que el adsorbente no llegó al punto de saturación para este tipo de compuestos. Alcanzó un máximo del 51.7% de la concentración inicial, mientras que para los azúcares totales no solo se alcanzó el punto de saturación, si no que se alcanzaron concentraciones de salida de 133% de la concentración inicial. Este efecto se ha observado antes, en el trabajo de Lee y Park del 2016. Estos autores mencionan que puede deberse a la naturaleza reversible del proceso de adsorción. En un principio puede ocurrir que los azúcares queden retenidos en la superficie del carbón activado, pero conforme se circula vinaza tequilera con concentraciones altas de compuestos con una mayor afinidad por el carbón activado (en este caso los fenólicos), los espacios en el adsorbente ocupados por los azúcares, son ocupados por estos compuestos lo que ocasiona un incremento temporal en la concentración del efluente.

*Tabla 11 Concentraciones iniciales de inhibidores presentes en la vinaza tequilera.*

Compuesto	Concentración (mg/L)
Ac. 3-hidroxibenzoico	1.0
Ac. 4-hidroxibenzoico	6.0
Furfural	1.8
Hidroximetilfurfural	109.2

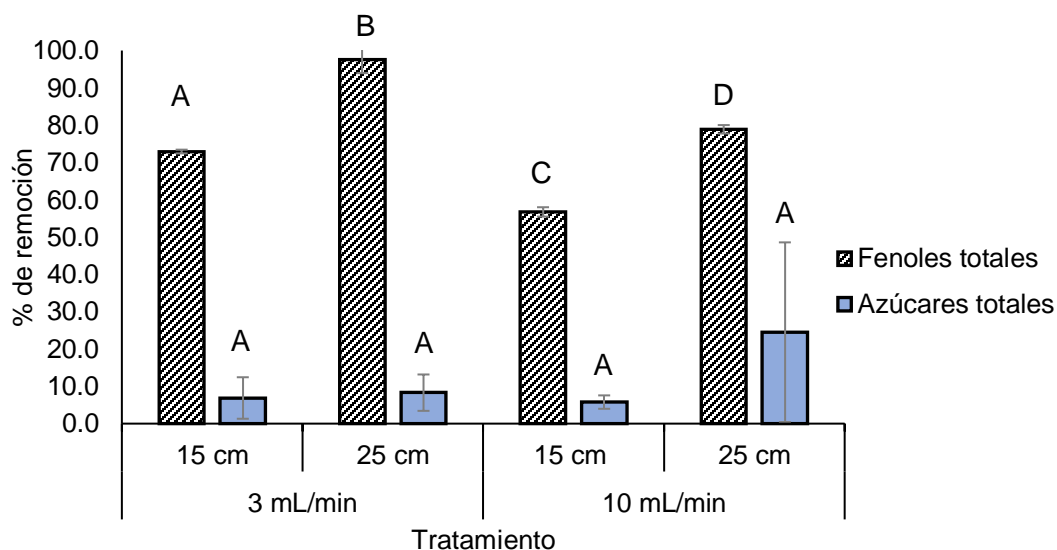


*Gráfica 4. Curvas de ruptura en la columna empacada con 25 cm de C.A. a 3 mL de velocidad de flujo, temperatura ambiente y pH 3.6.*

Hasta el final de este experimento, la concentración de la mayoría de los inhibidores, a excepción del HMF, que se mantuvo por debajo del límite de detección del método. La concentración máxima HMF fue menor al 10% de la concentración inicial. Por lo que, para el final del experimento, este aún se encontraba lejos del punto de saturación de la columna de adsorción.

#### **8.4.1 Efecto de la velocidad de flujo y longitud de lecho en la adsorción de fenoles y azúcares totales**

La Gráfica 5 muestra los resultados del experimento factorial  $2^2$  realizado en columnas de lecho empacado. Los datos obtenidos muestran que en función a la remoción de compuestos fenólicos totales, el mejor de los tratamientos fue aquel con flujo de 3 mL/min y longitud de lecho de 25 cm. Esto, ya que remueve en promedio 97% de la concentración inicial de fenoles. El análisis de varianza de los datos para azúcares totales mostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 tratamientos. Por ello, se seleccionó el tratamiento con 25 cm de longitud de lecho y 3 mL/min para las siguientes etapas de la investigación.



*Gráfica 5. Porcentajes de remoción después de 5 horas 30 minutos de operación para azúcares totales y fenoles totales. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ),  $n=3$ .*

Se detoxificó un lote de vinaza utilizando las condiciones establecidas en la pasada sección. La concentración inicial de sustrato e inhibidores de cada una de las vinazas se presenta en la Tabla 12.

*Tabla 12 Caracterización de las vinazas tequileras estudiadas en las pruebas de producción de hidrógeno.*

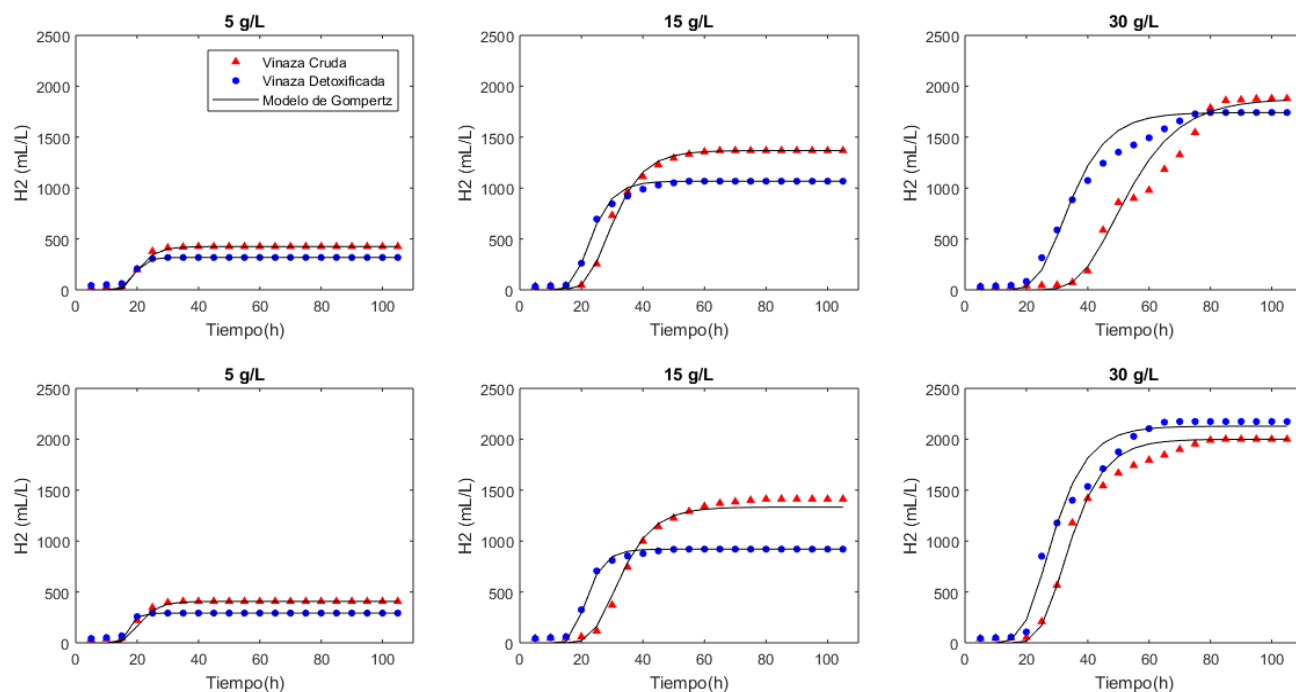
Vinaza	Cruda	Detoxificada
	mg/L	
DQO soluble	38,000.00	33,000.00
Glucosa	878.95	816.49
Xilosa	2,997.17	2,853.12
ST	29,400.00	20,950.00
SVT	26,660.00	20,300.00
Azúcares totales	14,488.07	8,815.54
Azúcares reductores totales	6,543.75	4,571.88
HMF	109.2	-
Ac. 4 hidroxibenzoico	6.00	-
Fenólicos totales	900	20
Ac. Acético	964.98	950.5



Cabe mencionar que la pérdida de azúcares para esta prueba de detoxificación, se desvió de lo encontrado en experimentos anteriores. Dado que se realizó en las mismas condiciones estudiadas, se concluyó que se debió a las diferentes características de los lotes de vinaza estudiados. La vinaza tequilera es un sustrato sumamente heterogéneo, y se han reportado diferencias estadísticamente significativas entre las características de lotes procedentes de distintos procesos de producción, y entre vinazas procedentes del mismo proceso de producción. Este resultado denota la necesidad de profundizar en futuros estudios acerca de todos los factores que pudiesen afectar el proceso de detoxificación, con miras a un posible escalamiento.

#### **8.4.2 Pruebas de producción de hidrógeno en lote**

Se llevaron a cabo las pruebas de fermentación en lote para ambas vinazas. Se realizó un ajuste del modelo de Gompertz a cada una de las réplicas (Gráfica 6). Las constantes promedio calculadas a partir de estos ajustes se muestran en la Tabla 11. La diferencia entre la producción máxima acumulada de biohidrógeno ( $H_{max}$ ) entre ambas vinazas se redujo conforme se aumentó la concentración inicial de DQO. Esto podría explicarse por la concentración de inhibidores cerca de un umbral de inhibición en la vinaza tequilera cruda. Por debajo de este umbral, la  $H_{max}$  no se vería afectada. Al incrementar la concentración inicial de vinaza cruda, la concentración de inhibidores aumentaría, lo que a su vez, reduciría el rendimiento.



Gráfica 6 Cinéticas de producción de hidrógeno y ajustes al modelo de Gompertz. Arriba: relación I/S=2.7, abajo: relación I/S=7.5.

No se encontraron diferencias significativas entre el pH de cada una de las réplicas. En todos los casos, se mantuvo en el intervalo de 4.92-5.52.

Tabla 13 Constantes promedio calculadas a partir del ajuste del modelo de Gompertz a los datos experimentales.

I/S	Vinaza	C.I. (gDQO/L)	Hmax		Rmax		Fase Lag		Rendimiento		Rendimiento	
			(mLH <sub>2</sub> /L)		(mLH <sub>2</sub> /L*h)		(h)	(LH <sub>2</sub> /L <sub>vinaza</sub> )		(molH <sub>2</sub> /mol <sub>A.T.</sub> )**		
2.7	Cruda	5	425.3 ± 0.3	Aa	63.5 ± 21.9	Aa*	17.1 ± 0.8	Aa	3.2 ± 0.0	Aac	1.8 ± 0.0	Aa
		15	1,347.6 ± 2.2	Ab	64.3 ± 8.1	Ab*	21.0 ± 2.8	Ab	3.5 ± 0.1	Aa	1.9 ± 0.0	Aa
		30	1,879.0 ± 79.5	Ac	42.2 ± 7.3	Ab*	35.8 ± 2.5	Ac	2.4 ± 0.1	Ac	1.3 ± 0.1	Aa
	Detox	5	317.6 ± 13.9	Ba	40.4 ± 8.4	Ba*	14.72 ± 0.1	Ba	2.1 ± 0.1	Bac	1.9 ± 0.1	Ba
		15	1,067.5 ± 39.6	Bb	75.2 ± 0.6	Bb*	16.3 ± 0.8	Bb	2.3 ± 0.1	Ba	2.1 ± 0.1	Ba
		30	1,742.2 ± 120.9	Bc	59.5 ± 33.5	Bb*	21.3 ± 3.1	Bc	1.9 ± 0.1	Bc	1.7 ± 0.1	Ba
7.5	Cruda	5	406.9 ± 0.4	Aa	49.1 ± 8.8	Aa*	16 ± 1.2	Aa	3.09 ± 0.0	Aac	1.7 ± 0.0	Aa
		15	1,412.8 ± 2.0	Ab	70.2 ± 19.2	Ab	24.86 ± 2.0	Ab	3.58 ± 0.0	Aa	2.0 ± 0.0	Aa
		30	2,000.0 ± 1.6	Ac	91.7 ± 25.9	Ab	23.12 ± 2.3	Ac	2.53 ± 0.0	Ac	1.4 ± 0.0	Aa
	Detox	5	292.1 ± 55.6	Ba	64.2 ± 0.8	Ba	15.05 ± 0.5	Ba	1.93 ± 0.4	Bac	1.8 ± 0.3	Ba
		15	853.6 ± 163	Bb	120.8 ± 28.4	Bb	16.5 ± 0.7	Bb	2.02 ± 0.1	Ba	1.8 ± 0.1	Ba
		30	2,128.5 ± 82.3	Bc	86.9 ± 15.5	Bb	17.41 ± 2.8	Bc	2.39 ± 0.0	Bc	2.2 ± 0.0	Ba

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre valores para ambas vinazas; letras minúsculas diferentes entre valores de la misma columna indican diferencias significativas entre concentraciones iniciales, \* en la misma columna indica diferencias significativas entre relaciones inóculo/sustrato para valores de la misma columna ( $p < 0.05$ ). ± indica desviación estándar  $n=2$ . \*\*Calculado a partir de azúcares totales considerando glucosa como estándar. \*\*\* Vinaza detoxificada.

