



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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Mejora de la producción de hidrógeno y ácidos
carboxílicos mediante fermentación extractiva en
lote y continuo**

Tesis que presenta

Ing. Enoé Rodríguez Jonguitud

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Ambientales

Director de Tesis:

Dr. Elías Razo Flores

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre 2023



Constancia de aprobación de tesis

La tesis “Mejora de la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos mediante fermentación extractiva en lote y continuo” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por Enoé Rodríguez Jonguitud y aprobada el 3 de noviembre del 2023 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Elías Razo Flores

Director/Codirectores de la tesis

Dr. José René Rangel Méndez

Miembro del Comité Tutorial

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

Miembro del Comité Tutorial

Dr. César Nieto Delgado

Miembro del Comité Tutorial

Aura Virginia Ontiveros Valencia

Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (1080320) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Fondo Sectorial SEP-CONAYCT, proyecto A1-S-37174 “Barreras inhibitorias y termodinámicas de la producción de hidrógeno: Fermentación extractiva como estrategia para mejorar su producción”, asignado al Dr. Elías Razo Flores.

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

Dedicatoria

A mi familia, cuyo amor inquebrantable ha sido el pilar sobre el que se construyó este trabajo.

A aquellos que, quizás sin saberlo, dejaron una huella indeleble en mi desarrollo personal, convirtiéndose en los héroes silenciosos de mi historia.

A los amigos, tanto a los que el tiempo había llevado lejos como a los que siempre estuvieron cerca.

Y a Rosty y Baloo, cuyas travesuras me recuerdan que la alegría se encuentra en los momentos más simples.

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Elías Razo Flores. No sólo abrió las puertas de su prestigioso grupo de trabajo para recibirme, sino que también me brindó su guía experta, confianza inquebrantable y apoyo incondicional a lo largo del desarrollo de este proyecto significativo.

Extendiendo mi gratitud, estoy eternamente agradecida con mi comité tutorial, compuesto por la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García, el Dr. José René Rangel Méndez, la Dra. Aura Virginia Ontiveros Valencia y el Dr. César Nieto Delgado. Cada uno de ustedes ha sido una fuente invaluable de conocimiento y orientación, y sus consejos perspicaces han sido fundamentales para la culminación de este trabajo.

Un reconocimiento especial para los técnicos académicos, M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz, la Dra. Elizabeth Isaacs Paez y Lic. Mario Delgado Cardozo. Su habilidad técnica y dedicación han sido cruciales para superar los múltiples desafíos que se me presentaron en el ámbito experimental.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer al equipo completo del Clúster Biocombustibles Gaseosos. Cada uno de ustedes ha aportado al clima de ayuda y motivación que ha enriquecido mi experiencia académica y personal durante esta crucial etapa de mi vida.

Su generosidad colectiva y apoyo han sido un pilar en mi vida académica, y por ello les estoy profundamente agradecida.

Contenido

Constancia de aprobación de tesis	i
Acta de examen	ii
Créditos institucionales	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Contenido	vi
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Abreviaturas	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv

1. Marco teórico	1
1.1. Fermentación oscura	1
1.1.1. Ácidos carboxílicos	2
1.2. Inhibición de la fermentación oscura	3
1.3. Fermentación extractiva	4
1.3.1. Fermentación extractiva con resinas poliméricas	4
1.4. Desafíos en la fermentación extractiva con resinas poliméricas	6
2. Antecedentes	8
2.1. Antecedentes del uso de resinas para fermentación extractiva en el grupo de trabajo	9
3. Justificación	11
4. Hipótesis y objetivos	12
4.1. Hipótesis	12
4.2. Objetivos	12
5. Metodología	13
5.1. Estrategia experimental	13

5.2. Inóculo, sustrato y medio mineral	14
5.3. Resinas poliméricas y acondicionamiento previo a su uso	14
5.4. Regeneración de resinas	15
5.5. Cinéticas y determinación de la capacidad de intercambio iónico/adsorción usando un fermentado	15
5.5.1. Fermentado para las cinéticas y determinación de adsorción/intercambio iónico	16
5.6. Fermentación extractiva en lote	17
5.6.1. Fermentación extractiva en lote configuración de columna y resina PAD950 (PAD950-C)	19
5.6.2. Fermentación extractiva en lote configuración de tanque agitado y resina PAD950 (PAD950-T)	19
5.6.3. Fermentación extractiva en lote configuración de tanque agitado y resina A110 (A110-T)	20
5.7. Fermentación extractiva en un reactor continuo	20
5.8. Métodos analíticos	20
5.9. Cálculos	21
5.9.1. Modelo de producción de hidrógeno en lote	21
5.9.2. Ecuaciones utilizadas para el cálculo de capacidad de adsorción/Intercambio iónico	21
5.9.3. Cálculos de rendimientos molares	22
6. Resultados y discusión	23
6.1. Cinética y capacidad de adsorción de la resina PAD950	23
6.2. Fermentación extractiva	27
6.2.1. Fermentación extractiva en lote configuración de columna y resina PAD950 (PAD950-C)	27
6.2.2. Fermentación extractiva en lote configuración de tanque agitado y resina PAD950 (PAD950-T)	32
6.2.3. Fermentación extractiva en lote configuración de tanque agitado y resina A110 (A110-T)	36
6.2.4. Comparación de sistemas de fermentación extractiva	41

6.3. Fermentación extractiva en un CSTR	43
6.3.1. Carga orgánica volumétrica de 40 g azúcares totales/L-d	44
6.3.2. Carga orgánica volumétrica 60 g azúcares totales/L-d	45
6.3.3. Comparación con la Literatura Existente	48
7. Conclusiones	50
8. Perspectivas	52
9. Bibliografía	54
Anexo 1. Fotografías y diagramas de reactor en lote y de sistema de extracción	60

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades de los principales ácidos carboxílicos detectados en sistemas de fermentación oscura.	2
Tabla 2. Ejemplos de sistemas que han empleado resinas de intercambio iónico y no iónico para remover ácidos carboxílicos de fermentados.	9
Tabla 3. Especificaciones de las resinas poliméricas utilizadas en este trabajo.	15
Tabla 4. Capacidad de adsorción/intercambio iónico de resina PAD950 en fermentados con diferentes concentraciones de sales minerales. Concentraciones iniciales en el fermentado: Con medio mineral reducido (g/L): Cloruro: 1.9; Acetato: 2.1; Lactato: 2.6; Butirato: 4.4. Sin medio mineral (g/L): Cloruro: 1.2; Acetato: 1.1; Lactato: 2.9; Butirato: 2.4.	25
Tabla 5. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz al sistema PAD950-C	29
Tabla 6. Parámetros cinéticos del modelado Gompertz de PAD950-T	34
Tabla 7. Parámetros cinéticos del modelado Gompertz de A110-T	37
Tabla 8. Parámetros estimados con modelo de Gompertz de fermentaciones extractivas en lote	41
Tabla 9. Rendimientos molares de ácidos carboxílicos producidos en la fermentación extractiva en lote.	42
Tabla 10. Velocidad volumétrica de hidrógeno (VVPH), concentración de ácidos carboxílicos producidos y eficiencia de consumo de azúcares totales en los experimentos de fermentación extractiva en continuo utilizando la resina PAD950. Los datos presentados se refieren a la operación en estado estable tanto para la fermentación control como para la fermentación extractiva.	43

Índice de figuras

Figura 1. Porcentaje de disociación de ácidos carboxílicos presentes en la fermentación oscura en función del pH.	3
Figura 2. Inhibición por ácidos carboxílicos no disociados en la fermentación oscura. Adaptado de Elbeshbishy et al., 2017[9]	4
Figura 3. Posibles interacciones entre la resina no funcionalizada y los ácidos carboxílicos presentes en la fermentación oscura: a) Interacciones hidrofóbicas entra la matriz de la resina y las cadenas hidrocarbonadas, b) Puentes de hidrógeno entre grupos carboxílico y zonas polares de la matriz de la resina	6
Figura 4. Diagrama de la metodología empleada: Comparación de las resinas A110 y PAD950 a través de estudios cinéticos y capacidad de adsorción/intercambio iónico, pruebas de fermentación extractiva en lote colocando la resina en columna empacada y tanque agitado, y análisis comparativo para la selección de configuración en sistemas continuos. El recuadro rojo especifica las pruebas previamente realizadas por Núñez-Valenzuela (2021) [26].	13
Figura 5. Configuraciones de fermentación extractiva en lote con resinas A110 y PAD950. Nomenclatura utilizada en las configuraciones: El nombre de la resina utilizada (A110 o PAD950), "C" y "T" denotan "columna" y "tanque", respectivamente. El experimento A110-C fue realizado por Núñez-Valenzuela (2021) [26], cuyos resultados se utilizan para fines comparativos.	18
Figura 6. Cinética de adsorción de cloruros y ácidos carboxílicos, usando la resina no iónica PAD950 (a) Fermentado con medio mineral reducido en sales; (b) Fermentado sin medio mineral.	23
Figura 7. Distribución de cargas de la resina PAD950	26
Figura 8. Producción de hidrógeno en lote en el sistema de fermentación extractiva en columna empacada con la resina PAD950 y de la fermentación control. Los puntos y cuadrados representan los datos	28

experimentales, mientras que las líneas sólidas representan el ajuste al modelo de Gompertz. Las líneas punteadas negras indican el lapso en el que estuvo conectado el sistema de extracción de ácidos carboxílicos.	
Figura 9. Producción de ácidos carboxílicos en lote. (a) fermentación control, (b) sistema de fermentación extractiva en columna empacada con la resina PAD950 (PAD950-C).	29
Figura 10. Diagrama simplificado de rutas metabólicas en la fermentación oscura y posibles rutas metabólicas que pueden tomar las bacterias productoras de hidrógeno, bacterias que consumen hidrógeno y bacterias ácido-lácticas (LAB) [33]	30
Figura 11. Producción de hidrógeno en el sistema de fermentación extractiva en lote con la resina PAD950 en un tanque agitado y control (sin fermentación extractiva). Los puntos y cuadrados representan los datos experimentales, mientras que las líneas sólidas representan el ajuste al modelo de Gompertz utilizado en el estudio. Las líneas punteadas negras indican el lapso en el que estuvo conectada la resina.	33
Figura 12. Volumen acumulado de hidrógeno producido dentro del tanque agitado con resina PAD950 durante la fermentación extractiva.	34
Figura 13. Producción de ácidos carboxílicos en lote. (a) fermentación control, (b) sistema de fermentación extractiva con el tanque agitado conteniendo la resina PAD950 (PAD950-T).	35
Figura 14. Producción de hidrógeno en el sistema de fermentación extractiva en lote con la resina A110 en tanque agitado y de la fermentación control. Los puntos y cuadrados representan los datos experimentales, mientras que las líneas sólidas representan el ajuste al modelo de Gompertz utilizado en el estudio. Las líneas punteadas negras indican el lapso en el que estuvo conectada la resina al reactor	37
Figura 15. Variación del pH en la corriente de salida tras pasar por la resina A110 (pH de fermentado en la corriente de salida de la	38

columna/tanque agitado). A110-C fue realizado por Núñez-Valenzuela (2021) [26].

Figura 16. Volumen acumulado de hidrógeno producido dentro del tanque agitado con resina A110 durante la fermentación extractiva. 39

Figura 17. Producción de ácidos carboxílicos en lote. (a) fermentación control, (b) sistema de fermentación extractiva con el sistema extractivo de tanque agitado con resina A110 (A110-T). 40

Figura 18. Ácidos carboxílicos producidos (g/L) (a) y consumo de azúcares totales (%) (b) en los experimentos de fermentación extractiva en continuo utilizando la resina PAD950. Los datos presentados se refieren a la operación en estado estable tanto para la fermentación control como para la fermentación extractiva. *18 horas de fermentación extractiva 44

Abreviaturas

λ	Tiempo de latencia (lambda)
C_0	Concentración de adsorbato inicial en el fermentado
C_{des}	Concentración de adsorbato en la solución de regeneración
C_{eq}	Concentración de adsorbato en el fermentado en el equilibrio
C_{eqr}	Concentración de adsorbato en la resina en condiciones de equilibrio
COV	Carga orgánica volumétrica
C_r	Concentración de resina
CSTR	Reactor de tanque agitado continuo
EBTC	Tiempo de contacto de cama vacía
H_2	Hidrógeno
H_{max}	Volumen máximo de hidrógeno acumulado
h_o	Velocidad de adsorción inicial
N_2	Nitrógeno
NaOH	Hidróxido de sodio
Q	Capacidad de adsorción/intercambio iónico
RMA	Rendimiento molar de acetato
R_{max}	Tasa máxima de producción de hidrógeno
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
TRH	Tiempo de retención hidráulico
VVPH	Velocidad volumétrica de producción de H_2

Resumen

Título: Mejora de la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos mediante fermentación extractiva en lote y continuo

PALABRAS CLAVE: Fermentación extractiva, Producción de hidrógeno, Ácidos carboxílicos, Inhibición por productos, Fermentación oscura, Resinas no funcionalizadas

La fermentación extractiva, una técnica innovadora, busca mejorar la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos, disminuyendo la inhibición por productos en la fermentación oscura. Este estudio comprueba la afinidad y la capacidad de adsorción de ácidos carboxílicos (ácido acético, ácido butírico y ácido láctico) por medio de la resina polimérica no iónica PAD950. Se realizaron fermentaciones extractivas en reactores en lote, empleando dos configuraciones de extracción de ácidos carboxílicos con la resina PAD950: una columna empacada y un tanque agitado. Los resultados demostraron mejoras en la producción: El volumen de hidrógeno acumulado incrementó 39.3% con la configuración de tanque agitado y 15% con la columna empacada. También se evaluó la resina iónica A110 en la configuración del tanque agitado, pero mostró resultados menos favorables que las fermentaciones extractivas que usaron la resina PAD950. Posteriormente se llevó a cabo la fermentación extractiva en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR) usando la resina PAD950 para extraer los ácidos carboxílicos en la configuración de tanque agitado, operando en etapas con cargas orgánicas volumétricas de 40 y 60 g azúcares totales/L-d. La producción de hidrógeno aumentó 34.8% y 26.8% para las cargas orgánicas de 40 y 60 g azúcares totales/L-d, respectivamente. Sin embargo, la concentración reducida de sales minerales en el medio pudo afectar la producción de los ácidos, así como modificar las rutas metabólicas. En ambas etapas se observó la presencia de lactato. En general, la extracción de ácidos carboxílicos mediante resinas emerge como una alternativa prometedora para atenuar la inhibición por producto y potenciar el rendimiento de la fermentación oscura. A pesar de su relevancia, la mayoría de los estudios se enfocan en la separación post-fermentación con resinas poliméricas.

Abstract

Title: Improvement of hydrogen and carboxylic acids production through batch and continuous extractive fermentation

KEYWORDS: Extractive fermentation, Hydrogen production, Carboxylic acids, Product inhibition, Dark fermentation, Non-functionalized resins

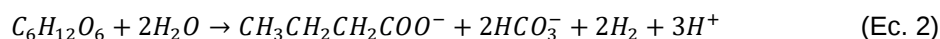
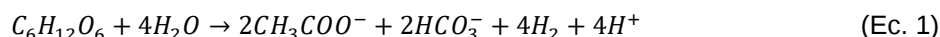
Extractive fermentation, an innovative technique, aims to enhance the production of hydrogen and carboxylic acids by reducing product inhibition in dark fermentation. This study verifies the affinity and adsorption capacity of carboxylic acids (acetic acid, butyric acid, and lactic acid) using the non-ionic polymeric resin PAD950. Extractive fermentations were carried out in batch reactors, using two extraction configurations with the PAD950 resin: a packed column and a stirred tank. The results showed improvements in production: The accumulated hydrogen volume increased by 39.3% with the stirred tank configuration and 15% with the packed column. The ionic resin A110 was also evaluated in the stirred tank configuration but showed less favorable results than the extractive fermentations that used the PAD950 resin. Subsequently, extractive fermentation was carried out in a continuous stirred tank reactor (CSTR) using the PAD950 resin to extract carboxylic acids in the stirred tank configuration, operating in stages with volumetric organic loads of 40 and 60 g total sugars/L-d. Hydrogen production increased by 34.8% and 26.8% for organic loads of 40 and 60 g total sugars/L-d, respectively. However, the reduced concentration of mineral salts in the medium could affect acid production and modify metabolic pathways. Lactate presence was observed in both stages. In general, the extraction of carboxylic acids using resins emerges as a promising alternative to mitigate product inhibition and enhance the yield of dark fermentation. Despite its relevance, most studies focus on post-fermentation separation with polymeric resins.

