



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

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Fermentación extractiva como estrategia para  
incrementar la co-producción de H<sub>2</sub> y ácidos  
carboxílicos en la fermentación oscura

Tesis que presenta

**Paulina Núñez Valenzuela**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias Ambientales**

Codirectores de Tesis:

**Dra. Aura Virginia Ontiveros Valencia**

**Dr. Elías Razo Flores**

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2021



## Constancia de aprobación de tesis

La tesis “**Fermentación extractiva como estrategia para incrementar la co-producción de H<sub>2</sub> y ácidos carboxílicos en la fermentación oscura**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Paulina Núñez Valenzuela** y aprobada el **27 de agosto de 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

**Dra. Aura Virginia Ontiveros Valencia**  
Co-directora de la tesis

---

**Dr. Elias Razo Flores**  
Co-director de la tesis

---

**Dr. César Nieto Delgado**  
Miembro del Comité Tutorial

---

**Dr. José René Rangel Mendez**  
Miembro del Comité Tutorial

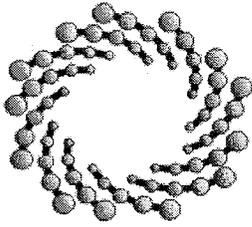


## **Créditos institucionales**

Esta tesis fue desarrollada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. Aura Virginia Ontiveros Valencia y el Dr. Elías Razo Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (1009190) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT, proyecto “Barreras inhibitorias y termodinámicas de la producción de hidrógeno: Fermentación extractiva como estrategia para mejorar su producción”, A1-S-37174, cuyo responsable técnico es el Dr. Elías Razo Flores



**IPICYT**

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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 094 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 27 días del mes de agosto del año 2021, se reunió a las 11:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. José René Rangel Méndez</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. César Nieto Delgado</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Aura Virginia Ontiveros Valencia</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó la C.

**Paulina Núñez Valenzuela**

sobre la Tesis intitulada:

*Fermentación extractiva como estrategia para incrementar la co-producción de H<sub>2</sub> y ácidos carboxílicos en la fermentación oscura*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Aura Virginia Ontiveros Valencia**  
**Dr. Elías Razo Flores**

El Jurado, después de deliberar, determinó

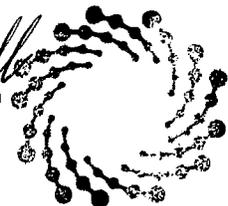
**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 13:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 27 días del mes de agosto de 2021.

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

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



**IPICYT**

SECRETARÍA ACADÉMICA  
INSTITUTO POTOSINO DE  
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
Y TECNOLÓGICA, A.C.

*Little girls with dreams,  
become women with vision*

## **Agradecimientos**

A la Dra. Aura Virginia Ontiveros Valencia y al Dr. Elías Razo Flores, por aceptarme en su grupo de trabajo y brindarme su guía y apoyo a lo largo de este proyecto. A mi comité tutorial, el Dr. José René Rangel Méndez y al Dr. César Nieto Delgado, por sus invaluable aportaciones y observaciones durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Rodolfo Palomo Briones y al M. en C. José de Jesús Montoya Rosales por sus valiosos comentarios que enriquecieron en gran medida mi trabajo. A la M. en C. Esmeralda Vences Álvarez, por su apoyo durante el desarrollo experimental.

Al grupo de trabajo del Dr. Elías, agradezco especialmente a Casandra y a Paola por su ayuda y motivación a lo largo de esta etapa.

Se agradece el apoyo técnico y administrativo brindado por el M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz, M. en C. Karen Lizeth Galindo Hernández y Lic. Mario Delgado.

# Contenido

Constancia de aprobación de tesis	i
Acta de examen	ii
Créditos institucionales	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Tabla de contenido	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xii

## Tabla de contenido

1	Introducción .....	1
2	Antecedentes.....	2
2.1	Fermentación oscura .....	2
2.1.1	Rutas metabólicas de la fermentación oscura.....	2
2.1.2	Ácidos carboxílicos: propiedades e inhibición .....	4
2.2	Fermentación extractiva.....	5
2.2.1	Uso de resinas de intercambio iónico para la extracción de ácidos carboxílicos 6	
2.2.2	Mecanismo de intercambio iónico.....	10
2.2.3	Factores que afectan el proceso de intercambio iónico.....	11
3	Justificación.....	12
4	Hipótesis.....	13
5	Objetivo general.....	13
5.1	Objetivos específicos.....	13
6	Metodología.....	14
6.1	Fuente de inóculo, sustrato y medio mineral.....	14

6.2	Resinas de intercambio iónico y acondicionamiento .....	14
6.3	Efecto de la concentración del medio mineral en la fermentación oscura .....	15
6.3.1	Ensayos en lote .....	15
6.3.2	Ensayos en continuo .....	16
6.4	Intercambio iónico en un efluente de fermentación oscura: cinéticas, capacidades de intercambio iónico y regeneración de sitios activos. ....	18
6.4.1	Selección de una resina adecuada para la remoción de ácidos carboxílicos de un efluente de fermentación oscura .....	19
6.4.2	Efecto del acondicionamiento de la resina A110.....	19
6.4.3	Regeneración de los sitios activos.....	19
6.4.4	Efecto de las sales disueltas.....	19
6.5	Fermentación extractiva.....	20
6.6	Análisis cinético de la producción de H <sub>2</sub> en lote .....	21
6.7	Análisis cinético de la remoción de ácidos carboxílicos en un efluente de fermentación oscura.....	22
6.8	Métodos analíticos.....	22
6.9	Cálculos.....	22
7	Resultados.....	24
7.1	Efecto de la concentración del medio mineral en la fermentación oscura .....	24
7.1.1	Ensayos en lote .....	24
7.1.2	Ensayos en continuo .....	27
7.2	Intercambio iónico en un efluente de fermentación oscura: cinéticas, capacidades de intercambio y regeneración de los sitios activos .....	30
7.2.1	Selección de una resina adecuada para la remoción de ácidos carboxílicos en un efluente de fermentación oscura .....	31
7.2.2	Efecto del acondicionamiento de la resina A110.....	35
7.2.3	Regeneración de los sitios activos.....	36
7.2.4	Efecto de las sales disueltas.....	38

7.3	Fermentación extractiva.....	41
8	Conclusiones y perspectivas.....	50
8.1	Conclusiones .....	50
8.2	Perspectivas .....	51
9	Referencias .....	52

## Lista de tablas

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Propiedades de los principales ácidos carboxílicos detectados en sistemas de fermentación oscura	4
2	Principales estudios donde se utilizan resinas de intercambio iónico para la extracción de ác. carboxílicos presentes en medios de fermentación	9
3	Especificaciones de las resinas de intercambio iónico probadas	15
4	Resumen del arreglo experimental para evaluar el efecto de la concentración del medio mineral en la producción de H <sub>2</sub> y ácidos carboxílicos en lote	16
5	Variaciones del medio mineral probadas en el CSTR para evaluar el efecto de la concentración del medio mineral en la producción de H <sub>2</sub> y ácidos carboxílicos	17
6	Ecuaciones utilizadas en los ensayos de intercambio iónico y fermentación oscura	23
7	Parámetros del modelo de Gompertz y rendimientos molares correspondientes a los ensayos de fermentación oscura en lote, utilizando diferentes concentraciones de medio mineral	26
8	Resumen de los resultados obtenidos durante la operación del CSTR probando diferentes condiciones del medio mineral	29
9	Resumen de los experimentos de intercambio iónico en un efluente de fermentación oscura utilizando tres resinas diferentes	34
10	Parámetros cinéticos resultados del ajuste del modelo de pseudo segundo orden a las cinéticas de intercambio iónico utilizando el efluente de la etapa III y IV	40
11	Capacidades de intercambio utilizando la resina A110 y los efluentes de la etapa III y IV	40
12	Parámetros obtenidos con el modelo modificado de Gompertz y rendimientos molares correspondientes a la cinética de producción de H <sub>2</sub> en el sistema de fermentación extractiva.	43
13	Principales resultados en diferentes estudios de fermentación extractiva.	49

## Lista de figuras

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Rutas metabólicas de la fermentación oscura.	3
2	Remoción de ácidos carboxílicos en una resina de intercambio iónico.	10
3	Sistema de fermentación extractiva.	21
4	Cinética de producción de H <sub>2</sub> utilizando diferentes concentraciones de medio mineral.	25
5	Desempeño del CSTR probando diferentes condiciones del medio mineral.	27
6	Diagrama de especiación de los principales ácidos carboxílicos de cadena corta generados en la fermentación oscura.	30
7	Cinéticas de intercambio iónico en un efluente de fermentación oscura.	32
8	Ajuste del modelo de segundo orden a los datos experimentales de las cinéticas de intercambio iónico en un efluente de fermentación oscura.	33
9	Capacidades de intercambio de las tres resinas probadas en un efluente de fermentación oscura.	34
10	Efecto del acondicionamiento de la resina A110.	36
11	Regeneración de los sitios activos de la resina A110.	37
12	Cinéticas de intercambio en el efluente etapa III y el efluente etapa IV.	39
13	Cinética de producción de H <sub>2</sub> en el sistema de fermentación extractiva.	42
14	Cinética de producción de ácidos carboxílicos en el sistema de fermentación extractiva.	43
15	Distribución de cargas de la resina A110.	44
16	Uso del sustrato en el sistema de fermentación extractiva.	45
17	Diferentes fenómenos dentro del sistema de fermentación extractiva.	48

## ABREVIATURAS

$\lambda$	Tiempo de latencia (lambda)
BV	Volumen de cama vacía
C	Concentración del adsorbato en la fase líquida en cualquier punto del tiempo
C <sub>0</sub>	Concentración inicial en la fase líquida
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CSTR	Reactor de tanque agitado continuo
DQO	Demanda química de oxígeno
EBCT	Tiempo de contacto de cama vacía
EtOH	Etanol
H <sub>2</sub>	Hidrógeno
H <sub>max</sub>	Volumen máximo de hidrógeno acumulado
h <sub>0</sub>	Velocidad de adsorción inicial
K <sub>2</sub>	Constante de velocidad de segundo orden
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
NaOH	Hidróxido de sodio
Q	Capacidad de intercambio
q <sub>e</sub>	Concentración del adsorbato en el adsorbente en condiciones de equilibrio
q <sub>T</sub>	Concentración del adsorbato en el adsorbente en cualquier punto del tiempo
R <sub>max</sub>	Tasa máxima de producción de hidrógeno
RMA	Rendimiento molar de acetato
RMB	Rendimiento molar de butirato
RMH	Rendimiento molar de hidrógeno
RML	Rendimiento molar de lactato
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TRH	Tiempo de retención hidráulico
VVPH	Velocidad volumétrica de producción de H <sub>2</sub>

## Resumen

Dentro de la fermentación oscura la inhibición por acumulación de productos (ácidos carboxílicos e hidrógeno) impide aproximarse a los rendimientos teóricos de producción de H<sub>2</sub>. Una potencial solución para este tipo de inhibición consiste en remover de manera continua los ácidos carboxílicos a la par que estos se generan, el proceso como tal es llamado fermentación extractiva. Reportes demuestran que es posible realizar la extracción de ácidos carboxílicos utilizando resinas de intercambio iónico, sin embargo, la aplicación de esta técnica en sistemas de fermentación extractiva ha sido poco estudiada. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la fermentación extractiva como método para la mejora de la producción en lote de H<sub>2</sub> y de ácidos carboxílicos por fermentación oscura, utilizando diferentes resinas de intercambio iónico.

Los experimentos iniciales consistieron en disminuir la concentración de aniones provenientes del medio mineral de la fermentación oscura para mitigar la competencia por los sitios activos, una vez definida la dilución del medio mineral, se procedió a realizar ensayos de intercambio iónico en lote. Se probaron las resinas A110 (macroporosa, base débil, amina primaria), A845 (gel, base débil, amina terciaria) y PAD 950 (macroporosa, adsorbente), para la remoción de acetato, lactato y butirato de un efluente de fermentación oscura. Se seleccionó a la resina A110 como la adecuada para la remoción de ácidos carboxílicos al presentar la mayor capacidad de intercambio total ( $1.25 \pm 0.12$  mmol/g) y afinidad hacia butirato. En el resto de los experimentos se trabajó con la resina A110 acondicionada. También fue analizado el efecto de tener aniones Cl<sup>-</sup> en el proceso de intercambio iónico, la presencia de Cl<sup>-</sup> disminuyó en un 45.2% y 31.8% la capacidad de intercambio de acetato y butirato, respectivamente. Finalmente, el experimento de fermentación extractiva consistió en acoplar una columna empacada con la resina A110 a un reactor productor de H<sub>2</sub> en lote, incrementando en un 15.2% el volumen de H<sub>2</sub> generado en comparación con el experimento de control. Al mismo tiempo, los rendimientos molares de acetato y butirato aumentaron en un 62.7% y 71.3 %, respectivamente. El efecto positivo al implementar el sistema de fermentación extractiva se debe principalmente al amortiguamiento de los procesos de inhibición por producto y posiblemente a un cambio dentro del metabolismo de la fermentación oscura que favorece la producción de butirato e H<sub>2</sub> a partir de lactato.

**Palabras clave:** ácidos carboxílicos, intercambio iónico, fermentación oscura

## Abstract

Dark fermentation's inhibition by accumulation of products (e.g., carboxylic acids and hydrogen) prevents approaching the theoretical yields of H<sub>2</sub> production. A potential solution for this type of inhibition is to remove carboxylic acids while these are generated, a process known as extractive fermentation. Reports have showed the feasibility of the carboxylic acids' extraction by using ion exchange resins. However, the use of ion exchange resins in extractive fermentation systems has been slightly studied. The aim of this work was to evaluate extractive fermentation as a method to improve the production of H<sub>2</sub> and carboxylic acids by dark fermentation by testing three different ion exchange resins.

The initial experiments consisted of moderating the competition for the resin's active sites by reducing the anions concentration from the dark fermentation's mineral medium. Once the dilution of the mineral medium was defined, batch ion exchange tests were performed. Resins A110 (macroporous, weak base, primary amine), A845 (gel, weak base, tertiary amine) and PAD 950 (macroporous, adsorbent) were tested for the removal of acetate, lactate, and butyrate from a dark fermentation effluent. The A110 resin was selected as suitable for the removal of carboxylic acids as presented the highest total exchange capacity ( $1.25 \pm 0.12$  mmol/g) and affinity towards butyrate. The rest of the experiments were conducted by utilizing the conditioned A110 resin. The effect of having Cl<sup>-</sup> anions in the ion exchange process was also evaluated. The presence of Cl<sup>-</sup> decreased by 45.2% and 31.8% the exchange capacity of acetate and butyrate, respectively. Finally, the extractive fermentation experiment was carried out by coupling a packed column with A110 resin to a batch H<sub>2</sub> producing reactor. The essay achieved a 15.2% increment in the generated H<sub>2</sub> volume, compared to the control experiment. In addition, the molar yields of acetate and butyrate were enhanced by 62.7% and 71.3%, respectively. The positive effect of employing an extractive fermentation system was mitigating product's inhibition processes and possibly prompting to changes within the metabolism of the dark fermentation that promoted the production of butyrate and H<sub>2</sub> from lactate.

**Key words:** *carboxylic acids, ion exchange, dark fermentation*

## 1 INTRODUCCIÓN

En el año 2015 el Gobierno de México expidió la Ley de Transición Energética (2015), la cual establece las metas de participación mínima de energías limpias (e.g. eólica, hidroeléctrica, solar, biogás, etc.) en la generación de energía eléctrica del 35% para 2024. De acuerdo con lo anterior se ha impulsado el desarrollo de fuentes de energía alternativas para diversificar y estabilizar la red eléctrica, tal es el caso del hidrógeno ( $H_2$ ). El  $H_2$  es un combustible que destaca por tener un elevado contenido energético (143 MJ/kg), una eficiencia de conversión a electricidad relativamente alta y su combustión sólo produce vapor de agua (Khan et al., 2018). Además, los métodos biológicos para la producción de  $H_2$  permiten la utilización de materia orgánica residual, contribuyendo a que las emisiones de  $CO_2$  asociadas sean relativamente bajas (Palomo-Briones et al., 2018).

Entre las alternativas biotecnológicas para la producción de  $H_2$ , la fermentación oscura destaca por ser de operación y control relativamente sencillo; así como por alcanzar altas velocidades de producción. Además en comparación con otras técnicas, como la fotofermentación, la fermentación oscura no depende de la disponibilidad de luz haciendo el diseño del reactor más simple (Palomo-Briones et al., 2017). Otro aspecto a considerar de la fermentación oscura es la producción de compuestos químicos de interés industrial, tal es el caso de los ácidos carboxílicos que pueden ser recuperados para mejorar la factibilidad económica del proceso. Con base en lo anterior, la fermentación oscura reúne características que la convierten en el proceso biotecnológico más cercano a un escalamiento industrial para la producción de  $H_2$ .

Actualmente el costo del  $H_2$  generado por fermentación oscura es elevado debido a que la mayor parte del sustrato (en términos de demanda química de oxígeno, DQO) termina en la fase líquida y no en el gas; es decir, una parte mínima del sustrato total es transformada en  $H_2$  mientras que el resto se usa para generar productos solubles como los ácidos carboxílicos (Sydney et al., 2018). Estos ácidos carboxílicos pueden ser utilizados como (I) fuente de carbono para la producción de biopolímeros, (II) precursores para el biodiesel u otros combustibles y (III) componentes para la producción de farmacéuticos y disolventes (Esteban-Gutiérrez et al., 2018). Cabe mencionar que el valor agregado de los ácidos carboxílicos (400–2500 USD/ton) es mayor al del  $H_2$  (600–1800 USD/ton) por lo que la generación, recuperación y comercialización de ácidos carboxílicos tendría un gran impacto económico en la tecnología de producción de  $H_2$  (de Sousa e Silva et al., 2020; IEA Bioenergy, 2011).

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Fermentación oscura

La fermentación oscura es un proceso redox anaerobio en el que distintas bacterias llevan a cabo la oxidación parcial de un sustrato rico en carbohidratos simples; al no existir un aceptor final, los electrones se disipan en forma de  $H_2$  al mismo tiempo que se forman productos reducidos como ácidos carboxílicos y alcoholes (Lee and Rittmann, 2009).

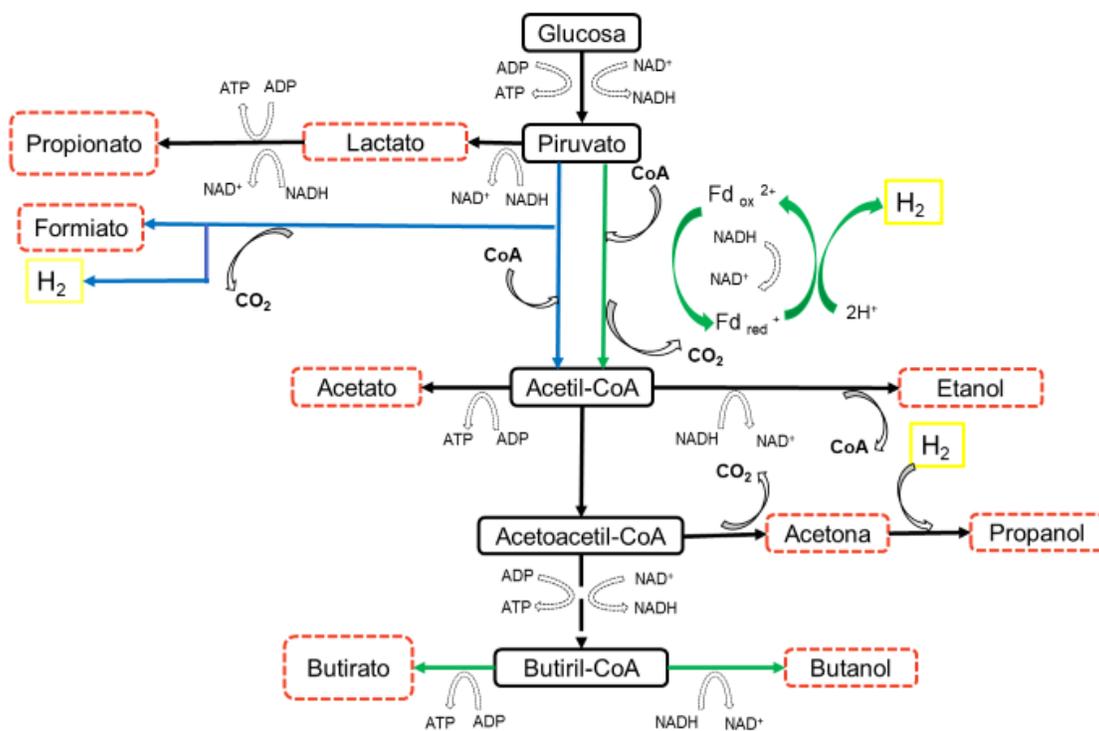
Las características específicas de los microorganismos que se encuentren en el sistema influyen directamente el desempeño de la fermentación oscura. Los principales microorganismos productores de  $H_2$  son bacterias anaerobias estrictas (*Clostridium*) o anaerobias facultativas (*Enterobacter*). Dentro de un cultivo mixto en condiciones mesofílicas, donde el inóculo es pretratado con un choque térmico (105°C, 24 h), es posible encontrar predominantemente microorganismos del género *Clostridium*; acompañadas de otros microorganismos anaerobios estrictos (e.g. *Acetanaerobacterium*, *Ethanoligenens*, *Megasphaera*, *Acidaminococcus* y *Prevotella*) y anaerobios facultativos (e.g. *Enterobacteriaceae*, *Bacillales*, *Shewanella* y *Pseudomonas*) (Cabrol et al., 2017; Palomo-Briones et al., 2021). Los cultivos mixtos presentan rendimientos de  $H_2$  similares a los reportados para cepas puras (1.4 - 2 mol  $H_2$ /mol hexosa), con la ventaja de operar en condiciones no estériles y con sustratos complejos provenientes de biomasa residual (Davila-Vazquez et al., 2008b).

