



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MASTER EN INGENIERIA AMBIENTAL

MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO A
TRAVÉS DE FERMENTACIÓN OSCURA IMPULSADA POR
LACTATO: APLICACIÓN DE ESTRATEGIAS OPERACIONALES
PARA LA OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA EN CONTINUO**

Autor: Dña. Deborah Leroy Freitas
Tutor 1: D. Raúl Muñoz Torre
Tutor 2: D. Octavio García Depraect

Valladolid, Julio, 2022

RESUMEN

El biohidrógeno es una fuente de energía renovable prometedora, pudiendo ser producido biológicamente a partir de diversos residuos orgánicos y aguas residuales vía fermentación oscura, que constituye un proceso atractivo debido a sus altas productividades y operación simple. En este estudio, se investigaron diferentes estrategias de operación con el objetivo de optimizar la producción de hidrógeno (H_2) mediante fermentación oscura, utilizando lactosuero en polvo como sustrato, con enfoque en la vía metabólica del lactato. Experimentos en lote fueron llevados a cabo para conocer la producción de H_2 ($2004,5 \pm 84,7$ NmL H_2/L_{reactor}) y consumo de sustrato ($94,48 \pm 0,87$ %) en el sistema e inferir sobre las principales vías de generación de hidrógeno por análisis de ácidos orgánicos. La operación en continuo fue realizada en cinco fases: fase control (I), adición de medio soporte inerte (II), introducción de nanopartículas de hierro encapsuladas en carbono (100 ppm) (III) y nanopartículas de Fe_2O_3 a concentración 100 ppm (IV) y 300 ppm (V). En configuración en lote, se observó que las principales vías de producción de H_2 estuvieron principalmente relacionadas a las vías del acetato y lactato, con aproximadamente 75,65 % de la productividad siendo explicada por estas vías metabólicas. La utilización de medio soporte fue fundamental para la estabilización del sistema en continuo, cuya máxima productividad (27276 NmL/L-d) fue alcanzada en presencia de nanopartículas de Fe_2O_3 (300 mg/L). La producción adicional de H_2 en el sistema en continuo posiblemente se debió a la activación o mejoramiento de la ruta metabólica del lactato, a partir de la utilización de metabolitos intermediarios, sin ocasionar alteración en el consumo de sustrato o en la concentración de biomasa. La utilización de nanotecnología se ve una alternativa prometedora para el incremento de la productividad de biohidrógeno impulsada por la ruta metabólica del lactato.

Palabras clave: Fermentación oscura impulsada por lactato; lactosuero; nanopartículas; producción de biohidrógeno.

ABSTRACT

Biohydrogen is a promising renewable energy source that can be produced from a wide variety of organic substrates and wastewaters via dark fermentation, which represents an attractive process due to its relative high productivity and simple operation. In this study, different operational strategies were investigated with the aim of optimizing hydrogen (H_2) production through dark fermentation, using cheese whey powder as substrate, with a focus on the lactate-utilizing, hydrogen-producing pathway. Batch experiments were carried out to determine the H_2 production (2004.5 ± 84.7 NmL H_2/L_{reactor}) and substrate consumption ($94.48 \pm 0.87\%$) profiles in the system and infer about the main H_2 production pathways by analysis of organic acids. Continuous operation was carried out in five stages: control (I), addition of inert support medium (II), introduction of iron nanoparticles encapsulated in carbon (100 ppm) (III) and Fe_2O_3 at a concentration of 100 ppm (IV) and 300 ppm (V). Under batch operation, the main H_2 production pathways were mainly related to the acetate and lactate pathways, with approximately 75.65% of the productivity being explained by these metabolic routes. The use of support medium was fundamental for the stabilization of the continuous system, whose maximum productivity (27276 NmL/L-d) was reached

in the presence of Fe_2O_3 nanoparticles (300 mg/L). The additional production of H_2 in the continuous system was likely possibly due to the activation or improvement of the lactate metabolic pathway, from the use of intermediate metabolites, without causing alterations in the consumption of substrate or in the concentration of biomass. The use of nanotechnology is a promising alternative for increasing biohydrogen productivity driven by the lactate metabolic pathway.

Keywords: biohydrogen production; cheese whey; Lactate-driven dark fermentation; nanoparticles.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Valladolid, al programa del Máster en Ingeniería Ambiental y al Banco de Santander por la oportunidad de ingresar a este curso y vivir esta experiencia tan importante para mi vida profesional y personal.

Agradezco a mis tutores Raúl Muñoz Torre y Octavio García Depraect por la atención, enseñanza, y acompañamiento durante todo el proceso de desarrollo del TFM.

Agradezco a los compañeros Leonardo Mendoza y Inji Mirzazada por su enorme contribución con el trabajo de laboratorio.

Agradezco a los compañeros del Máster en Ingeniería Ambiental, por la convivencia diaria y por la amistad.

Gracias a todos por esta experiencia inolvidable.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Energía y cambio climático</i>	1
1.1.1 Consumo de energía mundial.....	1
1.1.2 Principales fuentes de emisión.....	3
1.1.3 Objetivos Agenda 2030	4
1.2 <i>Fuentes de energía renovables</i>	4
1.3 <i>Biohidrógeno como alternativa de energía renovable</i>	6
1.3.1 Biofotólisis (directa e indirecta).....	6
1.3.2 Fotofermentación.....	7
1.3.3 Fermentación oscura	7
1.4 <i>Estrategias de optimización para la producción de biohidrógeno</i>	9
1.4.1 Inóculo y pretratamiento	9
1.4.2 Sustratos y macro/micronutrientes	9
1.4.3 Parámetros de operación (TRH, TCO, pH, temperatura).....	10
1.4.4 Configuración del reactor	10
1.5 <i>Lactosuero como sustrato para la producción de biohidrógeno vía fermentación oscura</i>	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 <i>Objetivo general</i>	14
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
3.1 <i>Sustrato e inóculo</i>	15
3.2 <i>Configuración del biorreactor y condiciones operacionales</i>	15
3.2.1 Experimentos en lote	16
3.2.2 Experimentos en continuo.....	16
3.3 <i>Métodos analíticos</i>	16
3.4 <i>Análisis de datos</i>	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1 <i>Experimentos en lote</i>	18
4.1.1 Producción de biohidrógeno y consumo de sustrato	18
4.1.2 Producción de metabolitos.....	19
4.2 <i>Experimentos en continuo</i>	24
4.2.1 Producción de H ₂ y estabilidad del sistema a diferentes condiciones operacionales.....	24
4.2.2 Remoción de sustrato y crecimiento de biomasa a diferentes condiciones operacionales	
	27
5. CONCLUSIONES.....	29
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	30
7. REFERENCIAS	31
ANEXOS.....	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Energía y cambio climático*

A lo largo de la segunda mitad del siglo XX, diversos países comenzaron a plantear preocupaciones sobre la protección del medio ambiente, especialmente con respecto a emisiones atmosféricas, su relación directa con el efecto invernadero y, consecuentemente, el cambio climático. Dicha preocupación es el resultado del rápido progreso en los medios científico, tecnológico, económico e industrial (Ermolina et al., 2021). Por lo tanto, los recursos energéticos provenientes de fuentes limpias y renovables son cada vez más importantes para hacer frente a los problemas mundiales de deterioro ambiental (Li et al., 2022). Considerando la relación directa entre el sector energético y los impactos a la atmósfera involucrados en la producción de energía, se presenta, a continuación, datos mundiales relacionados a esta problemática, y los objetivos/estrategias que se están llevando a cabo a fin de sustituir el uso de fuentes no renovables por soluciones ambientalmente sostenibles.

1.1.1 Consumo de energía mundial

La energía afecta a todos los aspectos de la vida moderna, y juega un papel vital en la vida cotidiana de los ciudadanos. Se trata de un insumo vital para el desarrollo socioeconómico de cualquier nación, cuya demanda está aumentando a un ritmo exponencial debido al crecimiento exacerbado de la población mundial (Dong et al., 2018). Las fuentes de energía se clasifican en dos grupos principales: fósiles (no renovables) y renovables. El término fósil se refiere a una edad geológica anterior. Los combustibles que se formaron en eras pasadas y son no renovables, considerando el periodo de vida humano (Demirbas, 2009). Por otro lado, la energía renovable es aquella que proviene de recursos naturales que se reponen naturalmente, como la biomasa, la energía hidroeléctrica, la eólica, la solar (térmica y fotovoltaica), la geotérmica y el hidrógeno (Wengenmayr & Bührke, 2011).

Las principales fuentes de energía eléctrica actualmente utilizadas, a nivel mundial, son petróleo, carbón, gas natural, energía nuclear, energía hidroeléctrica, energía eólica, energía solar, biocombustibles, y otras fuentes de energías renovables (Figura 1). Datos recientes (Ritchie et al., 2020) indican que las fuentes predominantemente utilizadas para producción de energía durante los últimos 50 años son fuentes de combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural), aunque el suministro de energía proveniente de fuentes renovables (solar, eólica y biocombustibles) ha crecido considerablemente en la última década. Se estima que la energía proveniente de fuentes renovables se convertirá en el principal recurso energético desde ahora hasta 2040, con proyección futura de un 50% del total de energía consumida en la Unión Europea, aproximadamente un 30% en Japón y China, y más del 25% en India y EE. UU (Ahmad & Zhang, 2020).

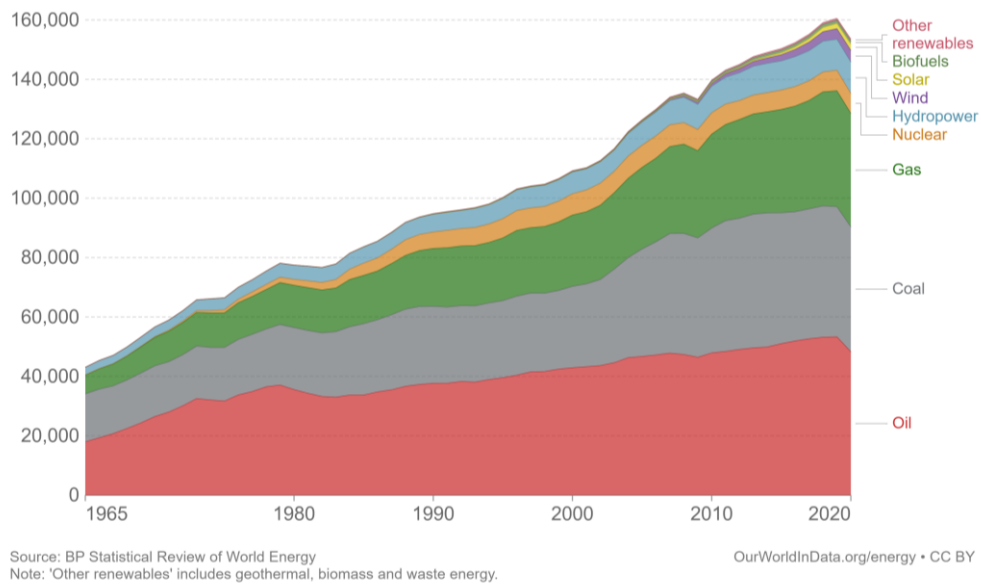


Figura 1. Consumo mundial de energía eléctrica, por fuente energética, medido en unidades de TWh (Fuente: Ritchie et al., 2020)

Según datos de la Agencia Internacional de Energía (IEA, 2021a), el sector eléctrico fue responsable por la emisión de 12,3 Gt de carbono en 2020, equivalente a 36% del total emisiones de dióxido de carbono (CO₂) relacionadas a energía eléctrica. El carbón contribuyó con poco más de un tercio como fuente de suministro de electricidad, pero alrededor de 75% de las emisiones de CO₂ del sector eléctrico. El gas natural fue la segunda fuente predominante de energía y emisiones de CO₂ en el sector eléctrico.

Entre los sectores que demandan mayor consumo energético a nivel mundial, el sector industrial representa aproximadamente 41% del requerimiento total. Los usos de energía en los sectores residencial y de servicios, a su vez, representan 27% y 21% del total, respectivamente (IEA, 2021b).

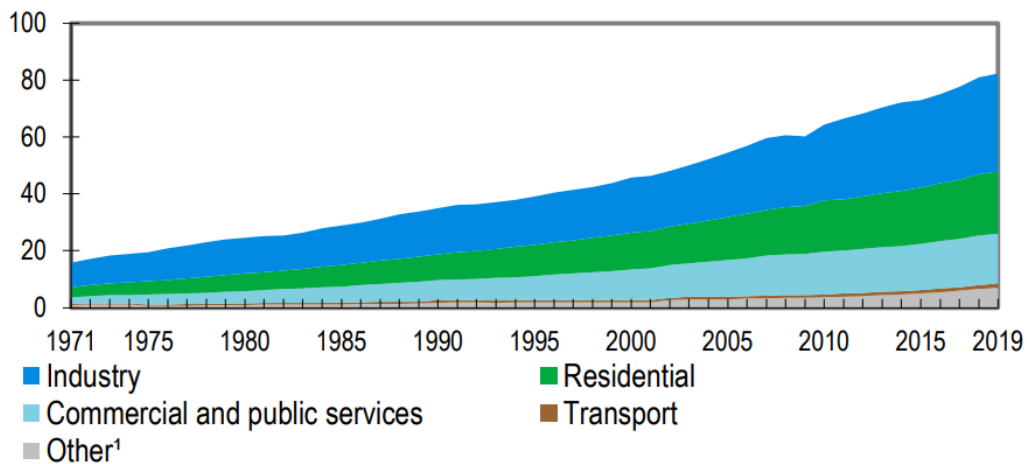


Figura 2. Consumo total de energía eléctrica, en exajoules (EJ) por sector, entre 1971-2019 (Fuente: IEA, 2021b).

1.1.2 Principales fuentes de emisión

La Convención Marco de las Naciones Unidas Sobre el Cambio Climático (CMNUCC, 1992) define el término “emisiones” como la liberación de gases de efecto invernadero (GEIs) o sus precursores en la atmósfera. Los GEIs, a su vez, son definidos como los componentes gaseosos presentes en la atmósfera, sean de fuentes naturales o antropogénicos, que absorben y reemiten radiación infrarroja. Los GEIs definidos como alta prioridad para control de acuerdo con el Reglamento (UE) 2018/1999 sobre la Gobernanza de la Unión de la Energía y de la Acción por el Clima son: dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O), hidrofluorocarburos (HFC), perfluorocarburos (PFC) y hexafluoruro de azufre (SF_6). En escala mundial, el CO_2 es el gas mayoritariamente emitido a la atmósfera (IPCC, 2014), contabilizando aproximadamente 75% de las emisiones totales (Figura 3a).

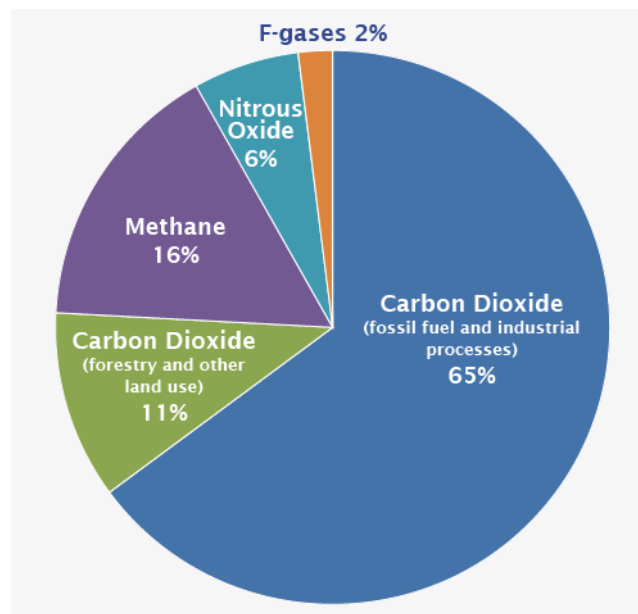


Figura 3. Emisiones globales de gases de efecto invernadero por tipos de gases (Fuente: IPCC, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el CO_2 supone la gran mayoría de las emisiones de gases de efecto invernadero del sector energético, pero también se emiten cantidades más pequeñas de CH_4 y N_2O . La liberación de estos gases en el proceso de producción de electricidad ocurre por la quema de combustibles fósiles, como el carbón, el petróleo y el gas natural. Menos del 1% de las emisiones de gases de efecto invernadero del sector provienen del SF_6 , un químico que, debido a sus características dieléctricas, es el principal fluido que se incorpora como aislante en los aparatos electrotécnicos (EPA, 2022).