1 Marco teórico

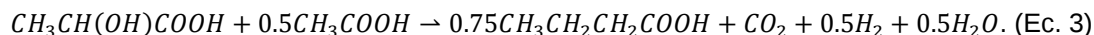
1.1 Fermentación oscura

La fermentación oscura es un proceso en el que los microorganismos anaerobios, estrictos o facultativos, producen hidrógeno (H_2) junto con ácidos carboxílicos, como el ácido acético, láctico y butírico, y dióxido de carbono a través de la oxidación parcial de un sustrato orgánico [1]. Durante la fermentación oscura las bacterias anaerobias fermentan la materia orgánica sin la presencia de luz, utilizando una gran variedad de sustratos tales como carbohidratos, proteínas, lípidos, biomasa lignocelulósica y residuos orgánicos [2].

Por estequiometria, el valor teórico del rendimiento de H_2 es de 4 mol de H_2 /mol hexosa si el acetato es el producto final de la fermentación (Ec. 1), mientras que su valor será de 2 mol de H_2 /mol de hexosa si el producto final es butirato (Ec. 2). En condiciones reales, el rendimiento de H_2 está en el intervalo de 1 a 2.5 mol de H_2 /mol de hexosa [3] debido a la posibilidad de que estén presentes otras rutas metabólicas, a la diversidad del consorcio microbiano, y los fenómenos inhibitorios provocados por los productos y los reactivos [4].



También se ha reportado que el ácido láctico generado por las bacterias ácido-lácticas dentro del consorcio puede ser utilizado junto con el ácido acético para la formación de butirato e hidrógeno (Ec. 3) [5]. Esta ruta metabólica se ha observado durante la transición de la fase de latencia y la fase exponencial en experimentos en lote: se consumen el ácido acético y el ácido láctico que fueron formados durante la fase de retardo y se aprecia un incremento del ácido butírico en el reactor, que coincide con la fase exponencial de la producción de H_2 .



Los principales factores que afectan la producción de H_2 por fermentación oscura son el pH, la temperatura, el tiempo de retención hidráulica, la presión parcial de H_2 ,

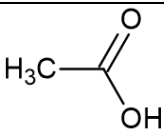
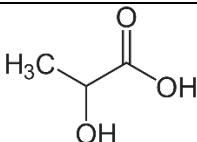
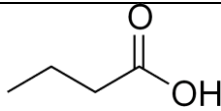
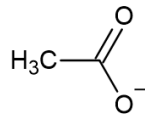
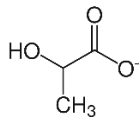
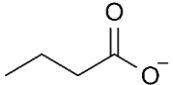
la concentración y composición del sustrato, la fuente y el pretratamiento del inóculo, la configuración del reactor y el modo de operación [2].

1.1.1 Ácidos carboxílicos

La fermentación oscura genera principalmente productos solubles como el acetato y el butirato. No obstante, en ciertos procesos que involucran elevadas concentraciones de sustratos simples, como el suero de leche, se han detectado otros ácidos carboxílicos de cadena corta como el lactato [4]. En lo que respecta a los reactores de fermentación oscura en lote, la producción de ácidos carboxílicos es dependiente de la concentración y del tipo de sustrato [6].

Los ácidos carboxílicos se distinguen por la presencia de un grupo carboxilo (R-COOH) ligado a su estructura de carbono. Cuando este grupo funcional pierde un protón, se convierte en un ácido carboxílico disociado, dando lugar a un carboxilato con carga negativa. En términos de acidez, los ácidos carboxílicos son considerados ácidos débiles debido a que tienen valores de pK_a que oscilan entre 3.86 y 4.82 y se pueden encontrar en su forma disociada a valores de pH entre 2 y 7 (Tabla 1).

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

Ácido carboxílico	Ácido acético	Ácido láctico	Ácido butírico
Estructura			
Nombre de carboxilato (forma desprotonada)	Acetato	Lactato	Butirato
Estructura de carboxilato			
pK_a a 25°C	4.76	3.86	4.82
Intervalo de pH en el cual se encuentra presente el ácido en forma ionizada	2.8-6.8	2.9-6.9	2.8-7.8

1.2 Inhibición de la fermentación oscura

Durante la fermentación oscura puede ocurrir inhibición por producto, provocada tanto por la acumulación de ácidos carboxílicos y/o H_2 dentro del sistema. En el caso de la inhibición por H_2 , el aumento en la presión parcial del H_2 provoca cambios en las rutas metabólicas y favorece la ruta de la homoacetogénesis [7]. La homoacetogénesis se refiere al proceso metabólico llevado a cabo por las bacterias homoacetógenas, bacterias estrictamente anaerobias que tienen la capacidad de sintetizar acetato a partir de ocho equivalentes reductores (por ejemplo, 4 mol de H_2) y dos moles de CO_2 [4].

En el caso de los ácidos carboxílicos, entre 80 y 90% se encuentran en su forma disociada, debido a que el pH de la fermentación oscila entre 5 y 6, mientras el pKa se encuentra entre 4.8 y 3.8 (Tabla 1). En la Figura 1, se observa el porcentaje de disociación de los ácidos carboxílicos presentes típicamente en una fermentación de producción de H_2 .

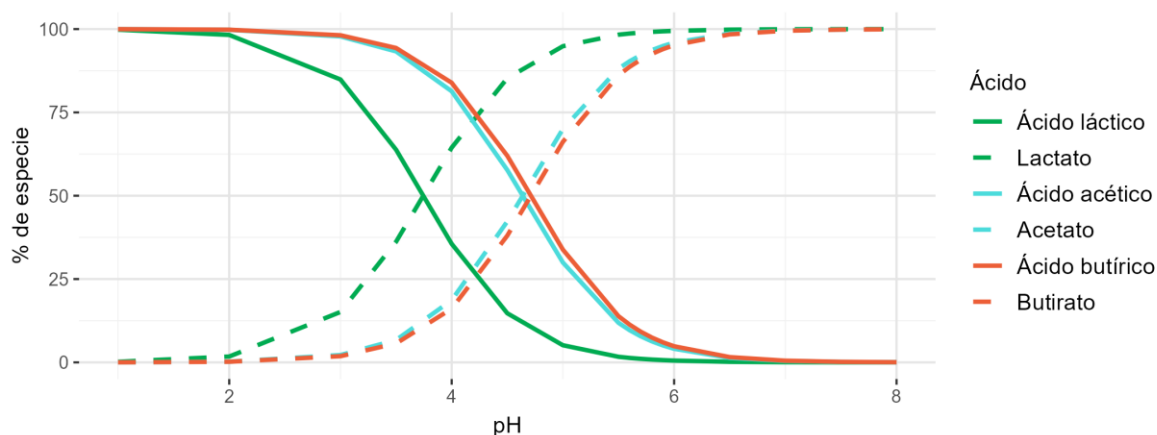


Figura 1. Porcentaje de disociación de ácidos carboxílicos presentes en la fermentación oscura en función del pH.

En el medio de la fermentación oscura coexisten las formas disociadas y no disociadas de ácidos carboxílicos, ambas promueven la inhibición por producto al aumentar su concentración [8].

- Si los ácidos se encuentran en forma no disociada, pueden penetrar en las bacterias, disociarse dentro de ellas y alterar su pH, lo que puede afectar su estado fisiológico y disminuir su crecimiento celular [9], [10].

- Si los ácidos se encuentran en su forma disociada, los iones presentes pueden aumentar la fuerza iónica del medio, lo que a su vez puede estimular la producción de autolisinas y promover la lisis celular de las bacterias productoras de H_2 [11]. La Figura 2 muestra los mecanismos mencionados.

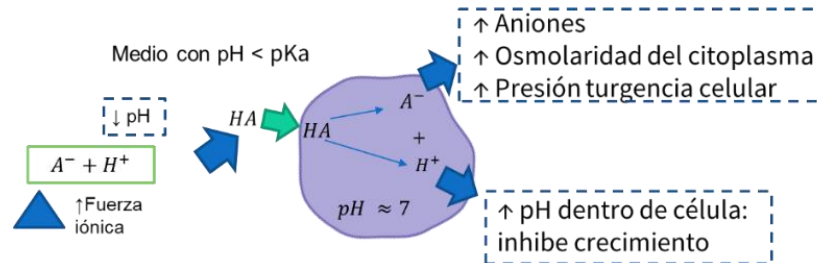


Figura 2. Inhibición por ácidos carboxílicos no disociados en la fermentación oscura. Adaptado de Elbeshbishy et al., 2017[9]

1.3 Fermentación extractiva

La fermentación extractiva implica la extracción de productos durante el proceso fermentativo con el fin de disminuir su concentración en el medio [12]. En el caso de la fermentación oscura, los sistemas extractivos se centran en la disminución del H_2 , los ácidos carboxílicos, o ambos, reduciendo así la inhibición por producto. Entre las técnicas empleadas para extraer ácidos carboxílicos se encuentran la electrodiálisis, los adsorbentes y las resinas poliméricas [13].

1.3.1 Fermentación extractiva con resinas poliméricas

La técnica de fermentación extractiva con resinas poliméricas resulta atractiva debido a su bajo costo y reducida demanda energética en comparación con la nanofiltración y la electrodiálisis [14], [15]. Se ha demostrado que las resinas poliméricas pueden integrarse en sistemas de fermentación en reactores continuos y tienen la capacidad de retener los ácidos carboxílicos generados, lo que aumenta la producción de estos [16], [17].

Se han empleado adsorbentes sólidos porosos de superficie extremadamente amplia, como el carbón activado, polímeros y resinas de intercambio iónico, con el objetivo de eliminar metabolitos del fermentado. Estos adsorbentes pueden añadirse directamente al fermentador o colocarse en un recipiente separado, permitiendo así la circulación del fermentado entre ambos [18].

El mecanismo de adsorción/intercambio iónico entre los ácidos carboxílicos y la resina depende tanto de las propiedades de la resina como del ácido carboxílico. Por ejemplo, el tipo de matriz polimérica, la porosidad y el grupo funcional (fuertemente básico, débilmente básico o no funcionalizada) de la resina pueden afectar su capacidad de adsorción, afinidad y selectividad para los ácidos carboxílicos. De igual forma, la estructura molecular, tamaño, carga y acidez del ácido carboxílico pueden influir en su interacción con la resina [19], [20]. Las resinas poliméricas empleadas en la extracción de ácidos carboxílicos son las resinas iónicas y las no iónicas o no funcionalizadas.

1.3.1.1 Resinas iónicas

El proceso de intercambio iónico en agua consiste en el intercambio de iones en fase acuosa por otros en fase sólida [21]. En el caso de los ácidos carboxílicos y la resina, el intercambio iónico se basa en la formación de enlaces iónicos entre el ácido ionizado y un catión presente en la superficie de la resina [15]. Esto significa que las resinas cargadas positivamente atraen iones con carga negativa. Al pasar agua que contiene ácidos carboxílicos a través de una resina de intercambio aniónico, estos ácidos se intercambian con otros aniones (como cloruro o hidróxido) unidos a la superficie de la resina. Como resultado, se reduce la concentración de ácidos carboxílicos en el agua, ya que quedan retenidos en la resina.

En general, el intercambio aniónico entre los ácidos carboxílicos y la resina implica enlaces iónicos entre el grupo carboxilo ionizado del ácido carboxílico y un catión (como el amonio) en la superficie de la resina. Sin embargo, otros factores como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y efectos estéricos también pueden desempeñar un papel en algunos casos [19], [20].

1.3.1.2 Resinas de intercambio no-iónico o no funcionalizadas

Las resinas no iónicas o no funcionalizadas están hechas por un polímero adsorbente (generalmente sintético) que no contiene grupos cargados en su superficie. Ejemplos de resinas no iónicas incluyen las compuestas por poliestirenos aromáticos, polidivinilbenceno y metacrilato alifático. Estas resinas adsorben ácidos carboxílicos mediante interacciones físicas que dependen de las propiedades tanto

de la resina como del ácido. Entre las interacciones principales se encuentra el efecto hidrofóbico, que es la tendencia de las moléculas no polares a agruparse en agua. Este efecto hace que los ácidos carboxílicos se adhieran a las partes no polares de la matriz de la resina, como cadenas hidrocarbonadas o anillos aromáticos (Figura 3a). Otra interacción es la unión de hidrógeno, que es la atracción entre un átomo de hidrógeno y uno electronegativo, como oxígeno o nitrógeno. La unión de hidrógeno puede ocurrir entre los grupos carboxilos de los ácidos y las partes polares de la matriz de la resina, como las uniones éter o éster (Figura 3b). La fuerza y selectividad de estas interacciones dependen de factores como tamaño molecular, forma, polaridad y acidez de los ácidos carboxílicos y la resina [22].

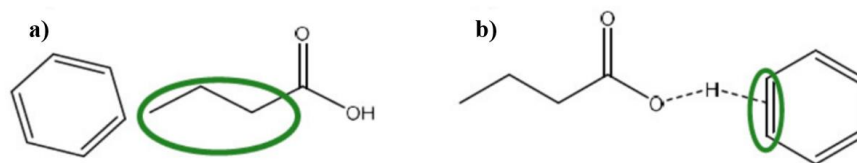


Figura 3. Posibles interacciones entre la resina no funcionalizada y los ácidos carboxílicos presentes en la fermentación oscura: a) Interacciones hidrofóbicas entra la matriz de la resina y las cadenas hidrocarbonadas, b) Puentes de hidrógeno entre grupos carboxílico y zonas polares de la matriz de la resina

1.4 Desafíos en la fermentación extractiva con resinas poliméricas

Es importante tener en cuenta que la presencia de aniones como SO_4^{2-} y Cl^- en el medio puede disminuir considerablemente la eficiencia de adsorción debido a la competencia por los sitios activos en las resinas de intercambio iónico [12]. En la fermentación, este problema es recurrente ya que el fermentado contiene ácidos carboxílicos y ciertos iones, siendo los más comunes Na^+ , K^+ , $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, Cl^- , y SO_4^{2-} [23].

Al seleccionar una resina es necesario considerar sus propiedades químicas, como la capacidad de intercambio y selectividad, así como sus propiedades físicas, como el tamaño de partícula, estabilidad, hinchazón, humedad y densidad de la resina

[21]. También deben tomarse en cuenta las condiciones de elución para la regeneración de la resina [24].

Un problema común en estos sistemas es la adsorción de células en las resinas, lo cual puede prevenirse mediante la inmovilización de la biomasa, la microfiltración del medio de fermentación antes de pasar por la columna de adsorción, o recubriendo el adsorbente con algún material protector. Se ha reportado en la literatura el uso de resinas de intercambio iónica recubiertas por capa de un polímero no iónico, como la agarosa, para reducir la adsorción celular [12], [25].

2 Antecedentes

Las investigaciones donde se implementa un sistema de intercambio iónico durante la fermentación oscura son escasas. En la mayoría de los estudios, el intercambio iónico se aplica al final del proceso, posterior a la fermentación, para tratar el fermentado y separar los ácidos carboxílicos. Además, en la literatura es común encontrar el uso de soluciones sintéticas que simulan el fermentado para evaluar la capacidad de intercambio iónico de las resinas. Sin embargo, tienen la desventaja de que no contienen biomasa, por lo que no se puede evaluar correctamente si la presencia de biomasa en un fermentado real afectará el desempeño de la resina.

Entre los estudios reportados donde se han usado resinas en la fermentación extractiva se encuentra el de Karekar y colaboradores (2020) [17], que operaron un reactor conectado a un tanque agitado que contenía resina para remover el ácido acético generado. Utilizando este sistema para controlar el pH, lograron incrementar hasta 1.6 veces la formación de ácido acético. Otros estudios han empleado sistemas de alimentación discontinua (fed-batch), por ejemplo, Garrett y colaboradores (2015) [16] operaron un reactor durante 107 días, utilizando una resina de base débil (IRA-67) con el objetivo de retener los ácidos láctico y acético producidos, y regular el pH del medio mediante este sistema de extracción. Con este enfoque, la productividad de la fermentación aumentó 1.3 veces en comparación con el reactor control (que no utilizaba resina). En la Tabla 2 se presentan algunos estudios en los que se han empleado resinas de intercambio iónico para mitigar la inhibición de la fermentación oscura por la producción de ácidos carboxílicos.

Tabla 2. Ejemplos de sistemas que han empleado resinas de intercambio iónico y no iónico para remover ácidos carboxílicos de fermentados.