#### 2.1.1 Rutas metabólicas de la fermentación oscura

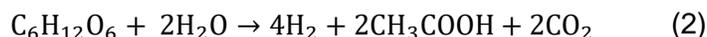
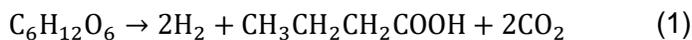
La fermentación oscura inicia con la degradación de carbohidratos a piruvato siguiendo la ruta metabólica Embden-Meyerhof. El proceso continúa ya sea a través de la vía de la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) o por la vía de la piruvato-formiato-liasa (PFL). Dentro de la vía PFL el piruvato se transforma en formiato y Acetil-CoA; posteriormente, el formiato es catalizado por la enzima formiato-hidrógeno-liasa (FHL) para generar  $H_2$  y  $CO_2$ . Por otra parte, en la vía PFOR se cataliza la conversión de piruvato y coenzima A (CoA) en acetil-CoA,  $CO_2$  y ferredoxina reducida cuyos electrones se disipan en forma de  $H_2$  (Cabrol et al., 2017) (Figura 1).

Estequiométricamente los microorganismos que siguen la vía de la PFL son capaces de producir 2 mol  $H_2$ /mol glucosa (Ec. 1). En contraste, los que siguen la ruta de la PFOR tienen un rendimiento máximo de 4 mol  $H_2$ /mol glucosa (Ec. 2). Sin embargo, estos valores son teóricos y, bajo condiciones reales, no pueden ser alcanzados debido a la

diversificación de rutas metabólicas, diversidad microbiana y fenómenos inhibitorios generados por la acumulación de ácidos carboxílicos e H<sub>2</sub> (Palomo-Briones, 2018).



**Figura 1.** Rutas metabólicas de la fermentación oscura utilizando glucosa como sustrato. Los microorganismos convierten la glucosa en piruvato por vías principalmente glucolíticas. El piruvato puede ser transformado en formiato por la vía de la piruvato-formiato liasa (PFL) para posteriormente liberar H<sub>2</sub> gaseoso y dióxido de carbono (línea azul), en cambio sí se inclina por la vía de la piruvato ferredoxina oxioreductasa (PFOR) una hidrogenasa permitirá reoxidar la ferredoxina (Fd) y producir H<sub>2</sub> (línea verde). Los recuadros rojos indican los subproductos de la fermentación. Adaptado de Cabrol et. al (2017).



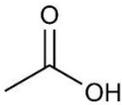
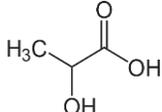
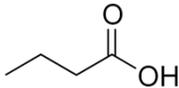
Si bien las rutas PFL y PFOR han sido ampliamente estudiadas, existen rutas metabólicas alternas que pueden contribuir a la generación de H<sub>2</sub> y butirato. García-Depraect et al. (2019) reporta un aumento en la producción de H<sub>2</sub> y butirato proveniente de la bioconversión incompleta del lactato, sugiriendo la existencia de interacciones cooperativas entre bacterias ácido lácticas y bacterias productoras de H<sub>2</sub> que consumen lactato y acetato.

### 2.1.2 Ácidos carboxílicos: propiedades e inhibición

Los principales productos solubles de la fermentación oscura son acetato y butirato, además, en procesos que utilizan altas concentraciones de sustratos simples (ej. suero de leche) se han encontrado también otros ácidos carboxílicos de cadena corta como el lactato (Agler et al., 2011; Palomo-Briones et al., 2018). Dentro de los reactores de fermentación oscura en lote la producción de ácidos carboxílicos dependerá de la concentración y tipo de sustrato, manteniendo comúnmente una relación acetato/butirato entre 0.4-0.7 (Davila-Vazquez et al., 2008a; Ye et al., 2011).

Los ácidos carboxílicos se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilo (C(=O)OH) unido al esqueleto de carbono, la desprotonación de dicho grupo funcional da lugar a un ácido carboxílico disociado, es decir, un carboxilato con carga negativa. En cuestiones de acidez, los ácidos carboxílicos son considerados ácidos débiles al tener valores de pKa entre 3.86 y 4.82 con un rango de disociación de 2 a 7 en la escala de pH (Tabla 1). Es importante resaltar que en el pH óptimo de fermentación (5-6) (Davila-Vazquez et al., 2008b) la mayor parte de los ácidos carboxílicos se encuentra en forma disociada (carboxilato).

**Tabla 1.** Propiedades de los principales ácidos carboxílicos detectados en sistemas de fermentación oscura.

Ácido carboxílico / carboxilato	Ácido acético/ acetato	Ácido láctico/ lactato	Ácido butírico/ butirato
Estructura			
Tamaño molecular estimado (nm <sup>3</sup> /partícula)	0.095	0.124	0.157
pKa a 25°C	4.76	3.86	4.82
Rango pH de disociación	3-7	2-6	3-7

En el medio de cultivo de la fermentación oscura coexisten las formas disociadas y no disociadas de ácidos carboxílicos, ambas desencadenan procesos celulares de inhibición por producto al aumentar su concentración. Sin embargo, el mecanismo de inhibición depende directamente de las especies de los ácidos carboxílicos en solución (Bundhoo and Mohee, 2016; Elbeshbishy et al., 2017; Jones et al., 2015; Wang et al., 2008).

En relación con la acumulación de ácidos disociados en solución, la inhibición se atribuye a un incremento en la fuerza iónica del medio (Ciranna et al., 2014; Zheng and Yu, 2005). Como producto de la disociación de los ácidos carboxílicos la concentración de cationes ( $H^+$ ) en el medio aumenta ocasionando la liberación de autolisinas, las cuales promueven la lisis celular de las bacterias productoras de  $H_2$  (Van Niel et al., 2003). En consecuencia, se promueve el cambio de acidogénesis a solventogénesis en la fermentación (Bundhoo and Mohee, 2016).

En cambio, los ácidos carboxílicos en su forma no disociada pueden penetrar la membrana de las bacterias y alterar el equilibrio fisiológico celular (Wang et al., 2008). Dentro del citoplasma ( $pH \approx 7$ ) los ácidos carboxílicos se disocian, generando un exceso de aniones que aumenta la osmolaridad del citoplasma y la presión de turgencia celular al mismo tiempo que los protones liberados disminuyen el pH intracelular, ocasionando que la célula utilice la energía destinada para crecimiento celular en restaurar el equilibrio fisiológico (Elbeshbishy et al., 2017). Es posible incluso que el gradiente de pH de la membrana colapse por el exceso de protones y la célula esporule o muera (Hawkes et al., 2002).

## **2.2 Fermentación extractiva**

La fermentación extractiva se define como el proceso donde los productos son removidos del sistema a la par que se generan, disminuyendo así su concentración en la fase líquida en comparación con un sistema convencional. En el caso de la fermentación oscura, el uso de sistemas extractivos se ha encaminado hacia la remoción de  $H_2$  y ácidos carboxílicos del medio de cultivo con el objetivo de mitigar la inhibición por producto mencionada en la sección anterior (Chang et al., 2012; Massanet-Nicolau et al., 2015).

Generalmente, la fermentación extractiva se apoya en procesos fisicoquímicas para la remoción de ácidos carboxílicos. El uso de membranas de nanofiltración o incluso electrodiálisis ha presentado resultados factibles para la recuperación de ácidos carboxílicos, sin embargo, su elevada demanda energética y costo operacional fomenta el

empleo de técnicas más sustentables como la adsorción en resinas de intercambio iónico (Rebecchi et al., 2016; Redwood et al., 2012).

### **2.2.1 Uso de resinas de intercambio iónico para la extracción de ácidos carboxílicos**

Diversos estudios demuestran la factibilidad de emplear resinas de intercambio iónico para la remoción de ácidos carboxílicos en efluentes provenientes de un proceso fermentativo (Tabla 2). Es importante mencionar que en la mayoría de los reportes se probaron resinas porosas funcionalizadas con diferentes formas de grupos amina cargados positivamente, los cuales interaccionan con los ácidos carboxílicos ionizados en solución.

Las resinas de intercambio iónico cuyo grupo funcional es una amina primaria, secundaria o terciaria son clasificadas como resinas de base débil y han demostrado ser aptas para la extracción de ácidos carboxílicos de cadena corta (Eregowda et al., 2020). Al utilizar la resina Amberlyst A21 se han alcanzado rendimientos de extracción del 15 al 24% para acetato, butirato y propionato en un efluente proveniente de la digestión anaerobia de residuos de la industria vinícola; (Rebecchi et al., 2016). De manera similar, se ha logrado extraer cerca del 70% de los ácidos carboxílicos (acetato, lactato y butirato) obtenidos mediante la fermentación oscura de desechos alimentarios, utilizando la resina Amberlite IRA-67 (Yousuf et al., 2016).

En contraste, las resinas de base fuerte (amina cuaternaria) presentan mayor selectividad por ácidos carboxílicos de cadena media. Fernando-Foncillas (2021) reporta el uso de la resina Dowex Marathon en efluentes producidos durante la fermentación de la fracción orgánica de desechos municipales, obteniendo una concentración 20 veces mayor de heptanoato en matriz sólida de la resina comparado con la concentración en el efluente.

En cuestiones de fermentación extractiva, se ha probado la resina Amberlite FPA53 durante la producción en lote de acetato por un cultivo de *Acetobacterium woodii* con gas  $H_2/CO_2$  como sustrato. En este estudio se acopló un reactor agitado, el cual contenía la resina y efluente proveniente del fermentador, una vez realizada la extracción de acetato, el efluente se recirculaba al fermentador. Como resultado de la extracción, la producción de acetato aumentó 1.6 veces (Karekar et al., 2020).

En 2017 fue reportada la extracción de ácidos carboxílicos en la fermentación oscura de biomasa microalgal por un consorcio microbiano. El experimento consistió en añadir la resina Amberlite IRA-400 (macroporosa, base fuerte, amina cuaternaria) a reactores

agitados en lote donde se ejecutó la fermentación, es decir, la extracción se realizó *in-situ*. Los resultados del estudio demostraron un aumento en la producción de acetato, butirato, propionato e H<sub>2</sub> generados. Asimismo, la presencia de la resina dentro del fermentador evitó la acidificación del medio de cultivo (Kidanu et al., 2017). Es notorio como la mayor parte de los trabajos que utilizan resinas de intercambio iónico para remoción de ácidos carboxílicos se enfocan en el empleo de la técnica posterior a la producción de dichos ácidos, ya sea en medios de fermentación o incluso en soluciones sintéticas (Eregowda et al., 2020). Sin embargo, son pocos los estudios que abordan la extracción de ácidos carboxílicos durante el proceso fermentativo, especialmente en la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura.

**Tabla 2.** Principales estudios donde se utilizan resinas de intercambio iónico para la extracción de ác. carboxílicos presentes en medios de fermentación.

Resina	Tipo de resina	Grupo funcional	Compuesto Removido y porcentaje de remoción	Fase líquida	Ácidos carboxílicos encontrados en la fase líquida y concentración	Referencia
Amberlyst A21	Base débil en forma libre, macroporosa	Amina terciaria	Acetato, 15% Propionato, 18% Isobutirato, 22% Butirato, 24% Valerato, 40%	Efluente proveniente de la fermentación anaerobia de desechos de la industria vinícola	Acetato, 11.4 g/L Propionato, 0.9 g/L Isobutirato, 0.8 g/L Butirato, 5.3 g/L	(Rebecchi et al., 2016)
Sepra SAX	Base fuerte en forma de Cl <sup>-</sup> , gel	Amina cuaternaria	Acetato, 3%			
Lewatit VP OC 1065	Base débil en forma libre, macroporosa	Amina primaria	Acetato, N.R. Lactato, N.R. Propionato, N.R. Butirato, N.R.	Solución sintética compleja, análoga a la composición de aguas residuales fermentadas	Acetato, 2.5- 10.25 g/L Lactato, 2.5- 10.25 g/L Propionato, 2.5- 10.25 g/L Butirato, 2.5- 10.25 g/L	(Reyhanitash et al., 2017)
Amberlite IRA96 RF	Base débil en forma libre, macroporosa	Amina secundaria	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , N.R. HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , N.R. Cl <sup>-</sup> , N.R. SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , N.R.			
Amberlite IRA96 SB	Base débil en forma libre, macroporosa	Amina terciaria				
Lewatit VP OC 1064 MD PH	No iónico, macroporosa	No funcionalizada	Acetato, N.R. Lactato, N.R. Propionato, N.R. Butirato, N.R.			

**Tabla 2.** Principales estudios donde se utilizan resinas de intercambio iónico para la extracción de ác. carboxílicos presentes en medios de fermentación.

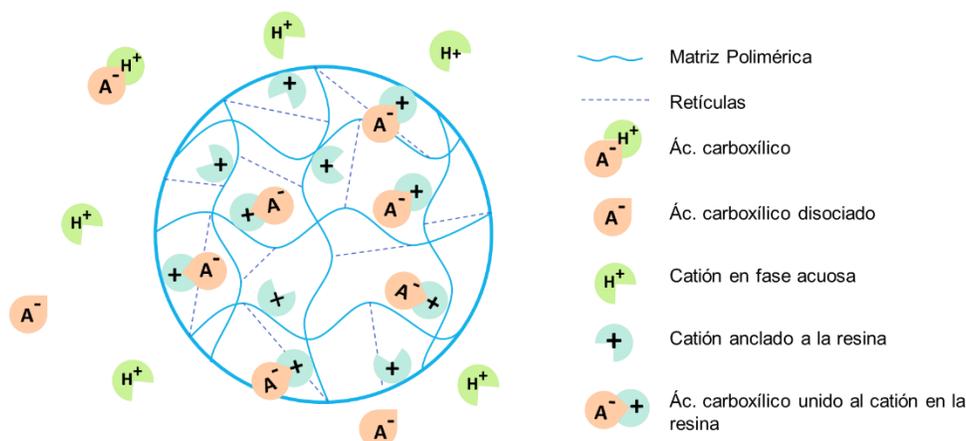
Resina	Tipo de resina	Grupo funcional	Compuesto Removido y porcentaje de remoción	Fase líquida	Ácidos carboxílicos encontrados en la fase líquida y concentración	Referencia
Dowex Marathon MSA	Base fuerte en forma de Cl <sup>-</sup> , macroporosa	Amina cuaternaria	Acetato, 4.9% Butirato, 5.0% Isovalerato, 1.1% Valerato, 7.6% Hexanoato, 9.6% Heptanoato, 11.9%	Efluente proveniente de la fermentación anaerobia de desechos orgánicos	Acetato, 1.8 g/L Butirato, 1.2 g/L Isovalerato, 1.3 g/L Valerato, 1.0 g/L Hexanoato, 1.9 g/L Heptanoato, 0.8 g/L	(Fernando-Foncillas et al., 2021)
Amberlite IRA67	Base débil en forma libre, gel	Amina terciaria	Acetato, 73.5% Lactato, 72.1% Butirato, 77.16%	Efluente proveniente de la fermentación anaerobia de desechos alimenticios	Acetato, 2.9 g/L Lactato, 11.7 g/L Butirato, 6.6 g/L	(Yousuf et al., 2016)
Amberlite IRA400	Base fuerte en forma de Cl <sup>-</sup> , macroporosa	Amina cuaternaria	Acetato, N.R. Propionato, N. R. Butirato, N. R.	Medio de cultivo en la fermentación oscura de biomasa microalgal	Acetato, N. R. Propionato, N. R. Butirato, N. R.	(Kidanu et al., 2017)
Amberlite FPA53	Base débil en forma libre, gel	Amina terciaria	Acetato, 76.4%	Medio de cultivo en la fermentación de H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetato, 10.22 g/L	(Karekar et al., 2020)
Amberlite IRA67	Base débil en forma libre, gel	Amina terciaria	Lactato, 59.1%	Medio de cultivo en la fermentación de glucosa	Lactato, 157.9 g/L	(Boonmee et al., 2016)

N.R.: No reportado

## 2.2.2 Mecanismo de intercambio iónico

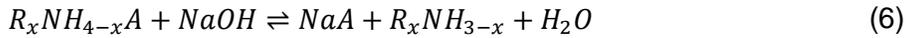
El intercambio iónico es una técnica utilizada principalmente en tratamiento de aguas para la remoción de iones disueltos que causan problemas estéticos o a la salud (e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). El proceso es llevado a cabo en resinas orgánicas sintéticas, las cuales son esferas compuestas de una matriz polimérica que puede presentar retículas; anclados a la matriz sólida se encuentran grupos funcionales homogéneos encargados de realizar el intercambio (Critten et al., 2014).

En el caso de la remoción de ácidos carboxílicos el intercambio iónico se basa en la formación de un enlace iónico entre el ácido ionizado en solución acuosa y el catión del grupo funcional anclado en la resina (Eregowda et al., 2020), tal como se muestra en la Figura 2. Al existir una cantidad finita de cationes en la resina eventualmente todos los grupos funcionales se encontrarán unidos a un ácido carboxílico, saturando la resina y terminando con el proceso de intercambio iónico. La resina puede regenerarse químicamente con una solución básica que libere a los ácidos carboxílicos del catión al que estaban unidos (López-Garzón and Straathof, 2014).



**Figura 2.** Remoción de ácidos carboxílicos en una resina de intercambio iónico. En la fase acuosa se encuentran las distintas especies de ácidos carboxílicos, al entrar en contacto con la resina sólo los ácidos carboxílicos ionizados (carga negativa) serán afines al catión de la resina y permanecerán unidos a la misma. Adaptado de Critten et al., 2014

Con base en reportes previos (Tabla 2), se afirma que las resinas de base débil, es decir, aquellas cuyo catión es una amina primaria, secundaria o terciaria son aptas para la remoción de ácidos carboxílicos de cadena corta. El mecanismo de intercambio iónico y posterior desorción de ácidos carboxílicos utilizando resinas funcionalizadas con grupos amina se muestra en las ecuaciones 3, 4, 5, y 6 (Rebecchi et al., 2016):



Donde AH es el ácido carboxílico, A<sup>-</sup> el ácido carboxílico disociado R<sub>x</sub>NH<sub>3-x</sub> el grupo amina desprotonado, R<sub>x</sub>NH<sub>4-x</sub><sup>+</sup> el grupo amina protonado y R<sub>x</sub>NH<sub>4-x</sub>A el ácido carboxílico unido a la amina. El valor de x es asignado dependiendo del tipo de amina utilizada, con x=1 para una amina primaria, x=2 para una amina secundaria y x=3 para una amina terciaria.