1.1.3 Objetivos Agenda 2030

En el año 2015, los 193 estados miembros de las Naciones Unidas aprobaron la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, un plan de acción con el objetivo de garantizar “*un mundo de respeto universal por los derechos humanos y la dignidad humana, el estado de derecho, la justicia, la igualdad y la no discriminación*” (UN, 2015), que abarca 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible. Entre ellos, el alcance del objetivo 7 contempla garantizar el acceso a energía asequible, fiable, sostenible y moderna para todos.

Para el cumplimiento de este objetivo hasta el año 2030, se propone aumentar significativamente la participación de las energías renovables en el mercado energético mundial, así como optimizar substancialmente la eficiencia energética en el sector. Asimismo, se necesitan nuevos sectores tecnológicos, como el de producción de hidrógeno, para completar la transformación del sistema energético (Ahmad & Zhang, 2020). Además, se sugiere mejorar la cooperación internacional a fin de facilitar el desarrollo de investigación y tecnología de energías limpias, y permitir la inversión en infraestructuras de energía renovable. El objetivo enfatiza también que se deben aplicar todas estas medidas tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (UN, 2015).

El tema del desarrollo de energía sostenible ha evolucionado y cambiado a lo largo del tiempo, donde inicialmente se discutía sobre la energía en el contexto de la reducción de las emisiones de GEIs y la mejora de la calidad del aire (UN, 1998). En los días actuales, la expansión de la energía sostenible contempla una visión más global, teniendo en cuenta los tres pilares del desarrollo sostenible: economía, sociedad y medio ambiente (Gunnarsdóttir et al., 2021). Por lo tanto, la búsqueda y el desarrollo de alternativas hacia la implementación de fuentes de energía renovables deben contemplar, además de la calidad medioambiental, el crecimiento económico y el desarrollo social.

1.2 **Fuentes de energía renovables**

Las Naciones Unidas definen energía renovable como “*la energía que se deriva de procesos naturales (por ejemplo, la luz del sol y el viento) que se reponen a un ritmo más alto de lo que se consumen*” (UN, 2016). Energía solar, eólica, geotérmica, hidroeléctrica y de biomasa son fuentes comunes de energía renovable. Sin embargo, fuentes derivadas de procesos biológicos anaerobios, que resultan en la obtención de CH₄ o H₂, son actualmente prometedoras para contribuir a la sustitución del uso de combustibles fósiles. A continuación, se presenta una breve descripción de dichas fuentes de energía.

- Solar

Alternativa que consiste en la conversión directa de la luz solar en energía eléctrica, cuya producción requiere grandes superficies e incidencia solar constante, con buenas soluciones de almacenamiento. Las técnicas solares activas incluyen el uso de paneles fotovoltaicos o colectores solares térmicos, que utilizan equipos eléctricos o mecánicos para convertir la luz solar en salidas de energía útil (Rhodes, 2010).

- Eólica

Utiliza turbinas para convertir la energía cinética del viento en energía mecánica, que alternativamente puede rotar a altas velocidades para producir electricidad. Es un sistema complejo en el que confluyen conocimientos que comprenden la aerodinámica, la ingeniería mecánica, civil y eléctrica (Ofualagba & Ubeku, 2008).

- Geotérmica

Energía extraída del núcleo de la Tierra, que proviene del calor generado durante la formación original del planeta y la desintegración radiactiva de los materiales. Esta energía térmica se almacena en rocas y fluidos en el centro de la tierra, donde el calor se transfiere desde las regiones profundas a las subsuperficiales, primero por conducción y luego por convección, con fluidos geotérmicos actuando como portadores (Barbier, 2002).

- Hidroeléctrica

Tiene como principio básico la utilización de la fuerza impulsora del agua para mover turbinas. Al construir una presa o barrera, se puede usar un gran depósito para crear un flujo controlado de agua la cual impulsa una turbina produciendo electricidad (Bagher et al., 2015).

- Biomasa

Se refiere a cualquier fuente de energía térmica y su conversión a energía eléctrica, producida a partir de materiales biológicos no fósiles. La biomasa puede quemarse directamente para obtener calor o convertirse en combustibles líquidos y gaseosos renovables a través de procesos físico-químico o biológicos (Perea-Moreno et al., 2019).

Las principales fuentes de biomasa utilizadas para producción de energía incluyen:

- 1) Madera y residuos del procesamiento de la madera;
- 2) Cultivos agrícolas (maíz, soja, caña de azúcar, pasto varilla, plantas leñosas y algas) y materiales de desecho (utilizados para producir biocombustibles);
- 3) Residuos sólidos municipales biodegradables y aguas residuales (procesos anaerobios para producción de biogás/gas natural renovable).

El proceso de digestión anaerobia, cuyos productos finales son CH_4 y CO_2 , es ampliamente utilizado para producir biogás a partir de biomasa residual como fuente de energía alternativa (Li et al., 2019). Con el objetivo de desarrollar tecnologías innovadoras basadas en procesos microbianos, es deseable separar las etapas de producción de hidrógeno y metano de la digestión anaerobia para favorecer respectivamente la etapa hidrolítica/acidogénica y acetogénica/metanogénica bajo condiciones controladas (Detman et al., 2017).

Con el objetivo de explorar en más profundidad el proceso de producción de biohidrógeno como alternativa renovable prometedora para la producción de energía eléctrica, los apartados a continuación presentan información sobre las vías de producción de H_2 a partir del proceso de fermentación y las estrategias actualmente empleadas para su optimización.

1.3 Biohidrógeno como alternativa de energía renovable

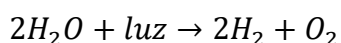
El hidrógeno es el elemento más abundante del universo, estando presente en aproximadamente 75% de toda la materia existente. Entre las diversas fuentes de energía renovables, el H₂ se considera el combustible verde más prometedor por ser sostenible, y tener alto potencial energético y eficiencia de conversión. Al tener en cuenta que 1 kg de este compuesto contiene una energía de aproximadamente 120 MJ, la producción de hidrógeno es considerada como la alternativa más atractiva y prometedora a la mayoría de los combustibles tradicionales basados en hidrocarburos (Chen et al., 2021; Sarkar et al., 2021).

Las fuentes de energía y carbono más sostenibles para la producción de biohidrógeno son los sustratos biodegradables (Nagarajan et al. 2019). Algunos sustratos ampliamente utilizados para este fin son subproductos de desechos agrícolas, productos lignocelulósicos (madera y desechos de madera), desechos de alimentos, desechos domésticos, algas, efluentes industriales y domésticos, efluentes agrícolas y ganaderos (Elsharnouby et al., 2013; Mahata & Das, 2022).

La degradación de los sustratos biológicos para producir biohidrógeno se puede llevar a cabo a través de biofotólisis (directa o indirecta), fotofermentación y fermentación oscura, de las cuales solo la última se puede realizar sin necesidad de aporte de luminosidad (Rittmann & Herwig 2012). A continuación, se describe el principio de cada uno de estos procesos, con enfoque más detallado en la fermentación oscura, proceso realizado en el presente trabajo.

1.3.1 Biofotólisis (directa e indirecta)

La biofotólisis es la acción de la luz sobre los sistemas biológicos resultando en la disociación de un sustrato, generalmente agua, en H₂ y oxígeno molecular (O₂) (Demirbas et al., 2009). Este proceso se lleva a cabo por organismos fotosintéticos, como algas y cianobacterias. En la biofotólisis directa, se suceden vías bioquímicas similares a la fotosíntesis de plantas y algas, con la particularidad de que en este proceso se produce H₂ gaseoso en lugar de compuestos carbonáceos. El proceso se lleva a cabo utilizando clorofila, en el cual la degradación de las moléculas de agua a H₂ y O₂ ocurre en presencia de la luz solar (fotones). Los iones de hidrógeno son generados en condiciones anaeróbicas en un medio con electrones proporcionados por la enzima hidrogenasa. Simultáneamente, se produce O₂ (Mahata & Das, 2022). El proceso se lleva a cabo según ilustrado en la Ecuación 1:



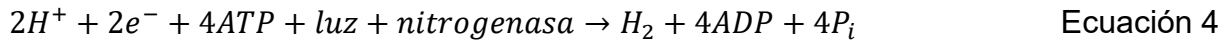
Ecuación 1

En la biofotólisis indirecta, que consiste en dos fases, los electrones necesarios para el proceso de producción de H₂ se derivan de compuestos orgánicos almacenados. En la primera fase tiene lugar la fotosíntesis y el almacenamiento de carbohidratos, mientras que, en la segunda, la fermentación de los carbohidratos previamente almacenados conlleva la producción de H₂. En estas dos etapas tiene lugar la fijación y evolución del CO₂ (Singh & Das, 2019). Las etapas involucradas en la biofotólisis indirecta son presentadas en las Ecuaciones 2 y 3:



1.3.2 Fotofermentación

La fotofermentación consiste en una serie de reacciones bioquímicas en las que sustancias orgánicas como los ácidos grasos volátiles de cadena corta (como el ácido acético), se convierten en H_2 , realizado por un grupo diverso de bacterias fotosintéticas en medio anaerobio (Mahata & Das, 2022). Las principales enzimas involucradas en este proceso son la nitrogenasa y la hidrogenasa de absorción. La nitrogenasa promueve la producción de H_2 (Ecuación 4), mientras que la hidrogenasa de captación favorece su consumo (Singh & Das, 2019).



La fotofermentación puede ocurrir en integración con la fermentación oscura, en la cual se produce gran cantidad de ácidos grasos volátiles (AGVs) como acetato, butirato y propionato. Las bacterias fotofermentativas pueden utilizar los AGVs como sustrato para la producción de H_2 y CO_2 (Kamram, 2021), como se representa en la Ecuación 5:



1.3.3 Fermentación oscura

La fermentación oscura consiste en la conversión anaerobia de sustratos orgánicos (generalmente carbohidratos) a biohidrógeno. Se trata de un proceso complejo realizado por un grupo diverso de bacterias, mediante series de reacciones bioquímicas (Das et al, 2008; Demirbas, 2009). Este proceso de producción de biohidrógeno tiene varias ventajas sobre otros, debido a su alta tasa de producción y rendimiento. Además, no tiene limitaciones de luminosidad como la fotólisis y la fotofermentación, ya que ocurre independientemente de la disponibilidad de luz (Mahata & Das, 2022). El proceso puede ocurrir en un rango de temperaturas entre 25 y 80 °C, o incluso a temperaturas hipertermófilas (> 80 °C), dependiendo de los linajes bacterianos utilizados (Lepage et al., 2021).

Una amplia gama de microorganismos anaerobios facultativos y obligados es capaz de producir H_2 de forma natural. Los principales grupos de bacterias productoras de H_2 por la vía de fermentación oscura se pueden clasificar según sus requisitos de temperatura (mesófilos y termófilos) y metabolismo (presencia o ausencia de O_2) (Singh & Das, 2019). La principal especie facultativa involucrada en la producción de H_2 es *Enterobacter sp.*, que posee enzimas formiato hidrógeno liasa (FHL) o [FeFe] hidrogenasa, responsables por incrementar el rendimiento y la tasa de producción de H_2 (Rachman et al., 1998).

Los anaerobios estrictos son más eficientes en la producción de H_2 , en términos de tasa de producción y rendimiento, en comparación con los anaerobios facultativos.

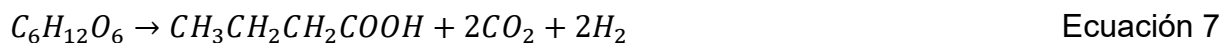
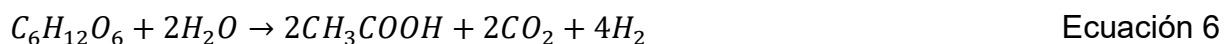
Además, son capaces de utilizar grandes variedades de sustratos en su metabolismo. El género bacteriano anaerobio obligado mejor conocido para la producción de H₂ es *Clostridium*, aunque otros géneros de participación menos significativa también han sido relacionados con el metabolismo del H₂ vía fermentación oscura, como *Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacter*, *Ethanoligenens* y *Thermotoga* (Onyenwoke et al., 2006; Pradhan et al., 2015; Slobodkin et al., 1999).

Una alternativa interesante para la producción de biohidrógeno es la utilización de cultivos mixtos, que generalmente se requieren para metabolizar sustratos complejos, como residuos de alimentos, desechos agroindustriales y lodos de depuradora. La variedad de microorganismos presentes en el consorcio es beneficiosa para la producción de biohidrógeno por su alta eficiencia en metabolizar una amplia gama de sustratos y por ser menos propenso a la contaminación en comparación con el cultivo puro. Por otro lado, una desventaja de su uso a gran escala es la estabilidad del cultivo, debido a los cambios en la dinámica de la población con respecto al tiempo y a las condiciones del medio (Laxman Pachapur et al., 2015; Karim et al., 2021; Singh & Das, 2019).

A continuación, se presentan algunas de las principales vías metabólicas involucradas en la producción de biohidrógeno por el proceso de fermentación oscura (acetato y butirato, y lactato), llevado a cabo por microorganismos anaerobios facultativos y/o estrictos.

- Vías de acetato y butirato

Bacterias hidrolíticas descomponen azúcares en moléculas de cadena más simples, permitiendo su disponibilidad para su consumo por otros grupos bacterianos (como *Clostridium*) capaces de metabolizar los monómeros por las vías acidogénica y acetogénica (Sivagurunathan et al., 2018). Al final de los procesos, se puede obtener ácido acético o ácido butírico, además del H₂ gaseoso, dependiendo de la ruta metabólica llevada a cabo (Baeyens et al., 2020). La estequiometría de los procesos muestra que son generados 4 moles de H₂ a partir de 1 mol de glucosa por la oxidación del piruvato a ácido acético (Ecuación 6), mientras que se producen 2 moles de H₂ cuando el piruvato se convierte en ácido butírico (Ecuación 7).



- Vía del lactato

Durante la producción biológica de H₂, además de los ácidos acético y butírico, se pueden producir el ácido láctico y el ácido propiónico (Kim et al., 2012). La acumulación de ácidos orgánicos puede afectar la producción de H₂ (Van Ginkel & Logan, 2005), y es reconocido que su tasa de producción disminuye cuando el metabolismo del sustrato fluye hacia el ácido láctico (Hawkes et al., 2002). Si bien los ácidos orgánicos mencionados anteriormente no se pueden usar como sustratos únicos para la producción de H₂, es posible utilizar mezclas de sustratos conteniendo ácido acético y ácido láctico para producir H₂ (Matsumoto & Nishimura, 2007).

Actualmente existen cuestionamientos sobre el papel exacto de la producción del ácido láctico, promovida por bacterias productoras de lactato (BPL), en el proceso

general de fermentación oscura, ya que pocos estudios han demostrado que estos grupos bacterianos podrían respaldar una producción mejorada de hidrógeno (Sikora et al., 2013). El hecho de que los productos del metabolismo de las BLPs pudiesen inhibir la producción de H₂ ha llevado a los expertos en el campo a recomendar limitar la proliferación de estos organismos. Sin embargo, su característica de ubicuidad, y la robustez y flexibilidad de su configuración metabólica permiten que dichas bacterias persistan y prosperen en los procesos de fermentación oscura (García-Depraect et al, 2021^a).

1.4 Estrategias de optimización para la producción de biohidrógeno

La producción de biohidrógeno a partir de fermentación oscura se considera una alternativa sostenible y de bajo coste. Sin embargo, para lograr su viabilidad en escala industrial y poder competir con otras fuentes para producción de energía, son requeridos un alto rendimiento y productividad. En este sentido, diversas investigaciones sobre el uso de diferentes parámetros operacionales/fisicoquímicos han sido intensamente estudiadas (Arimi et al., 2015). A continuación, se presenta información sobre algunos de los principales parámetros o estrategias actualmente investigadas en el ámbito de la producción de H₂ por fermentación oscura.