Resina	Características de la resina	Medio	Acido carboxílico removido	Referencia
Amberlite FPA53	Amina terciaria	Fermentado acetogénico de H ₂ -CO ₂	Acetato	[17]
Amberlite IRI-67	Amina terciaria	Efluente de fermentación de pulpa de dátil	Lactato	[24]
Amberlite 120	Ácido sulfónico			
Amberlite IRA67	Amina terciaria	Efluente de fermentado de azúcares de maíz	Lactato y acetato	[16]
Amberlyst A21	Amina terciaria	Efluente de fermentado de residuos vitivinícolas	Ácido acético, propiónico, butírico, valérico y caproico	[15]
Sepra NH2	Amina primaria			
Sepra ZT-SAX y Sepra SAX	Amina cuaternaria (sílica y polimérica)			
Amino SBA-15	Amina primaria, secundaria y terciaria (mesoporosa, no comercial)	Solución sintética que simula fermentado	Acido pirúvico y succínico	[26]
Lewatit VP OC 1065	Amina primaria	Solución sintética que simula fermentado de aguas residuales	Acido butírico, propiónico, acético, láctico. Iones comunes: H ₂ PO ₄ ⁻ / HPO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ y SO ₄ ²⁻	[23]
Amberlite IRA96 RF	Amina secundaria			
Amberlite IRA96 SB	Amina terciaria			
Lewatit VP OC 1064 MD	No funcional			

2.1 Antecedentes del uso de resinas para fermentación extractiva en el grupo de trabajo

En el grupo de trabajo de fermentación oscura de la DCA en el IPICYT, Núñez-Valenzuela (2021) [27] evaluó la capacidad de intercambio iónico y la cinética de tres resinas de intercambio iónico con ácidos carboxílicos, con el objetivo de

seleccionar la más adecuada e incorporarla a un sistema de fermentación extractiva en lote. Las resinas utilizadas fueron Purolite A110 (amina primaria, macroporosa), A845 (amina terciaria, en gel) y PAD950 (no iónica, macroporosa), siendo la primera la que presentó un mayor porcentaje de remoción de ácidos carboxílicos. En dicho estudio, también se evaluaron diferentes concentraciones de sales en la alimentación de un reactor continuo de tanque agitado de 1 litro, un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 6h, con carga orgánica volumétrica (COV) de 60 g azúcares totales/L-d, con el fin de disminuir la concentración de los aniones en el medio de cultivo de la fermentación oscura y evitar la competencia por los sitios activos en la resina de intercambio iónico. Posteriormente, se operó un reactor de tanque agitado en lote conectado a una columna que contenía la resina de intercambio iónico Purolite A110; durante su funcionamiento la biomasa entraba a la columna, acumulándose en la misma, provocando una concentración dinámica de ácidos carboxílicos generada tanto por su remoción como por su producción al interior de la columna.

Núñez-Valenzuela (2021) [27] reportó que no fue posible obtener la curva de rompimiento en la columna de intercambio iónico debido a la concentración dinámica de los ácidos carboxílicos en la entrada de la columna y al gradiente de concentración a lo largo de la misma. Otro problema que enfrentó la columna fue el proceso simultáneo de intercambio y regeneración de los sitios activos; esto ocurre porque los ácidos quedan retenidos en la resina y al realizar el intercambio iónico liberan contraiones (-OH), lo que provoca un aumento gradual del pH en el flujo que atraviesa la columna. Este incremento en el pH continúa hasta alcanzar un nivel lo suficientemente básico, lo que provoca la desprotonación de la resina y la pérdida de afinidad por los ácidos.

3 Justificación

Con el objetivo de buscar alternativas que puedan mitigar los problemas de operación identificados por Núñez Valenzuela (2021) [27], en este trabajo se propone utilizar una resina polimérica no ionizada, con el fin de evitar la competencia por los sitios activos en la resina. También se explorará la alternativa de reemplazar la columna empacada por un tanque agitado. Este enfoque tiene como objetivo evitar el taponamiento y problemas operacionales causados por la entrada y acumulación de biomasa en la columna. Adicionalmente, esta configuración también podría ayudar a mitigar el proceso de intercambio-regeneración que ocurre dentro de la columna, mejorando así la eficiencia del sistema de extracción de ácidos carboxílicos.

Después de obtener los resultados utilizando ambas configuraciones y empleando las dos resinas mencionadas, se procederá a comparar los obtenidos por Núñez-Valenzuela (2021) [27]. El objetivo de esta comparación es seleccionar la resina y la configuración que ofrezcan un mejor desempeño para, posteriormente, llevar a cabo la fermentación extractiva en un proceso continuo.

4 Hipótesis y objetivos

4.1 Hipótesis

- La resina no iónica PAD950 evitará los inconvenientes asociados al proceso de intercambio-regeneración.
- La fermentación extractiva con la resina en un tanque agitado reducirá los problemas operativos en comparación con el uso de una columna empacada.
- Al implementar un sistema de extracción con resina para retener ácidos carboxílicos en un reactor continuo de fermentación oscura, se potenciará la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos en comparación con sistemas sin fermentación extractiva.

4.2 Objetivos

- Comprobar afinidad de la resina polimérica PAD950 hacia los ácidos carboxílicos presentes en la fermentación oscura.
- Comparar la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos en dos configuraciones distintas de sistemas de extracción de ácidos carboxílicos acoplados a un reactor de fermentación oscura en lote: columna empacada y tanque agitado. Lo anterior con el fin de determinar cuál es la configuración más eficiente y, al mismo tiempo, reducir los problemas operativos debido a la acumulación de biomasa en la columna empacada de extracción de ácidos carboxílicos.
- Evaluar el desempeño de un sistema de intercambio iónico o adsorción en un sistema continuo de fermentación extractiva para la remoción de ácidos carboxílicos.

5 Metodología

5.1 Estrategia experimental

En términos generales, en este trabajo se estudió la fermentación extractiva utilizando resinas de intercambio iónico/adsorción como medio de extracción selectiva de ácidos carboxílicos presentes en un fermentado. Para ello, en primer lugar se realizaron cinéticas de adsorción/intercambio iónico con la resina no funcionalizada PAD950 y un fermentado, con el fin de determinar su capacidad de adsorción y comprobar su afinidad por los ácidos carboxílicos presentes. Posteriormente, se procedió a realizar una fermentación extractiva en lote en la que se conectó un fermentador de tanque agitado a una columna empacada con la resina PAD950, y finalmente, evaluar otra configuración al sustituir la columna empacada por un tanque agitado que contenía la resina PAD950. A partir de los datos experimentales obtenidos se seleccionó el sistema de extracción con mejor desempeño y se realizó un experimento en un reactor de fermentación oscura en continuo. En la Figura 4, se presenta un diagrama general de la metodología con la secuencia utilizada. A continuación, se detallarán cada una de estas etapas con mayor profundidad, así como los materiales utilizados.

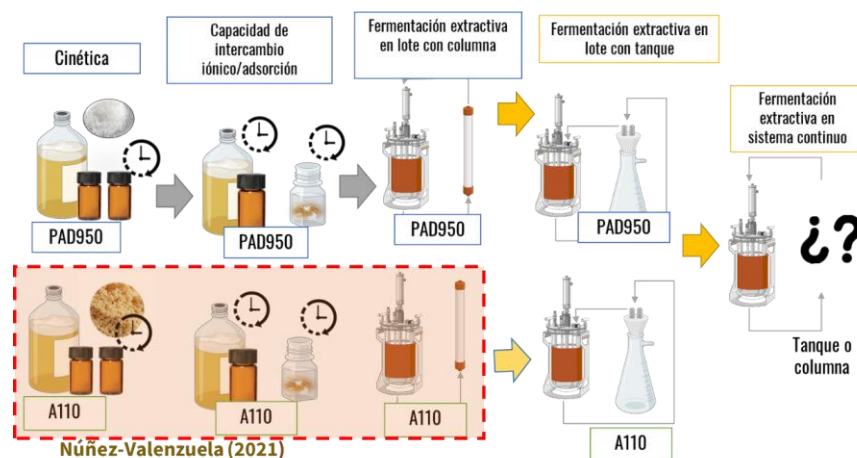


Figura 4. Diagrama de la metodología empleada: Comparación de las resinas A110 y PAD950 a través de estudios cinéticos y capacidad de adsorción/intercambio iónico, pruebas de fermentación extractiva en lote colocando la resina en columna empacada y tanque agitado, y análisis comparativo para la selección de configuración en sistemas continuos. El recuadro rojo especifica las pruebas previamente realizadas por Núñez-Valenzuela (2021) [26].

5.2 Inóculo, sustrato y medio mineral

Como inóculo se utilizó lodo granular metanogénico obtenido de un reactor UASB que trata los efluentes de la tequilera Casa Herradura (Amatitán, Jalisco). Antes de su uso, el lodo granular se sometió a un tratamiento térmico a 105°C durante 24 horas para eliminar a los microorganismos consumidores de hidrógeno. Luego, se redujo el tamaño de las partículas del lodo mediante un molino de bolas hasta alcanzar un tamaño de 850 μm (malla #20). El lodo tratado tenía un contenido de sólidos volátiles (SV) de 0.83 g por g de sólidos totales (ST).

Se utilizó suero de leche en polvo como sustrato en los experimentos de fermentación. El suero utilizado provino de Chilchota Alimentos S.A. de C.V. y contenía 0.75 g de lactosa y 1.01 g de DQO por g de suero. El medio mineral utilizado fue el medio reducido en sales descrito por Núñez-Valenzuela (2021) [27], conteniendo los siguientes macro y micronutrientes (mg/L): NH_4Cl , 700; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.125; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.7; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.91; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10.25. Es importante destacar que las concentraciones presentes en este medio están diluidas 10 veces en comparación con las concentraciones que normalmente se utilizan en el grupo de trabajo para experimentos de producción de hidrógeno [28].

5.3 Resinas poliméricas y acondicionamiento previo a su uso

Para este trabajo se usaron dos resinas poliméricas, Purolite A110, y Purosorb (PAD) 950, proporcionadas por Purolite S. de R.L. de C.V. (EUA), previamente seleccionadas por Núñez-Valenzuela (2021) [26]. Las características de las resinas se muestran en la Tabla 3.

Con el fin de evitar la presencia de gas en los poros de las resinas poliméricas utilizadas en los experimentos, se realizó un proceso de acondicionamiento previo, cubriendo las resinas con agua miliQ a 95°C e incubándolas durante 24 horas a 37°C y 100 rpm [27]. Es importante destacar que en ninguno de los experimentos mencionados se mezclaron las resinas, sino que se utilizó únicamente una de ellas en cada experimento.

Tabla 3. Especificaciones de las resinas poliméricas utilizadas en este trabajo.

Resina polimérica	A110	PAD 950
Tipo de resina	Base débil libre, macroporosa	Adsorbente, macroporosa
Estructura del polímero	Poliestireno reticulado con divinilbenceno	Acrílico
Tamaño de partícula	300-1200	350-1200
Tamaño/volumen de poro	20-100 nm	0.6 mL/g
Área superficial (min.)	-	450 m ² /g
Macro y meso poroso d50 (min.)	-	130 Å
Grupo funcional	Amina primaria	No iónico o no funcionalizada
Contra ion	OH ⁻	-
Capacidad de intercambio total	2 eq/L (43.7 Kgr/ft ³)	-

Además de los datos proporcionados por el fabricante, se determinó la distribución de cargas de la resina A110 utilizando un titulador automático Metler Toledo (PL 70). Se dispersaron 1.0 mg de resina en 25 mL de agua desionizada y se agitaron durante 24 horas. Luego se llevó a cabo la titulación en una atmósfera de N₂, utilizando NaOH 0.1 M para minimizar las interferencias por CO₂. Los iones liberados se calcularon siguiendo el método reportado por Arcibar-Orozco (2013) [29]. Paralelamente, se realizó un ensayo de control sin la inclusión de resina.

5.4 Regeneración de resinas

Para regenerar los sitios activos de las resinas, se procedió a lavar la resina después de su utilización. Luego se añadieron aproximadamente 100 mL de NaOH 1 M y se incubó durante 24 horas bajo agitación orbital a 100 rpm y 37°C. Tras esto, se decantó la resina y se incubó nuevamente (37 °C) por 12 horas con una solución 50:50 v:v de etanol y agua. Posteriormente, se decantó nuevamente la resina y se lavó con agua desionizada hasta que el agua de lavado alcanzó un pH de 7 [27].

5.5 Cinéticas y determinación de la capacidad de intercambio iónico/adsorción usando un fermentado

Para evaluar cómo interactúa la resina PAD950 con los ácidos carboxílicos y las sales minerales presentes en un fermentado, se llevó a cabo un estudio cinético

utilizando viales sacrificables que contenían 15 mL de fermentado y una concentración de 0.04 mg de resina PAD950/mg de solución. Cabe mencionar que antes de empezar los experimentos se ajustó el pH del fermentado a 5.8-5.9, ya que es el intervalo en el cual se opera la fermentación. Los viales se incubaron a 37°C con agitación orbital (100 rpm) y se tomaron muestras de la solución a los 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos. El criterio utilizado para determinar el final de la cinética consistió en verificar que tres puntos consecutivos de la misma tuvieran una desviación estándar inferior al 10% al medir la concentración de ácidos carboxílicos presentes. Se midió el pH de cada muestra y posteriormente se filtró el líquido utilizando un filtro de 0.22 μm para determinar la concentración de ácidos carboxílicos (formiato, acetato, lactato y butirato) y cloruro mediante electroforesis capilar.

En un experimento similar, los viales se incubaron hasta alcanzar el equilibrio (aproximadamente 4 horas) y luego se tomó una muestra para determinar las concentraciones de ácidos carboxílicos y cloruros presentes. A continuación, se reemplazó el volumen de fermentado por 15 mL de NaOH 1M y se incubó durante 24 horas. Finalmente, se midió la concentración de ácidos carboxílicos que se eluyeron en la solución.

Para evaluar si la presencia de iones en el fermentado afectaba la capacidad de adsorción e intercambio iónico, se llevaron a cabo pruebas adicionales, en las cuales se repitieron los experimentos anteriores utilizando un fermentado sin sales minerales. Posteriormente, se compararon los resultados con los obtenidos previamente.

5.5.1 Fermentado para las cinéticas y determinación de adsorción/intercambio iónico

Para obtener el fermentado que se usó en las cinéticas con las resinas, se operó un reactor continuo de tanque agitado (CSTR, Applikon modelo Z310210011) con un volumen de trabajo de 1 L y un espacio de cabeza de 0.3 L. Previo a la operación, el espacio de cabeza fue purgado con una mezcla de $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (80:20 v:v) durante 10 minutos para crear un ambiente anaerobio. Inicialmente, el reactor operó en lote

durante 24 horas, usando una concentración inicial de 15 g de azúcares totales/L, una relación sustrato/inóculo de 2.7 g sustrato/g SV y la composición de macro y micronutrientes descrita en la sección 6.2. Posteriormente, el CSTR se operó en continuo a un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 6 horas y una carga orgánica volumétrica de 60 g de azúcares totales/L-d. Durante la operación en continuo, se mantuvo una temperatura constante de 37°C, agitación a 300 rpm y un pH de 5.8 mediante un controlador automático. El estado estacionario del reactor CSTR se determinó cuando la producción volumétrica diaria de H₂ presentó una desviación estándar inferior a 10% durante al menos 12 TRH seguidos.

Para la caracterización de las resinas, se recolectaron dos tipos de fermentados: uno con presencia reducida de sales minerales y otro sin ellas. El primero se obtuvo del CSTR en estado estacionario, cuya alimentación contenía macro y micronutrientes en las concentraciones especificadas en la sección 6.2. El segundo fermentado se obtuvo de la operación del CSTR sin los macro y micronutrientes en la alimentación, recolectándolo después de dos TRH desde el momento en que se eliminaron las sales. Los fermentados fueron centrifugados a 3200 rpm durante 10 minutos para separar la biomasa de la fermentación antes de su utilización.