### 2.2.3 Factores que afectan el proceso de intercambio iónico

El desempeño del proceso de intercambio iónico depende de la resina utilizada y las condiciones de pH, temperatura y tiempo de contacto (Eregowda et al., 2020; Yousuf et al., 2016). Para la selección de la resina se deben de tomar en cuenta sus propiedades físicas entre las que se incluyen la estabilidad, densidad, humedad e hinchamiento. Igualmente es necesario considerar factores como la capacidad de intercambio y selectividad de la resina (Critten et al., 2014).

La capacidad de intercambio iónico se define como la cantidad de contraiones que pueden ser intercambiados en condiciones específicas y depende directamente de la cantidad de grupos funcionales que existen en la matriz polimérica de la resina. Típicamente las resinas de base débil presentan capacidades entre 1 a 1.8 mEq/mL expresadas en términos de volumen de resina húmedo, sin embargo, los valores pueden cambiar dado a que los grupos funcionales de estas resinas se ionizan en función del pH (Critten et al., 2014).

La preferencia de la resina para el realizar el intercambio con ciertos iones en solución es llamada selectividad. Cuestiones físicas como la distribución del tamaño de poro y los grupos funcionales de la resina impactan en la selectividad de esta. Adicionalmente es necesario tomar en cuenta la naturaleza química de los iones o moléculas orgánicas en solución acuosa; factores como su tamaño, valencia y electronegatividad determinan las especies químicas que realizarán el intercambio (Critten et al., 2014; Reyhanitash et al., 2017).

De acuerdo con lo anterior, es posible afirmar que una de las principales limitantes técnicas para el uso de procesos de intercambio iónico en efluentes complejos, donde los subproductos vienen acompañados de sales disueltas y sustrato remanente, es la presencia de otros aniones que puedan competir con los ácidos carboxílicos por el grupo funcional de la resina. Sin embargo es necesario añadir sales a base de cloruros o fosfatos como fuente de macro y micronutrientes para los microorganismos que realizan la fermentación, resultando en altas concentraciones de iones cloro disueltos en la fase acuosa (Davila-Vazquez et al., 2011; Montoya-Rosales et al., 2020).

Reyhanitash y colaboradores (2017) esbozaron el efecto de tener aniones disueltos en soluciones sintéticas de ac. carboxílicos análogas a un agua residual fermentada; las soluciones fueron tratadas con resinas funcionalizadas con aminas (Tabla 2), resultando en una disminución en la capacidad de intercambio de ácidos carboxílicos de las resinas, debido a la adsorción de los aniones cloro, sulfato y fosfato en la resina. De acuerdo con el tamaño molecular, valencia y electronegatividad el ion  $\text{Cl}^-$ , las resinas de base débil presentan mayor selectividad por el  $\text{Cl}^-$  que por los ácidos carboxílicos, explicando los resultados anteriores.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

Los métodos convencionales de producción de energía implican tanto el uso de combustibles fósiles como la liberación de gases de efecto invernadero. En la actualidad, se investigan y desarrollan alternativas sostenibles para suplir la demanda energética global. Una alternativa son los biocombustibles como el  $\text{H}_2$  obtenido mediante la fermentación oscura de residuos orgánicos. A pesar de la gran cantidad de reportes de fermentación oscura, los rendimientos experimentales de producción de  $\text{H}_2$  permanecen lejanos a los valores teóricos. Lo cual puede atribuirse a una serie de factores de entre los que destaca la inhibición por acumulación de productos solubles de la fermentación (ácidos carboxílicos).

Una potencial solución para mitigar la inhibición mencionada consiste en el uso de sistemas extractivos de ácidos carboxílicos durante la fermentación, utilizando resinas de intercambio iónico. El uso de dichas resinas presenta ventajas en comparación con otras técnicas, debido a su baja demanda energética y fácil recuperación de los ácidos carboxílicos removidos. Asimismo, varios estudios han demostrado la factibilidad de la extracción de ácidos carboxílicos en efluentes reales mediante el uso de resinas de intercambio iónico. Sin embargo, aún existe una brecha de conocimiento en la aplicación de esta técnica en

sistemas de fermentación extractiva, considerando las interferencias ocasionadas por la complejidad de la fase líquida generada.

Con base en lo anterior en este trabajo se abordaron tres aspectos principales: I) la disminución de sales en el medio de fermentación para evitar la competencia por los sitios activos de las resinas de intercambio iónico, II) la selección de una resina de intercambio iónico óptima para la extracción de ácidos carboxílicos en efluentes de fermentación oscura y III) la implementación de un sistema extractivo de ácidos carboxílicos a un reactor de fermentación oscura en lote acoplado una columna empacada con la resina seleccionada.

#### **4 HIPÓTESIS**

Se plantea que el uso de sistemas extractivos de ácidos carboxílicos durante la fermentación oscura conducirá a un aumento de la producción de  $H_2$  y ácidos carboxílicos. Esto se atribuye a la disminución en la concentración de ácidos carboxílicos en la fase líquida de la fermentación, lo cual amortigua los procesos de inhibición por producto y conduce cambios metabólicos en el consorcio.

#### **5 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el uso de sistemas extractivos de ácidos carboxílicos como estrategia para incrementar la coproducción de  $H_2$  y ácidos carboxílicos en la fermentación oscura.

##### **5.1 Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la disminución en la concentración de aniones en el medio de cultivo de la fermentación oscura en la producción de  $H_2$  y ácidos carboxílicos.
- Seleccionar una resina de intercambio iónico adecuada para la remoción de ácidos carboxílicos en un efluente real, con base en la capacidad de intercambio iónico de tres resinas diferentes.
- Determinar el efecto de los aniones disueltos en el proceso de intercambio iónico en un efluente real
- Mitigar la inhibición por producto en la fermentación oscura, acoplado una columna de intercambio iónico a un reactor productor de  $H_2$  en lote para la extracción simultánea de ácidos carboxílicos.
- Esbozar los cambios metabólicos causados por la implementación de sistemas extractivos de ácidos carboxílicos en la fermentación oscura

## 6 METODOLOGÍA

### 6.1 Fuente de inóculo, sustrato y medio mineral

Como inóculo se utilizó lodo granular proveniente de un reactor UASB que trata aguas residuales de la industria tequilera de “Casa Herradura” (Amatitán, Jalisco, México). El lodo fue sometido a un tratamiento térmico (105°C, 24 h) con el fin de seleccionar a los microorganismos formadores de esporas y eliminar a las *archaea* metanogénicas (Moreno-Andrade et al., 2015). Posteriormente, se disminuyó el tamaño de partícula en un molino de bolas hasta alcanzar una textura similar a polvo equivalente a malla #20 (850 µm). Finalmente, el lodo tratado fue caracterizado en términos de sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) con un valor de 0.90 g SV/g ST.

Para todos los ensayos de fermentación oscura se utilizó como sustrato suero de leche en polvo (Chilchota Alimentos S.A. de C.V., México) el cual contiene 0.76 g lactosa/ g suero y 1.01 g demanda química de oxígeno (DQO)/g suero. Asimismo, el medio mineral utilizado consistió en dos soluciones con la siguiente composición (Montoya-Rosales et al., 2020): solución amortiguadora (mg/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.125;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.635; solución de macro y micronutrientes (mg/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2100;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 100;  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.25;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 7;  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 19.1;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 102.5.

### 6.2 Resinas de intercambio iónico y acondicionamiento

Se probaron las resinas de intercambio iónico Purolite A110, Purolite A845 y Purosorb 950 todas adquiridas de Purolite S de R.L.de CV, EUA (Tabla 3). Previo a su uso, todas las resinas fueron hidratadas con agua miliQ a temperatura ambiente (25°C) durante 24 h.

Adicionalmente, en determinados ensayos la resina A110 fue acondicionada para evitar la presencia de aire dentro de los poros. El acondicionamiento consistió en cubrir la resina con agua miliQ a 95°C durante 20 minutos y posteriormente permaneció en incubación a una temperatura de 37°C con agitación orbital de 100 rpm por 24 h.

Complementario a los datos facilitados por el proveedor, se obtuvo la distribución de cargas de la resina A110 utilizando una tituladora automática Metler Toledo (PL 70). Se colocaron 100 mg de resina en 50 mL de agua desionizada en agitación por 20 h. Posteriormente, se ejecutó la titulación con NaOH 0.1 M en una atmósfera de  $\text{N}_2$  para evitar interferencias por  $\text{CO}_2$  y los iones liberados fueron calculados de acuerdo a lo reportado por Arcibar-Orozco (2013). Además, se realizó un experimento blanco sin la adición de resina.

**Tabla 3.** Especificaciones de las resinas de intercambio iónico probadas

<b>Resina de intercambio iónico</b>	<b>A110</b>	<b>A845</b>	<b>PAD 950</b>
Tipo de resina	Base débil libre, macroporosa	Base débil libre, gel	Adsorbente, macroporosa
Estructura del polímero	Poliestireno reticulado con divinilbenceno	Poliacrílico reticulado con divinilbenceno	Acrílico
Tamaño de partícula	300-1200	300-1200	350-1200
Tamaño/volumen de poro	20-100 nm	1-2 nm	0.6 mL/g
Área superficial (mínimo)	-	-	450 m <sup>2</sup> /g
Macro y meso poroso d50 (mínimo)	-	-	130 Å
Grupo funcional	Amina primaria	Amina terciaria	No iónico
Contra ion	-	-	-
Capacidad de intercambio total	2 eq/L (43.7 Kgr/ft <sup>3</sup> )	1.6 eq/L (35.0 Kgr/ft <sup>3</sup> )	-

### 6.3 Efecto de la concentración del medio mineral en la fermentación oscura

Con el propósito de disminuir la concentración de aniones (cloruros y fosfatos) que puedan interferir con el intercambio iónico de ácidos carboxílicos, se probaron distintas diluciones del medio mineral mencionado en la sección 6.1. Se realizaron ensayos de fermentación oscura en sistemas en lote y en continuo, buscando la dilución del medio mineral que no comprometiera la producción de H<sub>2</sub> y ácidos carboxílicos.

#### 6.3.1 Ensayos en lote

Se llevaron a cabo experimentos en lote de fermentación oscura con censado continuo de H<sub>2</sub> en el equipo Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II, Bioprocess Control, Suecia) adaptando el protocolo establecido por la Red Latinoamericana de BioH<sub>2</sub> (Carrillo-Reyes et al., 2019). Se utilizaron reactores con agitación mecánica individual con un volumen de operación de 0.36 L y 0.24 L de espacio de cabeza. Los experimentos se incubaron a 37 °C con agitación mecánica a 120 rpm, sin control de pH.

La concentración de sustrato inicial fue de 5 g<sub>lactosa</sub>/L de suero de leche en todos los ensayos, añadiendo el inóculo en una relación de sustrato/inóculo de 2.7 g sustrato/g SV, posteriormente el pH inicial fue ajustado a 7.5 con NaOH 5 M. Finalmente se desplazó el

espacio de cabeza con un flujo de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (20:80, v/v) durante 1 min. La Tabla 4 muestra el arreglo experimental utilizado.

**Tabla 4.** Resumen del arreglo experimental para evaluar el efecto de la concentración del medio mineral en la producción de H<sub>2</sub> y ácidos carboxílicos en lote.

Experi- mento	Solución amortiguadora (g/L)		Macro y micronutrientes (mg/L)					Fuerza iónica inicial* (mol/L)	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	CuCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	FeCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O		NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O
F0	Control positivo, medio mineral reportado por Carrillo-Reyes et al. (2019)								0.046
F1	0.125	0.635	2100	100	1.25	7	19.1	102.5	0.054
F2	0.0125	0.0635	2100	100	1.25	7	19.1	102.5	0.047
F3	-	-	2100	100	1.25	7	19.1	102.5	0.046
F4	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0

\*Fuerza iónica calculada con el software Visual MINTEQ, tomando en cuenta la concentración inicial de sales provenientes del medio mineral en las condiciones de pH inicial (7.5) y temperatura de fermentación (37°C)

De acuerdo al criterio establecido por Carrillo-Reyes et al. (2019), los experimentos fueron detenidos cuando la curva de producción de H<sub>2</sub> se volvió asintótica. Al finalizar los ensayos se tomaron y prepararon muestras líquidas para determinar la concentración de azúcares totales por el método de fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956) y la concentración de ácidos carboxílicos (formiato, acetato, propionato, lactato y butirato) por electroforesis capilar (Davila-Vazquez et al., 2008a).

### 6.3.2 Ensayos en continuo

Los experimentos en continuo fueron llevados a cabo en un CSTR (Applikon modelo Z310210011) equipado con un controlador automático de agitación, pH y temperatura; el volumen de trabajo se mantuvo en 1 L con 0.3 L de espacio de cabeza. Antes de iniciar la operación, el espacio de cabeza fue desplazado con una mezcla de CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> (80:20 v:v) por 10 min para propiciar un ambiente anaerobio. El reactor arrancó operando en lote durante 24 h con una concentración de 15 g<sub>lactosa</sub>/L de lactosa, posteriormente se procedió a trabajar con una COV de 60 g<sub>lactosa</sub>/L-d y un TRH de 6 h. Se controlaron las condiciones de la

fermentación manteniendo la temperatura en 37°C, la agitación en 300 rpm y el pH en 5.8 (Montoya-Rosales et al., 2020). En la Tabla 5 se muestran las seis etapas de operación, producto de distintas variaciones del medio mineral mencionado en la sección 6.1 (etapa I).

Se cuantificó de manera continua la cantidad de gas producido mediante un sistema de desplazamiento de volumen y su composición fue determinada por cromatografía de gases (Montoya-Rosales et al., 2020). Por otra parte se tomaron muestras diarias del efluente obtenido del CSTR las cuales fueron caracterizadas DQO, sólidos suspendidos volátiles (SSV) por métodos estándar (APHA/AWWA/WEF, 2012), mientras que los carbohidratos se cuantificaron por el método de fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956) y la concentración de ácidos carboxílicos se determinó por electroforesis capilar (Davila-Vazquez et al., 2008a).

**Tabla 5.** Variaciones del medio mineral probadas en el CSTR para evaluar el efecto de la concentración del medio mineral en la producción de H<sub>2</sub> y ácidos carboxílicos

Etapa	Solución amortiguadora (g/L)			Macro y micronutrientes (mg/L)					Fuerza iónica* (mol/L)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	CuCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	FeCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	
I	0.125	0.635	2100	100	1.25	7	19.1	102.5	0.050
II	-	-	-	10	0.125	0.7	1.91	10.25	0.001
III	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0
IV	-	-	700	10	0.125	0.7	1.91	10.25	0.014
V	-	-	1000	10	0.125	0.7	1.91	10.25	0.020
VI	-	-	500	10	0.125	0.7	1.91	10.25	0.010

\*Fuerza iónica calculada con el software Visual MINTEQ, tomando en cuenta la concentración inicial de sales provenientes del medio mineral, en las condiciones de pH (5.8) y temperatura (37°C) dentro del reactor

El efluente generado durante las etapas III y IV del CSTR fue recolectado, caracterizado y centrifugado a 3200 rpm por 10 min (Montoya-Rosales et al., 2020) con la finalidad de separar la biomasa generada en la fermentación y poder trabajar con el efluente clarificado en la sección siguiente (sección 6.4).

#### **6.4 Intercambio iónico en un efluente de fermentación oscura: cinéticas, capacidades de intercambio iónico y regeneración de sitios activos.**

En esta sección se trabajó con los efluentes clarificados mencionado en el apartado anterior y las resinas de intercambio iónico de la sección 6.2. Las pruebas de intercambio iónico en efluentes de fermentación oscura consistieron en cinéticas de intercambio iónico de ácidos carboxílicos, determinación de las capacidades de intercambio (Q) y finalmente la regeneración de los sitios activos de las resinas. Antes de iniciar cualquier experimento de intercambio iónico se ajustó el pH del efluente clarificado a un valor de 5.5 - 5.8 para asegurar la afinidad de los ácidos carboxílicos por los grupos funcionales de las resinas (Rebecchi et al., 2016).

Se realizaron cinéticas de intercambio iónico con el objetivo de determinar el tiempo en que el proceso de intercambio llega al equilibrio, es decir, cuando la concentración de ácidos carboxílicos permanece sin cambio en la fase líquida del sistema. Los experimentos se llevaron a cabo en viales sacrificables que contenían 15 mL de efluente más 0.04 g resina/mL, los viales fueron incubados a 37 °C con agitación orbital a 125 rpm, tomando muestras líquidas en diferentes tiempos (5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min) de acuerdo con lo reportado por la literatura (Aviña-Galván, 2018). Se midió el pH de cada muestra, posteriormente fueron filtradas (0.22  $\mu\text{m}$ ) para determinar la concentración de ácidos carboxílicos y aniones disueltos ( $\text{Cl}^-$ ) por electroforesis capilar. Finalmente, se ajustó un modelo cinético de pseudo segundo orden a los datos experimentales (Eregowda et al., 2020).

En un experimento análogo, se colocaron 15 mL de efluente clarificado y una concentración de resina de 0.04 g/mL. Estos viales se incubaron a las condiciones mencionadas previamente hasta que el sistema alcanzara el equilibrio en un tiempo determinado por las cinéticas de intercambio iónico. Se tomaron muestras del punto final del intercambio y se cuantificó la concentración de ácidos carboxílicos y  $\text{Cl}^-$  en el medio líquido para determinar la capacidad de intercambio en condiciones específicas.

Para regenerar la resina, se colocaron viales con la cantidad de efluente y resina mencionadas, en las mismas condiciones de incubación. Una vez que el sistema alcanzó el equilibrio, se reemplazó la fase líquida por el mismo volumen (15 mL) de solución alcalina de regeneración. Los viales permanecieron en incubación durante 24 h y finalmente se midió concentración de ácidos carboxílicos en la solución alcalina.

#### **6.4.1 Selección de una resina adecuada para la remoción de ácidos carboxílicos de un efluente de fermentación oscura**

Con el propósito de seleccionar una resina de intercambio iónico adecuada para la remoción de ácidos carboxílicos en un efluente de fermentación oscura, se probaron individualmente las resinas mencionadas en la sección 6.2. Previo a su uso, todas las resinas (A110, A845 y PAD 950) fueron hidratadas en agua miliQ a temperatura ambiente durante 24 h. Los experimentos realizados consistieron en cinéticas, determinación de la capacidad de intercambio y regeneración de las resinas; siguiendo la metodología establecida en el apartado 6.4. Cabe aclarar que la fase líquida de este set de experimentos fue un efluente análogo al obtenido de la etapa III del CSTR (sin sales añadidas).

Utilizando la capacidad de intercambio total y para butirato como criterio, se eligió a la resina con mejores resultados para continuar trabajando en el resto de los ensayos de intercambio iónico y fermentación extractiva.

#### **6.4.2 Efecto del acondicionamiento de la resina A110**

La resina A110 fue sometida a un acondicionamiento para evitar la presencia de gas dentro de sus poros. Antes de cualquier ensayo de intercambio iónico, la resina fue cubierta con agua miliQ a 95°C, por 20 min, posteriormente permaneció en incubación a 37°C y 120 rpm durante 24 h. En este apartado se realizaron cinéticas y se determinó la capacidad de intercambio de acuerdo con lo planteado previamente (sección 6.4), utilizando el efluente de la etapa III del CSTR (sin sales añadidas).

#### **6.4.3 Regeneración de los sitios activos**

La regeneración de los sitios activos fue realizada acorde a lo mencionado en el apartado 6.4, con el efluente de la etapa III del CSTR y la resina A110 acondicionada. Se probaron por triplicado las siguientes soluciones de regeneración: NaOH 1M, NaOH 1M en EtOH al 70%, NaOH 0.1 M y NaOH 0.1 M en EtOH al 70% (Rebecchi et al., 2016).