### 8.4.3 Efecto del pretratamiento sobre la producción máxima de hidrógeno (H<sub>max</sub>) en lote

El pretratamiento tuvo un efecto significativo sobre la producción máxima acumulada de H<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ). Este disminuyó en promedio el 13.05% de la producción máxima acumulada de H<sub>2</sub>. Estos resultados difieren de lo obtenido por Rodríguez-Félix *et al.* (2017). Estos autores reportan que la producción acumulada de H<sub>2</sub> se incrementó un 118% (de 1,195 a 2,607 mLH<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>) cuando se trataron vinazas tequileras a las cuales se les removieron inhibidores al circularlas por un lecho empacado con resina FPX-66 (Tabla 11).

Es importante mencionar que la concentración de HMF cuantificada por Rodríguez-Félix *et al.* (2015) en la vinaza cruda (224.3 mg/L) fue poco menos del doble que la detectada en la vinaza utilizada en esta investigación (119 mg/L). No se reportaron pérdidas de azúcares, lo que puede explicar las diferencias encontradas entre ambos trabajos.

En el trabajo de López-Gutiérrez (2015) se reportan resultados similares a los de esta investigación, en dicha investigación la H<sub>max</sub> se redujo un 3.7% cuando se removieron compuestos fenólicos utilizando la resina FPX66. Los derivados del furfural no fueron detectados en el hidrolizado estudiado por López-Gutiérrez (2015), por lo que se concluyó que los compuestos fenólicos totales equivalentes a ácido gálico removidos no ejercían un efecto inhibitorio en dicho estudio.

La vinaza empleada para el presente estudio solo la concentración de HMF se encuentra cerca de la mínima concentración inhibitoria (Siqueira y Reginatto 2015). Ello, sumado a la pérdida de azúcares encontrada, explicaría el porqué el pretratamiento de adsorción no incrementó la producción máxima de H<sub>2</sub>, por el contrario, la disminuyó.

La concentración inicial de DQO tuvo influencia sobre la producción de H<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ). La prueba de rangos múltiples para la concentración inicial de DQO, arrojó 3 grupos homogéneos, cada uno compuesto por uno de los niveles estudiados. Si bien la diferencia para cada par de niveles fue significativa,

resulta notable que el contraste entre el nivel 5 y 15 fue mayor que el encontrado entre los niveles 15 y 30. Esto sugiere que conforme se incrementa la concentración inicial de DQO, la diferencia disminuirá hasta no ser significativa debido a la inhibición por sustrato. No se detectaron efectos significativos para la relación inóculo/sustrato sobre la Hmax ( $p > 0.05$ ).

#### **8.4.4 Efecto del pretratamiento sobre la tasa máxima de producción de hidrógeno (Rmax)**

El pretratamiento tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la tasa de producción máxima de H<sub>2</sub>. En promedio, la Rmax obtenida con vinaza detoxificada fue 22.5% más veloz que la obtenida con vinaza cruda (Tabla 13). La concentración inicial de DQO también tuvo un efecto significativo al igual que la relación I/S ( $p < 0.5$ ).

Se sabe que el HMF y compuestos fenólicos de bajo peso molecular pueden inhibir enzimas de rutas de metabolismo primario, lo que disminuye el crecimiento bacteriano. Ello explicaría el aumento de la tasa máxima de producción de hidrógeno en las vinazas tequileras tratadas con carbón activado (Quéméneur *et al.*, 2012; Nissilä *et al.*, 2014; Siqueira y Reginatto, 2015; Bundhoo y Mohee, 2016).

Rodríguez-Félix *et al.* (2017), no encontraron diferencias significativas para la Rmax entre vinazas tratadas y crudas procedentes del mismo proceso de producción. El incremento en la tasa máxima de producción de hidrógeno podría mejorar la velocidad del proceso, lo que reduciría los tiempos de residencia, y permitiría trabajar con reactores de menor volumen.

Con respecto a la concentración inicial de DQO, se encontró diferencia significativa entre el nivel 5 gDQO/L y los otros dos niveles. En contraste, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos estudiados a 15 y 30 gDQO/L. La relación inóculo/sustrato (I/S) 7.5 dio lugar a una velocidad de producción en promedio 18% más veloz que la relación 2.7.

#### **8.4.5 Efecto del pretratamiento sobre la fase lag**

El pretratamiento tuvo un efecto significativo sobre la fase lag. En promedio, la producción de biohidrógeno con vinaza detoxificada inició 5.42 h antes que en las pruebas realizadas con vinaza cruda (Tabla 11).

Quéméneur et. al. (2012) y Siqueira y Reginatto (2015) reportan un comportamiento similar con respecto al efecto de los compuestos fenólicos y derivados del furfural de bajo peso molecular sobre la tasa máxima de producción de bioH<sub>2</sub>. En estos estudios, se menciona que, debido a su tamaño, estos compuestos logran entrar a la membrana celular más rápido. Ello, aunado a que, afectan rutas metabólicas importantes como la glucólisis, genera un mayor tiempo de latencia antes de iniciarse la producción de biohidrógeno.

El hecho de que los efectos más importantes del pretratamiento sobre los parámetros de la ecuación de Gompertz fueran sobre la R<sub>max</sub> y la fase lag, sugiere que la inhibición en las vinazas de este estudio se debió a compuestos fenólicos y furanos de bajo peso molecular, como se ha descrito anteriormente (Quéméneur et al., 2012, Siqueira y Reginatto, 2015).

La concentración inicial de DQO también tuvo un efecto significativo sobre la fase lag. Esta se incrementó conforme se aumentó la concentración, de 16 h para 5 gDQO/L, a 20 h, para 15 gDQO/L y hasta 26 h, para 30gDQO/L.

La relación I/S no tuvo efectos significativos sobre la fase lag observada durante los ensayos.

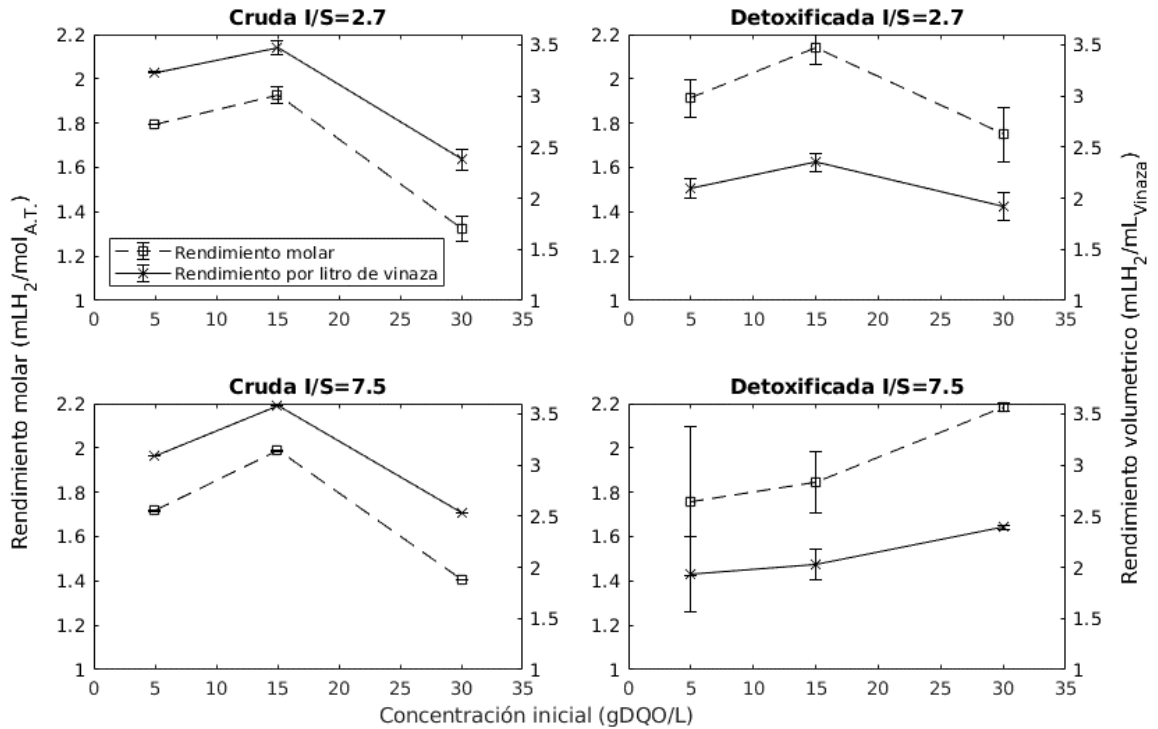
#### **8.4.6 Efecto del pretratamiento sobre el rendimiento de producción de hidrógeno**

Sólo el tipo de vinaza mostró tener diferencias significativas sobre el rendimiento molar de producción de biohidrógeno. La prueba de rangos múltiples para comparación de tratamientos demuestra que las vinazas detoxificadas en promedio generaron 1.90 molH<sub>2</sub>/mol<sub>A.T.</sub>, mientras que las vinazas crudas produjeron 1.69 molH<sub>2</sub>/mol<sub>A.T.</sub> (Tabla 13). Esto significa que la detoxificación solo incrementó en 11.32% el rendimiento molar de producción.

Estos resultados denotan un bajo nivel de inhibición, y contrastan con López-Gutiérrez (2015) quien no encontró inhibición alguna al comparar hidrolizados enzimáticos crudos y detoxificados con la resina FPX66. Los bajos niveles de inhibición pueden deberse a las bajas concentraciones de inhibidores como el furfural, el HMF y el ácido 4-hidroxibenzoico. Esto sugiere que únicamente estos compuestos tienen un efecto sobre el rendimiento de producción de H<sub>2</sub> y no los compuestos fenólicos totales equivalentes a ácido gálico.

El comportamiento observado para el rendimiento molar no se volvió a observar para el rendimiento calculado con base en los litros de vinaza (Gráfica 7). El pretratamiento tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento por litro de vinaza observado ( $p < 0.05$ ). En promedio, la vinaza cruda rindió 3 L H<sub>2</sub> por litro de vinaza alimentada, mientras que la vinaza detoxificada rindió 2.08 L H<sub>2</sub> respectivamente.

La concentración inicial de DQO también mostró un efecto significativo sobre el rendimiento calculado a partir del volumen de vinaza alimentado. La prueba de rangos múltiples mostró 2 grupos significativos: el primero, compuesto por los tratamientos con 30 y 5 gDQO/L, y el segundo, por los tratamientos 15 y 5 gDQO/L. Existió diferencia estadísticamente significativa solo entre los tratamientos 30 y 15 con promedios de 2.29 y 2.8 mLH<sub>2</sub>/mL de vinaza alimentada. La relación I/S no mostró tener diferencias significativas sobre el rendimiento por volumen de vinaza.



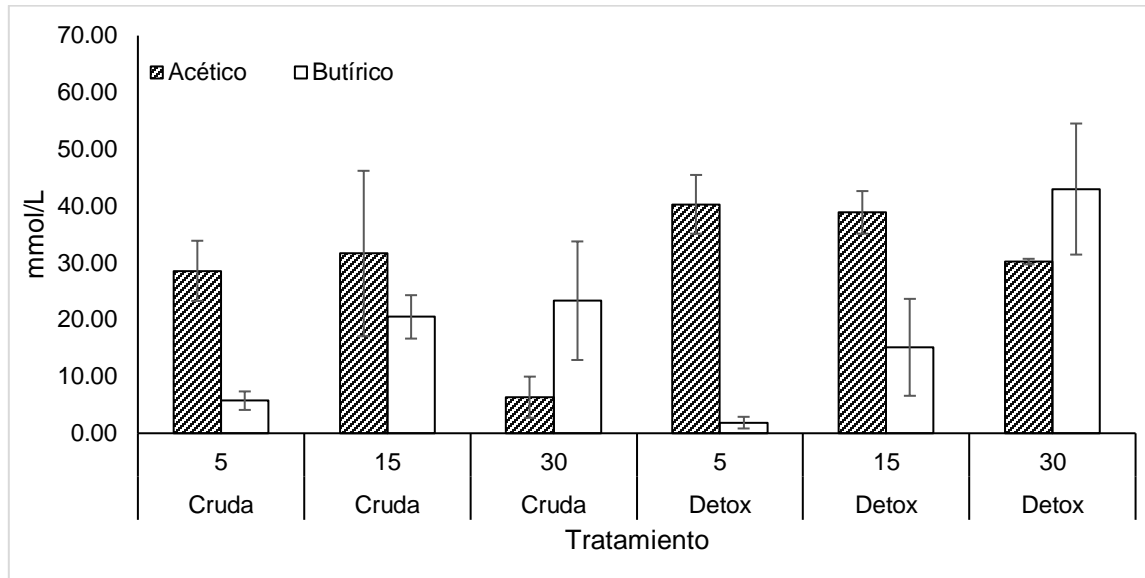
Gráfica 7. Comparativo de rendimiento molar y por litro de vinaza de los diferentes tratamientos.

La Gráfica 7 muestra un comparativo del rendimiento obtenido con ambas vinazas a las distintas concentraciones iniciales de DQO estudiadas. Si bien el rendimiento molar de producción de H<sub>2</sub> se incrementó con el pretratamiento, el rendimiento por litro de vinaza suministrada disminuyó. Ello sugiere que la pérdida de azúcares, así como de otros compuestos durante el tratamiento con carbón activado, influyó negativamente en la productividad de las vinazas detoxificadas.