5.6 Fermentación extractiva en lote.

Se utilizó el reactor Applikon anteriormente descrito, equipado con un controlador automático para mantener la agitación (300 rpm), pH (5.8) y temperatura (37°C) constantes. El volumen de trabajo fue de 1 L con un espacio de cabeza de 0.3 L. Para crear una atmósfera anaerobia, se burbujeó una mezcla de N₂:CO₂ (80:20 v:v) para desplazar el espacio de cabeza. Se inició la fermentación con una concentración inicial de 15 g de azúcares totales/L y una relación sustrato/inóculo de 2.7 g sustrato/g SV. La producción de H₂ se midió continuamente mediante un contador de micro caudales de gas µFlow (BPC Instruments). Para controlar el pH se adicionó NaOH 5 M. Previo a la fermentación extractiva, se realizó una fermentación control en lote por duplicado, bajo las condiciones ya descritas y en la cual no se utilizó resina.

Se realizaron tres configuraciones de fermentación extractiva en lote: con configuración de columna y resina PAD950 (PAD950-C), con configuración de tanque agitado y resina PAD950 (PAD950-T) y con configuración de tanque agitado y resina A110 (A110-T). Cabe mencionar que Núñez-Valenzuela (2021) [26] un experimento con la configuración de columna empacada con resina de intercambio iónico A110 (A110-C). Las diferentes configuraciones experimentales, incluyendo la realizada por Núñez-Valenzuela (2021) [27], se ilustran en la Figura 5.

Todas las resinas fueron regeneradas y el eluyente se analizó mediante electroforesis capilar para cuantificar los ácidos carboxílicos retenidos en la resina. Los ácidos carboxílicos retenidos fueron considerados en los rendimientos molares de los compuestos de interés en el proceso. En todos los experimentos de fermentación extractiva en lote se utilizó resina nueva para llevar a cabo el proceso de extracción. Una vez finalizado el experimento, la resina fue regenerada para ser reutilizada en futuros experimentos. Se consideró el gas producido en el recipiente contenedor de la resina para obtener la producción total de H_2 , así como obtener los parámetros en el modelo de Gompertz. Todos los experimentos de fermentación extractiva en lote se hicieron por duplicado.

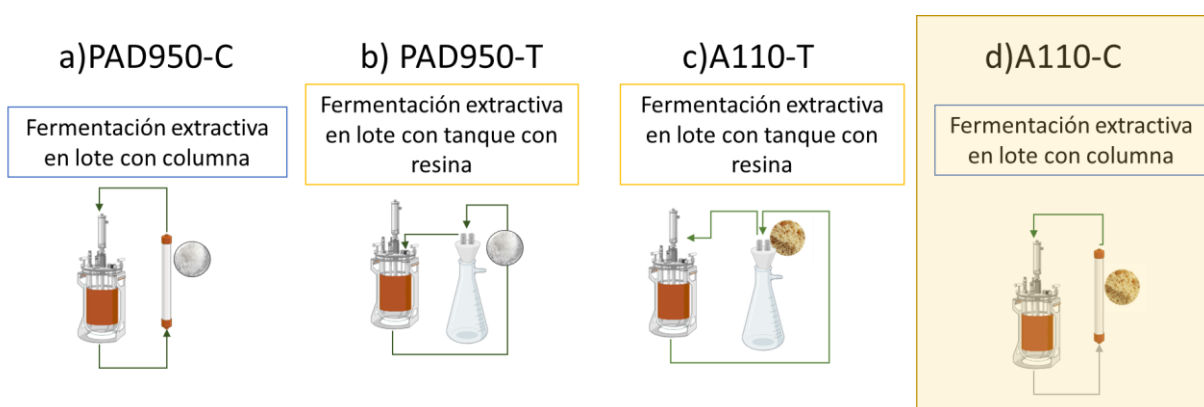


Figura 5. Configuraciones de fermentación extractiva en lote con resinas A110 y PAD950. Nomenclatura utilizada en las configuraciones: El nombre de la resina utilizada (A110 o PAD950), "C" y "T" denotan "columna" y "tanque", respectivamente. El experimento A110-C fue realizado por Núñez-Valenzuela (2021) [26], cuyos resultados se utilizan para fines comparativos.

5.6.1 Fermentación extractiva en lote configuración de columna y resina PAD950 (PAD950-C)

Se utilizó una columna empacada con un volumen de 126.3 mL conteniendo 76 gramos de resina PAD950. El flujo (4.21 mL/min) de entrada a la columna inició a las 8 horas de comenzada la fermentación y la columna se mantuvo conectada al reactor durante 6 horas. Es esencial mencionar que el efluente que salía de la columna se recirculaba nuevamente al fermentador. Para evitar el lavado celular en el fermentador, el tiempo de contacto en cama vacía (EBCT) de la columna se mantuvo en 30 minutos [27].

Se tomó muestra del fermentado a la entrada y salida de la columna empacada durante cada hora de operación de la fermentación extractiva para medir el pH y la concentración de ácidos carboxílicos.

5.6.2 Fermentación extractiva en lote configuración de tanque agitado y resina PAD950 (PAD950-T)

Como sistema extractivo para llevar a cabo la extracción de ácidos carboxílicos en la configuración de tanque agitado se empleó un matraz kitasato de 500 mL con tres aberturas: dos se utilizaron para la entrada y salida del fermentado, mientras que la tercera se conectó a un sistema para medir la producción de gas dentro del matraz, utilizando una probeta invertida sumergida en una solución saturada de sal. Un agitador magnético aseguró una agitación constante en el interior del matraz, similar a un tanque de mezcla homogénea. El volumen de trabajo en el matraz fue de 126.3 mL, conteniendo 76 gramos de resina PAD950, cantidad similar a la utilizada en la configuración de columna empacada. El tiempo de residencia dentro del matraz se estableció en 30 minutos, homologado al EBCT de la columna. La operación del sistema extractivo comenzó a las 8 horas del inicio de la fermentación y se mantuvo en funcionamiento durante 7 horas. Se tomó muestra del fermentado a la entrada y salida del sistema extractivo en tanque agitado conteniendo la resina durante cada hora de operación de la fermentación extractiva para medir el pH y la concentración de ácidos carboxílicos. Es importante recalcar que, con el fin de evitar la salida de

resina del matraz, se colocó un filtro al inicio de la manguera que conectaba el matraz al reactor. En el anexo 1 se muestran fotografías del sistema.

5.6.3 Fermentación extractiva en lote configuración de tanque agitado y resina A110 (A110-T)

Este experimento tuvo el mismo diseño que el descrito en la sección 6.6.2 (PAD950-T), solo que se usó la resina A110 con la misma masa de resina (86 g) que la usada por Núñez-Valenzuela (2021) [27] en el sistema A110-C.

5.7 Fermentación extractiva en un reactor continuo

Los experimentos en continuo se llevaron a cabo en un reactor CSTR Applikon, modelo Z310210011, equipado con un controlador automático para agitación (300 rpm), pH (5.8) y temperatura (37 °C). El volumen de trabajo se mantuvo en 1 L, dejando 0.3 L de espacio de cabeza. Para generar un ambiente anaerobio, se desplazó el aire en el espacio de cabeza con una mezcla de N₂:CO₂ (80:20, v:v) durante 10 minutos antes de iniciar la operación. Inicialmente el reactor se operó en lote a una concentración de sustrato de 10 g azúcares totales/L por 24 horas antes de la operación en continuo. Se operaron dos etapas en continuo a COV de 40 g azúcares totales/L-d y de 60 g azúcares totales/L-d y TRH de 6 horas. En ambas etapas, una vez alcanzado el estado estable, se conectó el sistema de extracción de ácidos carboxílicos de tanque agitado que contenía la resina PAD950. La fermentación extractiva se llevó a cabo durante un periodo de 18 horas, equivalente a 3 TRH, y la resina se reemplazó por una nueva cada 6 horas. Durante la operación se tomaron muestras tanto del fermentado del CSTR, como de la salida del sistema extractivo de tanque agitado para medir el pH y la concentración de ácidos carboxílicos. Se tomaron muestras cada hora durante las primeras 6 horas y posteriormente cada 2 horas hasta concluir el periodo de extracción de 18 horas.

5.8 Métodos analíticos

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST) fueron determinados por los métodos estándar [30]. La concentración de ácidos carboxílicos y cloruros en los fermentados se determinaron por electroforesis capilar (Agilent 1600A, Waldbronn, Alemania) con buffer aniónico (Agilent pH 12.1) y

columna capilar de sílica (Agilent, id=50 mm, L=80.5 cm, longitud efectiva=72 cm) a 25 °C y voltaje ajustado a 30 Kv [6]. La composición del gas producido se analizó por cromatografía de gases (GC, 6890N Network GC System, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con un detector de conductividad térmica y una columna capilar Hayesep D (Alltech, Illinois, EE. UU.), empleando nitrógeno como gas portador. Las temperaturas del inyector, horno y detector se fijaron en 250°C, 60°C y 250°C, respectivamente [31].

5.9 Cálculos

5.9.1 Modelo de producción de hidrógeno en lote

Se ajustó el modelo de Gompertz modificado (Ec. 4) a los datos obtenidos para describir la cinética de producción de H₂ en los reactores en lote.

$$H(t) = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{e R_{max}}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde H(t) es el volumen de H₂ acumulado (mL H₂/L) dependiente del tiempo t (h), H_{max} es el máximo volumen de hidrógeno acumulado (mL H₂/L), e es el número de Euler (2,71828), R_{max} es la tasa máxima de producción de hidrógeno (mL H₂/L-h) y λ es el tiempo de la fase de latencia (h). Los valores de H_{max}, λ y R_{max} fueron determinados con el método Rosenbrock quasi-Newton en el software Statistica.

5.9.2 Ecuaciones utilizadas para el cálculo de capacidad de adsorción/Intercambio iónico

$$C_{eqr} = C_o - C_{eq} \quad (\text{Ec. 5})$$

$$Q = \frac{C_o - C_{eq}}{C_r} \quad (\text{Ec. 6})$$

$$\text{Regeneración} = \left(1 - \frac{C_{eqr} - C_{des}}{C_{eqr}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

C_o es la concentración de adsorbato inicial en el fermentado

C_{eq} es la concentración de adsorbato en el fermentado en el equilibrio

C_{eqr} es la concentración de adsorbato en la resina en condiciones de equilibrio

Q es la capacidad de adsorción/intercambio iónico

C_r es la concentración de resina

C_{des} es la concentración de adsorbato en la solución de regeneración

Regeneración es el porcentaje de sitios activos recuperados tras la regeneración de la resina

5.9.3 Cálculos de rendimientos molares

$$RMH = \frac{\text{mol de } H_2 \text{ producido}}{\text{mol de hexosa consumida}} \quad (\text{Ec. 8})$$

$$RMA = \frac{\text{mol de Acetato producido}}{\text{mol de hexosa consumida}} \quad (\text{Ec. 9})$$

$$RML = \frac{\text{mol de Lactato producido}}{\text{mol de hexosa consumida}} \quad (\text{Ec. 10})$$

$$RMB = \frac{\text{mol de Butirato producido}}{\text{mol de hexosa consumida}} \quad (\text{Ec. 11})$$

RMH es el rendimiento molar de hidrógeno por mol de hexosa consumida

RMA es el rendimiento molar de acetato por mol de hexosa consumida

RML es el rendimiento molar de lactato por mol de hexosa consumida

RMB es el rendimiento molar de butirato por mol de hexosa consumida

6 Resultados y discusión

6.1 Cinética y capacidad de adsorción de la resina PAD950

Con el fin de disminuir la concentración de la biomasa presente y mitigar posibles interferencias e interacciones con la resina, el fermentado se centrifugó previo a su uso. Se utilizaron dos fermentados: uno que contenía medio mineral reducido y otro que no lo contenía. Antes de iniciar las cinéticas, se ajustó el pH del fermentado a 5.8-5.9. Las muestras se tomaron en los intervalos de tiempo especificados en la sección 6.5, considerando que se alcanzó el equilibrio cuando la desviación estándar de las últimas tres muestras fue menor a 10% de la media de la concentración de ácidos carboxílicos en el medio.

En la Figura 6 se presentan las cinéticas de adsorción de los dos fermentados, donde la relación $\text{Concentración/Concentración inicial}$ representa la fracción de ácidos carboxílicos y cloruros que aún permanecen disueltos en el medio. El sistema con medio mineral reducido en sales tardó aproximadamente 120 minutos en alcanzar el equilibrio, mientras que el sistema sin medio mineral tardó 180 minutos en llegar a dicho estado. Esta diferencia podría deberse a que la fuerza impulsora del fenómeno difusional (gradiente de concentración) es mayor en el fermentado con medio mineral reducido en sales que en el que no contiene sales.

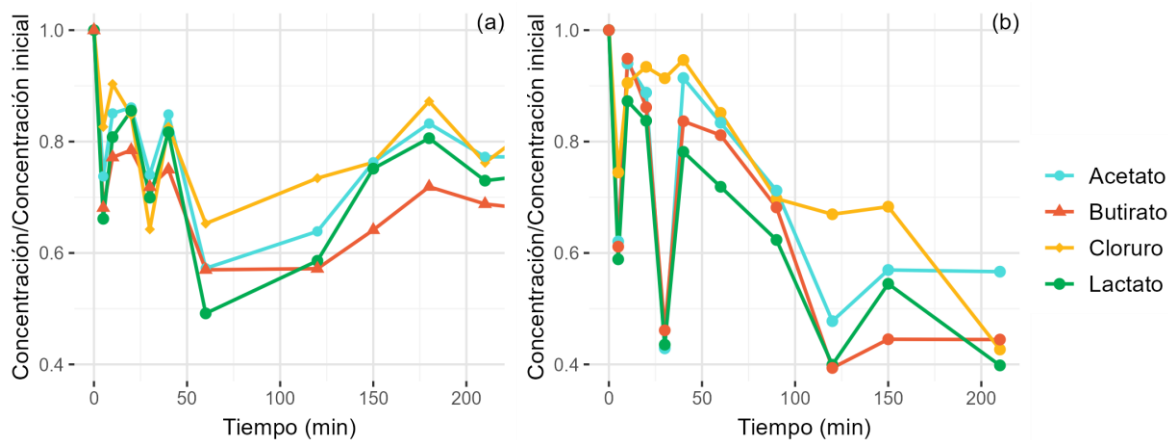


Figura 6. Cinética de adsorción de cloruros y ácidos carboxílicos, usando la resina no iónica PAD950 (a) Fermentado con medio mineral reducido en sales; (b) Fermentado sin medio mineral.

En ambas cinéticas no hubo cambios drásticos de pH, lo que se atribuye a que la resina polimérica PAD950 es una resina no funcionalizada y, por lo tanto, no libera contracción alguno que altere el pH de la solución. En contraste, si se tratase de una resina iónica, el intercambio iónico provocaría un aumento en el pH al liberar iones OH^- , coincidiendo con lo observado por Núñez-Valenzuela (2021) [27]. El poco cambio en el pH podría ayudar a inferir que el principal mecanismo de retención de ácidos carboxílicos en este caso es la adsorción.

El comportamiento observado en ambas cinéticas no se ajusta a lo esperado en una cinética convencional. A pesar de los intentos por ajustar los datos a modelos cinéticos de primer y segundo orden, con ninguno se logró obtener una correlación satisfactoria. Por lo anterior, sería recomendable investigar otros modelos o enfoques para una mejor comprensión de la cinética de este sistema específico. Una propuesta a considerar sería llevar a cabo la cinética utilizando una solución sintética con concentraciones similares a las del fermentado empleado y comparar los resultados. Si el comportamiento difiere entre la solución sintética y el fermentado utilizado, se podría suponer que el material orgánico residual y/o las especies que están en menor cantidad y no fueron consideradas en el estudio, como los fosfatos, influyen en el comportamiento cinético observado.

La capacidad de adsorción de la resina puede determinarse mediante un balance de masa, considerando las concentraciones iniciales y de equilibrio de los solutos (Tabla 4). Los resultados confirman que la resina tiene afinidad por los ácidos carboxílicos del fermentado, y muestra que la resina es más selectiva hacia el butirato que al acetato y lactato. Esta preferencia podría explicarse por la cadena alifática más larga del butirato respecto a los otros dos ácidos, lo que incrementa la interacción hidrofóbica entre la molécula de butirato y la superficie de la resina.

Existen variaciones en la capacidad de la resina para adsorber ácidos carboxílicos y cloruros, dependiendo de si los fermentados contienen o no sales minerales. La concentración inicial de ácidos carboxílicos fue mayor en los ensayos que utilizaron fermentados con sales minerales reducidas, en comparación con aquellos que no las contenían (Anexo 1). Se atribuye esta diferencia a la reducción en la producción

de ácidos carboxílicos cuando se excluyen las sales minerales en la alimentación del reactor CSTR, fuente de los fermentados utilizados en los experimentos.