#### **6.4.4 Efecto de las sales disueltas**

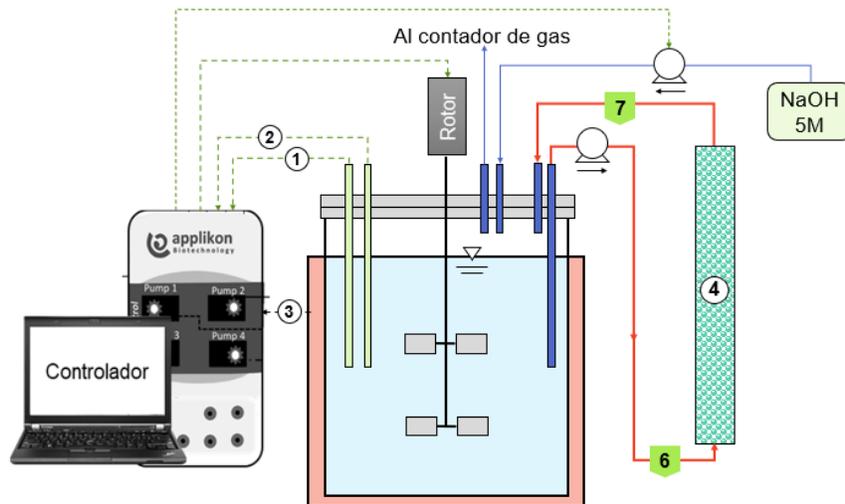
En este set de experimentos se comparó el uso del efluente de la etapa III (sin sales añadidas) con el efluente de la etapa IV (baja concentración de sales). Fueron llevadas a cabo cinéticas y la determinación de la capacidad de intercambio (sección 6.4), en ambos casos utilizando la resina A110 acondicionada.

## 6.5 Fermentación extractiva

Con el objetivo de obtener valores de referencia para el experimento de fermentación extractiva, se operó un reactor control de fermentación oscura en lote. El reactor (Applikon modelo Z310210011) se encontraba equipado con un controlador automático de agitación (300 rpm), pH (5.8) y temperatura (37°C); el volumen de trabajo fue de 1 L con 0.3 L de espacio de cabeza. Antes de iniciar la operación, el espacio de cabeza fue desplazado con una mezcla de CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> (80:20 v:v) por 10 min para propiciar un ambiente anaerobio. Se añadieron 15 g<sub>lactosa</sub>/L de suero de leche como sustrato manteniendo la relación de sustrato/inóculo de 2.7 g sustrato/g SV al agregar el lodo anaerobio. Asimismo, se utilizó el medio mineral de la etapa IV del CSTR (sección 6.3.2). Se cuantificó continuamente la cantidad de H<sub>2</sub> producido y se tomaron muestras líquidas durante todo el tiempo de fermentación. Las muestras fueron caracterizadas en azúcares totales, ácidos carboxílicos y Cl<sup>-</sup>, mientras que en el punto final se determinó la concentración de SSV.

Para el ensayo de fermentación extractiva, se empacó una columna con la resina A110 acondicionada en un volumen de cama vacía (BV) de 126.23 mL, al inicio de la operación la columna empacada fue llenada con agua miliQ. Posteriormente se montó un reactor similar al de control añadiendo una corriente de efluente hacia la columna, una vez que el efluente atravesaba la columna era recirculado al reactor, creando un sistema cerrado (Figura 3). Se ajustaron las concentraciones iniciales de sustrato y medio mineral al nuevo volumen de operación (1.126 L) que incluye el volumen del reactor y de la columna.

El flujo de entrada a la columna comenzó a las 8 h después de iniciada la fermentación manteniendo el tiempo de contacto de cama vacía (EBCT) en 30 min, la extracción de ácidos carboxílicos operó aproximadamente durante la fase exponencial y terminó en la hora 16 de fermentación. Se tomaron muestras líquidas a la entrada y salida de la columna, así como del fermentador y fueron analizadas de forma similar al experimento de control; asimismo se siguió la cinética de producción de H<sub>2</sub> del experimento. Al terminar el ensayo, la resina fue regenerada con NaOH 1M y los ácidos carboxílicos en la solución alcalina cuantificados. Cabe aclarar que los experimentos de esta sección (6.5) fueron realizados por duplicado.



**Figura 3.** Sistema de fermentación extractiva. (1) Sensor de pH, (2) sensor de temperatura, (3) chaqueta de calentamiento, (4) Columna empacada con la resina A110, (6) punto de muestreo del efluente del CSTR y (7) puntos de muestreo del efluente de la columna de intercambio iónico.

### 6.6 Análisis cinético de la producción de H<sub>2</sub> en lote

Para describir la cinética de producción de H<sub>2</sub> en lote se utilizó la ecuación de Gompertz modificada (Ec. 7). El modelo no lineal se ajusta al curso típico de producción acumulada de biogás, suponiendo que la curva de volumen acumulado de H<sub>2</sub> producido es análoga a la curva de crecimiento bacteriano (Kucharska et al., 2018).

$$H(t) = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{2.71828 R_{max}}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (7)$$

Donde H(t) es el volumen de H<sub>2</sub> acumulado (mL H<sub>2</sub>/L) dependiente del tiempo t (h), H<sub>max</sub> es el máximo volumen de H<sub>2</sub> acumulado (mL H<sub>2</sub>/L), R<sub>max</sub> es la tasa máxima de producción de H<sub>2</sub> (mL H<sub>2</sub>/L·h) y λ es el tiempo de la fase de latencia (h). Los parámetros cinéticos H<sub>max</sub>, R<sub>max</sub> y λ se determinaron ajustando los datos experimentales y los estimados con el modelo de Gompertz mediante regresión no lineal utilizando la herramienta Solver de Microsoft Excel.

## 6.7 Análisis cinético de la remoción de ácidos carboxílicos en un efluente de fermentación oscura

Reportes previos confirman el uso del modelo cinético de pseudo segundo orden (Ec. 8) para describir la cinética de remoción de ácidos carboxílicos utilizando resinas de intercambio iónico de base débil (Eregowda et al., 2020). El modelo fue linealizado antes de realizar el ajuste a los datos experimentales (Ec. 9)

$$\frac{dq_t}{dt} = K_2(q_e - q_t)^2 \quad (8)$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{K_2 q_e} + \frac{1}{q_e} t = \frac{1}{h_0} + \frac{1}{q_e} t \quad (9)$$

Donde  $q_e$  es la concentración del adsorbato en el adsorbente en condiciones de equilibrio (mg/g),  $q_t$  la concentración del adsorbato en el adsorbente en cualquier punto del tiempo (mg/g),  $K_2$  es la constante de velocidad de segundo orden (mg/g-min) y  $h_0$  la velocidad de adsorción inicial ( $\text{min}^{-1}$ ). Los parámetros cinéticos  $K_2$  y  $h_0$  fueron calculados mediante regresión lineal en el software Microsoft Excel.

## 6.8 Métodos analíticos

La composición del gas producido se determinó con un cromatógrafo de gases equipado con un detector de conductividad térmica (GC, 6890N Network GC System, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) y una columna capilar Hayesep D (Alltech, Illinois, EUA). Se utilizó nitrógeno como gas acarreador. Las temperaturas del inyector, horno y detector se establecieron en 250, 60 y 250°C; respectivamente.

La concentración de ácidos carboxílicos y  $\text{Cl}^-$  se determinó utilizando un equipo de electroforesis capilar (Agilent 1600A, Waldbronn, Alemania) con un buffer aniónico (Agilent pH 12.1) y una columna capilar de sílice (Agilent, id = 50 mm, L = 80.5 cm, longitud efectiva = 72 cm). La temperatura y voltaje se ajustaron a 25 °C y -30 kV, respectivamente.

Las concentraciones de DQO, sólidos suspendidos volátiles y totales fueron determinadas por los métodos estándar (APHA/AWWA/WEF, 2012). Finalmente, la concentración de carbohidratos totales fue cuantificada por el método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956).

## 6.9 Cálculos

Para establecer diferencias significativas entre las capacidades de intercambio de las tres resinas probadas (sección 6.4.1) se llevó a cabo una prueba de análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un 95% de confianza ( $p < 0.05$ ) para determinar si existían diferencias

significativas entre utilizar una u otra resina. El análisis estadístico fue llevado a cabo en el software Microsoft Excel. Por otra parte, las ecuaciones utilizadas en este trabajo se engloban en la tabla 6

**Tabla 6.** Ecuaciones utilizadas en los ensayos de intercambio iónico y fermentación oscura

Ecuaciones	Variables
$C_{eqr} = C_o - C_{eq}$	
$Q = \frac{C_o - C_{eq}}{C_r}$	(1) $C_{eqr}$ = Concentración de adsorbato en la resina en condiciones de equilibrio
regeneración (%)	(2) $C_r$ = Concentración de resina
$= \left( 1 - \frac{C_{eqr} - C_{des}}{C_{eqr}} \right) \times 100$	(3) $C_{des}$ = Concentración de adsorbato en la solución de regeneración
$EBCT = \frac{BV}{Q_c}$	(4) Regeneración (%) = Porcentaje de sitios activos recuperados tras la regeneración de la resina
$VVPH = \frac{V_{H_2 \text{ producido}}}{(t)(V_r)}$	(5) $Q_c$ = Flujo hacia la columna empacada
$RMH = \frac{\text{mol de } H_2 \text{ producido}}{\text{mol de hexosa}_{\text{consumido}}}$	(6) $t$ = tiempo
$RMA = \frac{\text{mol de Acetato}_{\text{producido}}}{\text{mol de hexosa}_{\text{consumido}}}$	(7) $V_r$ = Volumen de reactor
$RML = \frac{\text{mol de Lactato}_{\text{producido}}}{\text{mol de hexosa}_{\text{consumido}}}$	
$RMB = \frac{\text{mol de Butirato}_{\text{producido}}}{\text{mol de hexosa}_{\text{consumido}}}$	
Acetato homoacetogenico	
$= \frac{2[Ace] + 2[But] - [Pro] - H_2}{6}$	
Acetato homoacetogenico (%)	
$= \frac{\text{Acetato homoacetogenico}}{\text{Acetato total}} \times 100$	

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Efecto de la concentración del medio mineral en la fermentación oscura

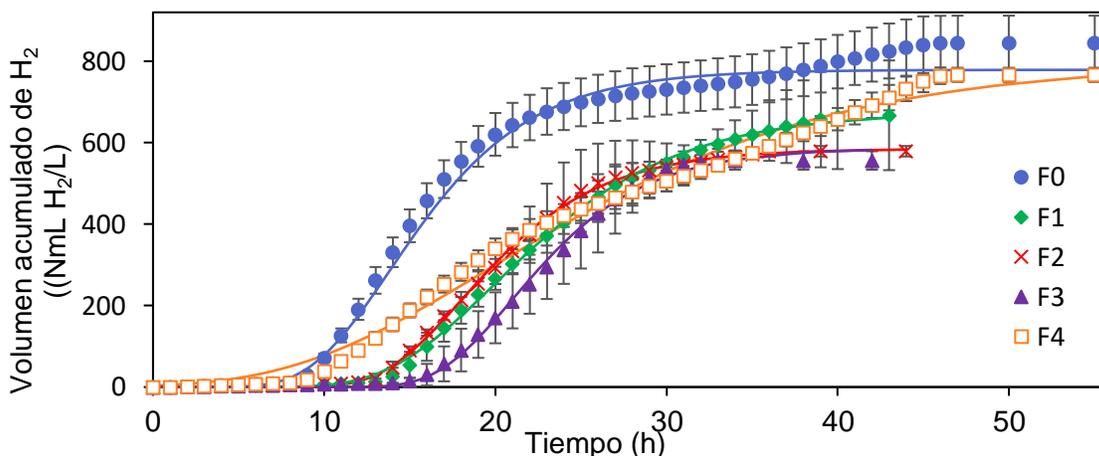
#### 7.1.1 Ensayos en lote

Los aniones presentes en la solución amortiguadora y la solución de nutrientes del medio mineral de la fermentación oscura, fosfatos y cloruros respectivamente, pueden interactuar con las aminas de las resinas de intercambio aniónico a probar y disminuir significativamente el rendimiento de la resina con respecto a la extracción de ácidos carboxílicos (Reyhanitash et al., 2017). Para mitigar esta competencia por los sitios activos, se probaron concentraciones diluidas de la solución amortiguadora en ensayos de fermentación oscura en lote con suero de leche en polvo como sustrato, con la finalidad de evaluar el efecto de la disminución o incluso eliminación de aniones en la producción de  $H_2$  y ácidos carboxílicos.

Junto con los experimentos donde se modifica la concentración del medio mineral propuesto por Montoya-Rosales (2020) (F1,F2,F3,F4), se colocó un control positivo (F0) utilizando el medio mineral específico del protocolo de la Red Latinoamericana de Bio $H_2$  (Carrillo-Reyes et al., 2019), todos los ensayos contenían la misma concentración de sustrato (5 g<sub>lactosa</sub>/L) e inóculo ( 2.35 g SV/L) y fueron llevados a cabo sin control de pH. Es importante mencionar que al término de los experimentos el pH disminuyó de 7.5 a aproximadamente 4 en todos los casos.

En la Figura 4 es posible observar como el control positivo (F0) presenta la mayor tasa máxima de producción de  $H_2$  ( $59.6 \pm 6.49$  NmL  $H_2$ /L-h) junto con un volumen acumulado de  $H_2$  de  $796.32 \pm 60.72$  NmL  $H_2$ /L. Estos resultados se pueden atribuir a que en la composición del medio mineral del control positivo (Carrillo-Reyes et al., 2019) se encuentra el compuesto MES (Ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico) en una concentración 0.1 M, el cual amortigua el pH dentro del rango de 5 y 7 con una capacidad amortiguadora de 0.014 M a un pH de 5. En contraste, la solución de fosfatos utilizada en los experimentos F1 (0.05 M) y F2 (0.005 M) amortigua el pH en el rango de 6 a 8 donde la capacidad buffer a pH 5 se aproxima a 0 en ambos casos. Por otra parte, se muestra que los experimentos F2 y F3 tienen comportamientos semejantes generando un volumen acumulado de  $H_2$  de  $607.03 \pm 29.67$  y  $590.79 \pm 25.49$  NmL  $H_2$ /L, infiriéndose que no hay una diferencia notable entre añadir la solución amortiguadora con una dilución 1:10 (F2) y no añadirla (F3). Lo anterior se debe a que la capacidad amortiguadora de la condición F2 se aproxima a cero durante todo el experimento. La condición donde no se añadió la solución amortiguadora ni la de

nutrientes (F4) presentó una fase de latencia ( $8.36 \pm 0.77$  h) similar al control positivo ( $8.66 \pm 0.49$  h), sin embargo, produjo 14.84 % más  $H_2$  que el experimento con el medio mineral sin dilución (F1) a pesar de tener la tasa de producción de  $H_2$  más lenta de este set de experimentos ( $25.87 \pm 1.87$  NmL  $H_2$ /L-h).



**Figura 4.** Cinética de producción de  $H_2$  utilizando diferentes concentraciones de medio mineral. (F0) control positivo, (F1) solución amortiguadora + solución de nutrientes, (F2) solución amortiguadora 1:10 + solución de nutrientes, (F3) solución de nutrientes sin solución amortiguadora, (F4) sin medio mineral. Las líneas continuas corresponden al modelo de Gompertz modificado, y los marcadores indican los datos experimentales.

En cuestiones de ácidos carboxílicos, fueron detectados acetato y butirato en todos los ensayos, mientras que sólo se encontró lactato en el control positivo (Tabla 7). El experimento F3 (solución de nutrientes sin solución amortiguadora) presentó los mejores rendimientos de acetato y butirato de este set de ensayos con un valor de  $0.38 \pm 0.04$  y  $0.32 \pm 0.11$  mol/mol hexosa respectivamente. Sin embargo, el rendimiento molar de  $H_2$  (RMH) obtenido fue de  $0.99 \pm 0.16$  mol  $H_2$ /mol hexosa, un 14.65 % menos que la condición F1 (solución amortiguadora sin dilución y solución de nutrientes).

Retomando los diferentes tipos de inhibición ocasionada por la acumulación de ácidos carboxílicos, se calculó la fuerza iónica en cada condición probada al inicio (Tabla 4) y al final de la fermentación (Tabla 7). En todos los casos la fuerza iónica disminuyó a la par que el pH, indicando que la inhibición no se atribuyó a un posible aumento en la fuerza iónica dentro del reactor. Al aproximarse el pH a 4 la especie protonada de los ácidos carboxílicos predomina, sugiriendo que en los experimentos en lote sin control de pH la inhibición es causada por el desbalance energético producto del ingreso de los ácidos carboxílicos no disociados a las células del consorcio microbiano.

Los resultados muestran que en los experimentos sin solución amortiguadora ni de nutrientes se obtiene un RMH de  $1.62 \pm 0.19$  mol H<sub>2</sub>/mol hexosa, es decir, un incremento del 39.63% del RMH con respecto al experimento F1 (solución amortiguadora sin dilución y solución de nutrientes), así como un rendimiento de butirato de  $0.29 \pm 0.12$  mol/mol hexosa, 10.34% más que el experimento F1. Con base en estos resultados, se concluye que la ausencia del medio mineral no compromete la producción de H<sub>2</sub> y ácidos carboxílicos en sistemas en lote, dando partida a las pruebas de dichas condiciones en cultivo en continuo.

**Tabla 7.** Parámetros del modelo de Gompertz y rendimientos molares correspondientes a los ensayos de fermentación oscura en lote, utilizando diferentes concentraciones de medio mineral

Experi- -mento	Remo- ción de sus- trato (%)	H <sub>max</sub> (NmL H <sub>2</sub> /L)	R <sub>max</sub> (NmL/ L-h)	λ (h)	RMH (mol H <sub>2</sub> / mol hexosa)	RMA (mol acetato/ mol hexosa)	RML (mol lactato/ mol hexosa)	RMB (mol butira- to/mol hexosa)	Fuerza iónica* (mol/L)
F0	93.5 ± 2.5	796.3 ± 60.7	59.6 ± 6.5	8.6 ± 0.5	1.4 ± 0.04	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.13	0.1 ± 0.04	0.001
F1	96.7 ± 0.1	700 ± 138.5	45.2 ± 8.8	13.9 ± 1.6	1.2 ± 0.2	0.2 ± 0.03	N. D.	0.3 ± 0.03	0.030
F2	96.8 ± 0.3	607 ± 29.7	49.3 ± 17.5	13.5 ± 1.3	1.0 ± 0.2	0.3 ± 0.04	N. D.	0.3 ± 0.1	0.026
F3	96.4 ± 0.2	590.8 ± 25.5	51.7 ± 7	16.9 ± 1.1	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.04	N. D.	0.3 ± 0.1	0.026
F4	79.6 ± 3.4	804.6 ± 82.4	25.9 ± 1.9	8.4 ± 0.8	1.6 ± 0.2	0.2 ± 0.07	N. D.	0.3 ± 0.1	0.003

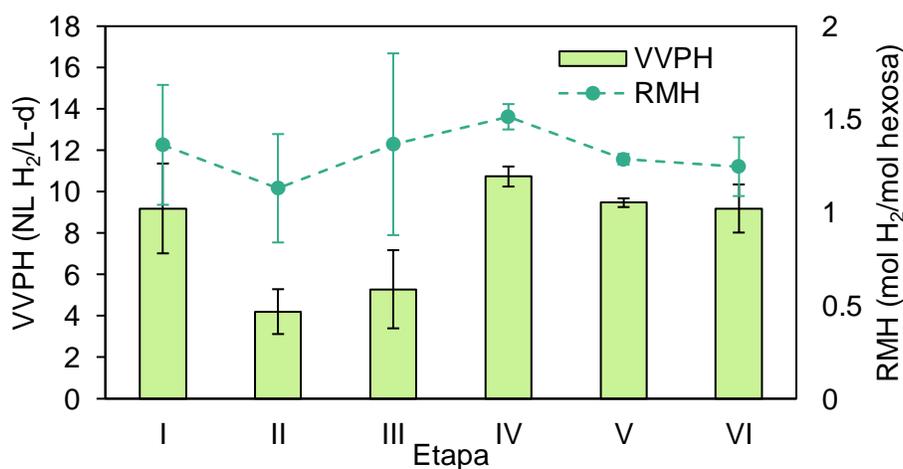
H<sub>max</sub>: volumen máximo de H<sub>2</sub> acumulado; R<sub>max</sub>: tasa máxima de producción de H<sub>2</sub>; λ: tiempo de la fase de latencia; RMH: Rendimiento molar de H<sub>2</sub>; RMA: Rendimiento molar de acetato; RML: Rendimiento molar de lactato; RMB: Rendimiento molar de butirato; N.D.: No detectado

\*Fuerza iónica a partir de las sales disueltas provenientes del medio mineral y los ácidos carboxílicos generados durante la fermentación, en el pH final del proceso

### 7.1.2 Ensayos en continuo

Se operó un reactor CSTR con una COV de 60 g<sub>lactosa</sub>/L-d y un TRH de 6h, ambos parámetros fueron establecidos para mantener la concentración de ácidos carboxílicos en un valor cercano al de referencia para las pruebas de intercambio iónico (Rebecchi et al., 2016). El objetivo del experimento fue evaluar el efecto de la disminución en la concentración de aniones en el medio de cultivo de la fermentación oscura en la producción de H<sub>2</sub> y ácidos carboxílicos en continuo, así como la recolección de efluente para pruebas de intercambio iónico posteriores.