1.4.1 Inóculo y pretratamiento

Como se mencionó anteriormente, la producción de H₂ por fermentación oscura se puede realizar usando cultivos puros o cultivos mixtos. El inóculo con cultivo mixto es más práctico y efectivo en comparación con el cultivo puro debido a la facilidad de control y operación, opciones más amplias de sustrato e interacciones sinérgicas con diversos microorganismos (Wang & Yin, 2021). Sin embargo, el H₂ producido podría ser consumido por las bacterias utilizadoras de H₂, limitando la producción global del sistema. Por lo tanto, se hace necesario un pretratamiento adecuado del cultivo mixto para eliminar los consumidores de H₂ y al mismo tiempo conservar los productores (Toledo-Alarcón et al., 2018). Algunos de los métodos de pretratamiento que se han investigado son choque térmico, choque de carga, ultrasonidos, adición de inhibidores químicos (por ejemplo, cloroformo), aireación, base, ácido, congelación y descongelación, microondas, campo eléctrico, radiación ionizante y radiación UV (Yang et al., 2019).

1.4.2 Sustratos y macro/micronutrientes

La influencia de la composición del medio afecta directamente la producción de H₂, producto directamente asociado al crecimiento bacteriano. La concentración adecuada de fuentes de carbono, nitrógeno, fosfato, vitaminas y metales traza es esencial para apoyar el crecimiento bacteriano deseado y, en consecuencia, altas tasas de producción de H₂ (Singh & Das, 2019).

El uso exitoso de materia prima con bajo o nulo costo y abundantemente disponible es uno de los principales factores para una producción eficiente de H₂ (Arimi et al., 2015). Los posibles sustratos que son candidatos para la producción de H₂ incluyen, por ejemplo, residuos de alimentos, residuos lignocelulósicos y algales, residuos orgánicos municipales, aguas residuales (urbanas, industriales o agrícolas) (Wang &

Yin, 2021). Sin embargo, dichos sustratos muchas veces necesitan aportes extras de macro y micronutrientes para alcanzar la máxima eficiencia de producción de H₂. En este sentido, es importante mantener la adecuada relación C/N para garantizar la estabilidad del proceso de fermentación oscura y, en consecuencia, altas tasas específicas de producción de H₂ (Toledo-Alarcón et al., 2018). Por lo tanto, se puede hacer necesaria una suplementación de fuente de nitrógeno. Como micronutrientes esenciales, se requiere, por ejemplo, fuentes de Mg, Na, Zn, Fe, K, Co, Mn, Ni, Cu, Mo y Ca (García-Depraect et al, 2021a).

1.4.3 Parámetros de operación (TRH, TCO, pH, temperatura)

Algunos parámetros operacionales son comúnmente monitoreados y controlados en el proceso de fermentación oscura para producción de biohidrógeno. El tiempo de retención hidráulico (TRH) está directamente relacionado con la tasa máxima de crecimiento específico de los organismos productores de H₂. Si la tasa de crecimiento de los organismos es alta, el TRH debe ser menor y viceversa, para obtener el máximo rendimiento (Singh & Das, 2019). La tasa de carga orgánica (TCO) afecta el rendimiento de la fermentación, por determinar la biodisponibilidad de sustrato. En general, se puede lograr TCO más altas disminuyendo el TRH y/o aumentando la concentración de sustrato (Arimi et al., 2015; García-Depraect et al, 2021^a; Kim et al., 2012).

Como se mencionó anteriormente, la fermentación oscura se puede realizar en diferentes rangos de temperatura. Los diferentes microorganismos involucrados en el proceso poseen requerimientos particulares de temperatura óptima, siendo ellos los mesófilos (25–40 °C), termófilos (40–65 °C), hipertermófilos (65–80 °C) y termófilos extremos (>80 °C) (Levin et al., 2004). El pH, a su vez, es uno de los parámetros que más influyen en la producción de H₂, ya que afecta el funcionamiento de diferentes enzimas celulares y, en última instancia, favorece o inhibe las diferentes vías metabólicas de los microorganismos (Khanna et al., 2011).

1.4.4 Configuración del reactor

El biorreactor de agitación continua es la configuración más utilizada en el proceso de producción de H₂ vía fermentación oscura, aunque otras diversas configuraciones han sido reportadas (Blanco et al., 2019; Freitas et al., 2020; Fuess et al., 2018; Santiago et al., 2019). La operación se puede llevar a cabo con biomasa en suspensión (García-Depraect et al., 2021b; Juang et al., 2011), o con adhesión de biomasa a un medio soporte inerte (Park et al., 2020; Sivagurunathan et al., 2015). Trabajos anteriores (Fernandes et al., 2013; Lee et al., 2003) observaron que, al permitir el crecimiento de biomasa adherida a un medio soporte, mejores resultados en términos de producción de H₂ ocurrían en sistemas anaerobios de lecho estructurado.

Otra estrategia de optimización consiste en la utilización de nanotecnología, introduciendo nanopartículas para aumentar la producción de biohidrógeno en el proceso de fermentación oscura (Kumar et al., 2019). Las nanopartículas tienen una alta especificidad, alta actividad catalítica y una gran superficie disponible. Al dirigirse directamente a la enzima hidrogenasa, aumenta la eficiencia de transferencia de electrones en microorganismos anaeróbicos. En consecuencia, mejoran la productividad y el rendimiento del H₂ (Mullai et al., 2013). Estudios anteriores

utilizando nanopartículas de naturaleza inorgánica evidenciaron incremento en la población de *Clostridium* y aumento de la actividad bacteriana en general (Zhang et al., 2021^a), con intensificación de producción de H₂ en hasta 31,8% (Zhang et al., 2021b), indicando su prometedora utilización para mejorar la eficiencia de producción de biohidrógeno.

1.5 Lactosuero como sustrato para la producción de biohidrógeno vía fermentación oscura

Desechos provenientes de producción agrícola e industrial, que contienen una amplia gama de azúcares, han sido globalmente utilizados como materia prima para el proceso de fermentación y producción de H₂ y biocombustibles (Rai et al., 2012). La lactosa es un tipo de azúcar común en los desechos/subproductos de la industria láctea. Considerando una producción anual de lactosuero de aproximadamente 21.600.000 toneladas, y debido a su alto contenido en lactosa, este subproducto es de gran preocupación ambiental para la industria láctea, pudiendo llegar a ser 100 veces más contaminante que las aguas residuales domésticas (Lopes et al., 2019). Por esta razón, se han planteado diversos enfoques biotecnológicos para minimizar este problema y permitir el aprovechamiento de sus subproductos (Rao & Basak, 2021).

Como rendimiento teórico, el proceso de fermentación del lactosuero conduce a la obtención de 8 mol de H₂ por mol de lactosa consumido, siendo este proceso considerado como una de las opciones existentes más económicamente viables para la producción de biohidrógeno (Prazeres et al., 2012). En general, el lactosuero contiene (en proporción *p/p*) aproximadamente 4,6% de lactosa, 1,2% de proteína cruda, 0,3% de grasa, 5–8% de sólidos totales, 0,6% de ceniza y 92,7% de agua (Lappa et al., 2019). Además, su relación DBO/DQO superior a 0,5 define su alta biodegradabilidad, haciendo que este sustrato sea una opción atractiva desde el punto de vista de aprovechamiento biotecnológico (Escalante et al., 2018).

Bacterias lácticas son ubicuas en el medio ambiente, y juegan un papel fundamental en la composición de comunidades microbianas acidogénicas. El desarrollo de estos grupos de microorganismos se ve relacionado con la inhibición de la producción de H₂ en biorreactores, debido a la competencia por sustratos y/o la excreción de bacteriocinas inhibitorias para el crecimiento de otras bacterias (Detman et al., 2021a). Sin embargo, recientemente se consideran que procesos de fermentación oscura asociados a la vía metabólica del lactato pueden ser alternativas interesantes para la producción de H₂ (Sikora et al., 2013). Esto se debe al hecho de que la producción de H₂ a partir del lactato depende de interacciones en un consorcio microbiano variado, compuesto por bacterias lácticas y por productoras de H₂ que consumen el ácido láctico. Dichas interacciones sintróficas han sido reportadas para fermentaciones utilizando una amplia gama de sustratos, incluso para lactosuero (García-Depraect et al., 2021b). En la Tabla 1 se aprecia un compilado de trabajos realizados con diferentes configuraciones de reactor, para producción de H₂ a partir de lactosuero, utilizando diferentes fuentes de inóculos mixtos. Para cada estudio, se presenta información sobre las condiciones operacionales utilizadas, así como las productividades de H₂ reportadas.

Tabla 1. Estudios sobre la producción de H₂ a partir de fermentación oscura utilizando lactosuero, en diferentes tipos de biorreactores operados en continuo (Fuente: adaptado de Rao & Basak, 2021)

Inóculo	Proceso	Vol. de trabajo (L)	TRH (h)	pH	T (°C)	Productividad/tasa de producción	Referencia
Lodo anaerobio	Anaerobio con agitación continua	3	72	4,5–5,5	35	12 L.kg ⁻¹ DQO	Fernández et al. (2015)
Lodo de fábrica de confitería	UASB	1,3	24	5	30	0,38 L.L ⁻¹ .h ⁻¹	Carrillo-Reyes et al. (2012)
Lactosuero crudo	Reactor de lecho relleno	2,5	24	>5	30	1,1 mol.mol ⁻¹ lactosa	Perna et al. (2013)
Lodo anaerobio termofilico	Reactor anaerobio de lecho fluidizado	1,98	4	4–4,5	55	Productividad H ₂ : 3,67 ± 0,59 mol.mol ⁻¹ lactosa Tasa producción: 4,1 ± 0,2 L.h ⁻¹ .L ⁻¹	Ottaviano et al. (2017)
Lodo anaerobio	Reactor anaerobio de lecho estructurado	-	24	6,8 ± 0,1	25	Productividad H ₂ : 1,4 ± 0,7 mol.mol ⁻¹ lactosa Tasa producción: 1,6 ± 0,7 L.L ⁻¹ .d ⁻¹	Blanco et al. (2019)
Compost de residuos de alimentos	Anaerobio con agitación continua	3,6	24	5,5	30	Productividad H ₂ : 0,9 mol.mol ⁻¹ lactosa Tasa producción: 0.8 L.L ⁻¹ .d ⁻¹	Castelló et al. (2018)

A pesar de las ventajas previamente mencionadas sobre la producción de H₂ a partir del proceso de fermentación oscura, es necesario superar diversos desafíos para que esta alternativa sea una realidad (Blanco et al., 2019). La complejidad de inóculos mixtos y sus procesos metabólicos, como las bajas eficiencias en la conversión de sustratos y la formación de metabolitos solubles que consumen H₂, todavía representan una barrera para su implementación en larga escala (Hallenbeck et al., 2009; Sivagurunathan et al., 2016). Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones centradas en aumentar la recuperación de energía de los sustratos fermentativos mediante el control de las vías metabólicas que se producen en los reactores de fermentación oscura.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo general*

Evaluar el efecto de diferentes condiciones operacionales en la producción continua de biohidrógeno a través de la fermentación oscura impulsada por la vía metabólica del lactato utilizando lactosuero en polvo como sustrato.

2.2 *Objetivos específicos*

- Entender el comportamiento de producción de H₂ y ácidos orgánicos, así como el consumo de sustrato, en ensayos de fermentación oscura en lote
- Evaluar el efecto general de la adición de un soporte inerte y de nanopartículas en el incremento de la producción de H₂, consumo de sustrato y crecimiento de biomasa en ensayo de fermentación en continuo
- Verificar posibles indicios de ocurrencia y/o mejoramiento de producción de biohidrógeno impulsada por la ruta del metabolismo del lactato, en experimentos en lote y continuo

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 *Sustrato e inóculo*

Lactosuero en polvo proveniente de Prolactea (Valladolid, España) fue caracterizado por su contenido en DQO (90,5% p/p), carbohidratos (79,5% p/p), lípidos (0,9% p/p), fósforo (0,5% p/p), nitrógeno (5,8% p/p), cenizas (7,3% p/p) y materia seca (97,4% p/p), y utilizado como sustrato en los ensayos de fermentación. El medio fue suplementado con los siguientes minerales (García-Depraect & León-Becerril, 2018): NH_4Cl (2,4 g/L); K_2HPO_4 (2,4 g/L); KH_2PO_4 (0,6 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,5 g/L); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,15 g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/L). Como fuente de inóculo, se utilizó digestato conteniendo un consorcio enriquecido con organismos productores de lactato, proveniente de un digestor anaerobio (escala piloto) de tratamiento de residuos de alimentos, como descrito por García-Depraect et al. (2022). El inóculo se pretrató por choque térmico (90 °C durante 20 min) y se almacenó a 4°C hasta su uso posterior. La solución para activación del inóculo se preparó según la siguiente proporción: lactosa (10 g/L); inóculo (0,1 L); solución de suplementación mineral (0,9 L). La activación se llevó a cabo en condiciones mesofílicas con agitación por 24 h, cuya composición resultante tenía un contenido de SSV/SST de 0,97 y pH 4,4.

3.2 *Configuración del biorreactor y condiciones operacionales*

Los ensayos de fermentación fueron llevados a cabo en un reactor anaerobio tipo tanque con agitación magnética continua, fabricado a medida, con volumen total de 1,25 L y volumen de operación de 0,8 L. El reactor estuvo equipado con un controlador de pH (EvopH-P5, BSV Electronic, España) acoplado a una fuente de solución de NaOH 6M, para mantener el pH, y puertos de muestreo para las fases líquida y gaseosa. La producción de gas se midió utilizando un contador de pulsos acoplado a un dispositivo de desplazamiento de líquido lleno de agua. La operación consistió en dos configuraciones principales, la primera en lote y la segunda en continuo. En la Figura 4 se aprecia el esquema completo del reactor y en la Figura A1 una fotografía del sistema, correspondiente a la operación en continuo.

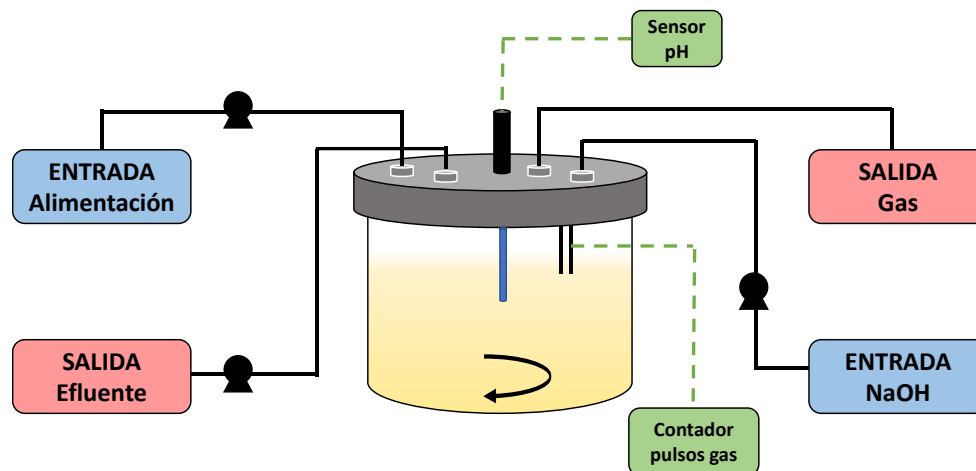


Figura 4. Diseño esquemático del reactor anaerobio tipo tanque con agitación continua

3.2.1 Experimentos en lote

Con el objetivo de llevar a cabo un seguimiento de la producción de H₂ a lo largo del tiempo a partir de lactosuero se realizaron ensayos de fermentación en lote en triplicado. Las fermentaciones fueron realizadas a temperatura (36 ± 1 °C) y agitación (~ 300 rpm) constante. El pH de cultivo inicial fue 6.7, el cual disminuyó por acidificación natural a 6.0 donde se mantuvo constante (± 0.1) a través de la adición de álcali. Al final de la fermentación el pH de cultivo incrementó ligeramente a 6.4. El arranque del reactor fue llevado a cabo con una alimentación constituida de 0,08 L de la solución del inóculo activado (0,55 g SSV/L), 0,72 L de solución de micronutrientes y lactosuero a concentración fija de 25 g DQO/L. Muestras puntuales de líquido y gas fueron tomadas cada 2-3 horas y 1 hora, respectivamente. Muestras líquidas fueron mantenidas a -20 °C hasta análisis para caracterización de los parámetros DQO (total y soluble), carbono orgánico total (COT), ácidos orgánicos y carbohidratos totales.