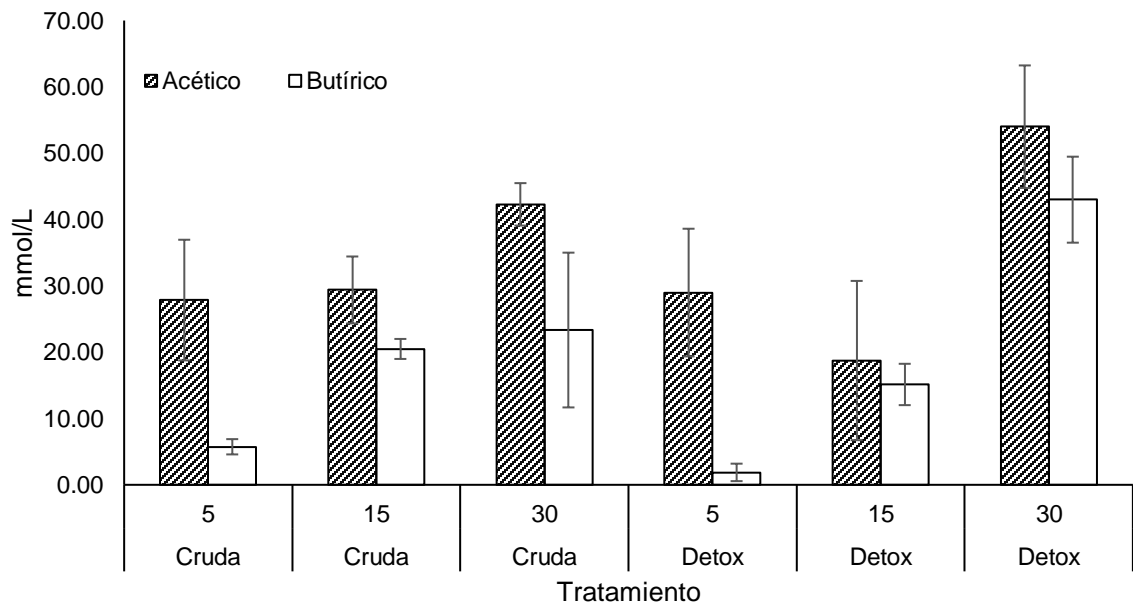
#### 8.4.7 Efecto del pretratamiento en el perfil de AGV

Se identificó a los ácidos acético y butírico como los productos principales de la fermentación en lote (Gráfica 8 y Gráfica 9). No se encontró ácido propiónico en ninguno de los tratamientos. Este comportamiento es deseable según lo establecido en la literatura debido a que las rutas metabólicas del acetato y del

butirato son productoras de H<sub>2</sub> (Ilustración 1) (Zhao *et al.*, 2008; González-Cabaleiro *et al.*, 2015).



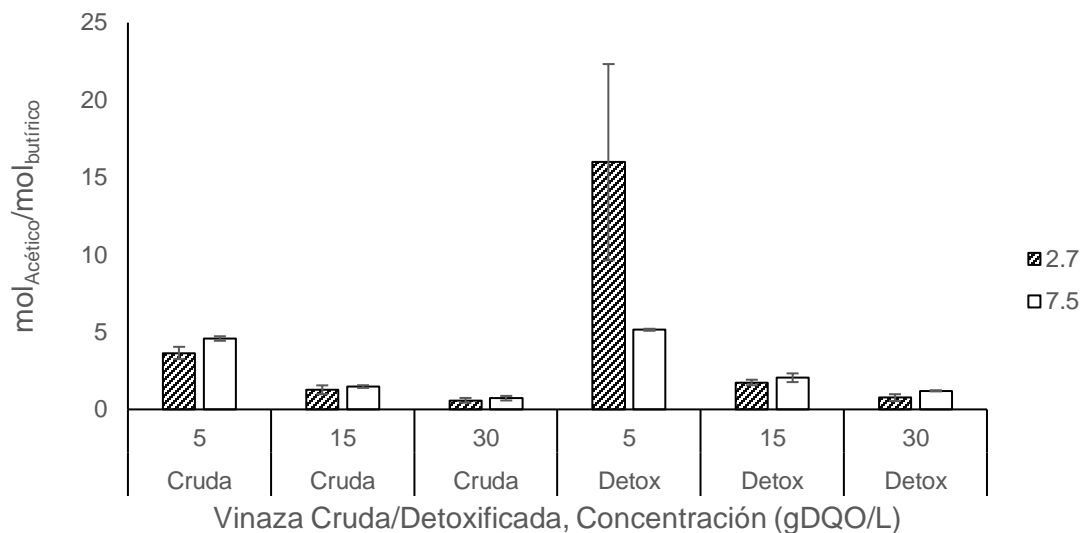
Gráfica 8. Producción de ácidos acético y butírico para relación I/S=2.7. Las barras representan desviación estándar, n=2.



Gráfica 9. producción de ácidos acético y butírico para la relación I/S=7.5. Las barras representan desviación estándar, n=2.



Según lo descrito en la literatura, la producción de ácido acético es deseable para fermentaciones anaerobias con cultivos mixtos, debido a que en esta ruta metabólica se producen 2 moles extra de  $H_2$  por cada mol de glucosa con respecto a la ruta productora de ácido butírico. Siguiendo este principio, se puede decir que la relación acético/butírico (Gráfica 10) fue favorable para todos los casos estudiados a excepción de los tratamientos con 30 g/L y relación I/S 2.7.



*Gráfica 10. Comparativo entre las relaciones acético/butírico para todos los tratamientos, las barras representan desviación estándar, n=2.*

Para la vinaza detoxificada, a 5 gDQO/L con relación I/S= 2.7 fue más de 3 veces mayor que para todos los demás casos, y fue mayor de lo reportado para fermentaciones con cultivos mixtos (Khanal, et al., 2003).

Esta producción de ácido acético no concuerda con el comportamiento observado para la producción de  $H_2$  con base en la estequiometría propuesta en la literatura para este tipo de fermentaciones (Gonzales-Cabaleiro et al., 2015). Esto puede ser indicio de que estas condiciones favorecen el crecimiento de organismos homoacetógenos.

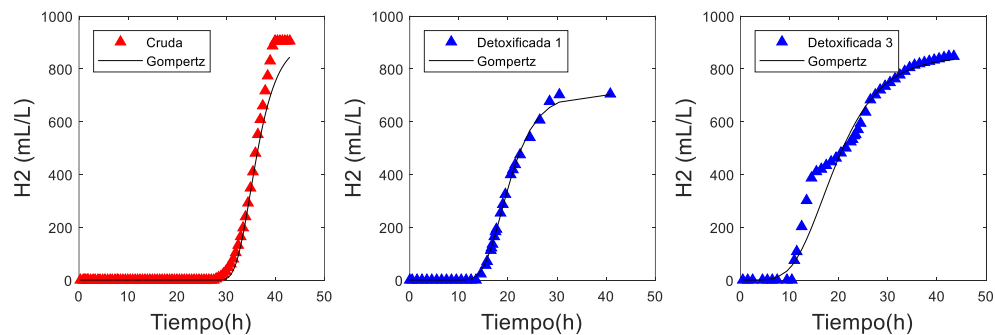
La aparición de organismos homoacetógenos es indeseable para los procesos de fermentación oscura para producción de hidrógeno, debido a que estos

tienen la capacidad de utilizarlo como donador de electrones produciendo ácido acético. Las estrategias para controlar su aparición aún son uno de los problemas sin resolver en los procesos de fermentación (Cabrol *et al.*, 2017).

## 8.5 PRUEBAS DE PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO EN CONTINUO

### 8.5.1 Arranque en lote de los reactores CSTR

Los resultados del arranque en lote se muestran en la Gráfica 11. Se realizaron en total 3 réplicas con vinaza detoxificada. Los resultados que se muestran en la gráfica corresponden a la primera y a la última corrida. Los datos experimentales se ajustaron al modelo modificado de Gompertz con el objetivo de comparar los resultados obtenidos durante la operación en lote de los reactores.



*Gráfica 11. Ajuste del modelo de Gompertz a los datos de producción en lote de los reactores CSTR.*

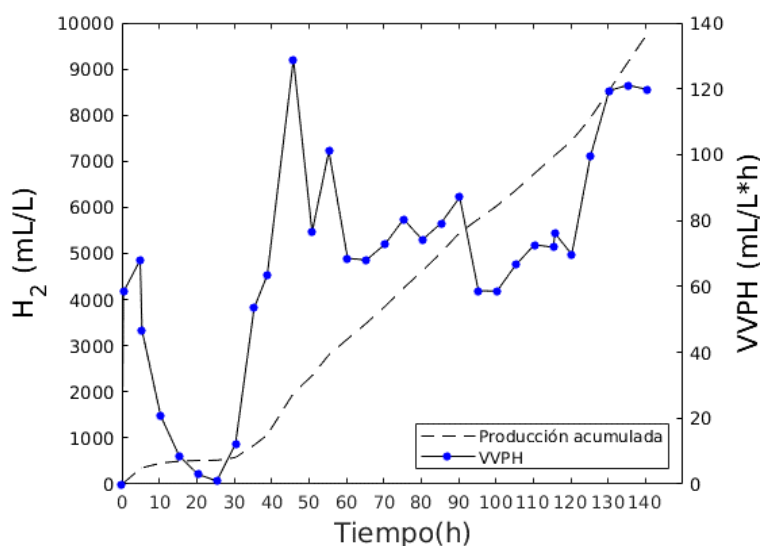
La fase lag para la vinaza cruda de 30.9 h fue mayor que la observada para la vinaza detoxificada de 14.9 y 10.5 h. Esto corrobora lo encontrado en etapas previas de esta investigación. En contraste a lo obtenido en las pruebas en AMPTS, la vinaza detoxificada mostró una menor  $R_{max}$  (68 y 50 mL/L\*h) en comparación a la vinaza cruda (110 mL/L\*h).

Ambas pruebas realizadas con vinaza detoxificada obtuvieron una producción máxima acumulada de  $H_2$  menor a la observada para la vinaza cruda. Este comportamiento corresponde al observado durante las pruebas en AMPTS.

## 8.5.2 Desempeño de los reactores en continuo

### 8.5.2.1 Vinaza cruda

El reactor comenzó a producir H<sub>2</sub> tras 5 h después de iniciada su operación en continuo. A partir de ahí, tuvo un periodo de 15 h de producción de H<sub>2</sub> a una VVPH promedio de 62 mL/L\*h, posterior al cual, hubo una caída en la producción de la hora 25 a la 38.



*Gráfica 12. Comportamiento de la producción de hidrógeno en el reactor alimentado con vinaza cruda, las flechas indican los puntos en los que se purgó el reactor debido a la colmatación.*

A partir de la hora 38, el reactor mantuvo la producción de biohidrógeno. Sin embargo, la producción de H<sub>2</sub> solo se mantuvo estable (variabilidad < 10%) durante el periodo comprendido entre las 60 y las 90 h ( $75.7 \pm 6.9$  mL/L\*h), entre las 95 y las 100 h ( $58.6 \pm 0.05$  mL/L\*h), las 110 y las 120 ( $71.4 \pm 3.5$  mL/L\*h) y las 130 a la 140 ( $120.1 \pm 0.83$  mL/L\*h).

Es importante mencionar que la principal dificultad observada durante la operación del reactor fue la colmatación. Al no contar con el actuador para control de nivel, fue necesario purgar el reactor dos veces durante su operación: a las 45 h, en el que el volumen del reactor alcanzó 1.6 L durante la noche, y a las 116 h, en el cual alcanzó un volumen de 1.7 L respectivamente. Posterior a la purga, el reactor se burbujeó por 5 minutos con N<sub>2</sub>. Durante las últimas 24 h

de operación el volumen del reactor alcanzó el nivel crítico de 3 L, por lo que el experimento se detuvo a las 140 h de operación. Los primeros dos incidentes de colmatación pudieron ser producto de pequeñas diferencias en la velocidad de flujo entre ambos cabezales de la bomba peristáltica. La última falla pudo ser producto de un taponamiento en la manguera de salida ocasionado por la acumulación de biomasa. Es posible que gran parte de la variabilidad observada se deba a las dificultades encontradas para mantener constante el volumen del biorreactor.