Las capacidades de adsorción de la resina PAD950 fueron mayores en el fermentado que contenía sales minerales (Tabla 4). Al comparar la magnitud de la capacidad de adsorción con la de la resina polimérica A110 (amina primaria) utilizada por Núñez-Valenzuela (2021) [27], se observa una diferencia, ya que se reportó un incremento en la capacidad de intercambio iónico al usar un fermentado sin sales minerales. Este fenómeno se explicó por la disminución de la competencia entre las sales y los ácidos carboxílicos por los sitios activos de la resina iónica. Siguiendo esa lógica, se esperaría una mayor capacidad de remoción de ácidos carboxílicos al utilizar un efluente con menor concentración de sales minerales. Sin embargo, la resina PAD950 muestra una mayor capacidad de adsorción con un fermentado que contiene sales minerales, lo que sugiere que otros factores, como la concentración inicial de ácidos carboxílicos, pueden estar influyendo en la capacidad de adsorción. Lo anterior concuerda con lo observado por Reyhanitash et al (2020) [23], donde una resina no funcionalizada (Lewatit VP OC 1064 MD PH), mostró mayor selectividad hacia los ácidos carboxílicos y poca afinidad hacia los iones de las sales presentes en la solución, mientras que las resinas iónicas (funcionalizadas con aminas) tuvieron mayor selectividad a los iones y sales minerales.

Tabla 4. Capacidad de adsorción/intercambio iónico de resina PAD950 en fermentados con diferentes concentraciones de sales minerales. Concentraciones iniciales en el fermentado: Con medio mineral reducido (g/L): Cloruro: 1.9; Acetato: 2.1; Lactato: 2.6; Butirato: 4.4. Sin medio mineral (g/L): Cloruro: 1.2; Acetato: 1.1; Lactato: 2.9; Butirato: 2.4.

Fermentado	Q (mmol/g)				
	Cl-	Acetato	Lactato	Butirato	Total
Con sales minerales reducidas	0.6 ± 0.2	0.4±0.5	0.4±0.1	0.8±0.1	2.1±0.3
Sin sales minerales	0.1 ±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.4 ±0.1

La conjetura de que una mayor concentración de ácidos carboxílicos en el fermentado con sales minerales resulta en una mayor capacidad de adsorción de la resina parece plausible. Sin embargo, para corroborar esta afirmación y entender

más a fondo el comportamiento de la resina con los ácidos carboxílicos, sería adecuado realizar una serie de isotermas con diferentes concentraciones iniciales de los ácidos carboxílicos. Esto permitiría examinar en mayor detalle la relación entre la concentración inicial de ácidos carboxílicos y la capacidad de adsorción de la resina. Además, este tipo de experimento ayudaría a validar la teoría de que el gradiente de concentración entre la resina y el medio impulsa la difusión de los ácidos carboxílicos presentes, lo que a su vez afecta la capacidad de adsorción de la resina.

La distribución de las cargas de la resina se determinó a través de una tituladora automática (Figura 7). El punto de carga cero se localiza entre pH 5.5 y 5. Esto sugiere que los grupos funcionales, aunque escasos, tendrán predominantemente una carga negativa a pH superiores al mencionado. Es importante resaltar que la fermentación ocurre a un pH entre 5 y 6, de modo que la superficie de la resina estaría cargada negativamente al operar en dichas condiciones. La magnitud de la concentración de la carga promedio de los grupos funcionales que están presentes en la resina (-0.01 – 0.02 mmol/g) sugiere que las interacciones iónicas serán débiles, lo que podría respaldar la hipótesis que la adsorción de los ácidos carboxílicos se lleva a cabo principalmente a través de otro proceso superficial, en lugar de intercambio iónico.

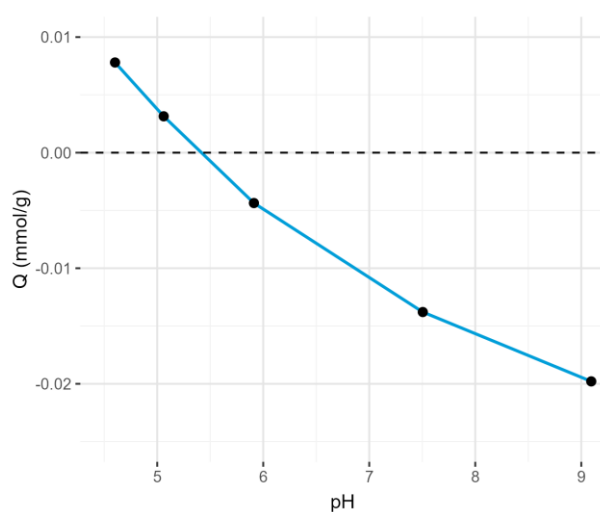


Figura 7. Distribución de cargas de la resina PAD950

En contraposición, la distribución de cargas de la resina de intercambio iónico A110 (amina primaria) presenta cargas de magnitudes de 0.5-0.1 (mmol/g) y mantiene una carga positiva desde un pH de 4 a 10, observándose una disminución de su carga a partir de pH 10, momento en el cual comienza a desprotonarse [27]. Mantener una distribución de carga positiva en un rango amplio de pH es altamente conveniente: Al mantener la carga positiva, la resina puede seguir adsorbiendo moléculas cargadas negativamente, como los ácidos carboxílicos.

Este contraste de comportamiento entre las resinas proporciona una comprensión más profunda sobre la interacción diferencial con los ácidos carboxílicos, dependiendo de la naturaleza de las resinas utilizadas.

6.2 Fermentación extractiva

Tras llevar a cabo los experimentos que permitieron verificar la afinidad de la resina por los ácidos carboxílicos presentes, el siguiente paso fue implementar la fermentación extractiva. Este procedimiento implicó el uso de la resina para extraer los ácidos carboxílicos en tiempo real, mientras estos se generaban durante el proceso de fermentación. En todos los experimentos de fermentación extractiva en lote realizados, se utilizó resina nueva para llevar a cabo el proceso de extracción. Una vez finalizado el experimento, la resina fue sometida a un proceso de regeneración para ser reutilizada en experimentos posteriores.

6.2.1 Fermentación extractiva en lote configuración de columna y resina PAD950 (PAD950-C)

El sistema consistió en un reactor de tanque agitado, en el cual procedía la fermentación oscura, conectado a una columna empacada con la resina PAD959, por la que circulaba el fermentado junto con la biomasa presente. Para realizar la fermentación extractiva en un reactor en lote productor de H_2 , se dejaron pasar 8 horas después de iniciar la fermentación para conectar la columna y comenzar con la extracción de los ácidos carboxílicos. Inicialmente, se planeó que la fermentación extractiva operara durante 8 horas, tal como en el estudio de Núñez-Valenzuela (2021) [27].

Es fundamental resaltar la presencia de una malla ubicada al inicio de la manguera que conectaba el reactor de fermentación con la columna o tanque conteniendo la resina. Esta malla fue colocada con el propósito de retener la mayor cantidad de biomasa posible, y mitigar el taponamiento de las mangueras asegurando un flujo continuo y eficiente en el sistema. Esta medida buscó mantener la integridad del proceso y disminuir posibles problemas operacionales. Sin embargo, a pesar de la presencia de la malla diseñada para retener la biomasa, ésta se acumuló en la entrada de la columna, generando una obstrucción en la parte inferior de la misma. Aproximadamente a las 5 horas de funcionamiento, el taponamiento generó un rechazo de la corriente del fermentado a la entrada de la columna. Por tal motivo, el sistema de fermentación extractiva solo estuvo en funcionamiento durante un periodo de 6 horas. La columna utilizada tenía un volumen de cama de 126.23 mL y fue empacada con resina PAD950 previamente acondicionada. El tiempo de retención hidráulica (EBCT) fue de 30 minutos.

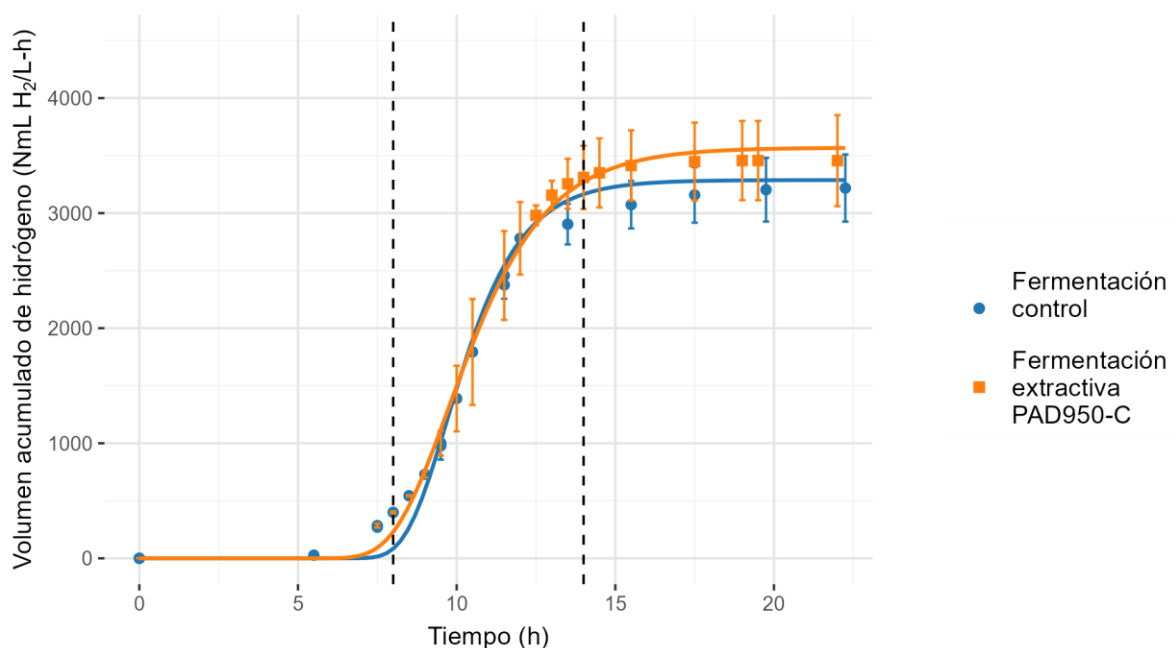


Figura 8. Producción de hidrógeno en lote en el sistema de fermentación extractiva en columna empacada con la resina PAD950 y de la fermentación control. Los puntos y cuadrados representan los datos experimentales, mientras que las líneas sólidas representan el ajuste al modelo de Gompertz. Las líneas punteadas negras indican el lapso en el que estuvo conectado el sistema de extracción de ácidos carboxílicos.

Tabla 5. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz al sistema PAD950-C

Reactor	$H_{\max}$ (NmL H_2 /L)	$R_{\max}$ (NmL H_2 /h-L)	λ (h)
Control	3102.9 ± 34.7	660.2 ± 59.5	7.9 ± 0.5
PAD950-C	3568.9 ± 430.5	755.6 ± 123.8	8.0 ± 0.0

En la Figura 8 se presentan los perfiles de producción de hidrógeno, tanto de la fermentación en lote control como de la fermentación en lote extractiva, junto con sus ajustes al modelo de Gompertz. Los parámetros obtenidos con el modelo se presentan en la Tabla 5. El modelo de Gompertz en la fermentación extractiva arrojó resultados positivos notables: el volumen acumulado de hidrógeno producido aumentó 15% y la velocidad máxima de producción de hidrógeno se incrementó en un 14.5% en comparación con el control.

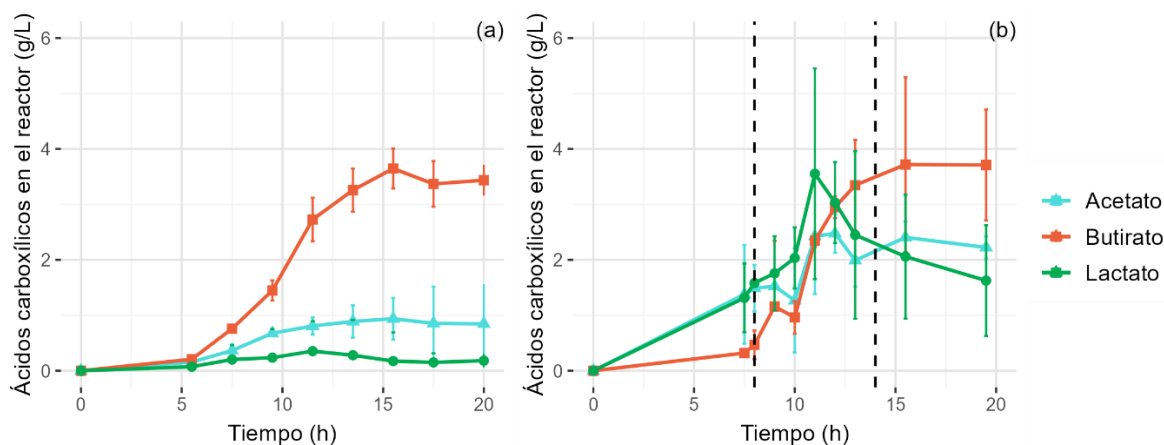


Figura 9. Producción de ácidos carboxílicos en lote. (a) fermentación control, (b) sistema de fermentación extractiva en columna empacada con la resina PAD950 (PAD950-C).

La Figura 9 ilustra la concentración de ácidos carboxílicos producidos a lo largo del tiempo en el reactor en lote para ambos sistemas: fermentación control y fermentación extractiva. El cambio más notable en la fermentación extractiva es el incremento en la producción de lactato hasta aproximadamente las 11 horas. Posteriormente, se observa que las concentraciones de acetato y lactato comienzan a decrecer alrededor de las 12 horas, simultáneamente con la fase exponencial de producción de hidrógeno y el incremento en la concentración de butirato. Esto podría atribuirse a la capacidad del consorcio de utilizar el lactato y el acetato para

producir butirato e hidrógeno adicional [5]. Un comportamiento similar también fue observado en la fermentación extractiva realizada por Núñez-Valenzuela (2021) [27].

Es posible que durante la fermentación extractiva haya un cambio en la composición del consorcio microbiano y/o que haya un cambio de rutas metabólicas de los microorganismos presentes.

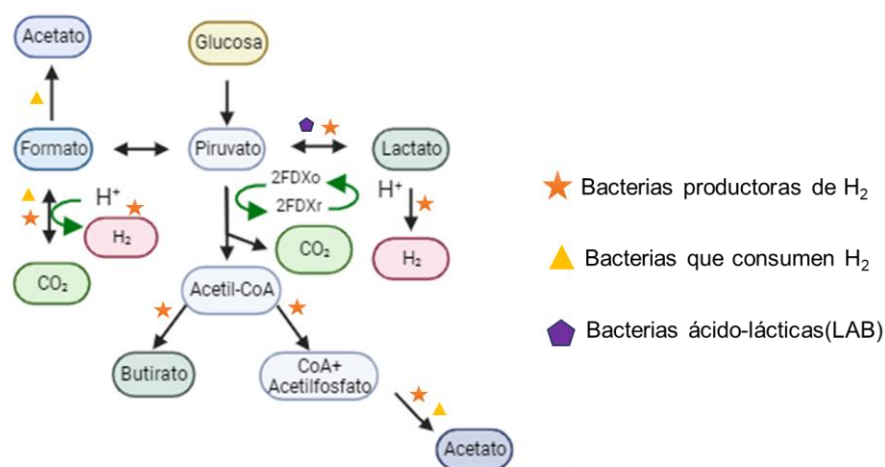


Figura 10. Diagrama simplificado de rutas metabólicas en la fermentación oscura y posibles rutas metabólicas que pueden tomar las bacterias productoras de hidrógeno, bacterias que consumen hidrógeno y bacterias ácido-lácticas (LAB) [33]

La concentración de lactato en las primeras 11 horas es más alta en la fermentación extractiva que en la fermentación control. Esto sugiere la posibilidad de que las bacterias ácido-lácticas (LAB) se hayan enriquecido durante la fermentación extractiva. Estas LAB pueden competir por el sustrato, promoviendo la producción de ácido láctico y reduciendo la generación de H₂ (Figura 10). Algunos autores han señalado a las LAB como responsables de redirigir la fermentación hacia la producción de lactato, adicionalmente algunas de estas bacterias secretan bacteriocinas, que inhiben a las bacterias productoras de H₂ [4], [32]. Por otro lado, se debe considerar que el lactato y el acetato poseen el potencial de producir butirato e H₂ (Ec. 3), tal como se observó en la fermentación extractiva de este estudio y en la realizada por Núñez-Valenzuela (2021)[27].