El CSTR arrancó operando en lote por 24 h a 37 °C, 300 rpm y un pH de 5.8 con una concentración inicial de 15 g<sub>lactosa</sub>/L de suero de leche, el medio mineral de la etapa I (sección 6.1) y se adicionaron 4.5 g SV/L de inóculo tratado térmicamente (sección 4.1), una vez transcurridas 24 h se inició a operar en continuo con un flujo de entrada y salida de 0.167 L/h. Cada etapa tuvo una duración de 8 a 12 TRHs. En la etapa I se utilizó el medio mineral acorde a lo reportado (Montoya-Rosales et al., 2020), fungiendo como la etapa de control. Posteriormente se procedió a disminuir la concentración del medio mineral hasta eliminarlo por completo en la etapa III y, finalmente, se probó el efecto de añadir distintas concentraciones de cloruro de amonio como fuente de nitrógeno (etapas IV a VI). El desempeño del reactor se muestra en la Figura 5 y en la Tabla 8.



**Figura 5.** Desempeño del CSTR probando diferentes condiciones del medio mineral.

Es notorio como en la etapa III la velocidad volumétrica de producción de H<sub>2</sub> (VVPH) disminuye en un 42.43% en comparación con la etapa I, como consecuencia de retirar por completo los micronutrientes y la fuente de nitrógeno del sistema. Asimismo, el porcentaje de remoción de sustrato disminuye hasta el 51.9%, es decir, el consorcio microbiano dejó

de consumir sustrato y por tanto la producción de  $H_2$  y ácidos carboxílicos se vio comprometida (Tabla 8). La concentración total de ácidos carboxílicos cayó en un 64.08%, detectando lactato aparte de acetato y butirato, indicando la presencia de bacterias ácido-lácticas (Palomo-Briones et al., 2017).

En comparación con los resultados de los ensayos en lote sin medio mineral (sección 7.1.1), donde la fermentación se lleva cabo sin comprometer la producción de  $H_2$  y ácidos carboxílicos, llevar las mismas condiciones a un sistema en continuo tiene resultados contrastantes. Es probable que al existir una baja concentración inicial de sustrato ( $5 \text{ g}_{\text{lactosa}}/\text{L}$ ) en los reactores en lote, la biomasa generada pudo sustentarse con la cantidad mínima de minerales y proteína presentes en el suero de leche. Sin embargo, en el CSTR la concentración de sustrato es 3 veces mayor ( $15 \text{ g}_{\text{lactosa}}/\text{L}$ ) ocasionando que la concentración de biomasa en el reactor aumente a la par y necesite de nutrientes para su crecimiento, cuya cantidad es insuficiente en el suero de leche (Rittmann and McCarty, 2001).

Con base en los resultados de la etapa III, se corrobora la necesidad de tener una fuerte de nitrógeno y micronutrientes en el medio de fermentación. Con el propósito de evitar sobreestimaciones en la cantidad de nitrógeno requerida, fue calculada la masa necesaria de  $NH_4Cl$  en solución para sustentar la concentración de SSV (biomasa) en un valor estándar para las condiciones del CSTR (Palomo-Briones et al., 2018; Rittmann and McCarty, 2001) obteniendo un valor de  $1.01 \text{ g}_{NH_4Cl}/\text{L}$ . En las etapas IV a VI se prueban concentraciones por debajo de los  $1000 \text{ mg}_{NH_4Cl}/\text{L}$ , así como dicha concentración, añadiendo el resto de los micronutrientes en una dilución 1:10.

En la etapa IV se probó una dilución 1:10 de los micronutrientes del medio mineral más  $700 \text{ mg}/\text{L}$  de  $NH_4Cl$  obteniendo el valor de VVPH más alto en este experimento ( $10.74 \pm 0.48 \text{ L } H_2/\text{L-d}$ ). También se detectaron concentraciones de acetato y butirato superiores a las reportadas en la etapa I, con un porcentaje de remoción de sustrato del  $95.0 \pm 5.52 \%$ , sugiriendo que la dilución del medio mineral utilizada en la etapa IV no compromete la producción de  $H_2$  y ácidos carboxílicos.

Al igual que en la sección anterior, se calculó la fuerza iónica considerando la concentración de sales de cada etapa (Tabla 5) y posteriormente tomando en cuenta también la concentración de ácidos carboxílicos generados (Tabla 8). En este caso la fuerza iónica incremento con la producción de ácidos carboxílicos debido a que el pH se mantuvo

constante en 5.8 durante toda la operación del reactor, lo cual fomenta que la especie disociada de los ácidos carboxílicos predomine (Figura 6). Es decir, en un reactor con control de pH la inhibición es ocasionada por un aumento en la fuerza iónica producto de la acumulación de ácidos carboxílicos disociados.

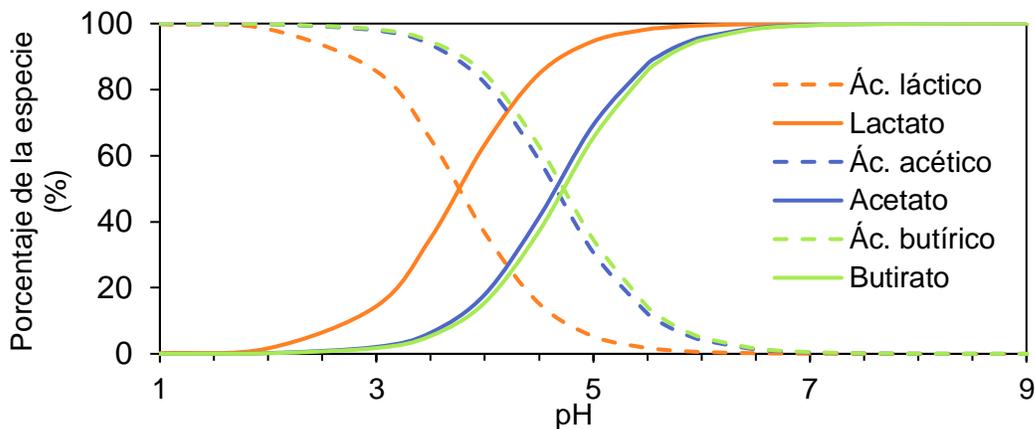
A pesar del desempeño de la fermentación, el efluente de la etapa III no contenía aniones provenientes del medio mineral, por tanto, fue recolectado para pruebas de intercambio iónico. Con base en los resultados obtenidos en la fermentación, también se almacenó el efluente proveniente de la etapa IV para experimentos posteriores.

**Tabla 8.** Resumen de los resultados obtenidos durante la operación del CSTR probando diferentes condiciones del medio mineral.

Etapa	Remoción de sustrato (%)	VVPH (LH <sub>2</sub> /L-d)	RMH (mol H <sub>2</sub> /mol hexosa)	Acetato (g/L)	Lactato (g/L)	Butirato (g/L)	Fuerza iónica* (mol/L)
I	90.4 ±	9.19 ±	1.36 ±	1.89 ±	N.D.	4.04 ±	0.066
	15.32	2.17	0.32	0.72		1.26	
II	49.9 ±	4.21 ±	1.13 ±	1.15 ±	N.D.	1.82 ±	0.019
	2.60	1.08	0.29	0.12		0.07	
III	51.9 ±	5.29 ±	1.37 ±	0.79 ±	0.67 ±	1.34 ±	0.021
	2.92	1.89	0.49	0.03	0.00	0.03	
IV	95.0 ±	10.74 ±	1.51 ±	2.03 ±	2.53 ±	3.61 ±	0.062
	5.52	0.48	0.07	0.30	0.69	0.60	
V	89.7 ±	9.47 ±	1.29 ±	1.58 ±	2.49 ±	3.35 ±	0.058
	0.50	0.21	0.03	0.18	0.21	0.58	
VI	98.8 ±	9.19 ±	1.25 ±	1.46 ±	2.06 ±	2.8 ±	0.052
	0.17	1.16	0.16	0.32	0.76	0.36	

VVPH: Velocidad volumétrica de producción de H<sub>2</sub>; RMH: Rendimiento molar de H<sub>2</sub>; N.D.: No detectado

\*Fuerza iónica calculada utilizando el software Visual MINTEQ tomando en cuenta las sales disueltas provenientes del medio mineral y los ácidos carboxílicos generados en cada etapa en las condiciones de pH (5.8) y temperatura (37°C) de la fermentación



**Figura 6.** Diagrama de especiación de los principales ácidos carboxílicos de cadena corta generados en la fermentación oscura

## 7.2 Intercambio iónico en un efluente de fermentación oscura: cinéticas, capacidades de intercambio y regeneración de los sitios activos

El efluente recolectado de las etapas III y IV en la sección 7.1.2 fue centrifugado a 3200 rpm por 10 min (Montoya-Rosales et al., 2020) para separar la biomasa generada en la fermentación. Tras la centrifugación la concentración de SSV disminuyó en un 78.26%. La finalidad de retirar la biomasa es amortiguar las interferencias que esta pueda causar en el proceso de intercambio iónico, considerando los poros de las resinas probadas. En todos los ensayos de intercambio iónico se trabajó con el efluente clarificado como fase líquida.

Antes de iniciar cualquier experimento de intercambio iónico se ajustó el pH del efluente clarificado a 5.5 - 5.8, debido a que estos valores se encuentran dentro del rango de pH de trabajo óptimo en un CSTR productor de H<sub>2</sub>. Asimismo, los pK<sub>a</sub>s de los ácidos carboxílicos a remover (pK<sub>a-acético</sub>=4.76, pK<sub>a-butírico</sub>=4.82, pK<sub>a-láctico</sub>=3.86) están por debajo de este pH, ocasionando que más del 90% de los ácidos carboxílicos se encuentre en su especie disociada afín a los grupos funcionales de las resinas a probar (Figura 6). Por otra parte, las resinas A110 y A845 se encuentran funcionalizadas con grupos amina, los cuales inician a desprotonarse en valores elevados de pH (pK<sub>a</sub> ≈10.6).

Los experimentos fueron planeados para acercarse lo más posible hacia las condiciones de operación reales (evitando interferencias), por ello la temperatura de incubación y el pH son los mismos que se utilizan en un CSTR, de la misma forma la concentración inicial de ácidos carboxílicos (C<sub>0</sub>) en los efluentes utilizados mantiene una relación acetato/butirato entre 0.4 - 0.6 acorde a los valores de referencia (Davila-Vazquez et al., 2008a; Ye et al., 2011).

### **7.2.1 Selección de una resina adecuada para la remoción de ácidos carboxílicos en un efluente de fermentación oscura**

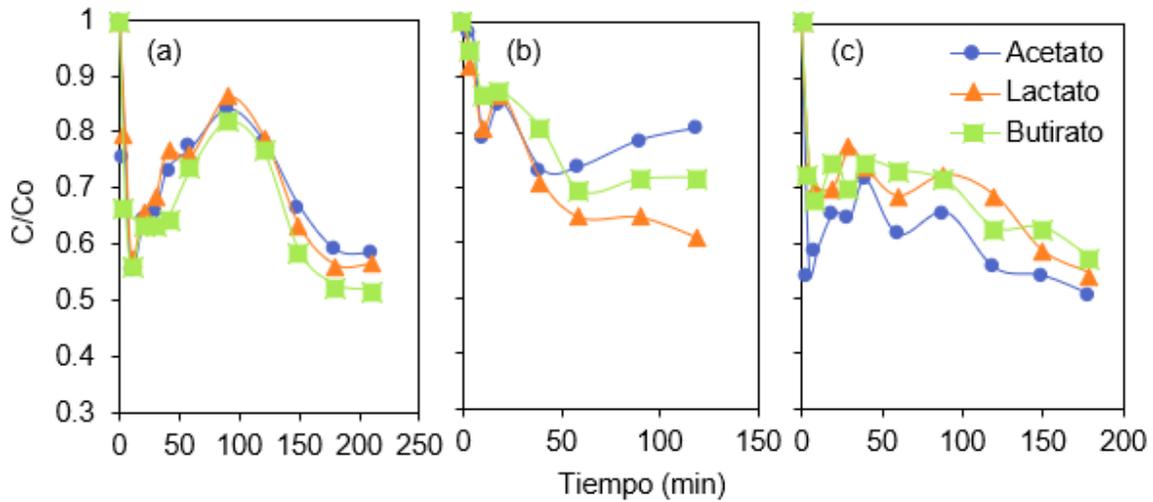
Se llevaron a cabo cinéticas de intercambio iónico en lote utilizando la misma concentración de resina en todos los experimentos y un efluente clarificado análogo al de la etapa III del CSTR (sin sales añadidas) para realizar comparaciones entre las 3 resinas sin interferencias. El objetivo de las cinéticas fue determinar el tiempo en que la concentración de ácidos carboxílicos en el fermentado deja de cambiar, es decir, cuando el proceso llega al equilibrio. Es importante mencionar que todos los experimentos del apartado 7.2.1 iniciaron en un pH de 5.5.

Tal como se mencionó en la sección 6.4, el seguimiento de la cinética se dio en los siguientes tiempos: 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min. En cada punto (incluyendo el tiempo 0,  $C_0$ ) se determinó la concentración de ácidos carboxílicos en el medio líquido. Para delimitar en que tiempo se llega al equilibrio, se estableció un criterio donde la desviación estándar de los últimos 3 puntos de la cinética debía de ser menor al 10%

El valor de  $C/C_0$  en la Figura 7 indica la fracción molar de ácidos carboxílicos remanentes en el efluente, es apreciable como las resinas A110 y PAD 950 alcanzan el estado de equilibrio en 3 y 2.5 h respectivamente mientras que la resina A845 puede llegar a esas condiciones en 1.5 h, cabe mencionar que la concentración de los tres ácidos carboxílicos detectados (acetato, lactato y butirato) deja de cambiar de manera simultánea. A pesar de que la resina A845 realiza el intercambio más rápido que el resto, sólo logra remover el 21.36% de los moles de acetato, 35.48% de lactato y el 28.43% de butirato. Caso contrario, la resina A110 presenta la mayor remoción de butirato (47.28%), dando indicios de cuál puede ser la resina con mejor desempeño.

Además, se realizó el ajuste de un modelo de pseudo segundo orden a los datos experimentales de la cinética con un valor de  $R^2$  mayor a 0.85 en todos los casos (Figura 8). Independientemente de la resina utilizada, la velocidad inicial de adsorción de acetato ( $h_0$ ) se mantuvo entre 0.8 a 0.1  $\text{min}^{-1}$ , coincidiendo con un comportamiento similar en el valor de  $h_0$  para lactato que en todos los casos se mantuvo entre 0.4 y 0.5  $\text{min}^{-1}$ . Sin embargo, en cuestiones de la velocidad inicial de adsorción de butirato, la resina A110 presenta el mejor desempeño (0.78  $\text{min}^{-1}$ ). Lo anterior puede atribuirse inicialmente a que el butirato se encuentra en mayor proporción en el efluente, lo que favorece el transporte

de la molécula dentro de la resina; asimismo, la estructura macroporosa de la resina facilita el paso del butirato a pesar de ser una molécula orgánica de 4 carbonos.



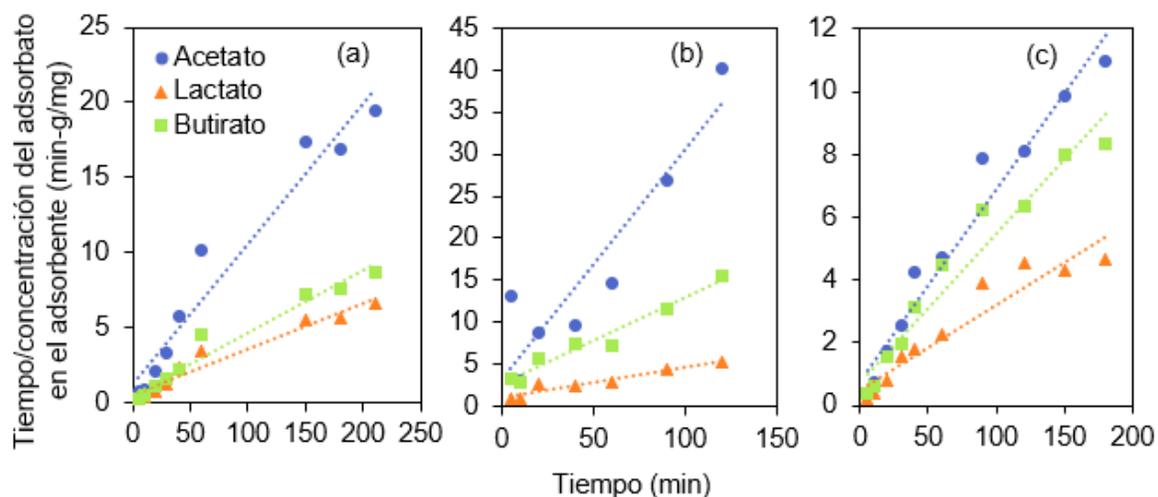
**Figura 7.** Cinéticas de intercambio iónico en un efluente de fermentación oscura: (a) resina A110, (b) resina A845 y (c) resina PAD 950

Es evidente que el valor de  $C/C_0$  presentado es inversamente proporcional a la concentración inicial de ácidos carboxílicos, es decir, cuanto mayor sea la concentración inicial menor será la fracción de ácidos carboxílicos removida. Debido a lo anterior es necesario obtener un valor normalizado que nos indique cuantos son los milimoles máximos de ácidos carboxílicos que puede remover una resina de intercambio iónico independientemente de la concentración inicial de ácidos carboxílicos, este parámetro es conocido como capacidad de intercambio.

El set de experimentos para determinar la capacidad de intercambio se llevó a cabo colocando viales por triplicado en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  y 125 rpm. Los viales contenían 15 mL del efluente clarificado (análogo etapa III CSTR) más 0.04 g/mL de resina, probando por separado cada una de las resinas. Los viales se dejaron incubando hasta llegar al estado de equilibrio, basándose en los tiempos obtenidos en las cinéticas y se tomaron muestras líquidas para cuantificar la concentración de ácidos carboxílicos en el punto final del proceso.

Para calcular la capacidad de intercambio iónico se realizó un balance de masa entre la concentración inicial y final de ácidos carboxílicos, normalizando entre los miliequivalentes de cada ácido y la cantidad de resina utilizada. Al obtenerse resultados similares entre las tres resinas, se llevó a cabo una prueba de análisis de varianza de un factor (ANOVA) con

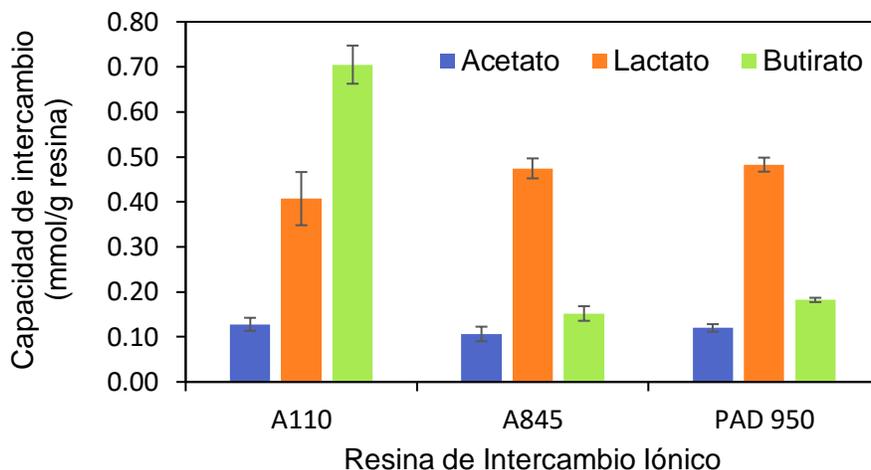
un 95% de confianza para determinar si existían diferencias significativas entre utilizar una u otra resina.