*Tabla 14 Comparativo de distintos reactores en continuo para la producción e hidrógeno utilizando vinazas como sustrato.*

Trabajo	Tipo de reactor	Sustrato	Condiciones experimentales	VVPH (LH <sub>2</sub> /L <sub>r</sub> *d)	Rendimiento
Este trabajo	CSTR	Vinaza tequilera	37 °C, pH 5.5 TRH 4h COA 40 gDQO/L*d	1.81	45 mLH <sub>2</sub> /gDQO 1.01 mol H <sub>2</sub> /mol <sub>A.T.</sub> 1.45 LH <sub>2</sub> /L <sub>vinaza</sub>
Buitrón et al (2014)	Lecho fijo	Vinaza tequilera	35°C pH 4.7 TRH 4 h CO 8.5 gDQO/L	1.72	33.12 mLH <sub>2</sub> /gDQO* <sup>c</sup>
Buitrón y Carvajal (2010)	Lotes secuenciales	Vinaza tequilera	35 °C pH 5.5 TRH 12 h* <sup>a</sup> CO 3 gDQO/L.	1.21* <sup>c</sup>	16.8 mLH <sub>2</sub> /gDQO*h
Albarez et. al. (2016)	Lotes secuenciales (biomasa inmovilizada)	Vinaza azucarera y melazas	30 °C, pH N.R* <sup>b</sup> . TRH 3 h* <sup>a</sup> CO 6 gDQO/L	0.30* <sup>c</sup>	0.13 mLH <sub>2</sub> /gDQO
Ramos y Silva, 2018	Lecho fluidizado	Vinaza azucarera	55 °C pH 4.26-4.9 TRH 8 h	2.54	22.62 mLH <sub>2</sub> /gDQO* <sup>c</sup>
Fuess et al. (2016)	Lecho empacado	Vinaza azucarera	55 °C, pH 5.5, TRH 7.5 h CO 84.2 gDQO/L*d	0.79* <sup>c</sup>	1.5 mol H <sub>2</sub> /mol carbohidratos 1097 mL H <sub>2</sub> /gDQO* <sup>c</sup>
Nunes-Ferraz (2015)	Lecho empacado	Vinaza azucarera	25° C pH 6.5 TRH 24h CO 36.4 gDQO/L*d	0.08* <sup>c</sup>	0.6 molH <sub>2</sub> /mol carbohidratos 84.2 mLH <sub>2</sub> /L <sub>vinaza</sub> 6.24 mLH <sub>2</sub> /gDQO* <sup>c</sup>

\*<sup>a</sup> Reactores en semicontinuo o lote alimentado

\*<sup>b</sup> No reportado

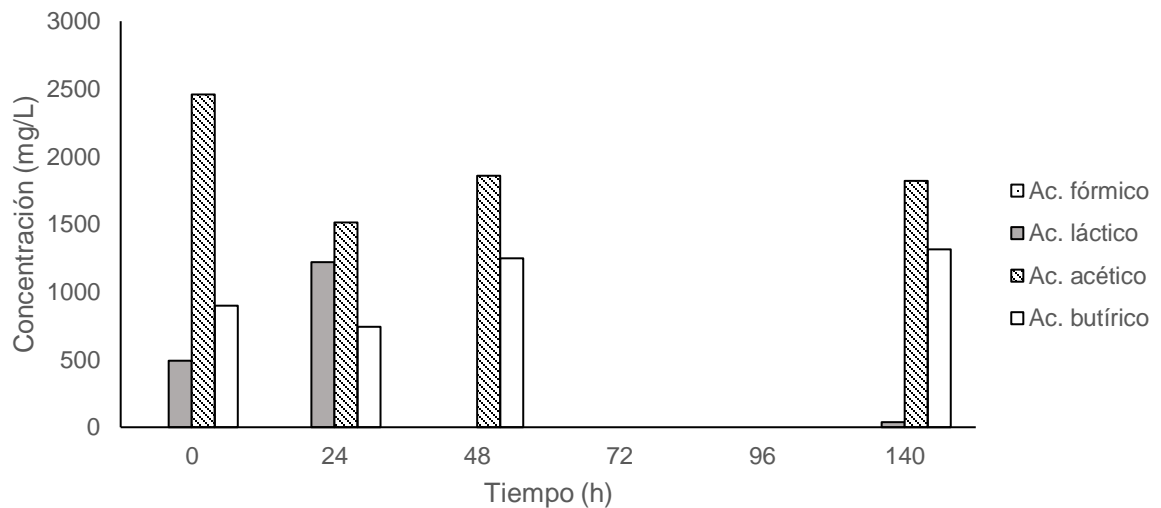
\*<sup>c</sup> Calculado a partir de los datos reportados considerando condiciones estándar

\*<sup>d</sup> Carga orgánica aplicada

La Tabla 14 compara los rendimientos y la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno obtenidos en este estudio con el desempeño reportado en otros estudios. Los rendimientos obtenidos se encuentran en un rango medio dentro de los valores reportados en la literatura para sustratos similares. Sin embargo, debido a las diferencias entre el tipo y volumen de reactor, así como las condiciones operacionales como pH, temperatura y carga orgánica aplicada, la comparación entre los datos se vuelve difícil.

#### 8.5.2.1.1 Producción de AGV

Durante la operación en continuo del CSTR con vinaza cruda y detoxificada se siguió la producción de AGV, los resultados se muestran en la Gráfica 13.



*Gráfica 13. Producción de AGV en el reactor de vinaza cruda.*

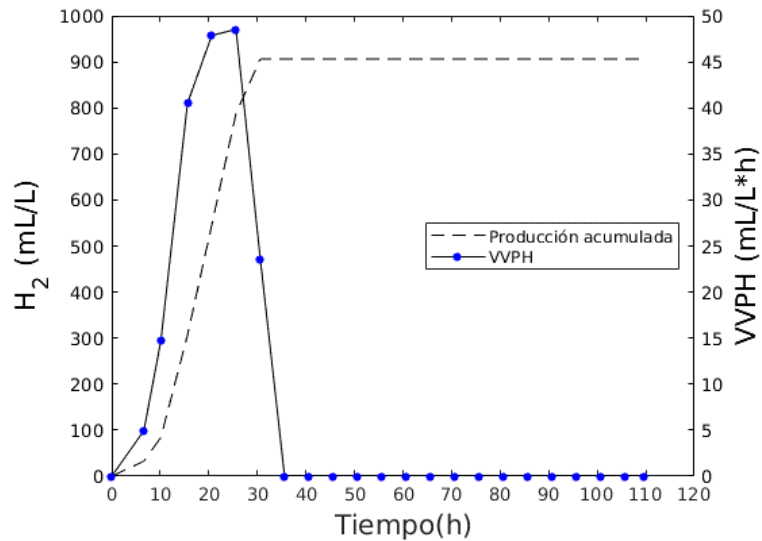
Los principales productos de la fermentación durante las primeras 24 h de operación en continuo fueron los ácidos acético, butírico y láctico. A las 48 h, el ácido láctico no fue detectado. Al final de la prueba, la concentración de ácido láctico fue de 35.34 mg/L.

Estos resultados pueden deberse a la presencia de distintas comunidades microbianas en el biorreactor, y a sus interacciones ecológicas. Para el caso de vinaza cruda, se produjo de ácido láctico durante las primeras horas de la fermentación (0-24 h). Las bacterias productoras de ácido láctico se han identificado en fermentadores para la producción de hidrógeno con anterioridad

(García-Depraect *et al.* 2017; Park *et al.* 2016, 2018). Sin embargo, su rol en el proceso de fermentación no está claro aún. Algunos autores les atribuyen interacciones ecológicas de sinergismo con las bacterias productoras de hidrógeno, debido a que consumen el oxígeno disuelto en el biorreactor y acidifican el medio generando condiciones propicias para la producción de H<sub>2</sub>. Garcia-Depraect *et al.* (2018) mencionan una relación de comensalismo entre microorganismos ácido lácticos y productores de hidrógeno: estos últimos usan el ac. láctico como sustrato y producen hidrógeno por medio de esta ruta. En otros trabajos, se atribuyen efectos negativos a la aparición de estos microorganismos en el biorreactor debido a relaciones de competencia por el sustrato disponible e inhibición por medio de los subproductos. Se sabe que el ácido láctico puede actuar como inhibidor, y que las bacterias productoras de ácido láctico producen bacteriocinas (Park *et al.* 2016, 2018; Kumar *et al.* 2017). En el biorreactor, la concentración máxima de ácido láctico se detectó durante el periodo de tiempo en el que la VVPH tuvo una caída a las 24 h de operación en continuo. Se dejó de detectar cuando esta se incrementó a las 48 h de operación. Esto sugeriría una relación de competencia entre microorganismos ácido-lácticos y productores de hidrógeno, en la cual, para el caso de la vinaza cruda, prevaleció el consorcio productor de hidrógeno.

#### **8.5.2.2 Vinaza detoxificada**

La vinaza detoxificada en la primera prueba inició producción a las 6 h de iniciada la operación en continuo. Este incrementó su VVPH hasta 47.9 mL/L\*h y se mantuvo estable por 5 h. Posterior a la hora 25, la producción de H<sub>2</sub> se detuvo completamente (Gráfica 15).

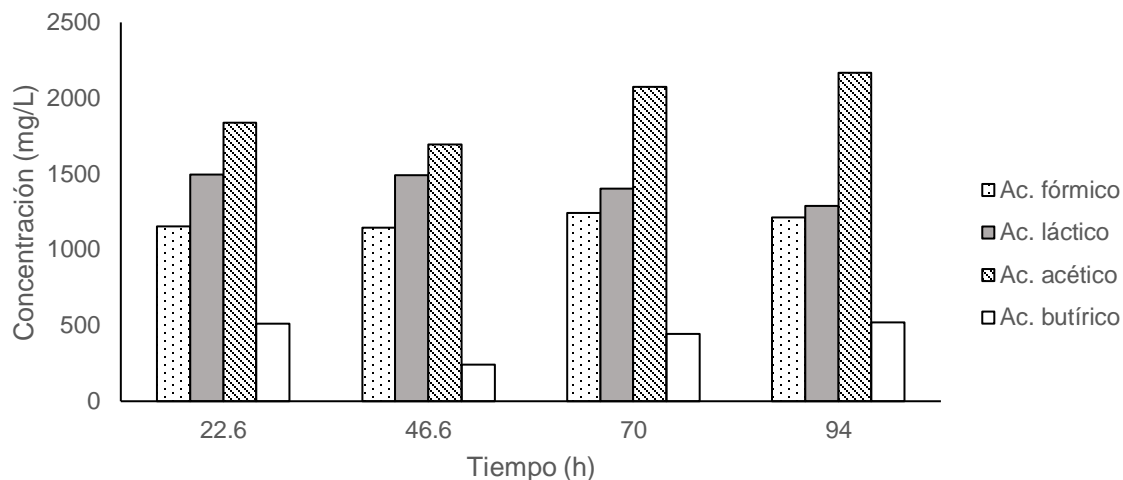


*Gráfica 14. Comportamiento de la producción de biohidrógeno en el reactor alimentado con vinaza detoxificada.*

La caída abrupta del biorreactor pudo deberse a varias razones. Debido a que el reactor se operó en el mismo TRH que el reactor de vinaza cruda, se descartó la posibilidad de que se debiera a un lavado de la biomasa activa. La concentración de oxígeno se mantuvo menor al 3% por medio de burbujes periódicos cada 24 h con N<sub>2</sub>, y tanto el pH como la temperatura se mantuvieron constantes por medio de la consola de control del biorreactor. Por ello, se descartaron fluctuaciones en esas variables como posibles causas del fallo en la producción de hidrógeno.

#### 8.5.2.2.1 Producción de AGV

El análisis de ácidos grasos volátiles generados en la vinaza detoxificada mostró que los productos principales de la fermentación fueron los ácidos acético, láctico, fórmico y butírico (Gráfica 15).



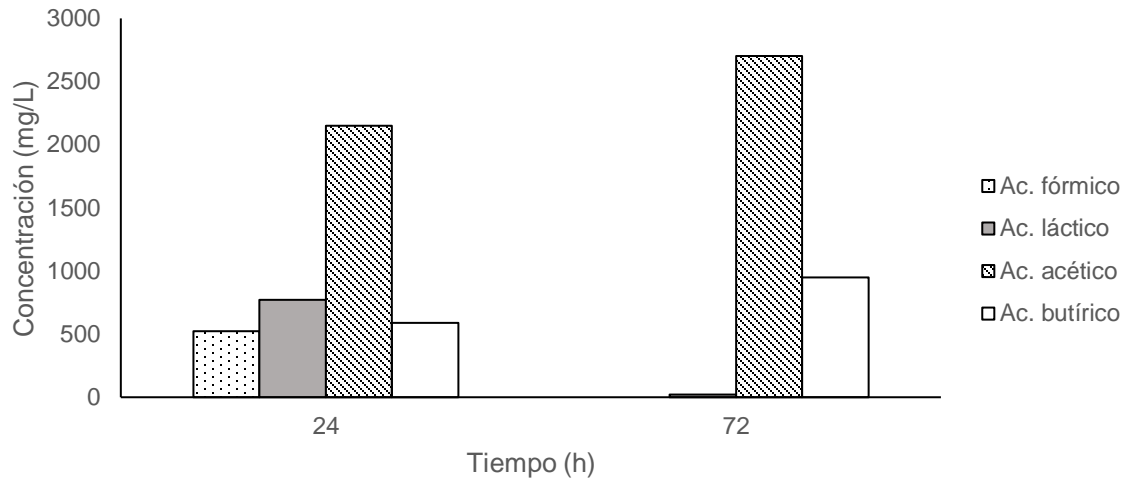
*Gráfica 15. Producción de AGV durante el segundo ensayo con vinaza detoxificada.*

Resulta de interés que la producción de ácidos acético y butírico se mantuvo posterior a que se dejó de detectar flujo de hidrógeno en la salida del reactor. Ello refuerza la idea de que la falla no se debió a la entrada de oxígeno al reactor. Se ha reportado la producción de ácido fórmico como un intermediario producido por anaerobios facultativos como *E. coli* en fermentaciones ácido-mixtas como un intermediario de la producción de hidrógeno. Sin embargo, al no producirse hidrógeno durante este periodo, podría ser evidencia de que el consorcio siguió alguna ruta metabólica consumidora de hidrógeno como la homoacetogénesis (Montiel Corona y Razo-Flores, 2018).

### **8.5.2.3 Segunda prueba con vinaza detoxificada**

La segunda prueba con vinaza detoxificada no tuvo producción de H<sub>2</sub> durante la fase de operación en lote. Se tomó muestra a las 24 h y al final de las 72 h que duró el experimento, los resultados del análisis de AGV se muestran en la Gráfica 16.