En este sentido, y considerando que diversos microorganismos pueden modificar sus rutas metabólicas en función de las condiciones ambientales, como es el caso de ciertas especies de *Clostridium* que tienen la capacidad de metabolizar lactato y acetato para generar butirato e hidrógeno cuando su fuente de carbono es limitada [32]. Basándose en investigaciones realizadas por el grupo de trabajo anteriormente, es probable que el consorcio microbiano este dominado por los géneros *Clostridium*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*; de hecho, se detectó la presencia de *C. butyricum*, que puede consumir lactato y acetato para generar H_2 y butirato [33]. A partir de lo expuesto, se puede plantear la hipótesis de que la fermentación extractiva está alterando las rutas metabólicas del consorcio. Sin embargo, es esencial realizar investigaciones más profundas y obtener evidencias adicionales para confirmar esta suposición.

En la fermentación extractiva, el rendimiento molar del acetato aumentó de 0.18 a 0.42 mol acetato/mol hexosa, con respecto a la fermentación control. En el mismo sentido, el rendimiento molar de lactato aumentó de 0.02 a 0.23 mol lactato/mol hexosa con respecto a la fermentación control, mientras que el rendimiento molar del butirato disminuyó de 0.54 a 0.50 mol butirato/mol hexosa. Es importante resaltar que no hubo cambio drástico en el pH del fermentado en la corriente de salida de la columna empacada al reactor, oscilando entre 5.7 y 5.8, sin experimentar mayores cambios.

La fermentación extractiva realizada por Núñez-Valenzuela (2021) [27], donde se empleó una columna empacada con resina A110 Purelite (Amina primaria), demostró un rendimiento de acetato inferior (0.26 mol acetato/mol hexosa) en comparación con el experimento del presente estudio en donde se usó la resina polimérica PAD950 en la columna empacada (PAD950-C), que fue de 0.42 mol acetato/mol hexosa. Un aspecto notable de la investigación de Núñez-Valenzuela (2021) [27] es que el ácido láctico formado durante el proceso de fermentación fue totalmente consumido, a diferencia del presente estudio en donde el lactato no se consumió por completo. La diferencia entre estos dos experimentos podría estar asociada con las características de las resinas empleadas: en la resina A110, los

iones de las sales minerales tienen mayor interferencia en el proceso de intercambio iónico, compitiendo por los sitios activos presentes en la resina. Adicionalmente, se observó un incremento en el pH del fermentado que atraviesa la columna empacada con resina A110 alcanzando valores de pH entre 10 y 11, causado por la liberación de los contraiones de la resina y la consiguiente desprotonación de la misma. Por el contrario, en el caso de la resina PAD950, el pH se mantuvo constante. Las condiciones descritas anteriormente tienen un efecto directo en la concentración de ácidos carboxílicos en el reactor. Esto, a su vez, podría influir en el metabolismo y/o la composición del consorcio microbiano presente. Esta cadena de interacciones podría explicar las diferencias observadas en los rendimientos de los ácidos carboxílicos en las fermentaciones extractivas realizadas con distintos tipos de resinas.

6.2.2 Fermentación extractiva en lote configuración de tanque agitado y resina PAD950 (PAD950-T)

Con el fin de mitigar los problemas operacionales, la acumulación de biomasa y los cambios de pH dentro de la columna empacada, se decidió cambiar la configuración del sistema de extracción colocando la resina PAD950 en un tanque agitado. Se contabilizó el hidrógeno que se produjo dentro del tanque agitado que contenía la resina mediante un sistema de desplazamiento de volumen y fue considerado para obtener los parámetros ajustados al modelo de Gompertz.

La Figura 11 presenta el perfil de producción de hidrógeno tanto de la fermentación control como de la fermentación extractiva, junto con el ajuste al modelo de Gompertz. Los parámetros obtenidos a partir del modelo se presentan en la Tabla 6. En la fermentación extractiva, el volumen acumulado de hidrógeno producido aumentó 39.3% en comparación con la fermentación control. No se observó un cambio relevante de la tasa máxima de producción de hidrógeno (R_{max}) ni de la fase de latencia (λ).

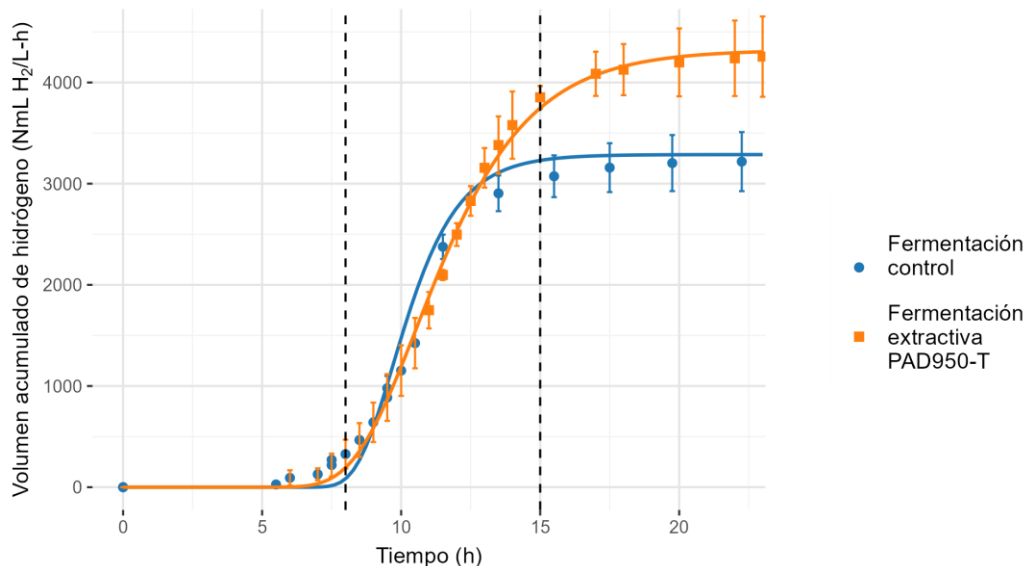


Figura 11. Producción de hidrógeno en el sistema de fermentación extractiva en lote con la resina PAD950 en un tanque agitado y control (sin fermentación extractiva). Los puntos y cuadrados representan los datos experimentales, mientras que las líneas sólidas representan el ajuste al modelo de Gompertz utilizado en el estudio. Las líneas punteadas negras indican el lapso en el que estuvo conectada la resina.

Al observar los parámetros del modelo de Gompertz ajustado en las fermentaciones extractivas que usaron la resina PAD950 (Tablas 5 y 6), se observa que ambas configuraciones aumentaron la producción de hidrógeno comparado con la fermentación control, siendo la configuración de tanque agitado la que exhibe un incremento mayor. Este resultado podría ser el efecto de la distinta interacción entre el fermentado y la resina en cada configuración. En el caso de la columna empacada, la disposición compacta de la resina puede limitar la accesibilidad del fermentado a los sitios de adsorción en la resina, ya que se pueden formar canales preferenciales donde el fermentado fluye predominantemente, minimizando la interacción con gran parte de la resina. Esto puede resultar en que no todos los ácidos carboxílicos presentes en el fermentado pueden acceder eficientemente a todos los sitios de adsorción. En contraste, en un tanque agitado, la resina se mueve libremente y la agitación permite una mayor dispersión de las partículas de resina en el fermentado.

Adicionalmente, en la columna empacada se identificaron ciertas áreas donde la biomasa tendía a acumularse de manera estratificada, formando una especie de manto alrededor de la resina, dificultando el libre flujo del fermentado hacia la resina. Se puede hacer la suposición de que la biomasa, al compactarse alrededor de la resina, era una barrera física, restringiendo el acceso del fermentado a los sitios de adsorción en la resina. Esta situación plantea un obstáculo potencial para la transferencia de masa efectiva: La acumulación de biomasa podría estar impidiendo que los ácidos carboxílicos presentes en el fermentado interactúen eficazmente con la resina, limitando así la retención de estos ácidos.

Tabla 6. Parámetros cinéticos del modelado Gompertz de PAD950-T

Reactor	$H_{\max}$ (NmL H_2 /L)	$R_{\max}$ (NmL H_2 /h-L)	λ (h)
Control	3102.9 ± 34.7	660.2 ± 59.5	7.96 ± 0.5
PAD950-T	4321.8 ± 309.9	699.5 ± 139.7	8.3 ± 0.7

El fermentado que va del reactor al tanque de extracción y viceversa contiene biomasa suspendida; parte de ésta se acumuló dentro del tanque y no regresó al reactor. Es posible suponer que la biomasa acumulada en el tanque sigue activa y es capaz de producir hidrógeno debido a la disponibilidad de sustrato. En la Figura 12 se muestra el volumen de hidrógeno producido dentro del tanque que contenía la resina, lo cual podría implicar que también se están produciendo ácidos carboxílicos dentro del tanque, a la par que se están adsorbiendo.

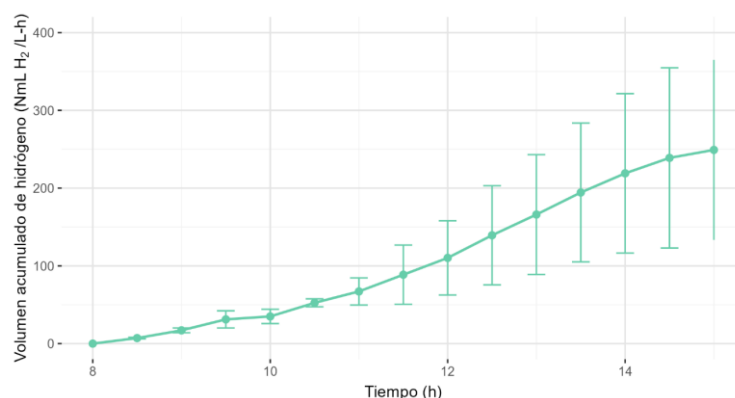


Figura 12. Volumen acumulado de hidrógeno producido dentro del tanque agitado con resina PAD950 durante la fermentación extractiva

El pH en la salida del tanque se mantuvo en valores cercanos a 5.7. Suponiendo que la mezcla dentro del tanque es homogénea y que el flujo de salida tiene la misma concentración que el líquido contenido dentro del tanque, se puede asumir que el pH en el tanque permanece constante.

En cuanto a la producción de ácidos carboxílicos dentro del reactor (Figura 13), se observó una mayor producción de lactato, butirato y acetato con respecto a la fermentación control. Esto sugiere que parte del hidrógeno producido proviene de la fermentación tipo acetato-butirato (Ec. 1 y 2). De manera similar a la fermentación extractiva con la configuración de la columna empacada (PAD950-C), se observa que la concentración de lactato, después de aproximadamente 13 horas, disminuye, indicando que hay un consumo que podría deberse a la ruta metabólica acetato-lactato (Ec. 3).

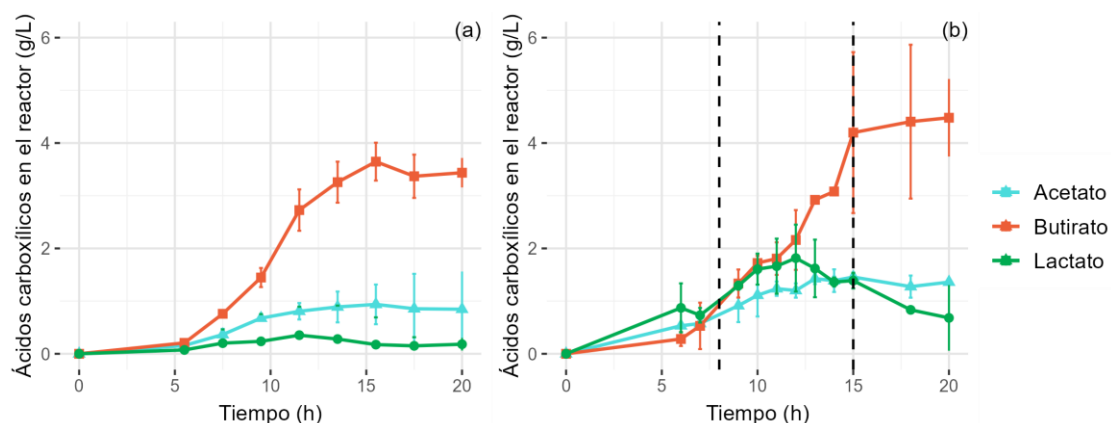


Figura 13. Producción de ácidos carboxílicos en lote. (a) fermentación control, (b) sistema de fermentación extractiva con el tanque agitado conteniendo la resina PAD950 (PAD950-T).

Se nota claramente que las concentraciones de butirato y lactato al final de la fermentación extractiva son mayores que en el control, lo que indica que la resina ayudó a disminuir el efecto inhibitorio de los ácidos carboxílicos (al retenerlos) y, al mismo tiempo, logró incrementar su producción (Figura 13). En la fermentación extractiva, el rendimiento molar de butirato aumentó de 0.54 y 0.65 mol butirato/mol hexosa consumida, con respecto a la fermentación control. El rendimiento molar de lactato incrementó de 0.02 a 0.27 mol lactato/mol hexosa, en comparación a la

fermentación control. El rendimiento molar de acetato fue similar al control 0.18 mol acetato/mol hexosa.

6.2.3 Fermentación extractiva en lote configuración de tanque agitado y resina A110 (A110-T)

Tras evaluar la fermentación extractiva con la configuración de tanque agitado, se retomó el trabajo realizado por Núñez-Valenzuela (2021) [26], que utilizó la resina A110 (amina primaria) en una columna empacada. Para tal efecto, en lugar de columna empacada con la resina se utilizó la configuración de tanque agitado, con el objetivo de determinar si esta nueva disposición podría mitigar tanto el problema de taponamiento de la columna como el cambio abrupto del pH dentro de la misma. En tal experimento se observó un efecto de intercambio-regeneración particular ya que, durante el intercambio iónico, la liberación de iones OH^- como contraiones provocaba un aumento en el pH de la corriente. Este cambio en el pH causaba la desprotonación de la amina primaria, lo que a su vez provocaba la liberación del ácido carboxílico que previamente la resina había retenido. Al cambiar la configuración a un tanque agitado, se busca reducir este efecto y explorar si de esta manera se logra una disminución en las fluctuaciones del pH, para así poder controlar mejor el proceso de intercambio-regeneración y mejorar la retención del ácido carboxílico por la resina.

Al igual que en la sección previa (PAD950-T), en este experimento se colocó la resina A110 en un tanque agitado conectado al fermentador durante 7 horas. La Figura 14 muestra la producción de hidrógeno, resaltando un comportamiento distinto a la fermentación control, principalmente en la disminución de la velocidad de producción (pendiente de la curva). Esta divergencia se observó al entrar el fermentado en contacto con la resina en el tanque.

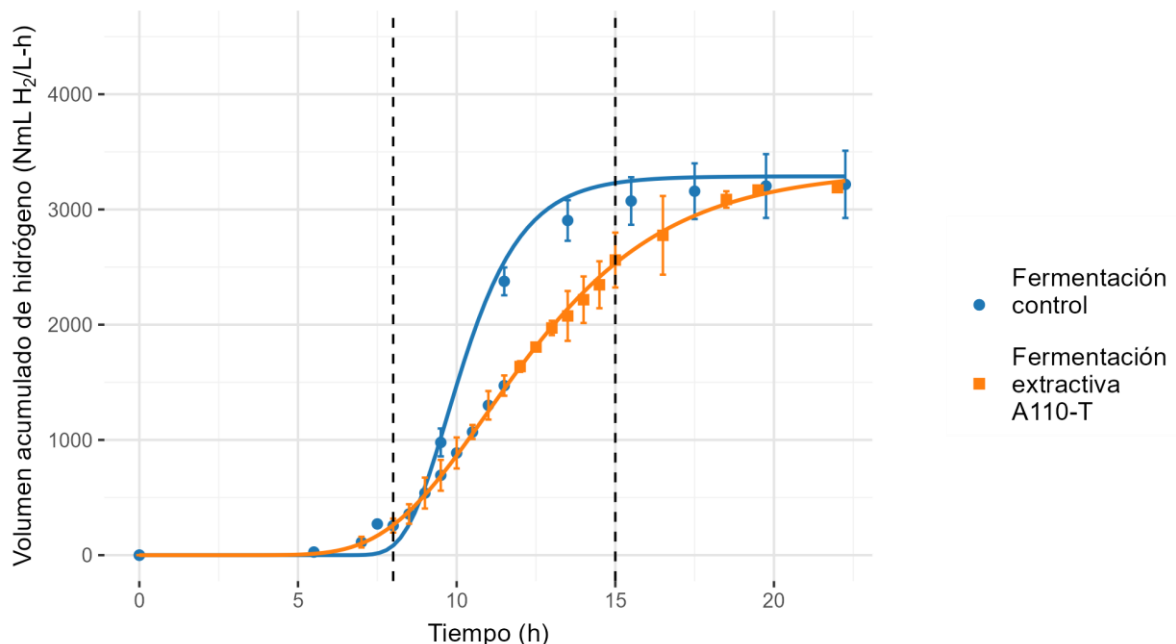


Figura 14. Producción de hidrógeno en el sistema de fermentación extractiva en lote con la resina A110 en tanque agitado y de la fermentación control. Los puntos y cuadrados representan los datos experimentales, mientras que las líneas sólidas representan el ajuste al modelo de Gompertz utilizado en el estudio. Las líneas punteadas negras indican el lapso en el que estuvo conectada la resina al reactor

La Tabla 7 muestra los parámetros obtenidos del ajuste del modelo de Gompertz, el volumen acumulado de hidrógeno producido aumentó 7.6% en comparación con la fermentación control, sin embargo, la velocidad máxima de producción de hidrógeno se redujo 41%.