3.2.2 Experimentos en continuo

La operación comenzó en configuración de lote, como se ha descrito en el apartado 3.2.1, empezando con el régimen continuo 10 h después. Se fijó un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 6 h, con alimentación continua, resultando en un caudal equivalente a 3,2 L/d. La concentración de lactosuero en la alimentación se estimó al fijarse la tasa de carga orgánica (TCO; 180 g DQO/L-d). La alimentación se mantuvo en refrigeración (4 °C) y agitación constante. La salida de efluente fue controlada por un dispositivo de desplazamiento de líquido instalado en el reactor, manteniendo constante el volumen de operación. Muestras de efluente líquido y gas fueron tomadas cada 12 h durante los ~29 días de operación. Muestras líquidas fueron mantenidas a -20 °C hasta análisis para caracterización de los parámetros DQO soluble, carbohidratos totales, sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV). Solución mezcla de dispersiones de poliéteres orgánicos con efecto antiespumante (Antifoam 204, Sigma-Aldrich®) fue añadida a la alimentación (20 µL/L), en el caso de constatar formación de espuma en el reactor.

Cinco fases de operación fueron llevadas a cabo, en las cuales se evaluaron diferentes estrategias para incremento de producción de H₂ por fermentación oscura impulsada por la vía del lactato. La fase I (7,54 días) consistió en una operación control, con las mismas condiciones establecidas en el arranque. En la fase II (7,46 días), se introdujo un medio soporte constituido de ruedas plásticas dentadas (Kaldnes K1 Bio Filter Media, Kaldnes Moving Bed™), con ocupación de 12% del volumen de operación. Las fases III (5 días), IV (4,55 días) y V (4,13 días) se fundamentaron en nanotecnología: adición de nanopartículas de hierro encapsuladas en carbono (CE-nZVI) (fase III, 100 ppm; CE-nZVI, Calpech, S.L.) y nanopartículas de Fe₂O₃ (fase IV, 100 ppm; fase V, 300 ppm; Iron(III) oxide nanopowder < 50 nm, Sigma-Aldrich®) a la fuente de alimentación.

3.3 **Métodos analíticos**

Los métodos analíticos fueron empleados según de acuerdo a García-Depraect et al. (2022). Las concentraciones de ácidos orgánicos (ácidos fórmico, acético, láctico, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocaproico, hexanoico y heptanoico) se midieron en un sistema Alliance HPLC (Waters e2695, EE. UU.) equipado con un UV –Detector VIS (Alliance 2998 PDA, Waters, EE. UU.) ajustado a 214 nm y precolumna Micro-Guard Cation H + Refill Cartucho de 30 × 4,6 mm

acoplado a una columna cromatográfica Aminex HPX-87H (Bio Rad, EE. UU.). La temperatura de la columna se mantuvo a 75 °C, mientras que el eluyente fue H₂SO₄ 25 mM a un caudal de 0,7 mL/min. Se utilizó una mezcla estándar (Sigma-Aldrich número de pieza CRM46975, EE. UU.) y L-lactato de sodio (Sigma-Aldrich número de pieza 71718, EE. UU.) para las curvas de calibración. Los carbohidratos totales se analizaron por el método de fenol-sulfúrico, mientras que el contenido de DQO, COT y sólidos se midieron según métodos estándar (APHA, 2005). Todos los reactivos usados fueron de grado analítico.

La composición del gas (H₂, CH₄, CO₂) se analizó utilizando un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 (Varian, EE. UU.) equipado con un detector de conductividad térmica y una columna capilar Varian CP-Molsieve 5A (15 m × 0,53 mm × 15 μm) interconectada con una columna capilar Varian CP-PoreBOND Q (25 m × 0,53 mm × 10 μm) y calibrada con mezclas de gases estándar certificadas de composición conocida (70,0 % H₂ y 30,0 CO₂; 70,53 % CH₄, 24,0 % CO₂, 2,99 % N₂, 2,0% H₂S, 0,49% O₂). Se utilizó gas helio ultrapuro como gas portador a 13 ml/min.

3.4 Análisis de datos

La productividad de biohidrógeno (en NmL H₂/L-d) se calculó de acuerdo con la Ecuación 8, donde Q_{H₂} es la producción diaria de H₂ (en NmL H₂/d) y V es el volumen del reactor (en L). El rendimiento de biohidrógeno (en NmL H₂/g DQO_{alimentada}) se calculó a partir de la Ecuación 9, donde TCO es la carga de DQO alimentada (en g/L-d). La productividad en la etapa de operación en lote fue estimada con ajuste cinético basado en el modelo de Gompertz modificado (Diaz-Cruces et al., 2020). El índice de estabilidad de la producción de biohidrógeno (IEP) se calculó utilizando la Ecuación 10, que considera las variaciones en la productividad de H₂ durante todo el tiempo de operación de un período determinado (excluyendo los resultados de los primeros 3 TRH de operación), como lo informaron previamente Tenca et al. (2011). Los datos de biogás se reportaron en condiciones de temperatura y presión estándar.

$$Productividad = \frac{Q_{H_2}}{V} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$Rendimiento = \frac{Productividad}{TCO} \quad \text{Ecuación 9}$$

$$IEP = 1 - \frac{Desviación\ estándar\ Productividad}{Promedio\ Productividad} \quad \text{Ecuación 10}$$

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y prueba post-hoc de Dunn con el objetivo de verificar diferencias significativas entre todas las fases de operación; prueba no paramétrica t de Wilcoxon para muestras pareadas para verificar diferencias significativas entre las fases III y IV; y prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney para verificar diferencias entre las fases IV y V, con respecto a la productividad de H₂ (α = 0,05). Para verificar diferencias entre las concentraciones medianas efluentes de carbohidratos, DQO_s y SSV en las diferentes fases, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y prueba post-hoc de Dunn. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Past 4.03.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Experimentos en lote

4.1.1 Producción de biohidrógeno y consumo de sustrato

Los ensayos de fermentación en configuración de lote fueron realizados en condiciones mesófilas con concentraciones iniciales fijas de lactosuero (22,22 g/L_{reactor}; 25 g/L DQO) y biomasa (0,55 ± 0,05 g SSV/L). En la Figura 5 se pueden apreciar la evolución de la formación acumulativa de H₂ con respecto al tiempo.

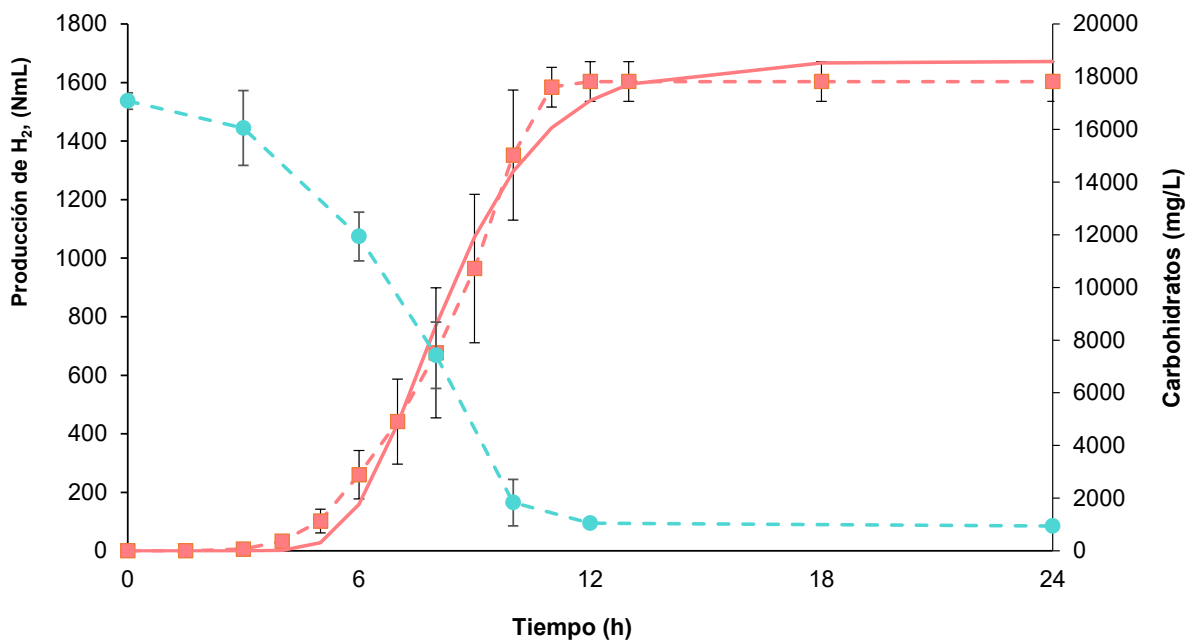


Figura 5. Producción de H₂ (■) y consumo de carbohidratos (●) a lo largo del tiempo de fermentación. Línea continua representa la tendencia adecuada para la producción de H₂ utilizando el modelo de Gompertz modificado (Díaz-Cruces et al., 2020).

La producción de biohidrógeno tuvo lugar tras un corto periodo de adaptación inicial de la biomasa (aproximadamente 4 h), resultando en una notable producción de H₂ al final de 12 h, contabilizando $2004,5 \pm 84,7$ NmL H₂/L_{reactor} y un rendimiento de $100,22 \pm 4,23$ NmL H₂/g DQO_{alim}. El curso temporal del consumo de sustrato y producción de H₂ gaseoso estuvo de acuerdo con la disminución gradual de carbohidratos en paralelo al aumento acumulativo de H₂ (Figura 5). Dicho consumo correspondió a una reducción de $94,48 \pm 0,87$ % en la concentración de carbohidratos hasta el final de la fermentación. En general el modelo de Gompertz modificado correlacionó los datos experimentales con gran precisión ($R^2 > 0,99$), como se muestra en la Tabla 2. La velocidad máxima de producción de H₂ ($R_{m\acute{a}x}$) se estimó en 342,3 NmL/h, correspondiente a una velocidad volumétrica máxima de producción de H₂ de 427,9 NmL/L-h.

Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos del modelo de Gompertz modificado (Diaz-Cruces et al., 2020).

Parámetro	Unidad	Valor
P	NmL	1672,5
R _{max}	mL H ₂ /h	342,3
λ	h	5,7
R ²	-	0,995

Similarmente, Kargi et al. (2012) observó un alto consumo de los carbohidratos presentes en el lactosuero simultáneamente a la producción de H₂, en ensayos en lote llevados a cabo en condiciones mesofílicas y termofílicas. El consumo de sustrato en ambos casos estuvo por encima del 95%, siendo observado consumo más rápido en la fermentación mesofílica. Sin embargo, en términos de productividad total, los autores obtuvieron 0,692 mL H₂/L_{medio} en condición mesófila y 1,144 mL H₂/L_{medio} en condición termófila, al final de 388 h de fermentación, utilizando lactosuero con una concentración de azúcares del 67%. Es notable la diferencia entre los resultados previamente obtenidos (Kargi et al. 2012) y los del presente estudio en términos de productividad de H₂ y tiempo de fermentación. Diversos estudios reportaron diferentes tasas de producción de H₂ a partir de lactosuero debido a las diferencias en las condiciones de fermentación y los cultivos microbianos (Alvarez-Guzmán et al., 2020; Gokfiliz-Yildiz & Karapinar, 2018; Moreira et al., 2017; Pandey et al., 2019; Romão et al., 2019).

Las remociones de DQO_{total}, DQO_{soluble} y COT se pueden apreciar en la Tabla 3. Se observa que la reducción de COT al final de los experimentos fue, como era esperado, considerablemente menos pronunciada que la eliminación de carbohidratos, con aproximadamente 70% del aporte de carbono orgánico original remanente en el efluente acidogénico al final del experimento. Remociones similares, entre 17-20%, fueron observadas previamente en ensayos en lote con condiciones de pH variando entre 5,5-8,5 (De Gioannis et al., 2014). La presencia del COT residual al final del proceso fermentativo está evidentemente relacionada con la presencia tanto de materia orgánica no degradada como de productos metabólicos (e.g alcoholes y ácidos orgánicos) (Lovato et al., 2021). A su vez, la eficiencia de eliminación de DQO fue más baja, considerando que este parámetro engloba también una fracción recalcitrante no rápidamente biodegradable.

Tabla 3. Remoción de DQO_{total}, DQO_{soluble} y COT en los ensayos de fermentación en lote

Parámetro	% remoción	Desviación estándar
DQO _{total}	11,4	4,0
DQO _{soluble}	13,4	2,6
COT	29,3	1,6

4.1.2 Producción de metabolitos

El análisis de los productos metabólicos proporciona información útil sobre la evolución del proceso y puede utilizarse para explicar los rendimientos de producción de H₂ observados. La producción de biohidrógeno en la fermentación oscura es

proporcional a la formación de ácidos orgánicos, ya que el gas H_2 es un subproducto de la formación de estos metabolitos. Sin embargo, la producción de gas H_2 está fuertemente relacionada con los tipos de metabolitos producidos y su concentración, de acuerdo con su relación estequiométrica (Kargi et al. 2012). Las curvas que muestran la evolución de la concentración de los principales ácidos orgánicos (acético, butírico, fórmico, láctico y propiónico) obtenidos durante los experimentos de fermentación en lote se muestran en la Figura 6. Se observó la presencia de lactato, formiato y propionato, aunque en bajas concentraciones, desde el tiempo 0 de fermentación. La presencia de los ácidos orgánicos al poner en marcha la fermentación probablemente se debe a la existencia de metabolitos residuales provenientes de la activación del inóculo, que contiene consorcios microbianos acidogénicos fermentativos que utilizan la lactosa como sustrato (García-Depraect et al., 2022).

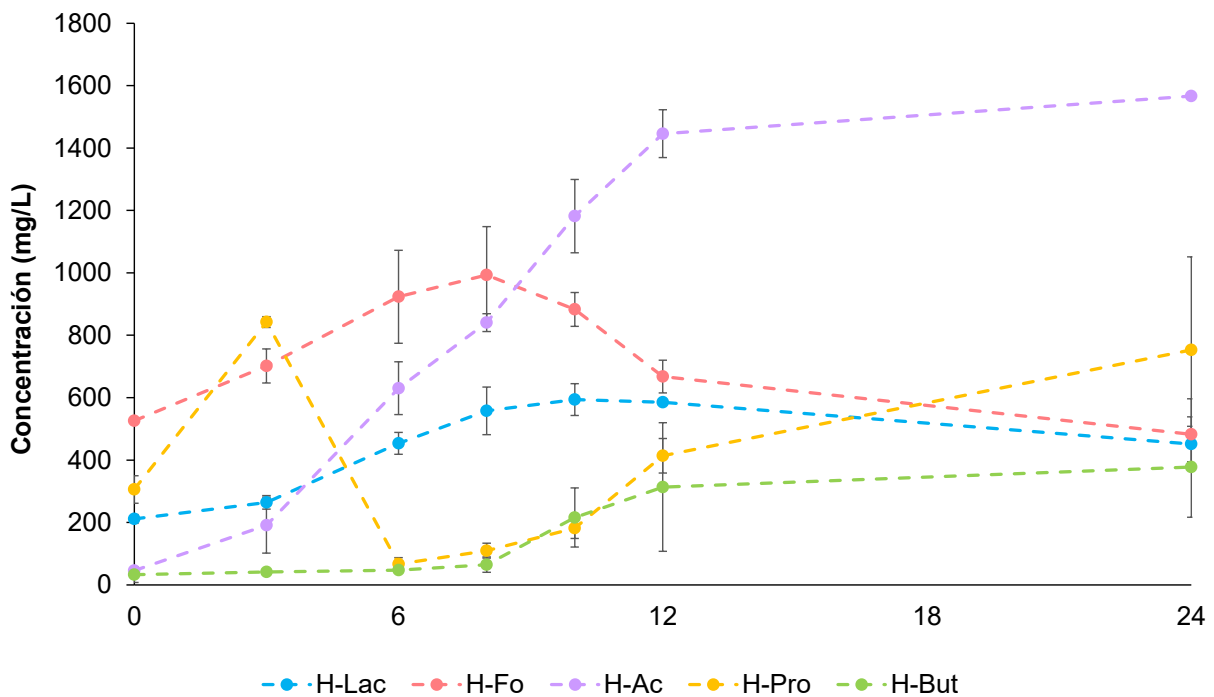


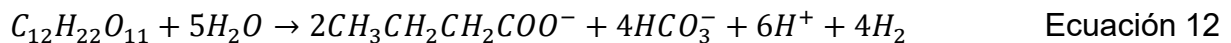
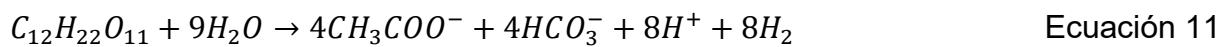
Figura 6. Evolución de la concentración de ácidos grasos volátiles (láctico, H-Lac; fórmico, H-Fo; acético, Hac; propiónico, H-Pr; butírico, H-But) a lo largo del tiempo de fermentación.