*Gráfica 16. Producción de AGV en el segundo reactor alimentado con vinaza detoxificada.*

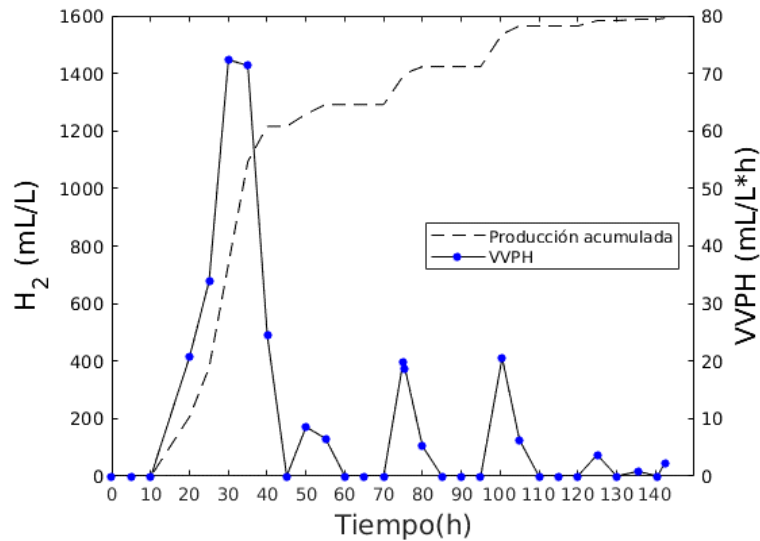
El ácido acético fue el principal producto de la fermentación. A las 24 h se detectaron, además, ácidos fórmico, láctico y butírico, mientras que para las 72 h se detectaron ácidos butírico y acético y la concentración de ácido láctico disminuyó.

#### **8.5.2.4 Tercera prueba con vinaza detoxificada**

La tercera prueba con vinaza detoxificada mostró un comportamiento muy similar al de la primera prueba en cuanto a la producción de H<sub>2</sub>, con la diferencia de que en lugar de detener abruptamente la producción de hidrógeno, esta se mantuvo intermitente.

La tercera prueba del biorreactor en continuo utilizando vinaza detoxificada inició producción de H<sub>2</sub> a las 10.1 h de operación. A partir de ese punto, tuvo un pico de producción máxima de 71.9 mL/L\*h hasta la hora 35, posterior a la cual, la producción cayó drásticamente (Gráfica 17).

El reactor tuvo a su vez 4 picos menores de producción de la hora 45 a la 60, de la 70 a la 85 y de 100 a la 110 y de la 125 a la 130.

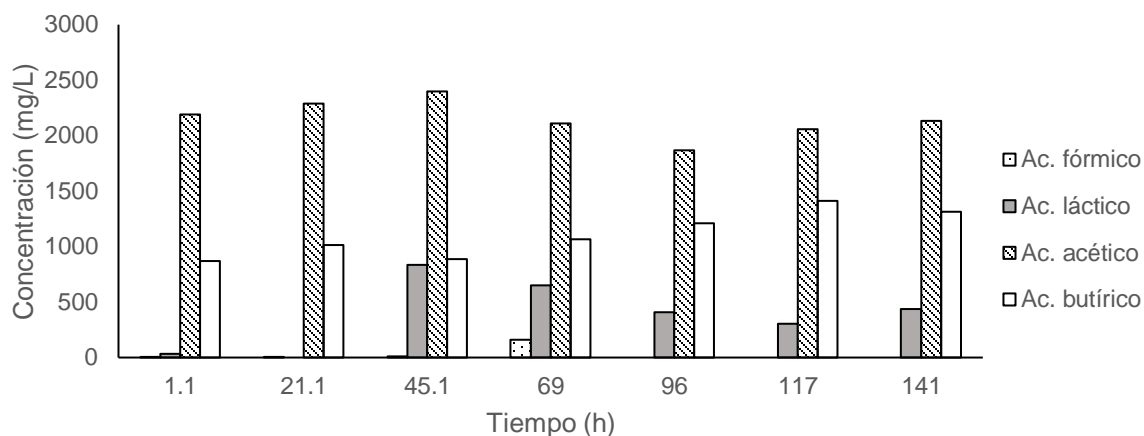


Gráfica 17. Comportamiento de la producción de biohidrógeno en la tercera corrida del reactor alimentado con vinaza detoxificada.

En cultivos mixtos, se sabe que las interacciones entre las poblaciones de microorganismos, así como los cambios en estas mismas, juegan un rol crucial en la producción de hidrógeno. Microorganismos homoacetógenos, sulfato-reductores, metanogénicos y productores de ácido láctico no son deseables en procesos de producción de hidrógeno (Cabrol *et al.*, 2017; García-Depraect y León-Becerril, 2018). Una hipótesis que explicaría el comportamiento inestable de los reactores alimentados con vinaza detoxificada sería, que las condiciones generadas después del pretratamiento de adsorción favorecen poblaciones microbianas no productoras de hidrógeno que pudiesen actuar como consumidores de hidrógeno (potencialmente homoacetógenos), como competidores por el sustrato, o como productores de compuestos inhibidores (bacterias ácido lácticas) (Gomes *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016; Montiel Corona y Razo-Flores, 2018; Regueira *et al.*, 2018). Esto reduciría significativamente los rendimientos de producción para la 3ra réplica y, en los casos de la primera y segunda réplica, los inhibiría completamente.

#### 8.5.2.4.1 Análisis de AGV

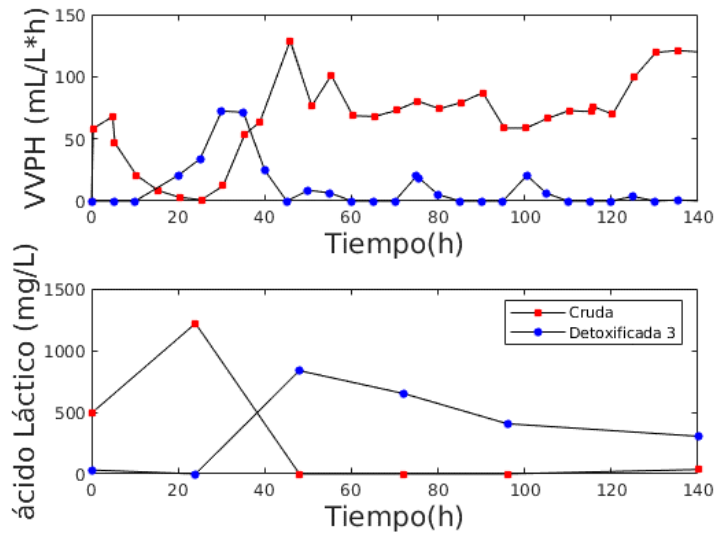
Los productos principales de la fermentación encontrados para la tercera réplica del biorreactor utilizando vinaza detoxificada fueron principalmente ácidos acético, butírico, y láctico (Gráfica 18).



*Gráfica 18. Producción de AGV durante el tercer ensayo con vinaza detoxificada.*

Durante las primeras 21 h de operación, mayoritariamente se produjeron ácidos acético y butírico. A partir de la hora 45, se empezó a detectar ácido láctico, y una pequeña fracción de ácido fórmico a las 69 h de operación. La concentración máxima de ácido láctico en el biorreactor, se midió 15 h después de que la velocidad de producción de H<sub>2</sub> cayera. En el artículo publicado por Park et. al. (2016) se correlaciona la aparición de bacterias ácido-lácticas con fallas abruptas en la producción de H<sub>2</sub>. Se sabe que, adicionalmente a competir por el sustrato con los productores de hidrógeno, algunas bacterias ácido-lácticas tienen la capacidad de segregar bacteriocinas, los cuales son péptidos que inhiben a otras bacterias afectando la permeabilidad de su membrana (Gomes et al., 2016; Rosa et al., 2016).

La Gráfica 19 muestra un comparativo de las VVPH y la concentración de ácido láctico observadas para la prueba de producción con vinaza cruda y la tercera prueba alimentada con vinaza detoxificada.



Gráfica 19. Comparación del comportamiento del reactor alimentado con vinaza cruda, y la tercera prueba alimentada con vinaza detoxificada.

Resulta interesante comparar el comportamiento de ambos reactores durante las primeras 48 h de operación. Para la vinaza cruda, el porcentaje de ácido láctico sobre los AGV totales se incrementó de 12.8% a 35% para posteriormente caer a las 48 h, donde no fue detectado ácido láctico en el reactor. Durante este mismo periodo de tiempo, la velocidad volumétrica de producción tuvo una caída de la hora 5 a la 25. A partir de la hora 25 la VVPH se incrementó gradualmente hasta llegar al valor pico de 128.86 mL/L\*h a las 45 h.

Durante la tercera prueba con vinaza detoxificada se observaron pequeñas concentraciones de ácido láctico únicamente al inicio de la operación en continuo (Gráfica 19). Para las primeras 21 h, no se encontró este ácido en el reactor; entre las horas 21 y 45, la producción de ácido láctico se incrementó hasta alcanzar el 20.2% de la producción total de AGV. Los niveles de producción máxima de ácido láctico coinciden en tiempo con la caída en la producción de H<sub>2</sub> para la vinaza detoxificada a las 45 h.

Ambos resultados pueden ser evidencia de un proceso de adaptación de la población microbiana a las distintas condiciones generadas por la detoxificación del sustrato. Por su parte, para la vinaza cruda, la población predominante

fueron las bacterias productoras de H<sub>2</sub>. Parece ser que, en la vinaza detoxificada, prevaleció la población de microorganismos productores de ácido láctico.

En los trabajos de Park *et al.* (2015, 2016, 2018) se mencionan resultados similares, y se liga la aparición de bacterias ácido-lácticas con concentraciones de glucosa menores a 1 g/L. En estos trabajos, se menciona la teoría de supervivencia K y r como una hipótesis que explicaría el por qué las bacterias ácido-lácticas. Por ejemplo, *Lactobacillus* spp., aparecen en reactores productores de hidrógeno a bajas concentraciones de sustrato. La teoría de supervivencia K y r menciona que los organismos estrategas r son organismos altamente afines al sustrato y con altas tasas de reproducción, mientras que los organismos estrategas k tienen expectativas de vida más largas y generalmente son microorganismos energéticamente más eficientes. Bajo esta teoría, las bacterias productoras de H<sub>2</sub> seguirían la estrategia r, siendo más afines a la vinaza cruda la cual tiene una mayor cantidad de azúcares (Tabla 12), mientras que los microorganismos productores de ácido láctico, serían estrategas tipo k adaptándose de mejor manera a la vinaza detoxificada la cual tiene una menor concentración de azúcares.

# Capítulo IV

## 9 CONCLUSIONES

---

Los resultados obtenidos en los ensayos de adsorción en lote demostraron la factibilidad de aplicar un pretratamiento de adsorción a las vinazas tequileras para separar compuestos fenólicos y remover color, lo que podría representar una ventaja para el tratamiento de este efluente.

El carbón activado mostró mayor capacidad de adsorción y afinidad por los compuestos fenólicos en comparación con las resinas de adsorción Amberlite®. Las resinas de adsorción presentaron menores capacidades de adsorción de fenoles totales en comparación al carbón activado, además de tener remociones de azúcares totales similares al de este. Sin embargo, por su durabilidad, su mayor velocidad de adsorción y su fácil desorción podrían aplicarse en estudios donde se busque separar compuestos fenólicos para revalorizarlos como antioxidantes o antimicrobianos.

Los resultados obtenidos pueden servir como base para futuros estudios en los que se tenga por objetivo recuperar los compuestos adsorbidos de las vinazas tequileras como un subproducto de valor agregado además del biohidrógeno.

La remoción de compuestos fenólicos mejoró la fase lag y la velocidad volumétrica de producción de H<sub>2</sub>. Esto ayudaría en el diseño de reactores más pequeños empleados para producción de H<sub>2</sub> a partir de vinazas tequileras.

Fue posible aumentar ligeramente el rendimiento molar de producción de hidrógeno en lote. Sin embargo, la producción máxima acumulada y el rendimiento por litro de vinaza se redujeron significativamente en las vinazas detoxificadas. En función a esta reducción observada en la productividad, la mejora en las velocidades del proceso por sí sola no justificaría la aplicación de una detoxificación utilizando las condiciones empleadas en este estudio.

La producción de biohidrógeno disminuyó cuando se emplearon vinazas tequileras detoxificadas como sustrato para alimentar al reactor en continuo. Una de las posibles causas de este fenómeno pudo ser la proliferación de

microorganismos no productores de hidrógeno que se adaptaron de mejor manera a las condiciones generadas por el proceso de detoxificación.

Los resultados obtenidos en las pruebas a corto plazo de producción continua de hidrógeno en conjunto con los resultados de las pruebas en lote muestran que el pretratamiento de detoxificación con carbón activado no mejoró la producción de hidrógeno. Estos resultados demuestran que no es necesario un pretratamiento de detoxificación en la vinaza tequilera con los adsorbentes probados, lo que reduciría los gastos del proceso de producción haciéndolo más rentable.

Si bien el análisis al perfil de ácidos grasos volátiles generados durante los experimentos en continuo proporciona evidencia acerca de los posibles cambios en la comunidad microbiana durante la operación de los reactores, resulta importante realizar un análisis de las distintas poblaciones microbianas el cual ayude a corroborar dichos cambios.

## 10 PROSPECTIVAS

---

La producción de biohidrógeno a partir de vinazas tequileras resulta una opción interesante para la valorización de un residuo que en la actualidad genera una importante problemática ambiental, los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación denotan la necesidad de futuros estudios en los que se tome un enfoque más amplio de los distintos subproductos que se podrían obtener a partir de las vinazas tequileras.