Tabla 7. Parámetros cinéticos del modelado Gompertz de A110-T

Reactor	Hmax (NmL H ₂ /L)	Rmax (NmLH ₂ /h-L)	λ (h)
Control	3102.9 $\pm$ 34.7	660.2 $\pm$ 59.5	7.96 $\pm$ 0.5
A110-T	3339.6 $\pm$ 38.9	389.4 $\pm$ 79.5	7.8 $\pm$ 0.6

En la Figura 15 se observa la variación de pH del fermentado que va del tanque agitado al reactor (A110-T). De manera similar a la fermentación extractiva realizada por Núñez-Valenzuela (2021) [26], el pH de la corriente se encontraba entre 9 y 10. Este hecho causaría la desorción de los ácidos retenidos en la resina ya que el aumento del pH provoca la desprotonación de las aminas presentes en la superficie

de la resina iónica, lo que a su vez ocasiona que los ácidos previamente retenidos se desprendan de la resina. Esto implica que no se están extrayendo de manera eficiente los ácidos carboxílicos del fermentado, ni se está mitigando la inhibición por producto.

El comportamiento diferente entre ambas cinéticas podría atribuirse a que parte de la biomasa que entra al tanque agitado de extracción y retorna al reactor experimenta un cambio brusco de pH. Esto podría provocar cambios en la actividad microbiana, así como en la composición de la comunidad bacteriana y/o rutas metabólicas. Es posible que algunas especies de bacterias no toleren el pH elevado y sufran lisis celular, otras especies más resistentes al pH alto sobrevivan y proliferen, mientras que otras especies que pueden tolerar el cambio de pH cambien sus rutas metabólicas. Cabe destacar que la mayoría de las bacterias involucradas en la producción de hidrógeno y en la fermentación oscura tienen un mejor desempeño a pH entre 4 y 7. Según el meta-análisis de Lopez Hidalgo et al (2022) [34] los microorganismos más comunes en la fermentación oscura son *Clostridium*, *Enterobacter* y *Bacillus*, el rendimiento de hidrógeno a pH altos de tales microorganismos tiende a bajar.

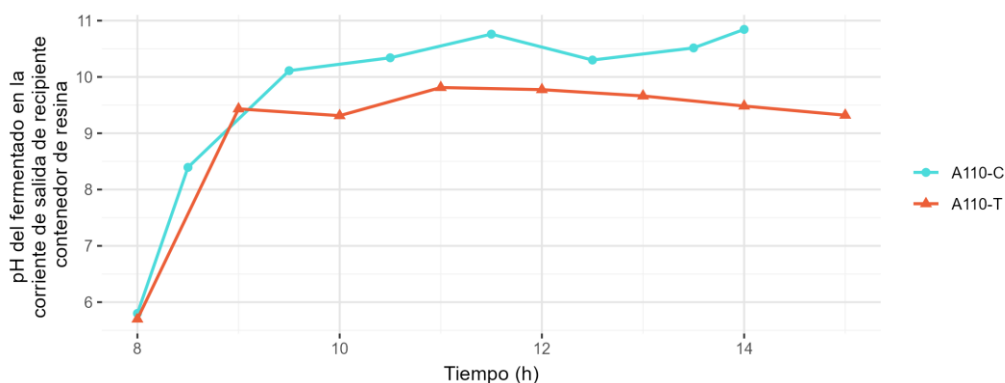


Figura 15. Variación del pH en la corriente de salida tras pasar por la resina A110 (pH de fermentado en la corriente de salida de la columna/tanque agitado). A110-C fue realizado por Núñez-Valenzuela (2021) [26].

En un entorno altamente básico, por ejemplo a pH 9, las células bacterianas enfrentan una serie de alteraciones funcionales que pueden llevar a la interrupción

de su ciclo celular. Este alto pH no sólo limita la disponibilidad de algunos nutrientes vitales, como hierro y cobre, sino que también provoca una disrupción en las funciones celulares normales, afectando la absorción de nutrientes, la progresión del ciclo celular y la expresión genética. Se conjetura que, en algunos organismos, el ciclo celular se detiene en un pH de 9.0 debido a que las células deben invertir energía para realizar los ajustes necesarios que resultan prioritarios para lidiar con estas condiciones [35].

Es importante tener en cuenta que estas hipótesis son especulativas y requerirían investigaciones y experimentos adicionales para validarlas y comprender completamente los mecanismos subyacentes que afectan los rendimientos de los productos de fermentación en las condiciones estudiadas.

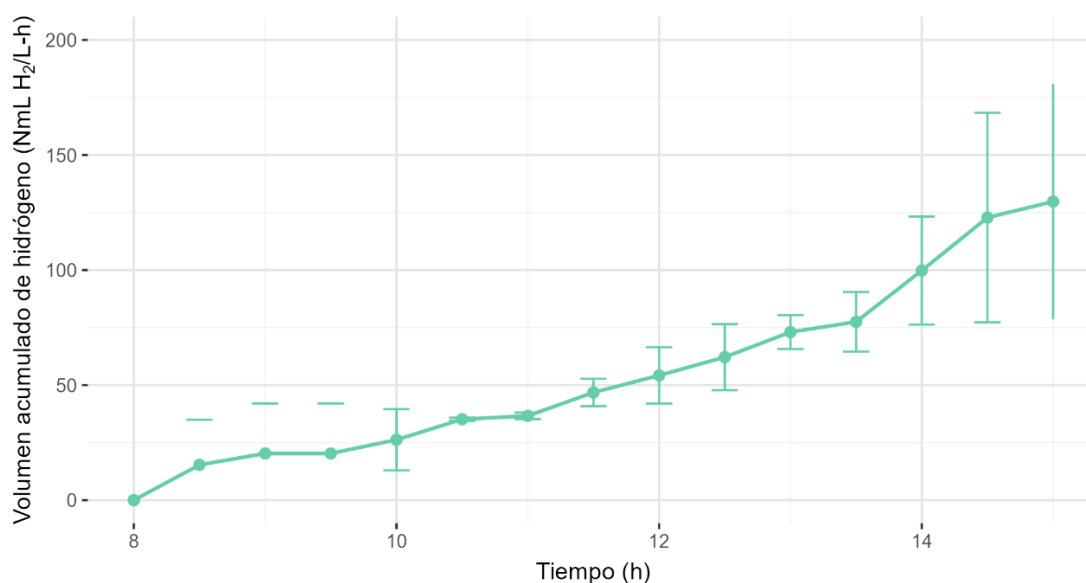


Figura 16. Volumen acumulado de hidrógeno producido dentro del tanque agitado con resina A110 durante la fermentación extractiva.

La Figura 16 presenta el volumen acumulado de hidrógeno generado en el sistema extractivo de tanque agitado con resina A110 durante la fermentación extractiva. De forma similar al experimento anterior, se constató que una porción de la biomasa que inicialmente se encontraba en el reactor se acumuló en el interior del tanque del sistema extractivo y no retornó al reactor. Al comparar con el volumen de hidrógeno producido en el tanque que albergaba la resina PAD950, se observó

mayor producción de hidrógeno en este último. Esta discrepancia en la producción de hidrógeno podría atribuirse a que el pH del tanque con la resina A110 fluctuó entre valores de 9 y 10. Es posible que la biomasa presente en este tanque no estuviera generando hidrógeno en la misma medida que el tanque agitado en el experimento PAD950-T debido a una respuesta al choque de pH.

En términos de producción de ácidos carboxílicos, en la fermentación extractiva se observa un ligero aumento en la producción de lactato y acetato, mientras que la producción de butirato se reduce, en comparación con la fermentación control (Figura 17). A diferencia de las otras fermentaciones extractivas en este trabajo, no se observa el patrón de aumento y disminución en la concentración de lactato. Se podría suponer que una fracción de la biomasa experimentó un choque de pH: una porción de la biomasa se mueve del reactor (pH 5.8) al recipiente con la resina (pH 9 a 10) y luego regresa al reactor. Además, el proceso de intercambio iónico-desprotonación, mencionado en la sección 2.1, hace que la cantidad de ácidos carboxílicos retenidos sea menor a la anticipada. Esto sugiere que quizás el efecto inhibitorio de los productos no se está atenuando como se buscaba inicialmente, modificando las rutas metabólicas y, probablemente, a la comunidad microbiana.

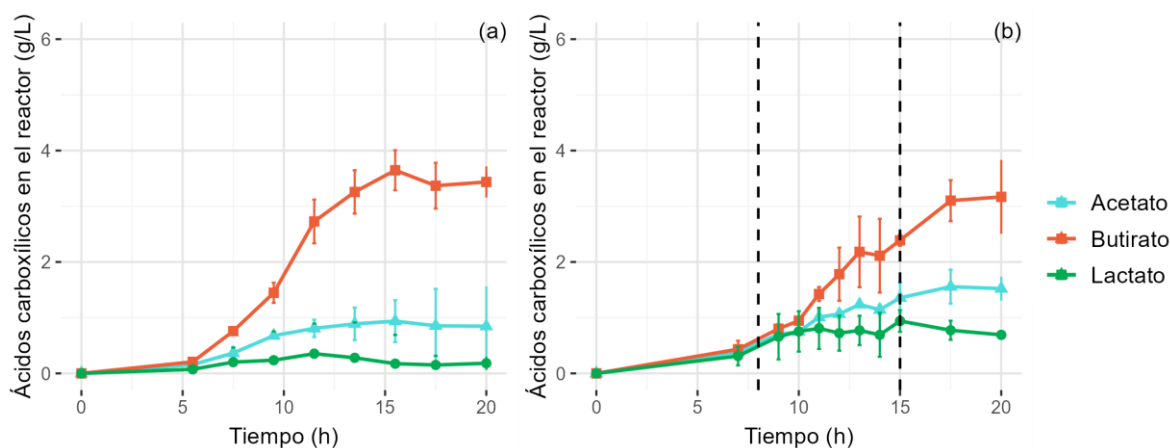


Figura 17. Producción de ácidos carboxílicos en lote. (a) fermentación control, (b) sistema de fermentación extractiva con el sistema extractivo de tanque agitado con resina A110 (A110-T).

6.2.4 Comparación de sistemas de fermentación extractiva

En la Tabla 8 se presentan los parámetros estimados del modelo de Gompertz correspondientes a las fermentaciones extractivas en lote utilizando resinas poliméricas. Las fermentaciones extractivas con mayor volumen acumulado de hidrógeno producido contenían la resina PAD950. Esto podría atribuirse a que la resina PAD950, al ser no iónica, exhibe una menor selectividad hacia los iones derivados de las sales minerales presentes en el fermentado, en comparación con la resina A110, que sí es iónica, y que el pH dentro del sistema de fermentación extractiva, es constante, como ya se discutió previamente.

Tabla 8. Parámetros estimados con modelo de Gompertz de fermentaciones extractivas en lote

Reactor	Hmax (NmL H ₂ /L)	Rmax (NmLH ₂ /h-L)	λ (h)	Referencia
Control	3102.9 ± 34.7	660.2 ± 59.5	7.96 ± 0.5	Este trabajo
PAD950-C	3568.9 ± 430.5	755.6 ± 123.8	8.02 ± 0.0	Este trabajo
PAD950-T	4321.8 ± 309.9	699.5 ± 139.7	8.3 ± 0.7	Este trabajo
A110-C	3762.9 ± 229.1	1120.7 ± 47.1	7.2 ± 0.5	Núñez-Valenzuela (2021)[27]
A110-T	3339.6 ± 38.9	389.4 ± 79.5	7.8 ± 0.6	Este trabajo

Al analizar los dos reactores que emplearon un sistema de extracción con resina PAD950, se observó un mejor desempeño en el sistema con la configuración de tanque agitado en comparación con la columna. La operación del tanque agitado conteniendo la resina mejoró la transferencia de masa y evitó diversos problemas operacionales, como los encontrados en el caso de la columna.

La producción de ácidos carboxílicos varió entre los distintos sistemas de fermentación extractiva, en comparación con la fermentación control. En términos generales, se observó un aumento en la producción de butirato, lactato y acetato. Esto permite suponer que el hidrógeno generado proviene, principalmente, de la fermentación de tipo acetato-butirato. De manera general, después de las 10 horas se da un consumo simultáneo de acetato y lactato, generando más butirato e hidrógeno.

Esta variación en la producción de ácidos carboxílicos podría deberse a las diferencias resultantes de las condiciones imperantes en la fermentación extractiva, lo cual afecta las rutas metabólicas y la composición de los productos finales. Es importante destacar que, a excepción del sistema A110-T, todos los sistemas de fermentación extractiva mostraron un mayor rendimiento molar de ácidos carboxílicos en comparación con el control (Tabla 9). Esto sugiere que la fermentación extractiva reduce la concentración de ácidos carboxílicos en el caldo de fermentación, minimizando potenciales efectos inhibitorios. Lo anterior trae como consecuencia una posible estimulación de las vías metabólicas del consorcio, incrementando la producción tanto de H₂ como de ácido carboxílicos, mejorando el rendimiento global del proceso.

Tabla 9. Rendimientos molares de ácidos carboxílicos producidos en la fermentación extractiva en lote.

Reactor	Rendimiento molar			Referencia
	Acetato (mol acetato/ mol hexosa)	Lactato (mol lactato/ mol hexosa)	Butirato (mol butirato/ mol hexosa)	
Control	0.18 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.54± 0.05	Este trabajo
PAD950-C	0.42±0.04	0.23 ± 0.11	0.50± 0.01	Este trabajo
PAD950-T	0.18±0.01	0.27 ± 0.07	0.65 ± 0.2	Este trabajo
A110-C	0.26± 0.01	N.A	0.70± 0.01	Núñez-Valenzuela (2021) [27]
A110-T	0.15±0.00	0.02±0.02	0.45±0.12	Este trabajo

El propósito de realizar las fermentaciones extractivas con las dos resinas bajo las distintas configuraciones era compararlas entre sí para identificar cuál ofrecía un mejor rendimiento y utilizarla en un sistema de fermentación extractiva en continuo. En términos de producción de hidrógeno, la fermentación extractiva PAD950-T obtuvo el mayor volumen acumulado del gas, como se refleja en la Tabla 8.

Así mismo, desde un enfoque experimental, la configuración con el sistema extractivo de tanque agitado fue la que presentó menos inconvenientes operacionales, evitando el taponamiento. Por consiguiente, se decidió usar la resina

PAD950 y la configuración del tanque agitado en el reactor continuo (PAD950-T), con base a los resultados obtenidos en las pruebas.

6.3 Fermentación extractiva en un CSTR

En el proceso de fermentación extractiva en continuo, se utilizaron dos condiciones de COV en experimentos completamente independientes, 40 y 60 g azúcares totales/L-d. Esto permitió evaluar el impacto en el rendimiento y la eficiencia del proceso de fermentación extractiva. En este estudio, se empleó una resina PAD950 regenerada, es decir, previamente utilizada y sometida a un proceso de recuperación, en lugar de una resina nueva. Utilizar resinas regeneradas tiene ventajas económicas y medioambientales al reducir la necesidad de adquirir y desechar resinas nuevas, siempre y cuando su eficacia y rendimiento no se vean comprometidos.