El perfil de producción de ácidos orgánicos cambió con el tiempo, predominando los ácidos fórmico y propiónico hasta la hora 3, seguido de un cambio hacia el ácido acético, confluente con la intensificación de la producción de H_2 . Una bajada en la producción de ácido fórmico fue observada a partir de la hora 8, seguido de una ligera producción de los ácidos propiónico y butírico. Contrariamente a lo esperado, la producción de ácido butírico fue la más baja en comparación con los demás metabolitos producidos, aunque esta fue generalmente una de las vías metabólicas preferidas para la producción de H_2 por fermentación oscura, acompañando la producción de ácido acético (Júnior et al., 2015; Magrini et al., 2021; Nikolaidis & Poullikkas, 2017).

Las rutas del butirato y del acetato en el metabolismo de producción de H₂ se ven directamente afectadas por determinados rangos de pH y por la abundancia y diversidad de microorganismos acetogénicos (Fang & Liu, 2002; Turon et al., 2016). Se observó anteriormente, en procesos de producción de H₂ por fermentación oscura, que en condiciones de pH inferiores a 6, el espectro de productos metabólicos consistió mayoritariamente en butirato y acetato, mientras que en pH más altos el espectro cambiaba a la producción de acetato y etanol (Calli et al., 2008; Guo et al., 2010; Slezak et al. 2017). En el presente estudio, el pH prácticamente constantemente a 6, con ligeras variaciones dentro del rango 6,0-6,3, lo que puede haber contribuido para la producción acentuada de acetato y reducida de butirato.

Cabe señalar que se ha observado que el patrón de fermentación se asocia con la dominancia de especies de *Clostridium* tanto en condiciones de pH alto como bajo, mientras que, a pH intermedio, los cambios metabólicos implican una mayor diversidad microbiana (Temudo et al., 2008). Como previamente se ha descrito por García-Depraect et al. (2022), miembros del género *Clostridium*, representaban aproximadamente 11% de la comunidad microbiana presente en el inóculo original y, al someter el inóculo al proceso de fermentación de residuos de alimentos con o sin control de pH, la abundancia relativa de *Clostridium* cambió drásticamente (abundancias relativas de aproximadamente 30% con y < 5% sin control de pH) y se favoreció significativamente el aumento de la diversidad microbiana. Esto sugiere que los efectos del pH (fijo o variable) resultan no solo de un cambio en las rutas metabólicas, sino también de cambios importantes en las comunidades microbianas, sugiriendo la ocurrencia del aumento en la diversidad bacteriana general durante el proceso de fermentación del lactosuero en el presente estudio.

En cultivos mixtos, las principales vías de fermentación productoras de H₂ durante la fermentación oscura son la vía del acetato y la vía del butirato. Los rendimientos teóricos de hidrógeno de las rutas del acetato y butirato son 8 y 4 moles de H₂ por mol de lactosa consumida, respectivamente (Ecuación 11 y Ecuación 12) (Lovato et al., 2021). A partir de un cálculo de producción neta, en el cual se consideró las relaciones estequiométricas entre los moles de ácido y H₂ producidos a partir del consumo de lactosa, se pudo realizar una estimación de la producción teórica de H₂ basado en los metabolitos producidos.



La producción de H₂ a partir del consumo de lactosuero estuvo mayoritariamente relacionada a la vía metabólica del acetato, el metabolito más abundantemente presente a lo largo de los ensayos de fermentación. Teniendo en cuenta la proporción estequiométrica, se obtiene el rendimiento teórico de H₂ a partir del acetato:

$$\frac{1522 \text{ mg/L acetato (Producción neta)}}{60,052 \text{ mg/mmol acetato}} \times \frac{2 \text{ mmol } H_2}{1 \text{ mmol acetato}} \times 22,4 \text{ NmL} = 1135 \text{ NmL } H_2/L_{\text{reactor}}$$

La producción de H₂ por la vía del acetato explicaría aproximadamente un 57% de la productividad total de los ensayos de fermentación (2004,5 NmL H₂/L_{reactor}). A pesar de la baja producción de butirato a lo largo del proceso, parte del H₂ producido puede

ser justificado a partir de la relación estequiométrica de la vía butírica, teóricamente responsable por un 8,7% del volumen total de H₂ producido en el proceso:

$$\frac{344,56 \text{ mg/L butirato (Producción neta)}}{88,11 \text{ mg/mmol butirato}} \times \frac{2 \text{ mmol H}_2}{1 \text{ mmol butirato}} \times 22,4 \text{ NmL} = 175,2 \text{ NmL H}_2/L_{\text{reactor}}$$

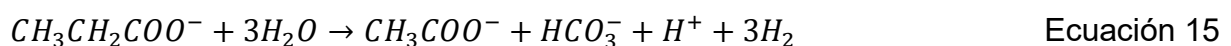
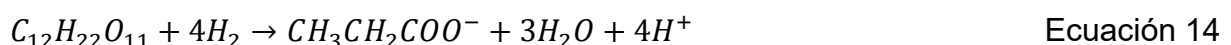
Asimismo, otras vías metabólicas alternativas, relacionadas a los ácidos fórmico y propiónico, también podrían asociarse directamente a la productividad de H₂ en los ensayos de fermentación oscura. Organismos anaerobios facultativos, especialmente miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (como *Escherichia* y *Klebsiella*, por ejemplo) pueden metabolizar el piruvato en ácido fórmico y otros productos en un proceso denominado fermentación del ácido fórmico (Ergal et al., 2018). El piruvato se convierte primero en ácido fórmico por la piruvato-formiato liasa con la producción de acetil-CoA, y la energía se conserva en forma de ATP a través del acetilfosfato. En condiciones anaerobias y en ausencia de aceptores de electrones adecuados, el ácido fórmico se degradará aún más en H₂ y CO₂ a través de la enzima hidrogeniliasa fórmica (Lee et al., 2011). Para cada mol de ácido consumido, se produce 1 mol de H₂ y 1 mol de CO₂ (Ecuación 13).



A través de esta vía, que corresponde con la caída en la concentración de ácido fórmico en el sistema (entre las 8 y 12 h), teóricamente se obtendría una cantidad de H₂ equivalente a aproximadamente 8% del total producido:

$$\frac{325,44 \text{ mg/L formiato (Producción neta)}}{46,03 \text{ mg/mmol formiato}} \times \frac{1 \text{ mmol H}_2}{1 \text{ mmol formiato}} \times 22,4 \text{ NmL} = 158,37 \text{ NmL H}_2/L_{\text{reactor}}$$

Por otro lado, las posibles vías del ácido propiónico en el metabolismo de la lactosa en la fermentación oscura se pueden relacionar con consumo (Detman et al., 2021b) y producción (Dahiya et al., 2021) de H₂, siendo desfavorable para el proceso cuando hay formación de este metabolito. *Clostridium propionium* (Baghchehsaraee et al., 2009), *Blautia* y *Propionicum* (García-Depraect et al., 2019) están involucrados en la producción de H₂. *Syntrophobacter fumaroxidans* y *Syntrophomonas wolfei*, a su vez, son grupos conocidos por su capacidad de consumir el ácido propiónico y producir acetato y H₂ (Cabrol et al., 2017). Las reacciones de consumo y producción de H₂ relacionadas a la vía del ácido propiónico (Lovato et al., 2021) se muestran en las Ecuaciones 14 y 15, respectivamente:



Se observó una disminución acentuada en la concentración de ácido propiónico entre las horas 3 y 6 (Figura 6), concomitante con el inicio de la producción de H₂ en la hora

6 (Figura 5), indicando la conversión del ácido propiónico en H₂ (Ecuación 15). Sin embargo, un ligero aumento en la concentración de este metabolito a lo largo del periodo remanente del proceso (Figura 6) puede indicar un consumo de H₂ en el metabolismo del sustrato (Ecuación 14). Como resultado final, se obtiene un equivalente de producción neta de 14,2% de H₂ (283,9 NmL H₂/L_{reactor}), restando la cantidad de H₂ consumida de la producida:

$$\frac{776 \text{ mg/L propionato (Producción neta)}}{74,08 \text{ mg/mmol propionato}} \times \frac{3 \text{ mmol H}_2}{1 \text{ mmol formiato}} \times 22,4 \text{ NmL} = 703,9 \text{ NmL H}_2/\text{L}_{\text{reactor}}$$

$$\frac{347,3 \text{ mg/L propionato (Consumo neto)}}{74,08 \text{ mg/mmol propionato}} \times \frac{4 \text{ mmol H}_2}{1 \text{ mmol formiato}} \times 22,4 \text{ NmL} = 420 \text{ NmL H}_2/\text{L}_{\text{reactor}}$$

$$\text{Producción} - \text{Consumo} = 283,9 \text{ NmL H}_2/\text{L}_{\text{reactor}}$$

Por las relaciones estequiométricas sugeridas, se supone una producción teórica de H₂ de 1630 NmL H₂/L_{reactor}, correspondiente a 81,3% del total observado en realidad. Es importante destacar que una importante vía metabólica involucrada en el proceso está asociada a la producción y consumo de ácido láctico, la vía del lactato, que diverge hacia diferentes rutas metabólicas intermedias. La fermentación oscura implica principalmente tres pasos, que incluyen (i) hidrólisis de lactosa en glucosa y galactosa, (ii) conversión de azúcares monoméricos en lactato por microorganismos homolácticos, como *Lactobacillus*, y (iii) conversión de lactato en H₂ y ácidos orgánicos por microorganismos fermentadores, como *Clostridium* (Asunis et al., 2020). En la Figura 7 se muestra un esquema simplificado de las vías de destino del láctico.

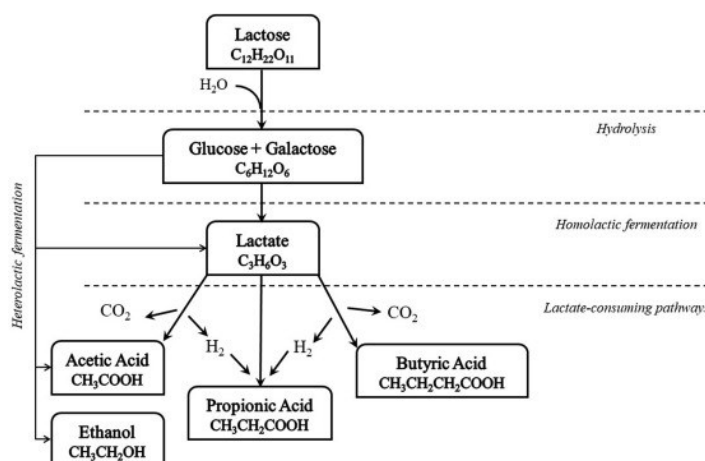
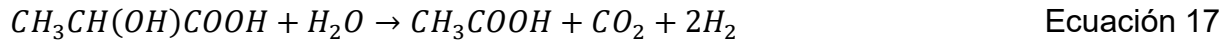
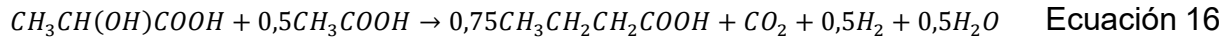


Figura 7. Principales vías metabólicas involucradas en el consumo de ácido láctico en el proceso de fermentación oscura (Fuente: Asunis et al., 2020)

Se observó una confluencia en la producción de los ácidos acético y láctico (aunque mucho menos expresiva para el último), que converge con la fase exponencial de producción de H₂, indicando una posible interacción entre las dos vías. Además, teniendo en cuenta la baja cantidad de butirato producida, es improbable que la producción de H₂ observada haya ocurrido, al menos en su mayoría, a través de un consumo de lactato y acetato por la vía alternativa de formación del butirico (Ecuación 16). El consumo de ambos ácido láctico y acético, y su conversión a H₂ ha sido reportado para vinazas tequileras (García-Depraect & León-Becerril, 2018). En este contexto, se ha demostrado que, en esta ruta metabólica, el lactato y el acetato actúan

como donante y aceptor de electrones, respectivamente (Tao et al., 2016). Dado que el catabolismo anaerobio de lactosa implica la producción de lactato, y que este no se acumuló en el caldo de fermentación, es posible deducir que el lactato se metabolizó en H₂ y acetato, concomitante con consumo de acetato y producción de H₂, como lo muestra las Ecuaciones 17 y 18.



Las relaciones estequiométricas son un buen método de estimación de las producciones teóricas de las reales, la complejidad de las vías metabólicas involucradas en el proceso de producción de H₂ por fermentación oscura muchas veces no es capaz de justificar la productividad de H₂ en su totalidad. Esto se debe a la presencia de vías competitivas que no generan H₂ (como la vía de producción de ácido láctico) u otras vías metabólicas que consumen H₂ directamente (Lovato et al., 2021) y una compleja y dinámica diversidad de microorganismos (Turón et al., 2016).

4.2 Experimentos en continuo

4.2.1 Producción de H₂ y estabilidad del sistema a diferentes condiciones operacionales

Tras el desarrollo de las condiciones óptimas de operación basadas en los resultados obtenidos en el experimento en lote, se operó el reactor anaerobio de tanque agitado en modo continuo, a condiciones mesófilas, con un TRH de 6 h y una TCO de 180 g DQO/L-d. La operación del reactor se llevó a cabo a lo largo de 29 días, dividida en 5 fases. En la Figura 8 se aprecia la evolución de la productividad de H₂, así como el contenido de H₂ en el gas producido (% v/v). Tras las primeras 12 h de operación (adaptación inicial), el contenido de H₂ en la fase gaseosa estuvo comprendido entre 49 y 62%, y la productividad de H₂ varió entre 16873,2 y 31879,7 NmL/L-d.

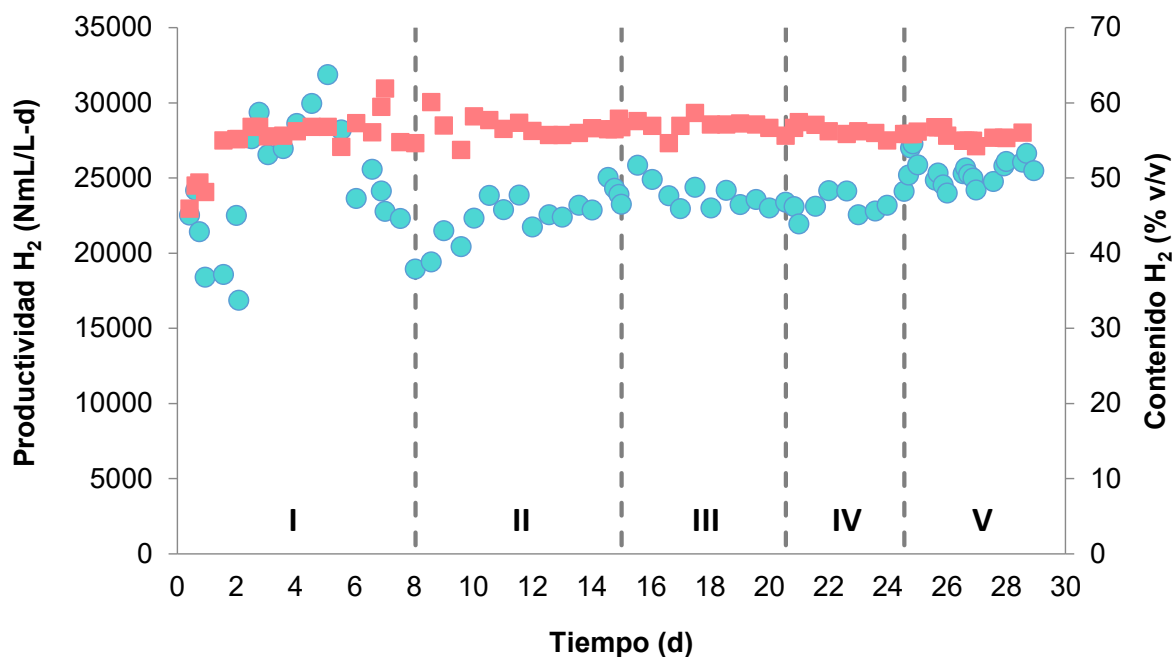


Figura 8. Evolución de la productividad de H₂ (●) y contenido de H₂ (■) en la fase gas para cada fase de operación (I a V).