**Figura 8.** Ajuste del modelo de segundo orden a los datos experimentales de las cinéticas de intercambio iónico en un efluente de fermentación oscura: (a) Resina A110, (b) Resina 845, (c), Resina PAD 950

La capacidad de intercambio de acetato se encuentra en un rango de 0.11 a 0.13 mmol/g resina sin presentar diferencias significativas entre las tres resinas probadas ( $p=0.22$ ). De la misma forma la capacidad de intercambio de lactato se encuentra entre 0.41-0.48 mmol/g resina en todos los casos ( $p=0.9$ ) (Figura 9). En cambio, la capacidad de intercambio de butirato máxima alcanzada fue de  $0.70 \pm 0.12$  mmol/g resina utilizando la resina A110. En términos de capacidad total de intercambio la resina A110 presenta una capacidad total de intercambio de  $1.25 \pm 0.12$  mmol/g resina, representando un aumento del 60.25% y 71.24% en comparación con la resina PAD950 y A845, respectivamente. A partir de estos resultados se puede concluir que en cuestiones de capacidad de intercambio iónico la resina A110 tuvo el mejor desempeño.

Es importante mencionar que todas las muestras de los experimentos de intercambio iónico, incluyendo cinéticas y capacidades de intercambio, fueron analizadas para cuantificar la concentración de azúcares totales con el propósito de asegurar que la biomasa remanente en el efluente no estuviera activa al momento de la incubación de los viales a 37 °C. Conforme los resultados observados, la concentración promedio de azúcares se mantuvo constante en todos los casos, dando indicio también de que la lactosa del efluente no fue removida durante el proceso de intercambio iónico.



**Figura 9.** Capacidades de intercambio de las tres resinas probadas en un efluente de fermentación oscura.

La Tabla 9 contiene un resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de intercambio iónico. Con base en los valores obtenidos se seleccionó a la resina A110 (amina primaria) dado a que presentó la máxima capacidad de intercambio iónico total ( $1.25 \pm 0.12$  mmol/g resina), así como para butirato ( $0.70 \pm 0.12$  mmol/g resina), lo cual es especialmente conveniente en los sistemas de fermentación oscura en continuo donde generalmente se produce butirato en mayor proporción que otros ácidos carboxílicos, como acetato, lactato. (Palomo-Briones et al., 2018). En el resto de los experimentos posteriores, se trabajó con la resina A110, optimizando su desempeño en el proceso de intercambio iónico y esbozando el efecto de las interferencias de aniones, para finalmente utilizar esta resina en un sistema de fermentación extractiva.

**Tabla 9.** Resumen de los experimentos de intercambio iónico en un efluente de fermentación oscura (análogo etapa III) utilizando tres resinas diferentes.

Resina	Grupo funcional	Tiempo en llegar al equilibrio (min)	Q (mmol/L)			
			Acetato	Lactato	Butirato	Total
A110	Amina primaria	180	$0.13 \pm 0.01$	$0.41 \pm 0.06$	$0.70 \pm 0.12$	$1.25 \pm 0.12$
A845	Amina terciaria	90	$0.11 \pm 0.02$	$0.47 \pm 0.02$	$0.15 \pm 0.02$	$0.73 \pm 0.05$
PAD 950	No iónico	150	$0.12 \pm 0.01$	$0.48 \pm 0.02$	$0.18 \pm 0.00$	$0.78 \pm 0.01$

### 7.2.2 Efecto del acondicionamiento de la resina A110

A partir de esta sección se cuantificó la concentración de  $\text{Cl}^-$  en solución acuosa para llevar un control de los sitios activos ocupados por dicho anión. Por otra parte, el pH de los experimentos fue ajustado a un valor de 5.8 para asegurar la afinidad de los ácidos carboxílicos por la resina. También se midió el pH de cada muestra como valor de referencia de la remoción de ácidos carboxílicos, teóricamente el valor de pH debería de incrementar conforme los ácidos carboxílicos realizan el intercambio con el grupo funcional de la resina.

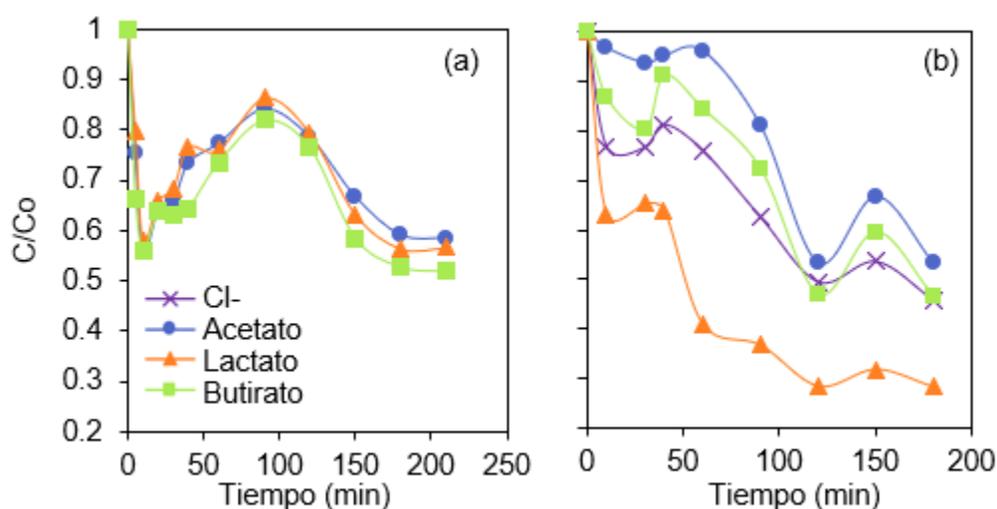
En experimentos anteriores, se utilizó la resina A110 hidratada (24 h, temperatura ambiente) para realizar cinéticas de intercambio en un efluente análogo al de la etapa III. Si bien se logró la remoción de ácidos carboxílicos, el comportamiento de la cinética presentó una rápida adsorción y un posterior incremento en la concentración de ácidos carboxílicos en el medio líquido, para una final adsorción cuando se llega al equilibrio del proceso (Figura 10-a). Lo anterior se puede atribuir a la presencia de gas en los poros de la resina, el cual puede ser liberado sometiendo a la resina a un acondicionamiento antes de utilizarla.

La resina A110 fue cubierta con agua miliQ a  $95^\circ\text{C}$  para retirar el gas remanente en los poros. Posteriormente se hidrató la resina en incubación a  $37^\circ\text{C}$  y 100 rpm durante 24 h (sección 6.2). Cabe recalcar que en este set de experimentos se trabajó sólo con el efluente clarificado de la etapa III para evitar las interferencias de sólidos disueltos y de aniones añadidos en el medio mineral.

Tal como se mencionó en la sección 6.4, el seguimiento de la cinética se dio en los siguientes tiempos: 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min. En cada punto (incluyendo el tiempo 0,  $C_0$ ) se determinó la concentración de ácidos carboxílicos y aniones en el medio líquido. Asimismo, se midió el pH a todas las muestras. Para delimitar en que tiempo se llega al equilibrio, se estableció un criterio donde la desviación estándar de los últimos 3 puntos de la cinética debe de ser menor al 10%, tomando en cuenta la concentración de ácidos carboxílicos y  $\text{Cl}^-$ .

El valor de  $C/C_0$  en la Figura 10 indica la fracción molar de ácidos carboxílicos remanentes en el efluente. Es apreciable como al acondicionar la resina se mitiga el comportamiento de adsorción-desorción-adsorción mencionado al inicio de esta sección, sugiriendo que el gas dentro de los poros de la resina fue liberado antes del inicio del experimento. Por otra parte,

al utilizar la resina acondicionada el proceso de intercambio iónico llega al equilibrio en 2.5 h, 30 min antes que en el ensayo sin acondicionamiento (3 h). En cuestiones de ácidos carboxílicos el acetato y butirato son removidos en fracciones similares en ambos experimentos, mientras que con la resina acondicionada el lactato es extraído prácticamente en su totalidad ( $C/C_0 = 0.3$ ); esto se puede atribuir a la baja concentración inicial de lactato en el experimento con resina acondicionada. También es posible observar que a pesar de que el efluente de la etapa III no contenía sales añadidas, existen aniones  $Cl^-$  en solución provenientes del agua utilizada para preparar la alimentación del reactor CSTR del cual proviene el efluente. En la Figura 10-b se muestra como aproximadamente la mitad de los iones  $Cl^-$  son removidos, dado a que también son afines a la amina primaria protonada del sitio activo de la resina.



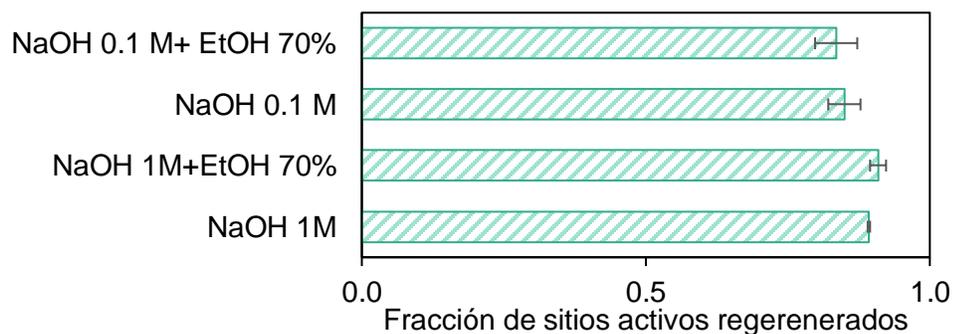
**Figura 10.** Efecto del acondicionamiento de la resina A110. Se muestran las cinéticas de intercambio iónico utilizando la resina A110: (a) sin acondicionar, (b) acondicionada

### 7.2.3 Regeneración de los sitios activos

Una de las ventajas que ofrece el uso de resinas de intercambio iónico es la fácil recuperación de los compuestos removidos, así como la regeneración de los grupos funcionales de la resina lo cual permite volver a utilizar el material. Lo anterior se realiza químicamente mediante la adición de una solución de regeneración cuya composición depende de la naturaleza de la resina a regenerar. En el caso de las resinas funcionalizadas con grupos amina, dicha solución debe de tener un pH elevado (14) para que el grupo amina pierda su carga positiva y deje de ser afín a los ácidos carboxílicos disociados y/o a los aniones en solución, generalmente se utilizan soluciones de NaOH (López-Garzón and Straathof, 2014).

La regeneración de los sitios activos se llevó a cabo por triplicado, colocando 15 mL de efluente clarificado de la etapa III más 0.04 g resina/mL (A110, acondicionada) en viales que fueron incubados hasta llegar al equilibrio de acuerdo con las condiciones descritas en la sección 6.4, posteriormente se retiró por completo la fase líquida y se determinó la concentración de ácidos carboxílicos en esta. La resina de intercambio iónico se mantuvo dentro del vial, el cual fue llenado nuevamente con 15 mL de solución básica para liberar los ácidos carboxílicos de los sitios activos y así regenerar la resina, los viales se incubaron nuevamente por 24 h para asegurar la desorción. Se probaron cuatro soluciones de regeneración: NaOH 1M, NaOH 1M en EtOH al 70%, NaOH 0.1 M y NaOH 0.1 M en EtOH al 70% (Rebecchi et al., 2016). Al final de la incubación, se tomaron muestras líquidas las cuales fueron neutralizadas y analizadas para determinar la concentración de ácidos grasos en la solución básica.

Para determinar la fracción de sitios activos regenerados se realizó un balance de masa entre la concentración inicial y en el equilibrio de ácidos carboxílicos en el efluente, así como de la concentración de ácidos carboxílicos en las diferentes soluciones básicas probadas. Al obtener valores similares (Figura 11) se llevó a cabo una prueba de análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un 95% de confianza para determinar posibles diferencias significativas entre utilizar una solución de regeneración u otra.



**Figura 11.** Regeneración de los sitios activos de la resina A110.

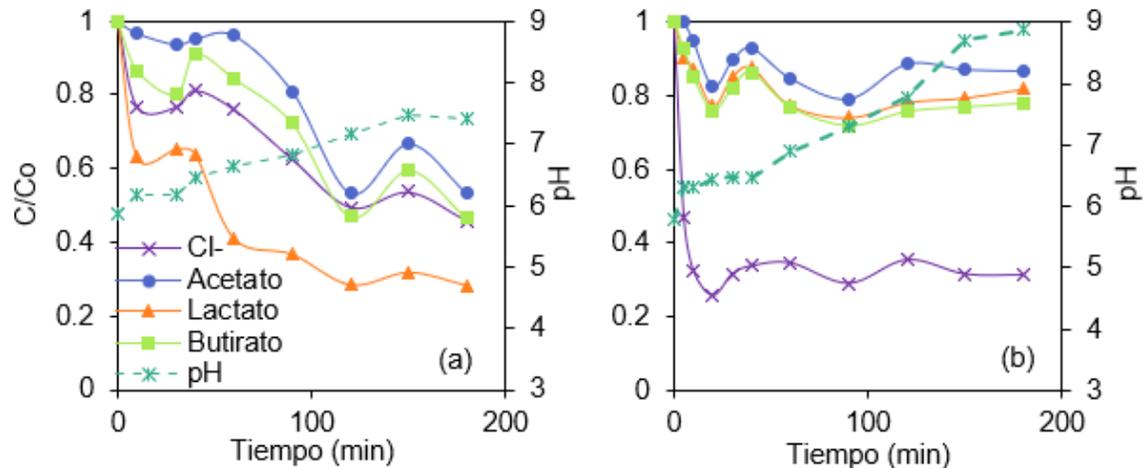
El valor de p obtenido fue de 0.018, menor a 0.05, estableciendo que existen diferencias significativas entre tratamientos. Las soluciones con mejores resultados fueron NaOH 1 M en EtOH 70% y NaOH 1M en solución acuosa, regenerando entre el 89 y 90% de los sitios activos. Con base en lo anterior se continuó trabajando con la solución de NaOH 1 M para la regeneración de la resina A110 en los experimentos posteriores.

#### 7.2.4 Efecto de las sales disueltas

En este set de experimentos se realizaron cinéticas de intercambio iónico de acuerdo con lo planteado en la sección 6.4. Se utilizó la resina A110 acondicionada en los efluentes de la etapa III (sin sales añadidas) y IV (con sales añadidas) con el objetivo de esbozar el efecto de tener aniones en solución durante el proceso de intercambio iónico. A pesar de que la cantidad de sales añadidas en la etapa IV del CSTR de la sección 7.1.2 es menor a la utilizada en los sistemas productores de H<sub>2</sub> convencionales (Montoya-Rosales et al., 2020), los aniones Cl<sup>-</sup> en el efluente competirán con los ácidos carboxílicos por el sitio activo de la resina (Reyhanitash et al., 2017).

Al utilizar el efluente de la etapa III, aproximadamente la mitad del acetato y el butirato son removidos, en cambio en la cinética del efluente de la etapa IV sólo se logra disminuir entre 16-20% la concentración de acetato, lactato y butirato (Figura 12) y se puede atribuir directamente a una mayor presencia de aniones Cl<sup>-</sup> en solución, cuya concentración disminuye en un 67.7%, es decir, los sitios activos de la resina fueron ocupados con aniones Cl<sup>-</sup>. Es importante mencionar que la cinética utilizando el efluente de la etapa IV llegó al equilibrio en 90 min, alcanzando un punto máximo de remoción en los primeros 20 min del experimento.

Ambos experimentos presentaron una tendencia ascendente en la escala de pH iniciando en un pH de 5.8, la cinética del efluente de la etapa III terminó en un valor de 7.42 mientras que el de la etapa IV ascendió hasta 8.8, confirmando el intercambio iónico de los ácidos carboxílicos en los dos ensayos. La diferencia entre la cinética de pH del efluente de la etapa III y la etapa IV puede atribuirse a la concentración inicial de ácidos carboxílicos en el sistema. En la etapa IV del CSTR se produjo una mayor cantidad de ácidos carboxílicos que durante la etapa III (Tabla 8), requiriendo una cantidad también mayor de NaOH para mantener el pH en 5.8 dentro del reactor. Lo anterior resulta en una concentración mayor de iones OH<sup>-</sup> en el efluente de la etapa IV en comparación con el de la etapa III. Asimismo, es importante considerar que la amina primaria del sitio activo se encuentra en forma de base libre y al protonarse para realizar el intercambio iónico se liberan iones OH<sup>-</sup> en la fase líquida (López-Garzón and Straathof, 2014; Rebecchi et al., 2016). En consecuencia, al remover los ácidos carboxílicos del efluente de la etapa IV, el pH presenta una tendencia más básica que en la cinética de intercambio iónico del efluente de la etapa III (Figura 12).



**Figura 12.** Cinéticas de intercambio iónico en el (a) efluente etapa III y (b) efluente etapa IV.

Se calculó la concentración de ácidos carboxílicos y  $\text{Cl}^-$  en la resina, aplicando un balance de masa entre la concentración inicial de las especies y su concentración en el efluente en cada punto de la cinética. Posteriormente se ajustó un modelo de pseudo segundo orden a los datos experimentales (Tabla 10) y se calcularon los parámetros cinéticos acorde a la sección 4.3.1. El valor de  $q_e$  indica la concentración de la especie en la resina en condiciones de equilibrio, es notorio como en el efluente de la etapa III  $q_e$  para  $\text{Cl}^-$  es 7 veces mayor utilizando el efluente de la etapa IV. Si bien gran parte de los sitios activos se encontraban unidos al anión  $\text{Cl}^-$  los valores de  $q_e$  para lactato y butirato fueron mayores en un 138.7 y 36.2%, respectivamente, en comparación con el experimento donde se utiliza el efluente de la etapa III. Los resultados son acordes al aumento del gradiente de concentración entre el efluente y la resina dado a que el efluente de la etapa IV contenía una mayor cantidad de ácidos carboxílicos en comparación con el de la etapa III (tabla 8). Un aumento en el gradiente favorece la difusión de las especies aniónicas en los poros de la resina repercutiendo en la velocidad inicial de adsorción ( $h_0$ ), incrementando en 1.8 veces la velocidad inicial de adsorción del butirato al utilizar el efluente de la etapa VI.

Finalmente, se obtuvo la capacidad de intercambio ( $Q$ ) para cada especie detectada, siguiendo la metodología de la sección 6.4, dejando los viales en incubación hasta alcanzar el equilibrio. La capacidad de intercambio se calculó con un balance de masa entre la concentración inicial y final de ácidos carboxílicos y  $\text{Cl}^-$ , normalizando entre los milimoles de cada especie y la cantidad de resina utilizada en los experimentos (Tabla 6).

La capacidad de intercambio iónico de acetato y butirato disminuyen en un 45.2 y 31.8% al utilizar el efluente de la etapa IV comparado con el efluente de la etapa III (Tabla 11). Por otra parte, la capacidad total al utilizar el efluente de la etapa IV aumenta hasta los  $2.13 \pm 0.10$  mEq/L, producto de la remoción del anión  $\text{Cl}^-$  proveniente de las sales añadidas del medio mineral. Las capacidades de intercambio iónico calculadas con el efluente de la etapa IV fueron utilizadas para establecer parámetros de operación en la siguiente sección.