Al ser el proceso de fermentación oscura sumamente sensible a los cambios en la comunidad microbiana del biorreactor, será importante realizar futuros estudios en los cuales se analicen los cambios en esta misma durante periodos prolongados de tiempo cuando se utilizan vinazas tequileras como sustrato, esto con el objetivo de identificar los factores que rigen los cambios en la comunidad microbiana y por tanto poder dar un paso adelante hacia tener un proceso mucho más controlado y eficiente.

Si bien los resultados obtenidos no respaldan la hipótesis de que un pretratamiento de adsorción aplicada como tecnología de detoxificación mejore significativamente el proceso de producción de biohidrógeno por la vía fermentativa, la adsorción puede aplicarse en futuros estudios para la obtención de compuestos potencialmente valorizables. Para este propósito, debe de estudiarse la aplicación no solo de adsorbentes más selectivos, sino también, tecnologías y procesos de desorción y aislamiento de estos compuestos.

Es importante mencionar también que, durante el proceso de fermentación, se genera un efluente de ácidos grasos volátiles, mismo que podría estar sujeto a una revalorización posterior, ya sea por medio de la producción de metano por digestión anaerobia, producción de biohidrógeno por medio de la fotofermentación o como bloques de síntesis. Esto sumado a lo mencionado anteriormente, plantea la posibilidad de proponer un tren de valorización o “biorefinería” aplicable a las vinazas tequileras donde como productos de valor se podrían obtener los compuestos separados de las vinazas tequileras durante la fase de adsorción: el biohidrógeno como un vector energético, y un efluente



rico en ácidos grasos susceptible a valorización por medio de las tecnologías antes mencionadas.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

---

Alemán-Nava, G. S., Alessandra Gatti, I., Parra-Saldivar, R., Jean-Francois, D., Rittmann, B. E., M.N. Iqbal, H. (2018) 'Biotechnological revalorization of Tequila waste and by-product streams for cleaner production – A review from bio-refinery perspective', *Journal of Cleaner Production*, 172, pp. 3713–3720. doi: 10.1016/j.jclepro.2017.07.134.

Albanez, R., Lovato, G., Zaiat, M., Ratusznei, S. M., Rodrigues, J. A. D. (2016) 'Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses', *International Journal of Hydrogen Energy*. Pergamon, 41(45), pp. 20473–20484. doi: 10.1016/J.IJHYDENE.2016.08.145.,

Arimi, M. M., Knodel, J., Kiprop, A., Namago, S. S., Zhang, Y., Geißen S. (2015) 'Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater : A review', *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 75(0), pp. 101–118. doi: 10.1016/j.biombioe.2015.02.011.

Bernal, M., Ruiz, M. O., Geanta, R. M., Benito, J. M., Escudero, I. (2016) 'Colour removal from beet molasses by ultrafiltration with activated charcoal', *Chemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 283, pp. 313–322. doi: 10.1016/j.cej.2015.07.047.

Bernardo, G. R. R., Rangel-Méndez, J. R., Alfaro-De la Torre, M. C. (2009) 'Chromium (III) uptake by agro-waste biosorbents: Chemical characterization, sorption-desorption studies, and mechanism', *Journal of Hazardous Materials*, 170(2–3), pp. 845–854. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.05.046.

Buitrón, G., Prato-Garcia, D., Zhang, A. (2014) 'Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor.', *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 70(12), pp. 1919–25. doi: 10.2166/wst.2014.433.

- Buitrón, G., Kumar, G., Martínez-Arce, A., Moreno, G. (2014) (1) 'Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H<sub>2</sub>-SBR + CH<sub>4</sub>-UASB) using tequila vinasses', *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(33), pp. 19249–19255. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.04.139.
- Buitrón, G. y Carvajal, C. (2010) 'Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time', *Bioresource Technology*, 101(23), pp. 9071–9077. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.127.
- Bundhoo, M. A. Z. y Mohee, R. (2016) 'Inhibition of dark fermentative biohydrogen production: A review', *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 41(16), pp. 6713–6733. doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.03.057.
- Buran, T. J., Sandhu, K., Li, Z., Rock, C. R., Yang, W. W., Gu, L. (2014) 'Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins', *Journal of Food Engineering*, 128, pp. 167–173. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.12.029.
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., Trebly, E. (2017) 'Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function', *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), pp. 158–181. doi: 10.1093/femsre/fuw043.
- Camara Nacional De la Industria Tequilera (2017) 'Información Básica de la Industria Tequilera junio 2017', (Junio), pp. 1–17. Disponible en: [http://www.tequileros.org/stuff/file\\_estadistica/1501005174.pdf](http://www.tequileros.org/stuff/file_estadistica/1501005174.pdf).
- Carvalho, F., Duarte, L. C., Lopes, S., Parajó, J. C., Pereira, H., Gírio, F. M. (2005) 'Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941', *Process Biochemistry*, 40(3–4), pp. 1215–1223. doi: 10.1016/j.procbio.2004.04.015.
- Chen, X. (2015) 'Modeling of experimental adsorption isotherm data', *Information (Switzerland)*, 6(1), pp. 14–22. doi: 10.3390/info6010014.
- Cheng, J., Lin, R., Song, W., Xia, A., Zhou, J., Cen, K. (2015) 'Enhancement of fermentative hydrogen production from hydrolyzed water hyacinth with activated carbon detoxification and bacteria domestication', *International Journal of*

*Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 40(6), pp. 2545–2551. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.12.097.

Cipriani, G., Di Dio, V., Genduso, F., La Cascia, D., Liga, R., Miceli, R., Ricco Galluzzo, G. (2014) 'Perspective on hydrogen energy carrier and its automotive applications', *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 39(16), pp. 8482–8494. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.03.174.

Dávila-Vázquez, G., Arriaga, S., Alatríste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., Rosales-Colunga, L. M., Razo-Flores, E. (2008) 'Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives', *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7(1), pp. 27–45. doi: 10.1007/s11157-007-9122-7.

Dávila-Vázquez, G., Alatríste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E. (2008) (1) '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), pp. 4989–4997. doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.06.065.

Dávila-Vázquez, G. y Razo-Flores, E. (2007) 'Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: Fundamentos y perspectivas', *BioTecnología*, 11(3), pp. 19–27.

Fuess, L. T., Kiyuna, L. S. M., Garcia, M. L., Zaiat, M. (2016) 'Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor', *International Journal of Hydrogen Energy*. Pergamon, 41(19), pp. 8132–8145. doi: 10.1016/J.IJHYDENE.2015.10.143.

García-Depraect, O., Gómez-Romero, J., León-Becerril, E., López-López, A. (2017) 'A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum', *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(9), pp. 5820–5831. doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.11.204.

García-Depraect, O. y León-Becerril, E. (2018) 'Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway: Operational performance, kinetic analysis and microbial ecology', *Fuel*. Elsevier, 234(June), pp. 151–160. doi: 10.1016/j.fuel.2018.06.126.

- Ghafari, M., Cui, Y., Alali, A., Atkinson, J. D. (2019) 'Phenol adsorption and desorption with physically and chemically tailored porous polymers: Mechanistic variability associated with hyper-cross-linking and amination', *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier, 361(April 2018), pp. 162–168. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.08.068.
- Gomes, S. D., Fuess, L. T., Mañunga, T., De Lima Gomes P. C. F. Zaiat, M. (2016) 'Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor', *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(19), pp. 8120–8131. doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.11.186.
- González-Cabaleiro, R., Lema, J. M., Rodríguez, J. (2015) 'Metabolic energy-based modelling explains product yielding in anaerobic mixed culture fermentations', *PLoS ONE*, 10(5), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0126739.
- Hatano, K., Aoyagi, N., Miyakawa, T., Tanokura, M., Kubota, K. (2013) 'Evaluation of nonionic adsorbent resins for removal of inhibitory compounds from corncob hydrolysate for ethanol fermentation', *Bioresource Technology*, 149, pp. 541–545. doi: 10.1016/j.biortech.2013.08.166.
- Khanal, S. K., Cheng, W. H., Li, L., Sung, S. (2004) 'Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products', *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(11), pp. 1123–1131. doi: 10.1016/j.ijhydene.2003.11.002.
- Kumar, G., Park, J. H., Sivagurunathan, P., Lee, S. H., Park, H. D., Kim, S. H. (2017) 'Microbial responses to various process disturbances in a continuous hydrogen reactor fed with galactose', *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Elsevier Ltd, 123(2), pp. 216–222. doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.08.006.
- Lazaro, C. Z., Perna, V., Etchebehere, C., Varesche M. B. A. (2014) 'Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration', *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(12), pp. 6407–6418. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.02.058.
- Lee, S. C. y Park, S. (2016) 'Removal of furan and phenolic compounds from simulated biomass hydrolysates by batch adsorption and continuous fixed-bed column adsorption methods', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 216, pp. 661–668. doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.007.

- Li, B., Sun, K., Guo, Y., Tian, J., Xue, Y., Sun, D. (2013) 'Adsorption kinetics of phenol from water on Fe/AC', *Fuel*. Elsevier Ltd, 110, pp. 99–106. doi: 10.1016/j.fuel.2012.10.043.
- Lin, S. H. y Juang, R. S. (2009) 'Adsorption of phenol and its derivatives from water using synthetic resins and low-cost natural adsorbents: A review', *Journal of Environmental Management*. Elsevier Ltd, 90(3), pp. 1336–1349. doi: 10.1016/j.jenvman.2008.09.003.
- Liu, C. M., Chu, C. Y., Lee, W. Y., Li, Y. C., Wu, S. Y., Chou, Y. P. (2013) 'Biohydrogen production evaluation from rice straw hydrolysate by concentrated acid pre-treatment in both batch and continuous systems', *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 38(35), pp. 15823–15829. doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.07.055.
- López-Gutiérrez, I., Méndez-Acosta, H. O., Razo-Flores, E., Dávila-Vázquez, G., Arreola-Vargas, J., Alatraste-Mondragón, F. Tesis de maestría, (2015) Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave tequilana weber var. azul: Efecto del procesamiento de la piña y de la sacarificación del bagazo. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- López-López, A., Dávila-Vázquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., Gallardo-Valdez, J. (2010) 'Tequila vinasses: Generation and full scale treatment processes', *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 9(2), pp. 109–116. doi: 10.1007/s11157-010-9204-9.
- Marino-Marmolejo, E. N., Corbalá-Robles, L., Cortez-Aguilar, R. C., Contreras-Ramos, S. M., Bolaños-Rosales, R. E., Dávila-Vázquez, G. (2015) 'Tequila vinasses acidogenesis in a UASB reactor with Clostridium predominance', *SpringerPlus*. Springer International Publishing, 4(1), p. 419. doi: 10.1186/s40064-015-1193-2.
- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J. P., Carrère, H. (2014) 'Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review', *Biotechnology Advances*. Elsevier B.V., 32(5), pp. 934–951. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.04.007.

- Montiel Corona, V. y Razo-Flores, E. (2018) 'Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency', *Bioresource Technology*. Elsevier, 249(August 2017), pp. 334–341. doi: 10.1016/j.biortech.2017.10.032.
- Moran-Salazar, R. G., Sanchez-Lizarraga, A. L., Rodriguez-Campos, J., Dávila-Vázquez, G., Marino-Marmolejo, E. N., Dendooven, L., Contreras-Ramos, S. M. (2016) 'Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives', *SpringerPlus*. Springer International Publishing, 5(1), p. 1007. doi: 10.1186/s40064-016-2410-3.
- Moreno-Andrade, I., Moreno, G., Kumar, G., Buitrón, G. (2011) 'Biohydrogen production from industrial effluents', *Biofuels*, (1), pp. 499–524. doi: 10.1016/B978-0-12-385099-7.00023-1.
- Myoung, J., Venditti, R. A., Jameel, H., Kenealy, W. R. (2010) 'Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*', *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 35(1), pp. 626–636. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.10.021.
- Nissilä, E., Lay, C. H., Puhakka, J. A. (2014) 'Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates - A review', *Biomass and Bioenergy*, 67, pp. 145–159. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.04.035.
- Nunes Ferraz Júnior, A. D., Etchebehere, C., Zaiat, M. (2015) 'Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials', *Anaerobe*. Academic Press, 34, pp. 94–105. doi: 10.1016/J.ANAEROBE.2015.04.008.
- Park, J. H.(a), Kumar, G., Park, J. H., Park, H. D., Kim, S. H. (2015) 'Changes in performance and bacterial communities in response to various process disturbances in a high-rate biohydrogen reactor fed with galactose', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 188, pp. 109–116. doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.107.
- Park, J. H., Lee, S. H., Ju, H. J., Kim, S. H., Yoon, J. J., Park, H. D. (2016) 'Failure of biohydrogen production by low levels of substrate and lactic acid accumulation', *Renewable Energy*. Elsevier Ltd, 86, pp. 889–894. doi: 10.1016/j.renene.2015.09.016.