El periodo I presentó una mayor variación en la productividad de H₂, con un promedio de $23859,8 \pm 2525,3$ NmL H₂/L-d, mientras que el contenido de H₂ estuvo en $55,6 \pm 1,9$ % (v/v). Este fue el periodo de mayor inestabilidad, con un índice IEP de 0,87. Estudios previos sobre el proceso de fermentación oscura utilizando lactosuero (Castelló et al., 2018) y glucosa (Gavala et al., 2006) como sustratos, en reactores anaerobios tipo tanque con agitación continua (CSTR – *continuous stirred-tank reactor*), observaron un comportamiento inestable en la producción de H₂. Castelló y colaboradores (2018) evidenciaron que, durante un periodo de 30 días de operación (con rendimiento máximo de 0,8 L H₂/L-d), el sistema alcanzó el estado estacionario después de 20 días, con caída brusca en el rendimiento de H₂ (menos de 0,1 L H₂/L-d). Los autores asociaron las fluctuaciones significativas en el rendimiento a la alta abundancia de BPL presentes en el sistema. Adicionalmente, Gavala y colaboradores (2006) asociaron la inestabilidad de producción de H₂ a la ausencia de condiciones de adhesión y/o formación de agregados bacterianos, al comparar los rendimientos obtenidos en sistema CSTR con un reactor de tipo UASB con biomasa granular.

En la fase II se introdujo el medio soporte constituido de ruedas plásticas dentadas, con el objetivo de promover la adhesión de la biomasa y disminución de las fluctuaciones en la producción de H₂ (Barca et al., 2015). En esta fase se observó una productividad promedio de $22507,5 \pm 1623,7$ NmL H₂/L-d con un contenido de H₂ de $56,6 \pm 1,3$ % (v/v). La adición del soporte para formación de biofilm ocasionó un rápido cambio en la estabilidad del sistema, caracterizada por un IEP de 0,95. Comparando otros estudios que utilizaron lactosuero para la producción de H₂, Lima et al. (2016) obtuvo 1084,1 NmL H₂/L-d, en un AnSBBR (reactor anaerobio en lote secuencial con biofilm, del inglés *anaerobic sequencing biofilm batch reactor*) con una TCO de 17 g DQO/L-d; Perna et al. (2013) obtuvo 999,0 NmL H₂/L-d en un reactor anaerobio de flujo ascendente con lecho fijo aplicando 37 g DQO^{L-d} y Rosa et al. (2014) logró 2878,4 NmL H₂/L-d en un reactor anaerobio de lecho fluidizado con una TCO de 20 g DQO/L-

d. Los autores destacaron, adicionalmente, la gran estabilidad y calidad del biogás producido. En la presente investigación, el rendimiento de producción de H₂ en la fase II fue notablemente superior; sin embargo, dicho resultado era esperado, teniendo en cuenta la alta TCO aplicada (180 g DQO/L-d).

Las fases III, IV y V se caracterizaron por el mantenimiento de la condición operacional anterior (presencia de medio soporte), sin embargo, con adición de nanopartículas. La productividad en la fase III, donde se introdujo nanopartículas de hierro encapsuladas en carbono a una concentración 100 ppm, estuvo en 23903,49 ± 901,46 NmL H₂/L.d con contenido de hidrógeno (v/v) de 57,0 ± 0,95%. Esta etapa se destaca por su mayor estabilidad en la producción de H₂ en comparación con las demás (IEP de 0,98), a pesar de no haber sido observado incremento en la productividad de H₂ por la adición de las nanopartículas. En las etapas posteriores se analizó el efecto de nanopartículas inorgánicas de Fe₂O₃, a diferentes concentraciones, siendo 100 y 300 ppm en las fases IV y V, respectivamente. Ambas fases fueron igualmente estables (IEP de 0,97), con productividades y contenidos de H₂ de 23261,5 ± 694,1 NmL H₂/L-d y 56,2 ± 0,6% (v/v) (fase IV), y 25500,15 ± 854,55 NmL H₂/L-d y 55,69 ± 0,6% (v/v) (fase V). Se evidenció incremento en la productividad en la fase V en comparación con la fase IV, como resultado en el aumento en la concentración de nanopartículas adicionadas.

En estudio anterior, nanopartículas de Fe₂O₃/C, a concentraciones de 200 y 300 mg/L, ocasionaron aumento en la producción de H₂ en hasta un 33,7% (Zhang et al., 2018), lo que demuestra que su utilización a concentraciones superiores a 100 mg/L (utilizada en la presente investigación) podría mejorar la actividad de la enzima hidrogenasa y ayudar a acelerar la transferencia de cadenas de electrones en la fermentación oscura. La utilización de nanotubos de carbono para optimizar la producción de H₂ vía fermentación oscura, utilizando glucosa como sustrato, provocó una producción de gas más eficiente y estimuló la formación de lodo granular en un reactor UASB de operación continua, confirmando mayor robustez y estabilidad del sistema cuando comparado a un sistema control sin adición de nanopartículas (Liu et al., 2012).

Con el objetivo de verificar posibles diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre las fases de operación, con respecto a la productividad de H₂, prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y prueba post-hoc de Dunn fueron aplicados. Los resultados de las pruebas estadísticas se aprecian en las Tablas A1 y A2 (ANEXO). La fase I, a pesar de su mayor inestabilidad y ausencia de medio soporte, presentó una productividad de H₂ significativamente más elevada que en la fase II. En la fase V se obtuvo el mayor rendimiento de producción de H₂, significativamente más elevado que en las fases de operación anteriores.

Al compararse el efecto de diferentes tipos de nanopartículas a misma concentración (fases III y IV), utilizando la prueba no paramétrica t de Wilcoxon para muestras pareadas ($\alpha = 0,05$), no se observó diferencias estadísticas entre las condiciones empleadas (Tabla A3, ANEXO). Sin embargo, al analizar el efecto diferentes concentraciones de nanopartículas de Fe₂O₃, utilizando la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$) se constató que a una concentración de 300 mg Fe₂O₃/L se obtuvo una productividad de H₂ significativamente más elevada que a concentración de 100 mg Fe₂O₃/L (Tabla A4, ANEXO), corroborando con los resultados previamente obtenidos por Zhang et al. (2018).

4.2.2 Remoción de sustrato y crecimiento de biomasa a diferentes condiciones operacionales

Se monitorearon las concentraciones (mg/L) de carbohidratos, DQO soluble (DQO_s) y SSV con el objetivo de seguir la remoción de materia orgánica y crecimiento de biomasa a lo largo de la operación del reactor en continuo. Las condiciones empleadas soportaron un $81,12 \pm 5,1\%$ de eficiencia de remoción de carbohidratos y $37,1 \pm 5,1\%$ de DQO_s. Esto se debió al consumo de carbohidratos y a la generación de ácidos (justificado por la DQO_s en la salida) por parte de microorganismos acetogénicos y acidogénicos que no fueron consumidos por el proceso, como se esperaba en un sistema fermentativo de producción de H₂ (Lovato et al., 2021). Con respecto a la biomasa, se verificó que hubo un incremento del $572,5 \pm 122,8\%$ en la concentración de SSV (mg/L) cuando se comparó con la concentración inicial del inoculo (548,33 mg/L). Los porcentajes de remoción de carbohidratos (que representan su conversión a metabolitos, gas o biomasa) y DQO_s e incremento de SSV en cada fase de operación, se muestran en la Tabla A5 (ANEXO), y las concentraciones efluentes de dichos parámetros se aprecian en la Figura 9.

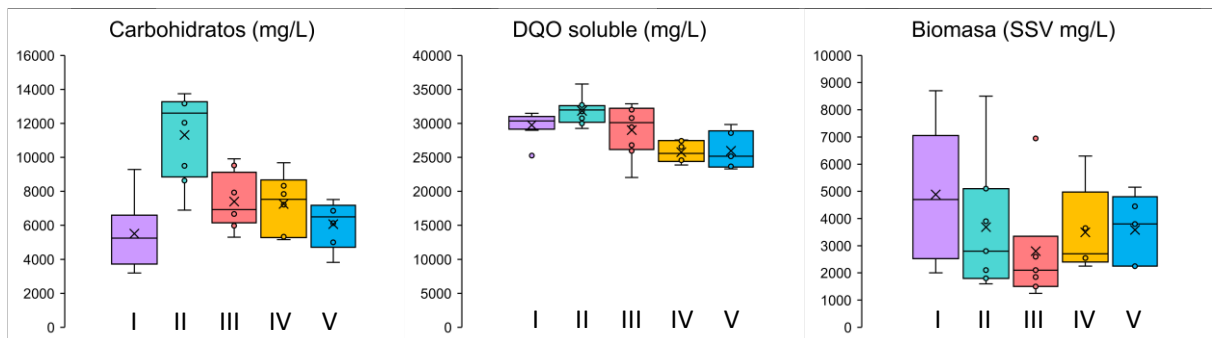


Figura 9. Concentraciones en el efluente de carbohidratos, DQO_s y SSV en cada fase de operación. Barras de error corresponden a la desviación estándar de los valores promedio.

Estudios anteriores han reportado una remoción (conversión) de carbohidratos de hasta $80,9 \pm 0,6\%$ y $88 \pm 10\%$, en sistemas AnSBR y AnSBBR (AnSBR con biofilm) utilizando vinaza de tequila y lactosuero como sustratos, respectivamente (García-Depraect et al., 2020; Lovato et al., 2021). Los resultados estuvieron de acuerdo con las eficiencias alcanzadas en el presente estudio ($81,1 \pm 5,1\%$), evidenciando que condiciones de operación adecuadas en sistemas de fermentación oscura pueden conferir altas tasas de conversión de sustrato al proceso.

Sin embargo, los porcentajes de remoción de materia orgánica (DQO_s) reportados en los estudios anteriormente mencionados, cuyo proceso implica la conversión de los productos orgánicos presentes en la fase líquida a productos gaseosos (H₂ y CO₂), fueron de $16,9 \pm 4,3\%$ y $30 \pm 2\%$ en sistemas AnSBR y AnSBBR, respectivamente (García-Depraect et al., 2020; Lovato et al., 2021). En la presente investigación, se observaron eficiencias de remoción de DQO_s más elevadas ($37,1 \pm 5,1\%$), confirmando la alta capacidad del sistema de convertir la materia orgánica biodisponible en H₂ gaseoso.

Es importante destacar que gran parte de la conversión de carbohidratos implica un crecimiento de biomasa fermentativa, además de metabolitos y productos gaseosos (Hawkes et al., 2007). Como era esperado, el sistema experimentó un importante

incremento en la concentración de biomasa en el biorreactor, con concentración máxima de 8,7 g SSV/L, verificada en la fase I, y mínima de 1,25 g SSV/L, observada en la fase III. Palomo-Briones y colaboradores (2017) verificaron, en un sistema CSTR utilizando lactosa como sustrato, que un alto porcentaje de sustrato se destinó a la síntesis de biomasa, para TRHs de 6 h (44%), 12h (54,9%), 18h (59%) y 24 h (59%), respectivamente. Además, Jung et al. (2010) observaron notables rendimientos de biomasa equivalentes al 46% en un CSTR alimentado con las aguas residuales de un fabricante de bebidas de café con un TRH de 6 h. Una posible razón del alto rendimiento de producción de biomasa puede ser que a un TRH corto (principalmente 6 y 12 h), los microorganismos dirigen una fracción importante del sustrato consumido para mantenerse en el sistema. Si los microorganismos no dirigen una fracción importante de DQO a la síntesis de biomasa en tales condiciones, serían lavados del sistema (Palomo-Briones et al., 2017).

Pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y, cuando aplicable, pruebas post-hoc de Dunn, fueron utilizadas para verificar posibles diferencias entre las concentraciones medianas del efluente de carbohidratos, DQO_s y SST entre las fases de operación (Tablas A6-10, ANEXO). El análisis reveló que el desempeño en términos de remoción o conversión de carbohidratos apenas en la fase II fue significativamente más bajo que en las demás, con una concentración en el efluente de $11314,6 \pm 2437,69$ mg/L, lo que corresponde a una reducción de $72 \pm 6\%$. Con respecto a la DQO_s, la utilización de nanopartículas de Fe₂O₃ en las fases IV y V promovió eficiencias de remoción significativamente más altas que en las fases I, II y III, independientemente de la concentración utilizada (> 42% de eficiencia). Sin embargo, no se observó ni incremento ni disminución de la concentración de biomasa al cambiarse las condiciones de operación, puesto que no se evidenció diferencias significativas entre las concentraciones efluentes de SSV entre las fases I a V.

El efecto de la utilización de nanopartículas de Fe₂O₃ fue indiscutiblemente beneficioso para la mejora del desempeño global del proceso de fermentación oscura, tanto en términos de producción de H₂ (particularmente en la fase V, con concentración de 300 mg Fe₂O₃/L) como de remoción de materia orgánica (DQO_s). Además, en estas fases no se observó cambios significativos en la conversión de sustrato y en el incremento/disminución de la concentración biomasa, indicando que la mayor eficacia de remoción de materia orgánica puede estar involucrada en el consumo de metabolitos intermediarios (ácidos orgánicos).

Un estudio previo confirmó que el aumento en la productividad de H₂ causado por la adición de magnetita, un material conductor a base de hierro, se debió a la activación de la vía de utilización de lactato que reutiliza el lactato y produce H₂ adicional (Kim et al., 2021). Otros estudios también constataron el efecto de las nanopartículas a base de hierro en productividades más altas de H₂ (Kim et al., 2022; Yang & Wang, 2018). La vía del lactato fue propuesta como una de las rutas metabólicas involucradas en la producción de H₂ en los ensayos de fermentación en lote, por no haber sido constatado una acumulación de ácido láctico en el sistema al mismo tiempo que se observó una productividad más elevada que la cantidad de ácido acético residual (apartado 4.1.2). Considerando la posibilidad de ocurrencia del metabolismo del lactato también en la condición de operación en continuo, los resultados son un indicio de que la presencia de nanopartículas puede haber impulsado la activación u optimización de esta ruta metabólica para incrementar la producción de H₂ en el sistema. Sin embargo, estudios moleculares son necesarios para verificar este supuesto.