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos resultados del ajuste del modelo de pseudo segundo orden a las cinéticas de intercambio iónico utilizando el efluente de la etapa III y IV

Especie	Cl-		Acetato		Lactato		Butirato	
	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV
$q_e(\text{mg/g})$	7.45	53.35	11.39	12.30	8.90	21.42	21.67	29.51
$h_o(\text{min}^{-1})$	0.03	1.39	0.01	0.06	0.05	0.09	0.07	0.08
$K_2(\text{mg/g-min})$	0.003	0.03	0.001	0.01	0.01	0.004	0.003	0.003
$R^2$	0.80	1.00	0.02	0.60	0.95	0.82	0.77	0.84

**Tabla 11.** Capacidades de intercambio utilizando la resina A110 y los efluentes de la etapa III y IV.

Resina	Efluente	Q (mmol/g)				
		Cl-	Acetato	Lactato	Butirato	Total
A110 acondicionada	Etapa III	0.86	0.31	0.04	0.44	1.65
		$\pm 0.02$	$\pm 0.07$	$\pm 0.01$	$\pm 0.06$	$\pm 0.15$
A110 acondicionada	Etapa IV	1.46	0.17	0.21	0.30	2.13
		$\pm 0.09$	$\pm 0.05$	$\pm 0.07$	$\pm 0.03$	$\pm 0.10$

### 7.3 Fermentación extractiva

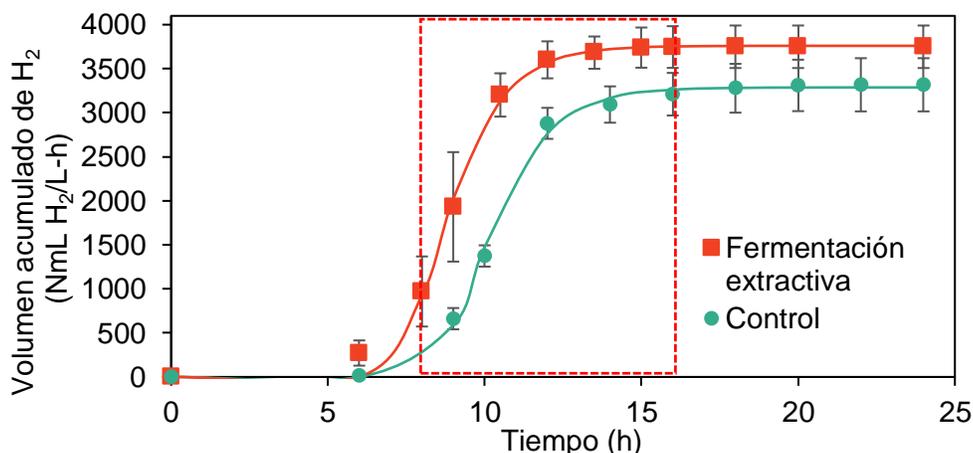
El ensayo de fermentación extractiva se llevó a cabo en un reactor productor de  $H_2$  en las condiciones planteadas en la sección 6.5. Primero se realizó el experimento de control (sin extracción) para determinar el punto de la cinética donde comenzaría la extracción, estableciendo este valor al final de la fase de latencia ( $\lambda$ ) e inicio de la fase exponencial de producción de  $H_2$ , es decir, a las 8 h de iniciada la fermentación. Cabe mencionar que los ácidos carboxílicos son generados a la par que el  $H_2$ , por ello se decidió cerrar la ventana de operación de la columna de intercambio iónico a un lapso de 8 h, terminando la extracción una vez que la producción de  $H_2$  alcanza la fase estacionaria (Figura 13).

La columna de intercambio iónico utilizada contaba con un BV de 126.23 mL y fue empacada con la resina A110 acondicionada. Se fijó el EBCT en 30 min, con base en los resultados de la cinética de intercambio iónico del efluente de la etapa IV (sección 7.2.4) donde a los 20 min de contacto entre la resina y el efluente se alcanzó el máximo punto de remoción de ácidos carboxílicos y  $Cl^-$ . Si bien el EBCT pudo ser fijado en 20 min fue necesario extenderlo a 30 min para evitar el lavado celular del reactor.

El sistema de fermentación extractiva consistió en un fermentador con una corriente de salida hacia la columna mencionada, el efluente que atravesaba la columna contenía no sólo los ácidos carboxílicos generados sino también la biomasa producida en el fermentador; posterior a su paso por la columna el efluente tratado era recirculado. A pesar de que la mayor parte de la biomasa generada en el experimento de extracción atravesó la columna, una fracción permaneció dentro de esta ocasionando que la concentración de SV en el reactor del sistema de fermentación extractiva disminuyera en un 34.1% en comparación con el experimento de control ( $3.68 \pm 0.06$  g SV/L).

En relación con la cinética de producción de  $H_2$  en el sistema de fermentación extractiva (Figura 13) es posible observar cómo al remover los ácidos carboxílicos del medio de fermentación el volumen de  $H_2$  generado aumenta en un 15.21% mientras que la velocidad máxima de producción de  $H_2$  ( $R_{max}$ ) incrementa en un 21.42% en comparación con el experimento de control (Tabla 12). Por otra parte, la fase de latencia ( $\lambda$ ) se reduce a 7.17 h. El porcentaje de remoción de sustrato en el experimento de fermentación extractiva y el de control fue del 98%, sin embargo, al remover los ácidos carboxílicos los rendimientos molares de acetato y butirato aumentan en un 62.00 y 71.19 % respectivamente. Los rendimientos molares de ácidos carboxílicos son producto de la suma de lo medido en el reactor y en la solución de NaOH 1M con la que se regeneró la resina al final de la cinética.

De manera general, los resultados anteriores sugieren que la fermentación extractiva mejora el desempeño de la fermentación oscura en lote.



**Figura 13.** Cinética de producción de H<sub>2</sub> en el sistema de fermentación extractiva. El cuadro rojo engloba el tiempo de operación de la columna de intercambio iónico. Los puntos señalan los datos experimentales y las líneas continuas el ajuste del modelo modificado de Gompertz

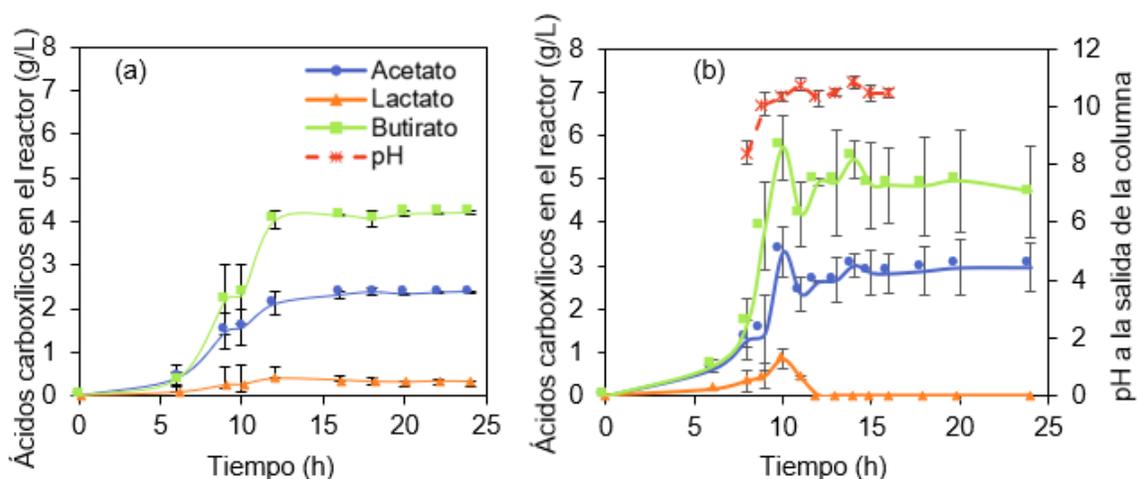
La Figura 14 muestra el cambio de la cinética de producción de ácidos carboxílicos al implementar el sistema de fermentación extractiva. En la hora 10 de fermentación se observa un incremento en la concentración de butirato y acetato (Figura 14-b) en comparación con el experimento de control y se puede atribuir a la remoción de ácidos carboxílicos tras pasar 4 EBCT. Es decir, al diluirse la concentración de ácidos carboxílicos desde el inicio de la operación de la columna, los procesos de inhibición por acumulación de ácidos ionizados se mitigaron, fomentando la producción de H<sub>2</sub> y de ácidos carboxílicos. Posteriormente se continuaron generando acetato y butirato en el reactor presentando una tendencia dinámica de incrementos y decrementos en su concentración, producto de la extracción por intercambio iónico en la columna. Al retirar la circulación a la columna de intercambio iónico (16 h de fermentación) la concentración de ácidos carboxílicos se mantuvo estable relativamente.

**Tabla 12.** Parámetros obtenidos con el modelo modificado de Gompertz y rendimientos molares correspondientes a la cinética de producción de H<sub>2</sub> en el sistema de fermentación extractiva.

Experi- mento	H <sub>max</sub> (NmL H <sub>2</sub> /L)	R <sub>max</sub> (NmL H <sub>2</sub> /h-L)	λ (h)	RMH (mol H <sub>2</sub> /mol hexosa)	RMA (mol acetato/ mol hexosa) <sup>a</sup>	RML (mol lactato/ mol hexosa) <sup>*</sup>	RMB (mol butirato/ mol hexosa) <sup>*</sup>
Control	3288.6 ± 279.0	922.2 ± 12.5	8.40 ± 0.16	1.81 ± 0.16	0.50 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.59 ± 0.01
Fermen- tación extractiva	3762.9 ± 229.1	1120.7 ± 47.1	7.17 ± 0.55	2.05 ± 0.13	0.81 ± 0.11	N.D.	1.01 ± 0.21

RMH: Rendimiento molar de H<sub>2</sub>; RMA: rendimiento molar de acetato; RML: rendimiento molar de lactato; RMB: rendimiento molar de butirato.

<sup>a</sup> Rendimientos molares considerando la concentración final de ácidos carboxílicos en el reactor y de los ácidos recuperados tras la regeneración de la resina A110

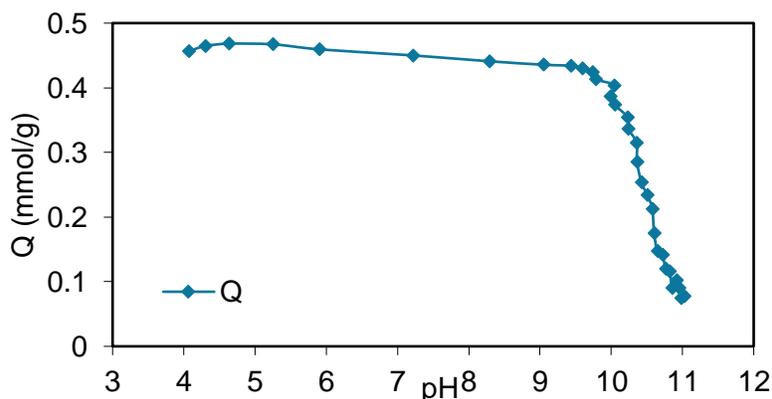


**Figura 14.** Cinética de producción de ácidos carboxílicos en el (a) experimento control y en el (b) sistema de fermentación extractiva

No fue posible generar una curva de rompimiento debido a la concentración dinámica de ácidos carboxílicos a la entrada de la columna, consecuencia de la producción de ácidos carboxílicos en el reactor y la dilución de estos en la columna de intercambio iónico. Al no existir la curva mencionada, no fue posible conocer el tiempo de saturación de la columna, por ello se calcularon deltas de adsorción, realizando un balance de masa entre los ácidos carboxílicos que entraban a la columna y los que salían de esta un EBCT después. Cuando

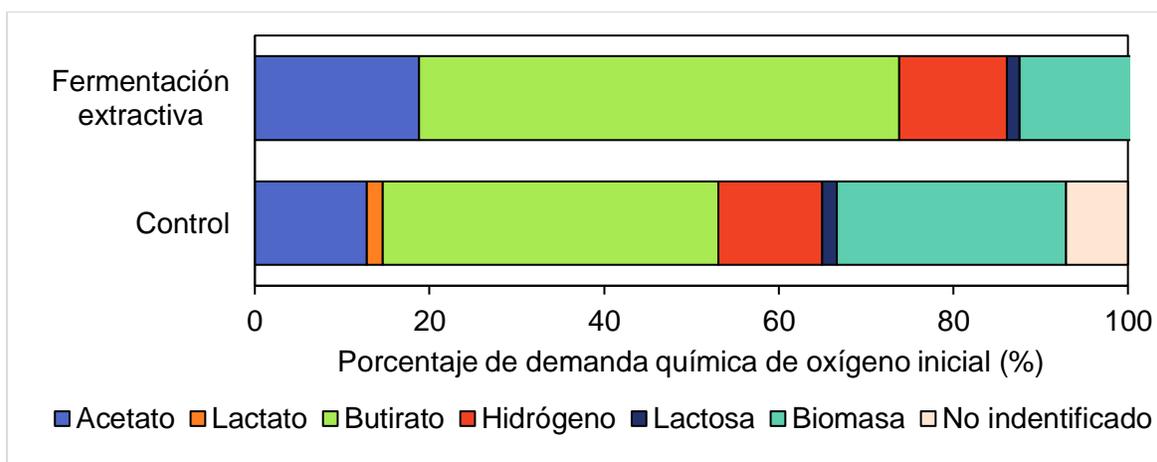
el valor de delta de adsorción se aproxima a cero, todos los sitios activos de la resina se encuentran unidos a un anión, es decir, la resina se satura por completo. En las 8 h de operación de la columna, se encontraron valores de delta desde 7.4 hasta 76.82 mmol/EBCT sin una tendencia clara donde el delta de adsorción a las 10 h de fermentación fue el más elevado (76.82 mmol/EBCT). Es necesario aclarar que el valor de delta no se aproximó a cero durante el experimento, indicando que la resina no llegó a saturarse. Asimismo, un aumento de pH de 5.8 a aproximadamente 10.6 en la entrada y salida de la columna, respectivamente, se mantuvo durante todo el experimento (Figura 14-b), confirmando que el proceso de intercambio se encontraba en un estado dinámico.

Retomando el comportamiento de la cinética de producción de ácidos carboxílicos, este puede ser explicado por el elevado valor de pH del efluente a la salida de la columna. Dentro de la columna se realizan de manera simultánea el intercambio y la regeneración de los sitios activos, producto de la inicial remoción de ácidos carboxílicos (Figura 14). Cuando el efluente entra a la columna tiene un pH de 5.8 el cual fomenta la afinidad de la resina por los ácidos carboxílicos, sin embargo, al permanecer los ácidos carboxílicos anclados a la resina, el pH del efluente aumenta al atravesar la columna. La distribución de cargas de la resina A110 (Figura 15) indica que la amina primaria con la que se encuentra funcionalizado el material, inicia a desprotonarse en un pH cercano a 10, perdiendo afinidad. Considerando que a la salida de la columna el pH se mantuvo cercano a 10.6 se puede afirmar que una fracción considerable de los ácidos carboxílicos regresó a la fase líquida y por tanto al reactor, ocasionando la tendencia no definida en la concentración de ácidos carboxílicos en el reactor, así como los valores del delta de adsorción.



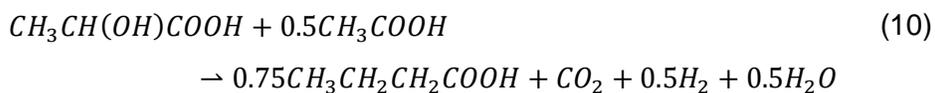
**Figura 15.** Distribución de cargas de la resina A110.

En la Figura 16 se aborda el cambio en el uso de sustrato al implementar el sistema de fermentación extractiva. Es notorio como la cantidad de lactosa final es mínima tanto en el experimento de control como en el de fermentación extractiva, indicando un consumo de sustrato de aproximadamente el 98% en ambos casos. El porcentaje de DQO inicial utilizado para la producción de acetato incrementa de un 12.8% a un 18.8 %, mientras que para butirato aumenta de un 38.4% a un 55% al utilizar el sistema de fermentación extractiva. Asimismo, el porcentaje utilizado para la generación de H<sub>2</sub> permaneció en el mismo rango tanto en el experimento control como el experimento de extracción.



**Figura 16.** Uso del sustrato en el sistema de fermentación extractiva.

Es importante mencionar que en el sistema de fermentación extractiva no se detectó lactato después de las 12 de fermentación y tampoco fue detectado en el NaOH 1M después de la regeneración de las resinas, mientras que en el experimento control se encontró una concentración de  $0.34 \pm 0.15$  g/L. Es decir, el lactato fue consumido durante la fase exponencial de producción de H<sub>2</sub> y ácidos carboxílicos (Figura 14-b), sugiriendo un cambio metabólico en la fermentación. El consumo de lactato puede explicar parcialmente el aumento en producción de H<sub>2</sub> y butirato. Se ha reportado que el ácido láctico generado por las bacterias ácido-lácticas dentro del consorcio puede ser utilizado como agente reductor junto con el ácido acético como agente oxidante para la formación de butirato e H<sub>2</sub> (García-Depraect and León-Becerril, 2018). Cabe mencionar que en dicha reacción el ácido láctico es el reactivo limitante al ser el metabolito que se produce en menor proporción comparado con el ácido acético (Ec. 10). Asimismo, la estequiometría de la reacción puede variar dependiendo de la relación sustrato/inóculo, el tipo de sustrato y las condiciones de operación.



En términos de comunidades microbianas, la producción y posterior consumo de lactato en el experimento de fermentación extractiva tiene relación con el papel de las bacterias ácido-lácticas en la fermentación oscura. Las bacterias ácido-lácticas (e.g. *Lactobacillus* y *Streptococcus*) son capaces de degradar azúcares simples provenientes del sustrato para generar lactato, una vez consumido todo el sustrato dichas bacterias detienen la producción de lactato. Acorde con lo anterior, en el experimento de fermentación extractiva la producción de lactato se detuvo en cuanto la concentración de azúcares totales en el reactor se aproximó a cero después de transcurridas 12 h de fermentación. Sin embargo, la producción de butirato e  $H_2$  continuo hasta después de 15 h de fermentación (figuras 13 y 14). Es decir, una vez que se terminó el sustrato en solución, el lactato generado por las bacterias ácido-lácticas fue consumido por microorganismos productores de  $H_2$  (e.g. *Clostridium*, *Enterobacter*) para generar  $H_2$  y butirato de acuerdo con el cambio metabólico descrito (García-Depraect et al., 2021, 2019). Si bien las bacterias ácido-lácticas compiten junto con los productores de  $H_2$  por el sustrato, es notorio como las interacciones entre estos dos grupos de bacterias favorecen el desempeño de la fermentación (Palomo-Briones et al., 2021). Cabe mencionar que el análisis genético del consorcio microbiano generado en la fermentación extractiva mostraría la evidencia necesaria al respecto de las interacciones mencionadas.

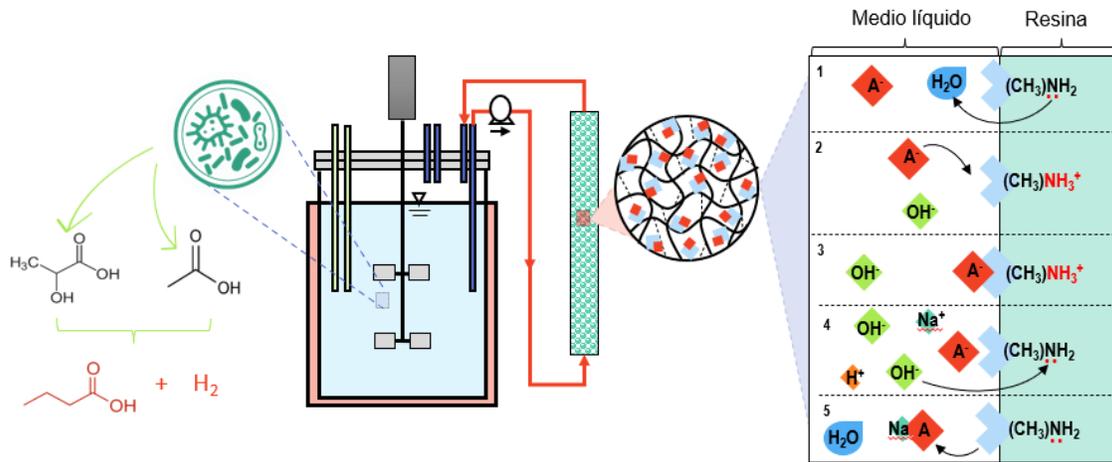
Considerando la concentración de lactato máxima en el sistema de fermentación extractiva ( $0.84 \pm 0.23$  g/L) y siguiendo la estequiometría de la Ec. 10, la contribución teórica del consumo de lactato sería de 0.68 g/L de butirato y 105.25 NmL de  $H_2$ . Lo cual confirma que, si bien pudo existir un cambio metabólico en el sistema de fermentación extractiva, la mejora en el desempeño de la fermentación se atribuye principalmente al amortiguamiento de los procesos de inhibición por producto.