- Park, J. H., Kim, D. H., Kim, S. H., Yoon, J. J., Park, H. D. (2018) 'Effect of substrate concentration on the competition between Clostridium and Lactobacillus during biohydrogen production', *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 43(25), pp. 11460–11469. doi: 10.1016/j.ijhydene.2017.08.150.
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J. P., Carrère, H., Trably, E. (2012) 'Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures', *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(4), pp. 3150–3159. doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.11.033.
- Ramos, L. R. y Silva, E. L. (2018) 'Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor', *International Journal of Hydrogen Energy*. Pergamon, 43(29), pp. 13081–13089. doi: 10.1016/J.IJHYDENE.2018.05.070.
- Regueira, A., Gonzáles-Cabaleiro, R., Ofiteru, I. D., Rodríguez, J., Lema, J. M., (2018) 'Electron bifurcation mechanism and homoacetogenesis explain products yields in mixed culture anaerobic fermentations', *Water Research*, 141, pp. 349–356. doi: 10.1016/j.watres.2018.05.013.
- Rodríguez-Félix, E., Marino-Marmolejo, E. N., Rodríguez-Campos, J., Cervantes-Martínez, J., Dávila-Vázquez, G. Tesis de maestría, (2017) Determinación de compuestos con potencial inhibitorio y/o toxico en vinazas tequileras para la producción de bio-hidrógeno.
- Rodríguez-Félix, E. Rodríguez-Campos, J., Cervantes-Martínez, J., Villanueva-Rodríguez, S., Dávila-Vázquez, G. (2016) 'Identification of volatile compounds found in Tequila vinasses', in Gutiérrez-Mora, A. (ed.) *III Simposio Internacional de Agave*. 1st edn. Guadalajara, Jalisco, Mexico: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, pp. 175–180.
- Rosa, P. R. F., Gomes, B. C., Varesche, M. B. A., Silva, E. L. (2016) 'Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater', *Chemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 284, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.cej.2015.08.088.

- Sainio, T., Turku I., Heinonen, J. (2011) 'Bioresource Technology Adsorptive removal of fermentation inhibitors from concentrated acid hydrolyzates of lignocellulosic biomass', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 102(10), pp. 6048–6057. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.107.
- Serrano, A., Feroso, F. G., Alonso-Fariñas, B, Rodríguez-Gutierrez G., Fernandez-Bolaños, J., Borja, R. (2017) 'Phenols recovery after steam explosion of Olive Mill Solid Waste and its influence on a subsequent biomethanization process', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 243, pp. 169–178. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.093.
- Siqueira, M. R. y Reginatto, V. (2015) 'Inhibition of fermentative H<sub>2</sub> production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates', *Renewable Energy*. Elsevier Ltd, 80, pp. 109–116. doi: 10.1016/j.renene.2015.01.070.
- Soto, M. L., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2011) 'Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review', *Journal of Food Engineering*, 105(1), pp. 1–27. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.02.010.
- Soto, M. L., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2016) 'Batch and fixed bed column studies on phenolic adsorption from wine vinasses by polymeric resins', *Journal of Food Engineering*. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.04.008.
- Stanford, J. P., Hall, P. H., Rover, M. R., Smith, R. G., Brown, R. C. (2018) 'Separation of sugars and phenolics from the heavy fraction of bio-oil using polymeric resin adsorbents', *Separation and Purification Technology*. Elsevier, 194(July 2017), pp. 170–180. doi: 10.1016/j.seppur.2017.11.040.
- Wankat, P. C. (2012) *Separation process engineering: includes mass transfer analysis*. Prentice Hall. Available at: [https://books.google.com.mx/books/about/Separation\\_Process\\_Engineering.html?id=p883u2-0w6cC&redir\\_esc=y](https://books.google.com.mx/books/about/Separation_Process_Engineering.html?id=p883u2-0w6cC&redir_esc=y) (Accessed: 12 July 2017).
- Zagklis, D. P. y Paraskeva, C. A. (2015) 'Purification of grape marc phenolic compounds through solvent extraction, membrane filtration and resin adsorption/desorption', *Separation and Purification Technology*, 156, pp. 328–335. doi: 10.1016/j.seppur.2015.10.019.



Zhao, B. H., Yue, Z. B., Zhao, Q. B., Mu, Y., Yu, H. Q., Harada, H., Li, Y. Y. (2008) 'Optimization of hydrogen production in a granule-based UASB reactor', *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(10), pp. 2454–2461. doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.03.008.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van't Riet, K. (1990) 'Modeling of the Bacterial Growth Curve', 56(6), pp. 1875–1881. Available at: <http://aem.asm.org/content/56/6/1875.full.pdf+html>.

## 12 ANEXO 1 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.

---

### 12.1 DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

#### 12.1.1 Materiales

- Digestor HATCH DRB200.
- Espectrofotómetro HATCH DR2800.
- Viales para digestión de DQO HATCH rango alto plus (20-15,000 mg/L).
- Matraces volumétricos.
- Filtros de fibra de vidrio de 0.45  $\mu\text{m}$  (para DQO soluble).

#### 12.1.2 Procedimiento

1. Encender el digestor y precalentarlo a 150 °C.
2. Homogeneizar la muestra, filtrarla (solo para DQO soluble), y diluirla en caso de ser necesario.
3. Preparar un blanco con agua destilada. Abrir uno de los viales, y añadir lentamente por las paredes del vial, 2 mL de agua destilada para determinaciones en el rango de 20 a 1,500 mg/L , o 0.2 mL para 200 a 15,000 mg/L.
4. Para las muestras, repetir el procedimiento para el blanco.
5. Cerrar bien los viales, enjuagarlos con agua y limpiarlos con papel.
6. Sujetar los viales por la tapa e invertirlos con precaución para mezclar.
7. Digerir a 150 °C por 2 horas.
8. Apagar el digestor y dejar enfriar hasta 120 °C.
9. Sacar los viales, invertirlos para homogeneizar, y dejarlos enfriar en una gradilla hasta alcanzar temperatura ambiente.
10. Cargar el programa DQO RA 435 en el espectrofotómetro. Ajustar el cero utilizando el blanco.
11. Leer las muestras con el mismo programa.

## 12.2 FENOLES TOTALES POR FOLIN-CIICALTEU

### 12.2.1 Materiales y reactivos

- Reactivo de Folin-Denis (tungstato de sodio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ), ácido fosfomolibdico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), y ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )).
- Carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ).
- Ácido gálico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ).
- Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ).
- Agitador Vórtex GENIE 2.
- filtros de fibra de vidrio de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- Viales de cristal con tapa (viales HATCH) limpios.
- Matraces volumétricos ámbar.
- Plancha de agitación y calentamiento.
- Espectrofotómetro HATCH DR5000.

### 12.2.2 Procedimiento

1. Realizar la curva patrón con ácido gálico desde 100 mg/L a 1,000 mg/L. El ácido gálico es poco soluble en agua, por lo que se recomienda diluirlo primero en un poco de etanol (de 1 a 10 mL) para la elaboración de la solución madre. Utilizar siempre matraces volumétricos ámbar o en su defecto. Forrar con aluminio los matraces utilizados.
2. Preparar una solución de carbonato de calcio al 20% p/v. Llevar a punto de ebullición por 5 minutos y filtrar.
3. Filtrar las muestras (pueden centrifugarse a 10,000 RPM por 5 min en caso de tener muchos sólidos) y diluir de ser necesario para que se encuentren en el rango de la curva de calibración.
4. Añadir 40  $\mu\text{L}$  de muestra, o solución patrón en un vial limpio, preparar también un blanco con agua destilada.
5. Añadir 200  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Denis y homogeneizar en vórtex por 5 segundos. Dejar reposar por 5 minutos en oscuridad.
6. Añadir 600  $\mu\text{L}$  de carbonato de calcio y dejar reposar por 2 h en oscuridad.
7. Medir a 765 nm. Ajustar a cero con el blanco.

8. Obtener la ecuación de la curva patrón por regresión lineal, despejar para concentración, y utilizar esa ecuación para calcular las concentraciones en las muestras.

## 12.3 FENOLES TOTALES POR 4-AMINOANTIPIRINA

### 12.3.1 Materiales y reactivos

- 4-aminoantipirina ( $C_{11}H_{13}N_3O$ ).
- Ferrocianuro de potasio ( $K_3Fe(CN)_6$ ).
- Fosfato de potasio monobásico ( $KH_2PO_4$ ).
- Fosfato de potasio dibásico ( $K_2HPO_4$ ).
- Hidróxido de amonio ( $NH_4OH$ ).
- Hidróxido de potasio (KOH).
- Ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ).
- Ácido gálico ( $C_7H_6O_5$ ).
- Matraces volumétricos ámbar de 50 mL.
- Matraces volumétricos de 1 L.
- Botellas serológicas (preferentemente ámbar) de mas de 50 mL.
- Frascos de vidrio ámbar con tapa de 100 y de 1 L.
- Celda para espectrofotómetro de cuarzo o de vidrio.
- Cronómetro.
- Filtros de 0.45  $\mu$ .
- Potenciómetro.
- Espectrofotómetro HATCH DR5000.

### 12.3.2 Procedimiento

1. Preparar solución A) 0.5 N de hidróxido de amonio. Medir 35 mL de hidróxido de amonio y aforar con agua destilada a 1 L. Almacenar en un frasco de vidrio ámbar a temperatura ambiente.
2. Preparar solución B) buffer de fosfatos. Disolver 52.25 g de  $KH_2PO_4$  y 36.15 g de  $K_2HPO_4$  en agua destilada, y después aforar a 500 mL. Medir el pH, y ajustar a 6.8

si es necesario con KOH o  $H_3PO_4$ . Almacenar en un frasco de vidrio de color ámbar con tapa a temperatura ambiente.

3. Preparar solución C) de 4-aminoantipirina. Disolver 1 g de aminoantipirina en agua destilada y aforar a 50 mL. Almacenar en una botella de plástico opaco con tapa. Etiquetar la fecha de preparación de la solución, ya que sólo puede ser almacenada por 4 semanas.
4. Preparar solución D) de ferrocianuro de potasio. Disolver 4 g de  $K_3Fe(CN)_6$  en agua destilada y aforar a 50 mL. Filtrar si es necesario y guardar en frasco de vidrio color ámbar a temperatura ambiente.
5. Filtrar la cantidad de muestra necesaria en filtros de nitrato de celulosa de 0.45 micras. La muestra se debe diluir lo necesario para que la concentración de fenol quede en el intervalo de 0 a 5 mg/L, considerando que el volumen final de la muestra debe ser 50 mL. La dilución queda a consideración del analista.
6. Preparar una curva de calibración con Ácido Gálico de 1 a 20 mg/L. Ajustar una línea recta de tal forma que se fuerce el inicio en el origen (0,0). La curva de calibración puede prepararse cada 15 días o cada vez que alguno de los reactivos se vuelve a preparar.
7. Transferir las muestras o soluciones patrón a los recipientes donde se realizará la reacción, estos pueden ser vasos de precipitado o botellas serológicas.
8. Encender el espectrofotómetro y calibrarlo a 460 nm. Se recomienda al analista dejar una nota en el espectro con su nombre y el tiempo en que el equipo estará en uso.
9. Realizar un blanco con 50 mL de agua destilada. Es sumamente importante **trabajar primero el blanco** y realizarle los pasos del 9 al 14.
10. Agregar 1.25 mL de solución A y agitar gentilmente.
11. Ajustar el pH a 7.9 +/- 0.1 con la solución B y agitar gentilmente. Es importante determinar el volumen necesario de la solución B en función al origen de la muestra (normalmente entre 0.5 y 1.0 mL). Esta cantidad se usará para todas las muestras de la misma naturaleza y la curva de calibración).
12. Añadir 0.5 mL de solución C y agitar gentilmente.
13. Añadir 0.5 mL de solución D y agitar gentilmente (es muy importante homogeneizar la muestra con cada uno de los reactivos antes de agregar el siguiente). Una vez añadido el reactivo D al blanco iniciar el cronómetro. **Las soluciones deben agregarse estrictamente en el orden que se indica, ya que de lo contrario se forman precipitados o el complejo no se forma adecuadamente, afectado de esta manera la cuantificación de fenoles.**
14. Procesar las muestras una por una (pasos 9 al 12) y anotar el tiempo en el que se añadió el reactivo D. Debido a que la reacción es reversible, se recomienda no

procesar más de 10 muestras a la vez. Si hay más de 10 muestras, procesar por lotes de 10 en 10.

15. Una vez transcurridos 15 minutos desde que se añadió el reactivo D al blanco, ajustar a cero el espectrofotómetro con el.
16. Leer cada muestra por duplicado en el espectrofotómetro a 460 nm cuando se hayan cumplido 15 minutos del tiempo en el que se añadió el reactivo D.
17. Obtener la ecuación de la curva patrón por regresión lineal y despejar para concentración. Utilizar esa ecuación para calcular las concentraciones en las muestras.

## **12.4 FÓSFORO TOTAL**

### **12.4.1 Materiales y reactivos**

- Kit HATCH TNT 845 para fósforo total (método del ácido ascórbico) rango ultra alto (6-60 mg/L).
- Digestor HATCH DRB200.
- Espectrofotómetro HATCH DR2800.

### **12.4.2 Procedimiento**

1. Tomar un vial y retirar cuidadosamente la cobertura de aluminio de la tapa.
2. Retirar la tapa y añadir 0.5 mL de muestra. Cerrar el vial invirtiendo la tapa (debe de quedar con las estrías hacia arriba).
3. Agitar enérgicamente por 3 segundos (garantizar que el reactivo se desprenda totalmente de la tapa).
4. Digerir a 100 °C por una hora.
5. Sacar del digestor y enfriar a temperatura ambiente.
6. Agitar por 3 segundos.
7. Añadir 0.2 mL del reactivo B (cerrar inmediatamente después de usarlo).
8. Tapar el vial con una de las tapas C incluidas en el kit.
9. Invertir el vial de 2 a 3 veces (hasta disolver todo el reactivo).
10. Dejar reposar por 10 minutos, y volver a agitar.
11. Introducir el vial en el espectrofotómetro, este automáticamente medirá la concentración de fósforo total en la muestra. Debido a que el método ya está precargado en el espectro no es necesario preparar un blanco.