5. CONCLUSIONES

- En lote, el sistema alcanzó una producción de H_2 de $2004,5 \pm 84,7$ NmL H_2/L_{reactor} y un rendimiento de $100,2 \pm 4,2$ NmL H_2/g DQO_{alim}, junto con un alto consumo de carbohidratos ($94,4 \pm 0,8\%$), al aplicarse una carga orgánica de 25 g DQO/L en los ensayos en lote;
- La vía del lactato fue propuesta como una de las rutas metabólicas involucradas en la producción de H_2 en los ensayos de fermentación en lote, por no haber sido constatado acumulación de ácido láctico en el sistema al mismo tiempo que se observó una productividad más elevada que la cantidad de ácido acético residual. La mayor parte (75,6%) de la producción de H_2 se explicó por las vías del acetato (57 %) y lactato-acetato- H_2 (18,65 %), inferidas a partir de las concentraciones residuales de ácidos orgánicos obtenidas.
- La introducción del soporte inerte rápidamente estabilizó la productividad de H_2 del sistema (IEP = 0,95), alcanzando su máxima estabilidad en la presencia de nanopartículas (IEP = 0,98).
- La adición de nanopartículas de Fe_2O_3 (particularmente a 300 mg/L) provocaron un mejor desempeño global del proceso ($25500,15 \pm 854,55$ NmL $H_2/L\cdot d$ y remoción de DQO superior a 42%);
- La mayor eficiencia de remoción de DQO debido a los efectos de nanopartículas de Fe_2O_3 estuvo probablemente involucrada con el consumo de metabolitos intermediarios (ácidos orgánicos) y su conversión a H_2 , impulsado por la optimización de la vía metabólica del lactato.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tras evaluar los resultados obtenidos, se sugiere que sean llevadas a cabo más investigaciones relacionadas al mejor entendimiento del proceso de fermentación oscura impulsada por la ruta metabólica del ácido láctico, utilizando lactosuero en polvo como sustrato, incluyendo los aspectos listados a continuación:

- Necesidad de realizar estudios moleculares para se entender con más profundidad la dinámica de las comunidades microbianas involucradas en el proceso;
- Realizar ensayos utilizando agua residual industrial (lactosuero ácido), con el objetivo de entender el funcionamiento del proceso de fermentación oscura al utilizar un efluente complejo proveniente de producción industrial real;
- Estudiar diferentes configuraciones de fermentadores de biomasa fija (ej.: sistemas inmovilizados, membrana dinámica);
- Probar diferentes variedades de nanopartículas, incluyendo la optimización de la dosis de uso.

7. REFERENCIAS

- Ahmad, T., & Zhang, D. (2020). A critical review of comparative global historical energy consumption and future demand: The story told so far. *Energy Reports*, 6, 1973-1991.
- Alvarez-Guzmán, C. L., Cisneros-de la Cueva, S., Balderas-Hernández, V. E., Smoliński, A., & De León-Rodríguez, A. (2020). Biohydrogen production from cheese whey powder by *Enterobacter asburiae*: Effect of operating conditions on hydrogen yield and chemometric study of the fermentative metabolites. *Energy Reports*, 6, 1170-1180.
- APHA (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA*, 21.
- Arimi, M. M., Knodel, J., Kiprop, A., Namango, S. S., Zhang, Y., & Geißen, S. U. (2015). Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: a review. *Biomass and Bioenergy*, 75, 101-118.
- Asunis, F., De Gioannis, G., Dessì, P., Isipato, M., Lens, P. N., Muntoni, A., ... & Spiga, D. (2020). The dairy biorefinery: integrating treatment processes for cheese whey valorisation. *Journal of Environmental Management*, 276, 111240.
- Baeyens, J., Zhang, H., Nie, J., Appels, L., Dewil, R., Ansart, R., & Deng, Y. (2020). Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 110023.
- Bagher, A. M., Vahid, M., Mohsen, M., & Parvin, D. (2015). Hydroelectric energy advantages and disadvantages. *American Journal of Energy Science*, 2(2), 17-20.
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., and Margaritis, A. (2009). Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 2573–2579.
- Barbier, E. (2002). Geothermal energy technology and current status: an overview. *Renewable and sustainable energy reviews*, 6(1-2), 3-65.
- Barca, C., Soric, A., Ranava, D., Giudici-Ortoni, M. T., & Ferrasse, J. H. (2015). Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: a review. *Bioresource technology*, 185, 386-398.
- Binod, P., Sindhu, R., & Pandey, A. (2013). The alcohol fermentation step: The most common ethanologenic microorganisms among yeasts, bacteria and filamentous fungi. In *Lignocellulose Conversion* (pp. 131-149). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Blanco, V. M. C., Oliveira, G. H. D. D., & Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. *Renewable Energy*, 139, 1310-1319.
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 158-181.
- Calli, B., Schoenmaekers, K., Vanbroekhoven, K., & Diels, L. (2008). Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose—effects of on-line pH control. *International journal of hydrogen energy*, 33(2), 522-530.

- Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 5591–5601.
- Castelló, E., Braga, L., Fuentes, L., & Etchebere, C. (2018). Possible causes for the instability in the H₂ production from cheese whey in a CSTR. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43, 2654–2665.
- Chen, W. H., Farooq, W., Shahbaz, M., Naqvi, S. R., Ali, I., Al-Ansari, T., & Amin, N. A. S. (2021). Current status of biohydrogen production from lignocellulosic biomass, technical challenges and commercial potential through pyrolysis process. *Energy*, 226, 120433.
- CMNU–C - Convención Marco de las Naciones Unidas Sobre el Cambio Climático (1992). Naciones Unidas, 1992. Disponible en: <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/convsp.pdf>.
- Das, D., Khanna, N., Nejat, Veziroğlu, T. (2008) Recent developments in biological hydrogen production processes. *Chem Ind Chem Eng Q* 14:57–67.
- Dahiya, S., Chatterjee, S., Sarkar, O., & Mohan, S. V. (2021). Renewable hydrogen production by dark-fermentation: Current status, challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 321, 124354.
- De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., & Spiga, D. (2014). Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *International journal of hydrogen energy*, 39(36), 20930-20941.
- Demirbas, A. (2009). *Biohydrogen* (pp. 163-219). Springer London.
- Detman, A., Chojnacka, A., Błaszczak, M., Kaźmierczak, W., Piotrowski, J., & Sikora, A. (2017). Biohydrogen and biomethane (Biogas) production in the consecutive stages of anaerobic digestion of molasses. *Polish journal of environmental studies*, 26(3), 1023-1029.
- Detman, A., Laubitz, D., Chojnacka, A., Kiela, P. R., Salamon, A., Barberán, A., ... & Sikora, A. (2021a). Dynamics of dark fermentation microbial communities in the light of lactate and butyrate production. *Microbiome*, 9(1), 1-21.
- Detman, A., Laubitz, D., Chojnacka, A., Wiktorowska-Sowa, E., Piotrowski, J., Salamon, A., ... & Sikora, A. (2021b). Dynamics and complexity of dark fermentation microbial communities producing hydrogen from sugar beet molasses in continuously operating packed bed reactors. *Frontiers in Microbiology*, 11, 612344.
- Díaz-Cruces, V. F., García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2020). Effect of lactate fermentation type on the biochemical methane potential of tequila vinasse. *BioEnergy research*, 13(2), 571-580.
- Dong, K., Hochman, G., Zhang, Y., Sun, R., Li, H., & Liao, H. (2018). CO₂ emissions, economic and population growth, and renewable energy: empirical evidence across regions. *Energy Economics*, 75, 180-192.
- Elsharnouby, O., Hafez, H., Nakhla, G., & El Naggar, M. H. (2013). A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12), 4945-4966.
- EPA – Environmental Protection Agency EPA (2022) Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-2020. U.S., EPA 430-R-22-003. Disponible en:

<<https://www.epa.gov/ghgemissions/draft-inventory-us-greenhouse-gas-emissionsand-sinks-1990-2020>>.

Ergal, Í., Fuchs, W., Hasibar, B., Thallinger, B., Bochmann, G., & Rittmann, S. M. (2018). The physiology and biotechnology of dark fermentative biohydrogen production. *Biotechnology advances*, 36(8), 2165-2186.

Ermolina, M., Matveevskaya, A., & Baranuk, M. (2021). Climate change and the UN 2030 agenda for sustainable development. In *Proceedings of Topical Issues in International Political Geography* (pp. 226-237). Springer, Cham.

Escalante, H., Castro, L., Amaya, M., Jaimes, L., & Jaimes-Estévez, J. (2018). Anaerobic digestion of cheese whey: energetic and nutritional potential for the dairy sector in developing countries. *Waste Management*, 71, 711–718.

Fang, H. H., & Liu, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource technology*, 82(1), 87-93.

Fernandes, B. S., Saavedra, N. K., Maintinguer, S. I., Sette, L. D., Oliveira, V. D., Varesche, M. B. A., & Zaiat, M. (2013). The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(6), 1348-1366.

Freitas, I. B. F., de Menezes, C. A., & Silva, E. L. (2020). An alternative for value aggregation to the sugarcane chain: Biohydrogen and volatile fatty acids production from sugarcane molasses in mesophilic expanded granular sludge bed reactors. *Fuel*, 260, 116419.

Fuess, L. T., Júnior, A. D. N. F., Machado, C. B., & Zaiat, M. (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: the key role of lactate. *Bioresource technology*, 247, 426-433.

García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., Muñoz, R., Rene, E. R., León-Becerril, E., Valdez-Vazquez, I., ... & Buitrón, G. (2021a). A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: the key to unlocking enhanced dark fermentative processes. *Bioresource technology*, 324, 124595.

García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2018). Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway: Operational performance, kinetic analysis and microbial ecology. *Fuel*, 234, 151-160.

García-Depraect, O., Martínez-Mendoza, L. J., Diaz, I., & Muñoz, R. (2022). Two-stage anaerobic digestion of food waste: Enhanced bioenergy production rate by steering lactate-type fermentation during hydrolysis-acidogenesis. *Bioresource Technology*, 127358.

García-Depraect, O., Muñoz, R., Rodríguez, E., Rene, E. R., & Leon-Becerril, E. (2021b). Microbial ecology of a lactate-driven dark fermentation process producing hydrogen under carbohydrate-limiting conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(20), 11284-11296.

García-Depraect, O., Muñoz, R., van Lier, J. B., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., & León-Becerril, E. (2020). Three-stage process for tequila vinasse valorization through sequential lactate, biohydrogen and methane production. *Bioresource technology*, 307, 123160.

- García-Depraect, O., Rene, E. R., Gómez-Romero, J., López-López, A., & León-Becerril, E. (2019). Enhanced biohydrogen production from the dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: novel insights into ecological regulation by pH. *Fuel*, *253*, 159-166.
- Gavala, H. N., Skiadas, I. V., & Ahring, B. K. (2006). Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, *31*(9), 1164-1175.
- Gokfiliz-Yildiz, P., & Karapinar, I. (2018). Optimization of particle number, substrate concentration and temperature of batch immobilized reactor system for biohydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, *43*, 10655–10665.
- Gunnarsdóttir, I., Davidsdóttir, B., Worrell, E., & Sigurgeirsdóttir, S. (2021). Sustainable energy development: History of the concept and emerging themes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *141*, 110770.
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., & Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. *International journal of hydrogen energy*, *35*(19), 10660-10673.
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?. *Trends in biotechnology*, *27*(5), 287-297.
- Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *International journal of hydrogen energy*, *27*(11-12), 1339-1347.
- Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *International journal of hydrogen energy*, *32*(2), 172-184.
- I–A - International Energy Agency (2021a), World Energy Outlook 2021, IEA,. Licence: Creative Commons Attribution CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- I–A - International Energy Agency (2021b), *Electricity total final consumption by sector, 1971-2019*, IEA, Paris. Disponible en: <<https://www.iea.org/data-and-statistics/charts/electricity-total-final-consumption-by-sector-1971-2019>>.
- IPCC (2014) Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel and J.C. Minx (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Juang, C. P., Whang, L. M., & Cheng, H. H. (2011). Evaluation of bioenergy recovery processes treating organic residues from ethanol fermentation process. *Bioresource technology*, *102*(9), 5394-5399.
- Jung, K. W., Kim, D. H., & Shin, H. S. (2010). Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. *international journal of hydrogen energy*, *35*(24), 13370-13378.
- Júnior, A. D. N. F., Etchebere, C., & Zaiat, M. (2015). Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: influence of support materials. *Anaerobe*, *34*, 94-105.

- Kamran, M. (2021). Bioenergy. In *Renewable Energy Conversion Systems* (pp. 243–264). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823538-6.00002-6>
- Kargi, F., Eren, N. S., & Ozmihci, S. (2012). Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(10), 8338-8342.
- Karim, A., Islam, M. A., Mishra, P., Yousuf, A., Faizal, C. K. M., & Khan, M. M. R. (2021). Technical difficulties of mixed culture driven waste biomass-based biohydrogen production: Sustainability of current pretreatment techniques and future prospective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 151, 111519.
- Khanna, N., Kotay, S. M., Gilbert, J. J., & Das, D. (2011). Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. *Journal of Biotechnology*, 152(1-2), 9-15.
- Kim, D. H., Yoon, J. J., Kim, S. H., & Park, J. H. (2021). Effect of conductive material for overcoming inhibitory conditions derived from red algae-based substrate on biohydrogen production. *Fuel*, 285, 119059.
- Kim, D. H., Yoon, J. J., Kim, S. H., & Park, J. H. (2022). Acceleration of lactate-utilizing pathway for enhancing biohydrogen production by magnetite supplementation in *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology*, 127448.
- Kim, T. H., Lee, Y., Chang, K. H., & Hwang, S. J. (2012). Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresource technology*, 103(1), 136-141.
- Kumar, G., Mathimani, T., Rene, E. R., & Pugazhendhi, A. (2019). Application of nanotechnology in dark fermentation for enhanced biohydrogen production using inorganic nanoparticles. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(26), 13106-13113.
- Lappa, I. K., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., & Kopsahelis, N. (2019). Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Foods*, 8, 347.
- Laxman Pachapur, V., Jyoti Sarma, S., Kaur Brar, S., Le Bihan, Y., Ricardo Soccol, C., Buelna, G., & Verma, M. (2015). Co-culture strategies for increased biohydrogen production. *International Journal of Energy Research*, 39(11), 1479-1504.
- Lee, D. J., Show, K. Y., & Su, A. (2011). Dark fermentation on biohydrogen production: pure culture. *Bioresource technology*, 102(18), 8393-8402.
- Lee, K. S., Lo, Y. S., Lo, Y. C., Lin, P. J., & Chang, J. S. (2003). H₂ production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors. *Biotechnology letters*, 25(2), 133-138.
- Lepage, T., Kammoun, M., Schmetz, Q., & Richel, A. (2021). Biomass-to-hydrogen: A review of main routes production, processes evaluation and techno-economical assessment. *Biomass and Bioenergy*, 144, 105920.
- Levin, D. B., Pitt, L., & Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International journal of hydrogen energy*, 29(2), 173-185.
- Li, S., Li, F., Zhu, X., Liao, Q., Chang, J. S., & Ho, S. H. (2022). Biohydrogen production from microalgae for environmental sustainability. *Chemosphere*, 291, 132717.

- Li, Y., Chen, Y., & Wu, J. (2019). Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. *Applied energy*, 240, 120-137.
- Lima, D. M. F., Lazaro, C. Z., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., & Zaiat, M. (2016). Optimization performance of an AnSBBR applied to biohydrogen production treating whey. *Journal of Environmental Management*, 169, 191-201.
- Liu, Z., Lv, F., Zheng, H., Zhang, C., Wei, F., & Xing, X. H. (2012). Enhanced hydrogen production in a UASB reactor by retaining microbial consortium onto carbon nanotubes (CNTs). *international journal of hydrogen energy*, 37(14), 10619-10626.
- Lopes, A. C. A., Eda, S. H., Andrade, R. P., Amorim, J. C., & Duarte, W. F. (2019). New alcoholic fermented beverages—potentials and challenges. *Fermented beverages*, 577-603.
- Lovato, G., Augusto, I. M. G., Júnior, A. D. N. F., Albanez, R., Ratusznei, S. M., Etchebehere, C., ... & Rodrigues, J. A. D. (2021). Reactor start-up strategy as key for high and stable hydrogen production from cheese whey thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(54), 27364-27379.
- Magrini, F. E., de Almeida, G. M., da Maia Soares, D., Fuentes, L., Etchebehere, C., Beal, L. L., ... & Paesi, S. (2021). Effect of different heat treatments of inoculum on the production of hydrogen and volatile fatty acids by dark fermentation of sugarcane vinasse. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(6), 2443-2456.
- Mahata, C., & Das, D. (2022). Current Status and Prospects of Biohydrogen Production Process. *Microbial Biotechnology for Renewable and Sustainable Energy*, 99-133.
- Matsumoto, M., & Nishimura, Y. (2007). Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(3), 236-241.
- Montecchio, D., Yuan, Y., & Malpei, F. (2018). Hydrogen production dynamic during cheese whey dark fermentation: new insights from modelization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(37), 17588-17601.
- Moreira, F., Machado, R., Romão, B., Batista, F., Ferreira, J., & Cardoso, V. (2017). Improvement of hydrogen production by biological route using repeated batch cycles. *Process Biochemistry*, 58, 60–68.
- Mullai, P., Yogeswari, M. K., & Sridevi, K. J. B. T. (2013). Optimisation and enhancement of biohydrogen production using nickel nanoparticles—A novel approach. *Bioresource technology*, 141, 212-219.
- Nagarajan D, Lee D-J, Chang J-S (2019) Recent insights into consolidated bioprocessing for lignocellulosic biohydrogen production. *Int J Hydrog Energy* 44(28):14362–14379
- Nikolaidis, P., & Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and sustainable energy reviews*, 67, 597-611.
- Ofualagba, G., & Ubeku, E. U. (2008). Wind energy conversion system-wind turbine modeling. In *2008 IEEE Power and Energy Society General Meeting-Conversion and Delivery of Electrical Energy in the 21st Century* (pp. 1-8). IEEE.
- Onyenwoke, R. U., Lee, Y. J., Dabrowski, S., Ahring, B. K., & Wiegel, J. (2006). Reclassification of *Thermoanaerobium acetigenum* as *Caldicellulosiruptor acetigenus* comb. nov. and emendation of the genus description. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(6), 1391-1395.