En la Figura 17 se engloban los diferentes fenómenos ocurridos dentro del sistema de fermentación extractiva. Iniciando por el proceso de intercambio iónico, fueron extraídos el 35.1% de los ácidos carboxílicos generados, un porcentaje bajo comparado con otros estudios de fermentación extractiva donde se ha logrado remover entre 59.1% a 76.1% de los ácidos totales producidos (Boonmee et al., 2016; Karekar et al., 2020). En contraparte, la concentración total de ácidos carboxílicos aumentó 1.59 veces en comparación con el

experimento de control, acorde a lo descrito en la literatura (Karekar et al., 2020). Es decir, aunque la eficiencia de remoción de ácidos carboxílicos de la columna de intercambio iónico no fue alta, permitió aumentar la cantidad de ácidos carboxílicos generados en el reactor como consecuencia de la mitigación de los procesos de inhibición por producto y del cambio metabólico que favorece la producción de butirato y  $H_2$  a partir de lactato y acetato.

Una forma de incrementar la remoción de ácidos carboxílicos en la columna de intercambio iónico consiste en limitar la cantidad de iones  $OH^-$  provenientes del NaOH utilizado para mantener el pH en un valor de 5.8 dentro del reactor de fermentación oscura. Varios estudios demuestran que al emplear resinas de intercambio iónico para la extracción de ácidos carboxílicos ya sea de manera *in-situ* o *ex-situ*, es factible mantener el pH dentro del fermentador en un valor cercano al óptimo (6.0-6.1) sin necesidad de añadir una solución alcalina mientras el proceso sigue activo (Kidanu et al., 2017; Roy et al., 2021). Controlar el pH de tal manera amortiguaría los cambios de pH en la columna de intercambio iónico del presente trabajo, fomentando la afinidad de los grupos amina por los ácidos carboxílicos. Como resultado de lo anterior, se esperaría un aumento en la remoción de ácidos carboxílicos y, por lo tanto, un incremento en la producción de  $H_2$  en comparación con los experimentos de fermentación extractiva reportados en esta sección. En el apartado 8.2 se abordan distintas propuestas para optimizar la remoción de ácidos carboxílicos utilizando resinas de intercambio iónico.

Considerando que la mayor parte de la literatura engloba estudios de fermentación extractiva en la producción de acetato o lactato (Tabla 13), aún no existen suficientes datos para establecer valores de referencia en cuestiones de producción de  $H_2$  empleando sistemas extractivos. La relevancia de este estudio radica en ser el primero en su tipo, mostrando un incremento tanto en la velocidad de producción de  $H_2$  (21.42%) como en el volumen de  $H_2$  acumulado (15.21%) al acoplar una columna de intercambio iónico a un reactor productor de  $H_2$  y ácidos carboxílicos en lote. Los resultados obtenidos son un punto de partida para el empleo y optimización del uso de resinas de intercambio iónico en procesos de fermentación extractiva, con el objetivo de incrementar la generación de biocombustibles gaseosos ( $H_2$ ) y sus subproductos de valor agregado (ácidos carboxílicos).



**Figura 17.** Diferentes fenómenos ocurridos dentro del sistema de fermentación extractiva. En el lado derecho de la figura se muestra el proceso de intercambio iónico (1-3) y regeneración (4-5) de la resina A110 empacada en la columna. En el lado izquierdo se señala el cambio metabólico producto de la extracción de ácidos carboxílicos, el cual favorece la producción de  $\text{H}_2$  y butirato a partir de lactato y acetato.

**Tabla 13.** Principales resultados en diferentes estudios de fermentación extractiva.

Resina	Grupo funcional y tipo de resina	Ácidos carboxílicos encontrados en la fase líquida y porcentaje de remoción	Configuración del sistema	Principales resultados	Referencia
Amberlite IRA400	Amina cuaternaria Base fuerte en forma de Cl <sup>-</sup> , macroporosa	Acetato, N. R. Propionato, N. R. Butirato, N. R.	Fermentación oscura en lote, en presencia de la resina de intercambio iónico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amortiguamiento de pH en el sistema</li> <li>• Aumento del 19.23% en el rendimiento total de ácidos carboxílicos</li> </ul>	(Kidanu et al., 2017)
Amberlite FPA53	Amina terciaria Base débil en forma libre, gel	Acetato, 76.4 %	Fermentador feedbatch productor de acetato, acoplado a un tanque agitado con la resina de intercambio iónico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amortiguamiento del pH del sistema</li> <li>• Aumento en 1.6 veces la producción de acetato</li> </ul>	(Karekar et al., 2020)
Amberlite IRA67	Amina terciaria Base débil en forma libre, gel	Lactato, 59.1 %	Fermentación ácido láctica en lote, en presencia de la resina de intercambio iónico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amortiguamiento de pH del sistema</li> <li>• Aumento en 1.2 veces la producción de lactato</li> </ul>	(Boonmee et al., 2016)
Purolite A110	Amina primaria. Base débil en forma libre, macroporosa	Acetato, 24.20 % Butirato, 37.5%	Fermentación oscura en lote, acoplado a una columna empacada con la columna de intercambio iónico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento del 15.2% en la producción de H<sub>2</sub></li> <li>• Aumento del 62.0% en el rendimiento de acetato</li> <li>• Aumento del 71.3% en el rendimiento de butirato</li> </ul>	Este estudio

## 8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 8.1 Conclusiones

En este trabajo se disminuyó la concentración de aniones de la fermentación oscura sin comprometer la producción de H<sub>2</sub> y ácidos carboxílicos en un CSTR, obteniendo como resultado un medio mineral con la siguiente composición (mg/L): NH<sub>4</sub>Cl, 700; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10; CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.125; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.7; FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.91; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10.25. El uso de este medio mineral modificado permite llevar a cabo la extracción de ácidos carboxílicos utilizando resinas de intercambio iónico, disminuyendo las interferencias ocasionadas por los aniones (Cl<sup>-</sup>) en solución.

La resina A110 (macroporosa, base débil, amina primaria) fue seleccionada como la más adecuada para la remoción de ácidos carboxílicos en un efluente sin sales añadidas, en comparación con las resinas A845 y PAD 950. El criterio de selección fue la capacidad de intercambio total de la resina A110 ( $1.25 \pm 0.12$  mmol/g), así como su selectividad hacia la remoción de butirato dado a que este es el metabolito que se genera en mayor proporción dentro de la fermentación oscura.

Por otra parte, se optimizó el desempeño de la resina A110 en el proceso de intercambio iónico mediante el acondicionamiento de la misma. El acondicionamiento utilizando agua miliQ a 95°C y posterior incubación evitó el estancamiento de aire en los poros de la resina y fomentó la hidratación de la matriz polimérica.

Se analizó el efecto de las sales añadidas en el intercambio iónico de ácidos carboxílicos en un efluente de fermentación oscura. Al tener una mayor concentración de iones Cl<sup>-</sup> en solución, la capacidad de intercambio total de la resina A110 acondicionada aumenta de  $1.65 \pm 0.15$  a  $2.13 \pm 0.10$  mmol/g de resina, producto de la adsorción de Cl<sup>-</sup>. Como consecuencia de la competencia por los sitios activos de la resina las capacidades de intercambio iónico para el acetato y butirato disminuyeron en un 45.2% y 31.8%, respectivamente, en comparación con el experimento sin sales añadidas. Adicionalmente, el tiempo en que la cinética de intercambio llega al punto máximo de remoción de ácidos carboxílicos (20 min) sirvió como punto de partida para fijar el EBCT en los experimentos de fermentación extractiva.

El uso de sistemas extractivos mejora el desempeño de la fermentación oscura. Acoplar una columna empacada con la resina A110 a un reactor productor de H<sub>2</sub> en lote incrementa en un 15.2% el volumen de H<sub>2</sub> generado en comparación con el experimento de control. Al

mismo tiempo, aumenta los rendimientos molares de acetato y butirato en un 62.7% y 71.3% %, respectivamente. El efecto positivo al implementar el sistema de fermentación extractiva se debe principalmente al amortiguamiento de los procesos de inhibición por producto y posiblemente a un cambio dentro del metabolismo de la fermentación oscura que favorece la producción de butirato e  $H_2$  a partir de lactato. Es importante resaltar que este estudio es uno de los primeros en el campo que reporta el efecto positivo del uso de resinas de intercambio iónico para la extracción de ácidos carboxílicos durante la fermentación oscura.

## **8.2 Perspectivas**

A pesar de los avances reportados en este trabajo, se sugiere la ejecución de experimentos adicionales para mejorar el desempeño de la fermentación oscura utilizando sistemas extractivos con resinas de intercambio iónico.

Un factor crucial es la retención de la biomasa dentro del reactor, inicialmente con el propósito de evitar el lavado celular al acoplar el sistema de extracción. Una opción factible es el uso de membranas dentro del reactor productor de  $H_2$  en la corriente de salida hacia la columna de intercambio iónico. De esta manera, la biomasa nunca abandona el fermentador y se evita también el taponamiento de los poros de las resinas. Asimismo, sería posible disminuir el EBCT de la columna empacada.

También, es posible cambiar la configuración del sistema de extracción. Otra forma de utilizar las resinas de intercambio iónico es dentro de un tanque agitado acoplado al reactor fermentador. Este tipo de sistemas han sido previamente probados y ofrecen ventajas como una mejora en la transferencia de masa, haciendo el proceso de intercambio más rápido, logrando incluso controlar el pH de fermentación (Karekar et al., 2020).

Es necesario aumentar la afinidad de las resinas por los ácidos carboxílicos para optimizar el proceso de intercambio iónico. Si bien una limitante es la interferencia de otros aniones en solución, eliminar por completo los aniones  $Cl^-$  del medio de cultivo tiene efectos negativos en el crecimiento bacteriano (Roeßler et al., 2003). Se sugiere encaminar los experimentos futuros hacia el control autónomo de pH del sistema, aumentando el flujo de la recirculación de la columna o tanque agitado donde ocurre el intercambio iónico.

Trabajando en las áreas de oportunidad aquí descritas se podría proceder al uso de sistemas extractivos de ácidos carboxílicos en un CSTR.

## 9 REFERENCIAS

- Agler, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H., Angenent, L.T., 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: The carboxylate platform. *Trends Biotechnol.* 29, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.11.006>
- APHA/AWWA/WEF, 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Standard Methods.*
- Arcibar-Orozco, J.A., 2013. *Environmental Applications of Functionalized Activated Carbon with Iron Oxyhydroxide Nanoparticles.* Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Aviña-Galván, I., 2018. *Estudio de la remoción de compuestos que inhiben la producción de biohidrógeno por medio de materiales a base de carbono.* Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.
- Boonmee, M., Cotano, O., Amnuaypanich, S., Grisadanurak, N., 2016. Improved Lactic Acid Production by In Situ Removal of Lactic Acid During Fermentation and a Proposed Scheme for Its Recovery. *Arab. J. Sci. Eng.* 41, 2067–2075. <https://doi.org/10.1007/s13369-015-1824-5>
- Bundhoo, M.A.Z., Mohee, R., 2016. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 6713–6733. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- 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 Microbiol. Rev.* 41, 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>
- Carrillo-Reyes, J., Tapia-Rodríguez, A., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Maluf Braga, A.F., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Etchebehere, C., Fuentes, L., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H.O., Ruiz-Filippi, G., Tapia-Venegas, E., Trably, E., Wenzel, J., Zaiat, M., 2019. A standardized biohydrogen potential protocol: An international round robin test approach. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 26237–26247. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.124>
- Chang, S., Li, J., Liu, F., Yu, Z., 2012. Effect of different gas releasing methods on anaerobic fermentative hydrogen production in batch cultures. *Front. Environ. Sci. Eng.* 6, 901–906. <https://doi.org/10.1007/s11783-012-0403-1>
- Ciranna, A., Ferrari, R., Santala, V., Karp, M., 2014. Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the alkalithermophile *Caloramator celer*: Kinetic, metabolic and transcription analyses. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 6391–6401. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.047>
- Critten, J.C., Trussell, R., Hand, D., Howe, K., Tchobanoglous, G., 2014. *MWH Water Treatment Principles and Design, GPSA 12 ed 2004 - FPS.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382092-1.00019-1>
- Davila-Vazquez, G., Alatríste-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E., 2008a. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 4989–4997. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.065>
- Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatríste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., Rosales-Colunga, L.M., Razo-Flores, E., 2008b. Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 27–45. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9122-7>
- Davila-Vazquez, G., de León-Rodríguez, A., Alatríste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2011. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community

- composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy* 35, 3174–3181. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.046>
- de Sousa e Silva, A., Sales Morais, N.W., Maciel Holanda Coelho, M., Lopes Pereira, E., Bezerra dos Santos, A., 2020. Potentialities of biotechnological recovery of methane, hydrogen and carboxylic acids from agro-industrial wastewaters. *Bioresour. Technol. Reports* 10, 100406. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100406>
- Dubois, M., K.A.Gilles, J.K.Hamilton, P.A.Rebers, Fred.Smith, 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Elbeshbishy, E., Dhar, B.R., Nakhla, G., Lee, H.S., 2017. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>
- Eregowda, T., Rene, E.R., Rintala, J., Lens, P.N.L., 2020. Volatile fatty acid adsorption on anion exchange resins: kinetics and selective recovery of acetic acid. *Sep. Sci. Technol.* 55, 1449–1461. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1600553>
- Esteban-Gutiérrez, M., Garcia-Aguirre, J., Irizar, I., Aymerich, E., 2018. From sewage sludge and agri-food waste to VFA: Individual acid production potential and up-scaling. *Waste Manag.* 77, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.05.027>
- Fernando-Foncillas, C., Cabrera-Rodríguez, C.I., Caparrós-Salvador, F., Varrone, C., Straathof, A.J.J., 2021. Highly selective recovery of medium chain carboxylates from co-fermented organic wastes using anion exchange with carbon dioxide expanded methanol desorption. *Bioresour. Technol.* 319. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124178>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.06.126>
- García-Depraect, O., Muñoz, R., Rodríguez, E., Rene, E.R., León-Becerril, E., 2021. Microbial ecology of a lactate-driven dark fermentation process producing hydrogen under carbohydrate-limiting conditions. *Int. J. Hydrogen Energy* 46, 11284–11296. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.08.209>
- García-Depraect, O., Valdez-Vázquez, I., Rene, E.R., Gómez-Romero, J., López-López, A., León-Becerril, E., 2019. Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. *Bioresour. Technol.* 282, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.100>
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Hussy, I., 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1339–1347. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00090-3)
- IEA Bioenergy, 2011. Biobased Chemicals - Value Added Products from Biorefineries. IEA Bioenergy Task 42 Biorefinery 36.
- Jones, R.J., Massanet-Nicolau, J., Guwy, A., Premier, G.C., Dinsdale, R.M., Reilly, M., 2015. Removal and recovery of inhibitory volatile fatty acids from mixed acid fermentations by conventional electrodialysis. *Bioresour. Technol.* 189, 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.001>
- Karekar, S.C., Srinivas, K., Ahring, B.K., 2020. Continuous in-situ extraction of acetic acid produced by *Acetobacterium woodii* during fermentation of hydrogen and carbon dioxide using Amberlite FPA53 ion exchange resins. *Bioresour. Technol. Reports* 12, 100568. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100568>
- Khan, M.A., Ngo, H.H., Guo, W., Liu, Y., Zhang, X., Guo, J., Chang, S.W., Nguyen, D.D., Wang, J., 2018. Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as

- renewable energy. *Renew. Energy* 129, 754–768.  
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.029>
- Kidanu, W.G., Trang, P.T., Yoon, H.H., 2017. Hydrogen and volatile fatty acids production from marine macroalgae by anaerobic fermentation. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 22, 612–619. <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0258-1>
- Kucharska, K., Hołowacz, I., Konopacka-Łyskawa, D., Rybarczyk, P., Kamiński, M., 2018. Key issues in modeling and optimization of lignocellulosic biomass fermentative conversion to gaseous biofuels. *Renew. Energy* 129, 384–408. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.018>
- Lee, H.S., Rittmann, B.E., 2009. Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 749–758. <https://doi.org/10.1002/bit.22107>
- López-Garzón, C.S., Straathof, A.J.J., 2014. Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnol. Adv.* 32, 873–904. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.002>
- Massanet-Nicolau, J., Premier, G.C., Jones, R.J., Guwy, A., Reilly, M., Dinsdale, R.M., 2015. Removal and recovery of inhibitory volatile fatty acids from mixed acid fermentations by conventional electrodialysis. *Bioresour. Technol.* 189, 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.001>
- Montoya-Rosales, J., 2020. Discontinuous biomass recycling as a successful strategy to enhance continuous hydrogen production at high organic loading rates. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.265>
- Montoya-Rosales, J. de J., Palomo-Briones, R., Celis, L.B., Etchebehere, C., Razo-Flores, E., 2020. Discontinuous biomass recycling as a successful strategy to enhance continuous hydrogen production at high organic loading rates. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 17260–17269. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.265>
- Moreno-Andrade, I., Moreno, G., Kumar, G., Buitrón, G., 2015. Biohydrogen production from industrial wastewaters. *Water Sci. Technol. A J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 71, 105–110. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.471>
- Palomo-Briones, R., 2018. Strategies of control of microbial communities during dark fermentation. Instituto Potosino de Investigación en Ciencia y Tecnología.
- Palomo-Briones, R., Montoya-Rosales, J. de J., Razo-Flores, E., 2021. Advances towards the understanding of microbial communities in dark fermentation of enzymatic hydrolysates: Diversity, structure and hydrogen production performance. *Int. J. Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.06.016>
- 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. *Appl. Energy* 198, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.04.051>
- Palomo-Briones, R., Trably, E., López-Lozano, N.E., Celis, L.B., Méndez-Acosta, H.O., Bernet, N., Razo-Flores, E., 2018. Hydrogen metabolic patterns driven by *Clostridium-Streptococcus* community shifts in a continuous stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2465–2475. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8737-7>
- Rebecchi, S., Pinelli, D., Bertin, L., Zama, F., Fava, F., Frascari, D., 2016. Volatile fatty acids recovery from the effluent of an acidogenic digestion process fed with grape pomace by adsorption on ion exchange resins. *Chem. Eng. J.* 306, 629–639. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.07.101>
- Redwood, M.D., Orozco, R.L., Majewski, A.J., Macaskie, L.E., 2012. Electro-extractive fermentation for efficient biohydrogen production. *Bioresour. Technol.* 107, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.026>
- Reyhanitash, E., Kersten, S.R.A., Schuur, B., 2017. Recovery of Volatile Fatty Acids from

- Fermented Wastewater by Adsorption. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 9176–9184. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02095>
- Rittmann, B.E., McCarty, P.L., 2001. *Environmental biotechnology: principles and applications*, First. ed. McGraw-Hill Education.
- Roeßler, M., Sewald, X., Müller, V., 2003. Chloride dependence of growth in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 161–165. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00509-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00509-3)
- Roy, S., Olokede, O., Wu, H., Holtzapfle, M., 2021. In-situ carboxylic acid separation from mixed-acid fermentation of cellulosic substrates in batch culture. *Biomass and Bioenergy* 151, 106165. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106165>
- Sydney, E.B., Novak, A.C., Rosa, D., Pedroni Medeiros, A.B., Brar, S.K., Larroche, C., Socol, C.R., 2018. Screening and bioprospecting of anaerobic consortia for biohydrogen and volatile fatty acid production in a vinasse based medium through dark fermentation. *Process Biochem.* 67, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.012>
- Van Niel, E.W.J., Claassen, P.A.M., Stams, A.J.M., 2003. Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 255–262. <https://doi.org/10.1002/bit.10463>
- Wang, B., Wan, W., Wang, J., 2008. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 7013–7019. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.09.027>
- Ye, X., Morgenroth, E., Zhang, X., Finneran, K.T., 2011. Anthrahydroquinone-2,6-disulfonate (AH 2QDS) increases hydrogen molar yield and xylose utilization in growing cultures of *Clostridium beijerinckii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 855–864. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3571-1>
- Yousuf, A., Bonk, F., Bastidas-Oyanedel, J.R., Schmidt, J.E., 2016. Recovery of carboxylic acids produced during dark fermentation of food waste by adsorption on Amberlite IRA-67 and activated carbon. *Bioresour. Technol.* 217, 137–140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.035>
- Zheng, X.J., Yu, H.Q., 2005. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. *J. Environ. Manage.* 74, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.08.015>