## 12.5 NITRÓGENO TOTAL

### 12.5.1 Materiales y reactivos

- Kit TNT 828 para nitrógeno total (método de digestión de persulfato) rango ultra alto (20-100 mg/L).
- Viales de cristal con tapa limpios.
- Digestor HATCH DRB200.
- Espectrofotómetro HATCH DR2800.

### 12.5.2 Procedimiento

1. Colocar en un vial limpio 0.2 mL de muestra. Añadir 2.3 mL de la solución A y una pastilla de B, ambas incluidas en el kit.
2. Digerir a 100 °C por una hora.
3. Retirar del digestor y enfriar hasta temperatura ambiente, añadir una pastilla del reactivo C.
4. Cerrar el vial e invertir hasta que se haya disuelto el reactivo de C.
5. Transferir lentamente 0.5 mL de la muestra preparada a uno de los viales incluidos en el kit.
6. Añadir lentamente 0.2 mL de la solución D.
7. Cerrar inmediatamente e invertir hasta que la disolución sea completa.
8. Esperar 15 minutos, y luego insertar en el espectrofotómetro. Este, medirá automáticamente el código de barras y determinará la concentración de nitrógeno total en la muestra. Debido a que el método está precargado en el espectrofotómetro, no se requiere preparar un blanco.

## 12.6 AZÚCARES TOTALES

### 12.6.1 Materiales y reactivos

- Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ).
- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ).
- Fenol ( $C_6H_5OH$ ).
- Viales de cristal con tapa (viales HATCH).

## 12.6.2 Procedimiento

1. Preparar curva patrón con glucosa de 20 mg/L hasta 100 mg/L en intervalos equidistantes.
2. Preparar una solución de fenol al 5% p/v.
3. Añadir 1 mL de muestra o curva patrón a los viales. Preparar un blanco con agua destilada.
4. Agregar 600  $\mu$ L de fenol al 5% a cada una de las muestras.
5. Inclinar los viales 45° apuntando en dirección contraria al cuerpo y añadir 3.5 mL de ácido sulfúrico concentrado vertiéndolo lentamente por las paredes del vial. Extremar precauciones debido a que la reacción es altamente exotérmica.
6. Cerrar los viales, y limpiarlos con papel. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente.
7. Medir en espectrofotómetro a 480 nm, utilizar el blanco para ajustar a cero.

## 12.7 AZÚCARES REDUCTORES

### 12.7.1 Materiales y reactivos

- Ácido dinitrosalicílico (DNS) ( $C_7H_4N_2O_7$ )
- Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ).
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Tartrato mixto de sodio y potasio  $KNaC_4H_4O_6$ .
- Matraces aforados.
- Viales de vidrio con tapa.
- Frascos ámbar.
- Digestor DRB200.
- Espectrofotómetro HATCH DR5000.

### 12.7.2 Procedimiento

1. Preparar la solución A. Diluir 1.6 g de hidróxido de sodio y 30 g de tartrato de sodio y potasio en 50 mL de agua desionizada.
2. Preparar la solución B. Diluir 1 g de DNS en 30 mL de agua desionizada.
3. Preparar la solución 1% de DNS: Mezclar solución A y solución B, aforar a 100 mL. Almacenar en un frasco ámbar.
4. Preparar curva de calibración con glucosa de 250 hasta 1750 mg/L



5. Diluir la muestra de ser necesario para que entre en el intervalo de la curva de calibración.
6. Añadir en cada tubo 0.5 mL de muestra o curva de calibración y 0.5 mL de solución 1% de DNS. Preparar un blanco con agua destilada.
7. Digerir a 100 °C por 5 minutos.
8. Agregar 5 mL de agua destilada cerrar el vial y homogeneizar.
9. Medir en el espectrofotómetro a 540 nm. Ajustar el cero con el blanco.

## 12.8 SÓLIDOS TOTALES

### 12.8.1 Materiales

- Crisoles de porcelana.
- Estufa.
- Desecador.
- Pinzas para crisoles.
- Guante de carnaza.

### 12.8.2 Procedimiento

1. Llevar los crisoles a peso constante (se recomienda dejar los crisoles por 24 h en la estufa a 100° C). **No manipular los crisoles sin las pinzas.**
2. Llevar las muestras a temperatura ambiente y homogenizar.
3. Tomar 2 mL de muestra y colocar en la cápsula de porcelana que ha sido llevada a peso constante.
4. Secar en la estufa a 103 – 105°C durante 1 hora.
5. Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente.
6. Pesar y registrar peso.
7. Calcular la concentración de sólidos totales con la siguiente fórmula:

$$\text{Sólidos totales} = \frac{\text{Peso cápsula con residuo} - \text{peso cápsula} * 1,000}{\text{Volumen de muestra}}$$

## 12.9 SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES

### 12.9.1 Materiales

- Crisoles de Gooch.
- Filtros de fibra de vidrio de 0.45 µm.
- Bomba de vacío.
- Estufa.
- Desecador.

### 12.9.2 Procedimiento

1. Llevar el crisol con filtro a peso constante (pesar y registrar datos).
2. Añadir 2 mL de muestra.
3. Filtrar la muestra con el crisol de Gooch y el filtro aplicando vacío.
4. Lavar el disco 3 veces con 10 mL de agua dejando que drene completamente.
5. Secar el crisol en la estufa a 103 – 105° C durante 1 hora.
6. Enfriar en desecador a temperatura ambiente.
7. Pesar y registrar peso.
8. Calcular la concentración con la fórmula:

$$SST = \frac{(\text{Peso del crisol con residuo} - \text{Peso del crisol con disco}) * 1,000}{\text{Volumen de muestra}}$$

## 12.10 SÓLIDOS DISUELTOS TOTALES (SDT)

El contenido de sólidos disueltos se estima por diferencia entre los sólidos totales y los sólidos suspendidos totales

$$SDT = ST - SST$$

## 12.11 SÓLIDOS TOTALES VOLÁTILES

### 12.11.1 Material

- Crisoles de procelana.
- Desecador.
- Estufa.

- Mufla.
- Guantes de carnaza.
- Pinzas para crisol.

### 12.11.2 Procedimiento

1. Llevar los crisoles a peso constante.
2. Añadir 2 mL de muestra al crisol.
3. Secar a 103-105° C por una hora. y enfriar en el desecador.
4. Pesar y registrar la concentración de sólidos totales.
5. Calcinar los crisoles en la mufla a 550° C por una hora
6. Apagar la mufla y no abrir hasta que la temperatura de esta llegue a 100 °C.
7. Sacar los crisoles y dejar enfriar en el desecador.
8. Pesar y registrar los datos. Calcular la concentración de sólidos totales volátiles con la siguiente fórmula:

$$STV = \frac{(\text{Peso de la cápsula ST} - \text{Peso con residuo}) * 1,000}{\text{Volumen de muestra}}$$

## 12.12 SÓLIDOS SEDIMENTABLES

### 12.12.1 Material

- Cono Imhoff
- Agitador

### 12.12.2 Procedimiento

1. Llevar la muestra a temperatura ambiente.
2. Homogeneizar la muestra
3. Colocar la muestra homogenizada en el cono Imhoff hasta la marca de 1L.
4. Dejar sedimentar durante 45 minutos.
5. Desprender suavemente los sólidos adheridos a la pared del cono con un agitador.
6. Dejar reposar por 15 minutos
7. Registrar el volumen de sólidos sedimentables en mL/L.



## 13 ANEXO 2 SCRIPTS UTILIZADOS EN MATLAB

---

### 13.1 AJUSTE DE MODELO DE GOMPERTZ A ARCHIVOS GENERADOS EN AMPTSII

El script para MATLAB (2017 o siguiente) obtiene los datos experimentales a partir del archivo .xlsx generado por el software de bioprocess control. Ajusta el modelo modificado de Gompertz a cada una de las réplicas, y organiza las constantes de interés en una tabla.

```
%% Script para AMPTS
clear
clc
%% obtención de datos
crudos2=datastore('AMPTS.xlsx','NumHeaderLines',15);[~,ncol0]=size(preview(crudos2));
crudos=datastore('AMPTS.xlsx','NumHeaderLines',15,'VariableTypes',repmat({'double'},[1 ncol0]));
crudos=read(crudos); [nfil,~]=size(crudos);

%% Curando la base
for ii=1:ncol0
    if sum(isnan(crudos(:,ii)))==nfil
        crudos(:,ii)=zeros(nfil,1);
    end
end
indicadorn=(ncol0-1)/2;
%% Aplicando ajustes
prod=crudos(:,2:(indicadorn+1));
t=crudos(:,1);
vel(:,1:indicadorn)=crudos(:,(indicadorn+2):end);
datos=zeros(4,indicadorn);
for idx=1:indicadorn
    [~,~,~,datos(1:4,idx)]=Ajusteg(t,prod(:,idx),idx);
end
datos=datos';
function[H,A,B,c]=Ajusteg(a,b,nfig)
%% Establecer modelo.
x1=[1,1,1];
fun=@(x0,x)(x0(1)*exp(-exp((2.71828*x0(2)/x0(1))*((x0(3)-x)+1))));
options=optimoptions('lsqcurvefit','Algorithm','trust-region-reflective',...
'MaxIterations',10000,'MaxFunctionEvaluations',10000);
%% Ajustando modelo a datos experimentales
[nfil,~]=size(b);
if sum(b==0)==nfil
    H=0; A=0; B=0; r=0;
    c=zeros(1,4);
else
    idxmax=find(isnan(b))==1,1,'first')-1;
    x=a(1:idxmax,:); y=b(1:idxmax,:);
    [c,~,residuals]=lsqcurvefit(fun,x1,x,y,[],[],options);
    r=1-((sum(residuals.^2))/(sum((y-mean(y)).^2)));
    xu=min(x):0.001:max(x); yu=fun(c,xu);
    figure(nfig);
    plot(x,y,'ko',xu,yu,'b-');
end
H=c(1); A=c(2); B=c(3); c(4)=r;
end
```

## 13.2 AJUSTE DE MODELOS CINÉTICOS DE ADSORCIÓN

### 13.2.1 Modelo de pseudo-primer orden

La función-script “primord” ajusta el modelo de pseudo-primer orden, o ecuación de Lagergen, a los datos experimentales de cinéticas de adsorción y muestra las constantes calculadas en un vector.

```
function[constantes,r]=primord(B,C)
x0=[0 0];
x0(1)=max(C);
fun=@(x0,B)(x0(1)*(1-exp(-(x0(2)*B))));
options=optimoptions('lsqcurvefit','Algorithm','trust-region-reflective',...
    'MaxIterations',1000000,'MaxFunctionEvaluations',1000000);
[b,~,residuals]=lsqcurvefit(fun,x0,B,C,[],[],options);
r=1-((sum(residuals.^2))/(sum((C-mean(C)).^2)));
xu=min(B):0.001:max(B);yu=fun(b,xu);
plot(xu,yu,'b-')
constantes=b
end
```

### 13.2.2 Modelo de pseudo-segundo orden.

La función-script “Segundord” ajusta el modelo cinético de pseudo-segundo orden a los datos experimentales y organiza las constantes en un vector.

```
function[constantes,r]=Segundord(B,C)
x0=[0 1];
x0(1)=max(C);
fun=@(x0,B)((B*(x0(1)^2)*x0(2))./(1+(B*x0(1)*x0(2))));
options=optimoptions('lsqcurvefit','Algorithm','trust-region-reflective',...
    'MaxIterations',1000000,'MaxFunctionEvaluations',1000000);
[b,~,residuals]=lsqcurvefit(fun,x0,B,C,[],[],options);
r=1-((sum(residuals.^2))/(sum((C-mean(C)).^2)));
xu=min(B):0.001:max(B);yu=fun(b,xu);
plot(xu,yu,'r-')
constantes=b
end
```

## 13.3 AJUSTES A MODELOS DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN.

### 13.3.1 Modelo de Freundlich

La función “Freundlich” ajusta el modelo de Freundlich a los datos de las isotermas de adsorción y organiza las constantes en un vector.

```
function[b,R2]=Freundlich(B,C)
fun=@(x0,B)(x0(1)*B.^x0(2));
x0=[0 0.01];
options=optimoptions('lsqcurvefit','Algorithm','levenberg-marquardt',...
    'MaxIterations',1000000,'MaxFunctionEvaluations',1000000);
[b,~,residuals]=lsqcurvefit(fun,x0,B,C,[],[],options);
r=1-((sum(residuals.^2))/(sum((C-mean(C)).^2)));
xu=min(B):0.001:max(B);yu=fun(b,xu);
```

```

plot(xu,yu,'b-');
%b(2)=1/b(2)
R2=r
end

```

### 13.3.2 Modelo de Langmuir

La función-script “Langmuir” ajusta el modelo de Langmuir a los datos de las isothermas, y organiza los constantes calculadas en un vector.

```

function[b,R]=Langmuir(B,C)
fun=@(x0,B)((x0(1)*x0(2)*B)/(1+x0(2)*B));
x0=[100 00];
options=optimoptions('lsqcurvefit','Algorithm','trust-region-reflective',...
'MaxIterations',100000000,'MaxFunctionEvaluations',1000000);
[b,~,residuals]=lsqcurvefit(fun,x0,B,C,[],[],options);
r=1-((sum(residuals.^2))/(sum((C-mean(C)).^2)));
xu=min(B):0.001:max(B);yu=fun(b,xu);
plot(xu,yu,'r--');
R=r
end

```