- Ottaviano, L. M., Ramos, L. R., Botta, L. S., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2017). Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 4848–4860.
- Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Applied Energy*, 198, 77-87.
- Pandey, A., Srivastava, S., Rai, P., & Duke, M. (2019). Cheese whey to biohydrogen and useful organic acids: a non-pathogenic microbial treatment by *L. acidophilus*. *Scientific Reports*, 9, 1–9.
- Park, J. H., Sim, Y. B., Kim, J. S., & Kim, S. H. (2020). Effects of alginate immobilization on dynamic membrane formation and H₂ fermentation from galactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(10), 5874-5880.
- Perea-Moreno, M. A., Samerón-Manzano, E., & Perea-Moreno, A. J. (2019). Biomass as renewable energy: Worldwide research trends. *Sustainability*, 11(3), 863.
- Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Lima, D. F., Borzacconi, L., Varesche, M., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2013). Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 54–62.
- Pradhan, N., Dipasquale, L., d'Ippolito, G., Panico, A., Lens, P. N., Esposito, G., & Fontana, A. (2015). Hydrogen production by the thermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana*. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12578-12600.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: a review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68.
- Rachman, M. A., Nakashimada, Y., Kakizono, T., & Nishio, N. (1998). Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(4), 450-454.
- Rai, P. K., Singh, S. P., & Asthana, R. K. (2012). Biohydrogen production from cheese whey wastewater in a two-step anaerobic process. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(6), 1540-1549.
- Rao, R., & Basak, N. (2021). Fermentative molecular biohydrogen production from cheese whey: present prospects and future strategy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(7), 2297-2330.
- Reglamento (UE) 2018/1999 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la Gobernanza de la Unión de la Energía y de la Acción por el Clima, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.o 663/2009 y (CE) n.o 715/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 94/22/CE, 98/70/CE, 2009/31/CE, 2009/73/CE, 2010/31/UE, 2012/27/UE y 2013/30/UE del Parlamento Europeo y del Consejo y las Directivas 2009/119/CE y (UE) 2015/652 del Consejo, y se deroga el Reglamento (UE) n.o 525/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, Diario Oficial de la Unión Europea, L 328/1, de 21/12/2018.
- Rhodes, C. J. (2010). Solar energy: principles and possibilities. *Science progress*, 93(1), 37-112.

- Ritchie, H.; Roser, M.; and Rosado, P. (202–)– "Ene"gy". Published online at OurWorldInData.org. Disponible en: <<https://ourworldindata.org/energy-mix#:~:text=Globally%20we%20get%20the%20largest,than%2080%25%20of%20energy%20consumption>>.
- Rittmann S, Herwig C (2012) A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production. *Microb Cell Factories* 11(1):115
- Romão, B. B., Silva, F. T. M., de Barcelos Costa, H. C., do Carmo, T. S., Cardoso, S. L., de Souza Ferreira, J., Batista, F. R. X., & Cardoso, V. L. (2019). Alternative techniques to improve hydrogen production by dark fermentation. *3 Biotech*, 9, 18.
- Rosa, P. R. F., Santos, S. C., & Silva, E. L. (2014). Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(3), 1288-1296.
- Santiago, S. G., Trably, E., Latrille, E., Buitrón, G., & Moreno-Andrade, I. (2019). The hydraulic retention time influences the abundance of Enterobacter, Clostridium and Lactobacillus during the hydrogen production from food waste. *Letters in applied microbiology*, 69(3), 138-147.
- Sarkar, O., Katakojwala, R., & Mohan, S. V. (2021). Low carbon hydrogen production from a waste-based biorefinery system and environmental sustainability assessment. *Green Chemistry*, 23(1), 561-574.
- Schuchmann, K., & Müller, V. (2016). Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 82(14), 4056-4069.
- Singh, V., & Das, D. (2019). Potential of hydrogen production from biomass. *Science and engineering of hydrogen-based energy technologies*, 123-164.
- Sikora, A., Błaszczuk, M., Jurkowski, M., Zielenkiewicz, U., 2013. Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia: On purpose or by coincidence?, In: Kongo, J.M. (Ed.), *Lactic acid bacter—a - R & D for food, health and livestock purposes*. InTech, pp. 487-514.
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S. H., Kobayashi, T., Xu, K. Q., ... & Bélafi-Bakó, K. (2016). A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(6), 3820-3836.
- Sivagurunathan, P., Kuppam, C., Mudhoo, A., Saratale, G. D., Kadier, A., Zhen, G., ... & Kumar, G. (2018). A comprehensive review on two-stage integrative schemes for the valorization of dark fermentative effluents. *Critical reviews in biotechnology*, 38(6), 868-882.
- Sivagurunathan, P., Sen, B., & Lin, C. Y. (2015). High-rate fermentative hydrogen production from beverage wastewater. *Applied Energy*, 147, 1-9.
- Slezak, R., Grzelak, J., Krzystek, L., & Ledakowicz, S. (2017). The effect of initial organic load of the kitchen waste on the production of VFA and H₂ in dark fermentation. *Waste Management*, 68, 610-617.
- Slobodkin, A. I., Tourova, T. P., Kuznetsov, B. B., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (1999). *Thermoanaerobacter siderophilus* sp. nov., a novel dissimilatory Fe (III)-reducing, anaerobic, thermophilic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(4), 1471-1478.

- Tao, Y., Hu, X., Zhu, X., Jin, H., Xu, Z., Tang, Q., & Li, X. (2016). Production of butyrate from lactate by a newly isolated *Clostridium* sp. BPY5. *Applied biochemistry and biotechnology*, 179(3), 361-374.
- Temudo, M. F., Muyzer, G., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. (2008). Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(6), 1121-1130.
- Tenca, A., Schievano, A., Perazzolo, F., Adani, F., & Oberti, R. (2011). Biohydrogen from thermophilic co-fermentation of swine manure with fruit and vegetable waste: maximizing stable production without pH control. *Bioresource technology*, 102(18), 8582-8588.
- Toledo-Alarcón, J., Capson-Tojo, G., Marone, A., Paillet, F., Júnior, A. D. N. F., Chatellard, L., ... & Trably, E. (2018). Basics of bio-hydrogen production by dark fermentation. In *Bioreactors for microbial biomass and energy conversion* (pp. 199-220). Springer, Singapore.
- Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., & Steyer, J. P. (2016). Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: a review. *Process Biochemistry*, 51(11), 1843-1854.
- UN – United Nations (1998) Kyoto Protocol to the United Nations Framework Convention on Climate Change. United Nation 1998.
- UN – United Nations. (2015). Transforming our world: The 2030 agenda for sustainable development. A/RES/70/1, 21 October. Disponible en: <https://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E>.
- UN – United Nations. (2016). Specifications for the application of the United Nations Framework Classification for Fossil Energy and Mineral Reserves and Resources 2009 to Renewable Energy Resources. ECE/ENERGY/2016/4. 19 July. Disponible en <https://unece.org/DAM/energy/se/pdfs/comm25/ECE_ENERGY_2016_4.pdf>.
- Van Ginkel, S., & Logan, B. E. (2005). Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environmental science & technology*, 39(23), 9351-9356.
- Wang, J., & Yin, Y. (2021). *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: an overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(70), 34599-34625.
- Wengenmayr, R., & Bührke, T. (Eds.). (2011). *Renewable energy: sustainable energy concepts for the future*. John Wiley & Sons.
- Yang, G., Yin, Y., & Wang, J. (2019). Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(26), 13147-13156.
- Yang, G., & Wang, J. (2018). Improving mechanisms of biohydrogen production from grass using zero-valent iron nanoparticles. *Bioresource technology*, 266, 413-420.
- Zhang, J., Zhao, W., Yang, J., Li, Z., Zhang, J., & Zang, L. (2021a). Comparison of mesophilic and thermophilic dark fermentation with nickel ferrite nanoparticles supplementation for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 329, 124853.
- Zhang, J., Li, W., Yang, J., Li, Z., Zhang, J., Zhao, W., & Zang, L. (2021b). Cobalt ferrate nanoparticles improved dark fermentation for hydrogen evolution. *Journal of Cleaner Production*, 316, 128275.

ANEXOS

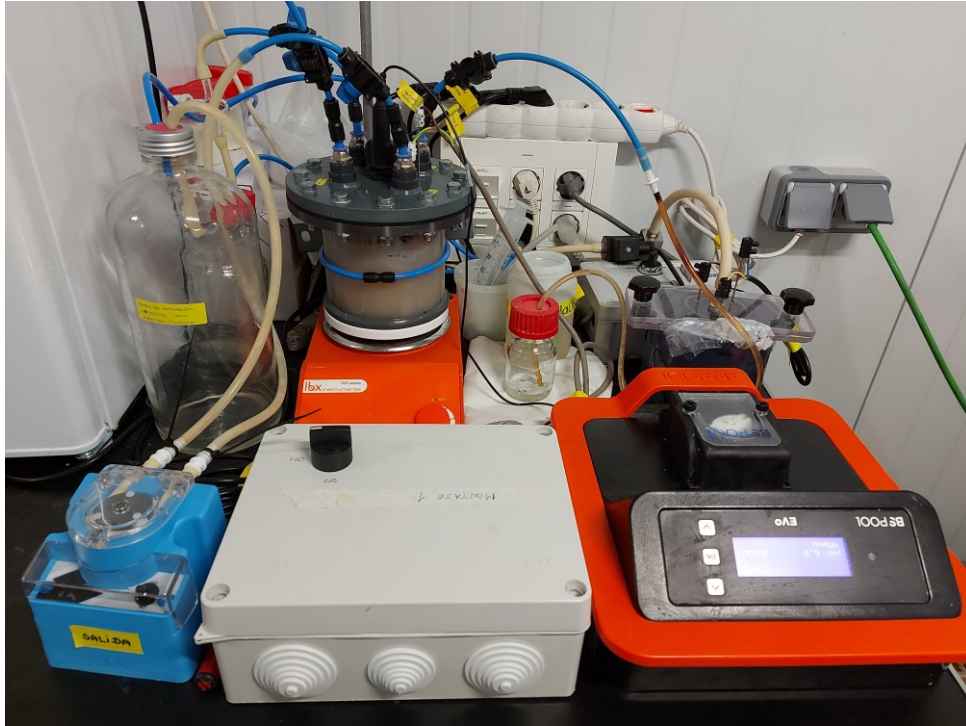


Figura A1. Fotografía del sistema de operación en continuo.

Tabla A1. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis entre las fases de operación cuanto a las productividades de H₂.

Parámetro	Valor
<i>H</i> (<i>chi</i> ²)	25,1
<i>H</i> _c (<i>tie corrected</i>)	25,1
<i>p</i> -value	4,811E-05*

*Hay diferencia significativa entre las medianas de las muestras ($\alpha = 0,05$)

Tabla A2. Matriz con valores de *p* resultantes de la prueba *post-hoc* de Dunn entre las fases de operación cuanto a las productividades de H₂.

	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V
Fase I		0,00961*	0,6069	0,1199	0,02558*
Fase II	0,00961*		0,1003	0,5272	2,586E-06*
Fase III	0,6069	0,1003		0,3675	0,01925*
Fase IV	0,1199	0,5272	0,3675		0,0007453*
Fase V	0,02558*	2,586E-06*	0,01925*	0,0007453*	

*Hay diferencia significativa entre las medianas de las muestras ($\alpha = 0,05$)

Tabla A3. Resultados de la prueba t de Wilcoxon para muestras pareadas entre las fases de operación III y IV cuanto a las productividades de H₂.

Parámetro	Valor
<i>W</i>	43
<i>p-value (Normal appr. Z: 1,5799)</i>	0,11413*
<i>p-value (Monte Carlo)</i>	0,13186*
<i>p-value (exact)</i>	0,13086*

*Hay diferencia significativa entre las medianas de las muestras ($\alpha = 0,05$)

Tabla A4. Resultados de la prueba de la U de Mann-Whitney para muestras pareadas entre las fases de operación III y IV cuanto a las productividades de H₂.

Parámetro	Valor
<i>Mann-Whitney U</i>	3
<i>p-value (Z: 4,1983)</i>	2,6892E-05*
<i>p-value (Monte Carlo)</i>	0,0001*

*Hay diferencia significativa entre las medianas de las muestras ($\alpha = 0,05$)

Tabla A5. Eficiencias de remoción de carbohidratos y DQO_s e incremento de biomasa (%) en cada fase de operación.

Fase	Carbohidratos	DQO _s	SSV
I	86,15 ± 4,65 %	34,29 ± 4,10 %	790,58 ± 426,06 %
II	71,55 ± 6,13 %	29,68 ± 4,12 %	572,17 ± 416,03 %
III	81,41 ± 3,82 %	35,91 ± 7,84 %	410,64 ± 330,93 %
IV	81,74 ± 4,05 %	43,09 ± 3,24 %	536,47 ± 270,09 %
V	84,75 ± 3,23 %	42,68 ± 5,37 %	552,89 ± 212,80 %

Tabla A6. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis entre las fases de operación cuanto a las concentraciones efluentes de carbohidratos.

Parámetro	Valor
<i>H (chi2)</i>	17,02
<i>Hc (tie corrected)</i>	17,02
<i>p-value</i>	0,001917*

*Hay diferencia significativa entre las medianas de las muestras ($\alpha = 0,05$)

Tabla A7. Matriz con valores de *p* resultantes de la prueba *post-hoc* de Dunn entre las fases de operación cuanto a las concentraciones efluentes de carbohidratos.

	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V
Fase I		9,961E-05*	0,06768	0,09355	0,5336
Fase II	9,961E-05*		0,03898*	0,05411	0,002878*
Fase III	0,06768	0,03898*		0,9883	0,285
Fase IV	0,09355	0,05411	0,9883		0,3239
Fase V	0,5336	0,002878*	0,285	0,3239	

*Hay diferencia significativa entre las medianas de las muestras ($\alpha = 0,05$)

Tabla A8. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis entre las fases de operación cuanto a las concentraciones efluentes de DQO_s.

Parámetro	Valor
<i>H (chi2)</i>	17,23
<i>Hc (tie corrected)</i>	17,24
<i>p-value</i>	0,001738*

*Hay diferencia significativa entre las medianas de las muestras ($\alpha = 0,05$)

Tabla A9. Matriz con valores de *p* resultantes de la prueba *post-hoc* de Dunn entre las fases de operación cuanto a las concentraciones efluentes de DQO_s.

	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V
Fase I		0,1918	0,8681	0,02908*	0,03369*
Fase II	0,1918		0,1412	0,0006971*	0,0008618*
Fase III	0,8681	0,1412		0,0425*	0,04884*
Fase IV	0,02908*	0,0006971*	0,0425*		0,9563
Fase V	0,03369*	0,0008618*	0,04884*	0,9563	

*Hay diferencia significativa entre las medianas de las muestras ($\alpha = 0,05$)

Tabla A10. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis entre las fases de operación cuanto a las concentraciones efluentes de SSV.

Parámetro	Valor
<i>H (chi2)</i>	4,158
<i>Hc (tie corrected)</i>	4,164
<i>p-value</i>	0,3843

*Hay diferencia significativa entre las medianas de las muestras ($\alpha = 0,05$)