En ambas COV, la producción de hidrógeno alcanzó el estado estable antes de conectar el reactor CSTR al sistema extractivo de tanque agitado con la resina PAD950 para iniciar la extracción de los ácidos carboxílicos. La resina fue reemplazada cada 6 horas, equivalente a 1 TRH. La extracción de ácidos carboxílicos se llevó a cabo durante un período de 18 horas (3 TRH). En la Tabla 10 y la Figura 18 se presentan las concentraciones de los ácidos carboxílicos y la velocidad volumétrica de hidrógeno producido.

Tabla 10. Velocidad volumétrica de hidrógeno (VVP), concentración de ácidos carboxílicos producidos y eficiencia de consumo de azúcares totales en los experimentos de fermentación extractiva en continuo utilizando la resina PAD950. Los datos presentados se refieren a la operación en estado estable tanto para la fermentación control como para la fermentación extractiva.

COV (g azúcares totales/L- d)	H ₂ producido	Concentración de ácidos carboxílicos			Azúcares totales consumidos (%)
	VVP (L H ₂ /L-d)	Acetato (g/L)	Lactato (g/L)	Butirato (g/L)	
40	2.24	0.91 ± 0.1	2.33 ± 0.03	2.01±0.02	88.2±2.3
40*	3.02	0.98 ± 0.1	2.36 ± 0.0	2.19 ± 0.1	91.1±4.5
60	2.39	0.92±0.1	1.77±0.1	2.12±0.1	60.5±4.1
60*	3.03	1.16±0.0	2.09±0.1	2.22±0.1	65.1±2.0

*18 horas de fermentación extractiva

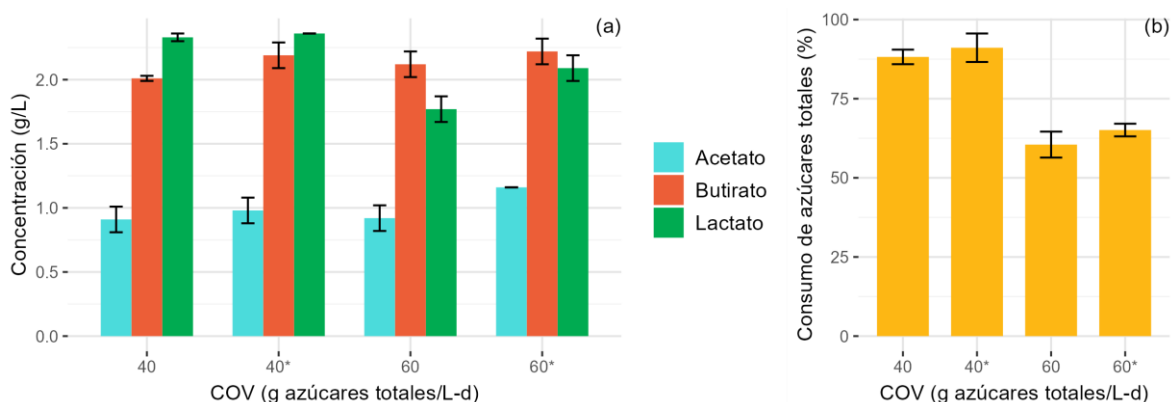


Figura 18. Ácidos carboxílicos producidos (g/L) (a) y consumo de azúcares totales (%) (b) en los experimentos de fermentación extractiva en continuo utilizando la resina PAD950. Los datos presentados se refieren a la operación en estado estable tanto para la fermentación control como para la fermentación extractiva. *18 horas de fermentación extractiva

6.3.1 Carga orgánica volumétrica de 40 g azúcares totales/L-d

En el caso de la operación del reactor continuo a una COV de 40 g azúcares totales/L-d, la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVP) aumentó de 2.24 L H₂/L-d en estado estable a 3.02 L H₂/L-d después de 18 horas (3TRH) de fermentación extractiva. Esto indica que el proceso de fermentación extractiva mejoró la producción de hidrógeno 34.8%, lo cual podría deberse a que la extracción de ácidos carboxílicos por la resina PAD950 favoreció las vías metabólicas de producción de hidrógeno en la fermentación.

El total de ácidos carboxílicos producidos aumentó 5.3% después de la fermentación extractiva (de 5.34 a 5.53 g ácidos carboxílicos/L). El acetato y butirato aumentaron su concentración en 7.7% y 8.7% después de 18 horas de fermentación extractiva pasando de 0.91 a 0.98 g acetato/L y de 2.01 a 2.19 g butirato/L (Tabla 10). Por otro lado, la concentración de lactato mostró un incremento de 1.3%, un porcentaje menor al esperado si se compara con los experimentos en lote. En ambos experimentos de fermentación extractiva en lote donde se usó la resina PAD950, el lactato fue el metabolito que presentó un mayor incremento en el rendimiento molar (Tabla 10).

En estudios previos llevados a cabo por el grupo de investigación, se ha observado que las concentraciones de lactato se pueden cuantificar en sistemas continuos cuando la COV alcanza valores superiores a 90 g de azúcares totales/L-d [36]. No obstante, en el presente estudio se observó una concentración de lactato de 2.3 g/L en sistemas CSTR con una COV de 40 g de azúcares totales/L-d, la cual está muy por debajo de las cargas mencionadas.

Vale la pena destacar que las condiciones ambientales en un sistema continuo pueden diferir de las experimentadas durante los ensayos en lote, lo que podría influir en la producción de lactato. Es posible que la eficiencia de extracción de la resina PAD950 para el lactato no sea la misma en un sistema continuo que en uno en lote debido a las diferencias en concentración de los ácidos carboxílicos, provocando que los ácidos carboxílicos presentes interactúen de forma diferente con la resina. También pueden haberse producido variaciones en el consorcio microbiano utilizado y sus rutas metabólicas, lo que podría haber afectado la distribución de los productos de la fermentación. Asimismo, es factible que la extracción continua de ácidos carboxílicos por la resina PAD950 haya modificado el equilibrio metabólico del microorganismo, conduciendo a una menor producción de lactato en comparación con los experimentos en lote.

6.3.2 Carga orgánica volumétrica 60 g azúcares totales/L-d

Al comparar la producción de ácidos carboxílicos y la velocidad de producción de hidrógeno antes y después de la fermentación extractiva a la COV de 60 g azúcares totales/L-d, se observa un aumento importante (Figura 18; Tabla 10). La VVPH aumentó un 26.8% al pasar de 2.39 L H₂/L-d en estado estable a 3.03 L H₂/L-d después de 18 horas de fermentación extractiva. El total de ácidos carboxílicos producidos aumentó 13.72% después de la fermentación extractiva al pasar de 4.81 a 5.47 g ácidos carboxílicos/L. Las concentraciones de acetato, lactato y butirato aumentaron 26.1%, 18.1% y 4.7%, respectivamente. El acetato paso de 0.92 a 1.16 g/L, el lactato aumentó de 1.77 a 2.09 g/L y el butirato de 2.09 a 2.22 g/L. Estos resultados indican que la fermentación extractiva tuvo un impacto positivo en la

producción de ácidos carboxílicos y la velocidad de producción de hidrógeno, lo que sugiere una mejora en el proceso.

Hay particularidades notables en el estado estable a una COV de 60 g azúcares totales/L-d COV si comparamos con los resultados presentados por Montoya-Rosales y colaboradores (2022) [28], donde el sistema de fermentación, sustrato, COV e inóculo eran idénticos, solo diferían en la concentración de sales minerales empleadas en el medio de fermentación. Es relevante notar que en ese trabajo la VVPH fue de 6.4 L H₂/L-d y las concentraciones de los ácidos carboxílicos fueron mayores (acetato 3.02 g/L, butirato 5.8 g/L y lactato 0 g/L, refiriendo al lactato como un metabolito que fue consumido completamente en la fermentación) [28]. Adicionalmente, el consumo total de azúcares alcanzó 94%, mientras que en la presente investigación fue de 60%. Esta discrepancia podría ser resultado de la reducción en la concentración de micronutrientes y macronutrientes en el medio de fermentación, reduciendo el crecimiento del consorcio microbiano. Adicionalmente, en el presente trabajo, al tener los microorganismos una mayor concentración de sustrato disponible, es posible que la fermentación extractiva haya tenido un efecto positivo en el metabolismo de las bacterias ácido-lácticas, pero no en las productoras de H₂.

Núñez-Valenzuela (2021) [26] determinó que la cantidad de sales utilizadas podría sostener la fermentación en un proceso en lote, cosa que se comprobó; no obstante, es claro que la reducción de sales compromete el desempeño de un reactor continuo a las COV aplicadas en el presente trabajo. Por lo tanto, un área de oportunidad para futuros trabajos es la determinación de las cantidades precisas de sales necesarias para mantener un estado estable que no comprometa tanto la producción de metabolitos como la eficiencia de la fermentación extractiva.

En el presente trabajo, las diferencias en la producción de ácidos carboxílicos se pueden atribuir a cambios en las rutas metabólicas, influenciados por la cantidad de azúcares totales disponibles en el medio, la concentración del medio mineral y la remoción continua de ácidos carboxílicos en procesos de fermentación extractiva. En sistemas CSTR bien controlados para la fermentación oscura, la baja diversidad

en comunidades microbianas favorece una producción de hidrógeno de alto rendimiento. Este hecho subraya la importancia de conocer la estructura de la comunidad microbiana para obtener información sobre la producción o cambios en los ácidos carboxílicos. Si ciertas especies microbianas dominan en una configuración de fermentación, es probable que tengan vías metabólicas específicas que afecten el perfil de ácidos carboxílicos observados [33]. Una comprensión detallada de estos elementos ayudaría a optimizar la producción de ácidos carboxílicos y arrojar luz sobre las complejidades involucradas en la fermentación extractiva en procesos continuos.

Al comparar la concentración de ácidos carboxílicos, la producción de hidrógeno de los estados estables de COV de 40 y 60 g azúcares totales/L-d (Tabla 10), se observa que los valores son similares, con la diferencia principal en el porcentaje de azúcares totales consumidos. Cuando el crecimiento bacteriano y la actividad metabólica se ven limitados por la disponibilidad de nutrientes, es posible que la producción de hidrógeno no aumente proporcionalmente con el incremento en la concentración de azúcares. En otras palabras, aunque haya más azúcares disponibles para la fermentación en la COV de 60 g azúcares totales/L-d que con 40 g azúcares totales/L-d, la producción de biomasa y de hidrógeno podría estar limitada por la disponibilidad de macro y micronutrientes presentes en el medio de fermentación.

Las bacterias fermentativas, al consumir azúcares en el medio de cultivo, también requieren nutrientes esenciales para su crecimiento y actividad metabólica. Estos nutrientes incluyen nitrógeno, fósforo, azufre y otros elementos traza. La disponibilidad de dichos nutrientes es fundamental para mantener la actividad bacteriana y, en última instancia, la producción de hidrógeno y otros productos de fermentación.

En ambos casos, con COV de 40 y 60 g azúcares totales/L-d, se utilizó la misma cantidad de medio mineral. Si bien es posible que un aumento en la concentración de azúcares pueda intensificar la actividad bacteriana, no necesariamente se traduce en un incremento proporcional en el crecimiento (lo que implicaría una

mayor demanda de macro y micronutrientes). Por otra parte, al utilizar sales minerales en concentraciones reducidas, es posible que se haya observado una disminución en el crecimiento y/o actividad microbiana. Sin embargo, determinar la magnitud y la naturaleza exacta de este efecto requiere de estudios adicionales para llegar a una conclusión definitiva.

Independientemente de estas consideraciones, es crucial destacar que, a pesar de las posibles limitaciones, el uso de la fermentación extractiva con la resina PAD950 logró potenciar la producción tanto de hidrógeno como de ácidos carboxílicos en las COV estudiadas.

6.3.3 Comparación con la Literatura Existente

En la Tabla 11 se presentan otros trabajos reportados en la literatura de fermentación extractiva. Tales estudios evidencian el potencial de diversas técnicas para aumentar los productos en la fermentación. Al contrastar los resultados del presente estudio con otros trabajos, se observa que se sigue una línea adecuada de investigación: Aunque cada estudio presenta particularidades y contextos específicos, este enfoque se presenta como una opción viable cuyos resultados son positivos y tienen área de oportunidad para mejorar.

Al comparar el presente estudio con investigaciones que también emplearon resinas poliméricas, como las de Garrett y colaboradores. (2015) [16] y Karekar et al. (2020) [17], se observan resultados competitivos, especialmente considerando la diferencia en inóculos utilizados. Las investigaciones mencionadas aplicaron sistemas de lote alimentado y resinas de intercambio iónico. Estos datos sugieren una posible dirección para investigaciones futuras: implementar un sistema similar con el objetivo de prolongar la operación de la fermentación.

Tabla 11. Ejemplos de sistemas de fermentación extractiva

Técnica utilizada	Detalles de la técnica utilizada	Ácidos carboxílicos de la fase líquida	Configuración del sistema	Principales resultados	Referencia
Uso de resina iónica	Uso de resina de intercambio iónico IRA67 (amina primaria), mantener ácido láctico a concentración menor a 20 g/L	Ácido láctico y ácido acético	Reactor lote alimentado conectado con tanque agitado gracias a un controlador de pH que hace circular fermentado a reactor hasta llegar a pH 5.5	Aumentó 25% la producción total de ácido láctico. Reactor funcionó durante 108 días	(Garrett et al, 2015) [16]
Uso de resina iónica	Uso de resina Amberlite FPA53 (amina terciaria) para extraer acetato	Ácido acético	Reactor lote alimentado conectado a un tanque agitado que contiene resina de intercambio iónico	Usar sistema de extracción como controlador de pH Aumentó 160% producción de ácido acético	(Karekar et al, 2020) [17]
Uso de fase orgánica	Uso de aceite de silicona para extraer hidrógeno y CO ₂ presente en fase líquida	Ácido acético y butírico. Ácido láctico solo presente en etapa de COV 138 g AT/L-d	CSTR al que se le agregaba 10% (v/v) de aceite de silicona- Cada etapa duraba 60 horas	Dos COV: 60 g AT/L-d: Aumentó la producción de H ₂ en 29%. El acetato y butirato aumentaron su concentración en 28% y 10% 138 g AT/L-d: Aumentó la producción de H ₂ en 13%. El acetato, lactato y butirato aumentaron su concentración en 28%, 0% y 4%	(Montoya et al, 2022) [28]
Uso de resina no funcionalizada	Uso de resina PAD950, conectada a tanque agitado. I	Ácido acético, láctico y butírico.	CSTR conectado a tanque agitado que contiene resina no funcionalizada	Dos COV: 40 g AT/L-d: Aumentó la producción de H ₂ en 34.8%. El acetato y butirato aumentaron su concentración en 7.7% y 8.7% 60 g AT/L-d: Aumento de 26.8% de producción de H ₂ . Las concentraciones de acetato, lactato y butirato aumentaron 26.1%, 18.1% y 4.7% respectivamente	Este trabajo

7 Conclusiones

Se demostró que la resina PAD950 tiene afinidad hacia los ácidos carboxílicos presentes en la fase líquida de la fermentación oscura. Al utilizar la resina PAD950 en la implementación en diferentes configuraciones, como columna empacada y tanque agitado, en la fermentación extractiva se demostró que aumentaba la producción de hidrógeno y de ácidos carboxílicos.

Al usar la resina PAD950 en una columna empacada, se logró un incremento del 15% en la producción de hidrógeno y un aumento notable en el rendimiento molar de los ácidos carboxílicos. Por otro lado, cuando se empleó la resina en un tanque agitado para la fermentación extractiva, no solo se obtuvo una mejora considerable del 39.3% en la producción de hidrógeno, sino también se redujeron los problemas operativos, ofreciendo ventajas importantes sobre la configuración de columna empacada.

Los cambios detectados en las rutas metabólicas en PAD950-C y PAD950-R, en comparación con la fermentación control, sugieren que la fermentación extractiva podría influir en el metabolismo microbiano. En ambas configuraciones de fermentación extractiva utilizando la resina PAD950, se notó un aumento inicial en la concentración de lactato, que posteriormente disminuyó entre las 10 y 12 horas desde el comienzo de la fermentación. Esta observación ayuda a plantear la hipótesis de que el lactato podría estar siendo consumido para generar butirato e hidrógeno, sin embargo, se necesita realizar una investigación más profunda para poder confirmarlo.

En comparación con el uso de la resina iónica A110, la resina PAD950 no presenta el fenómeno de adsorción-regeneración, evitando así fluctuaciones drásticas en el pH y posibles perjuicios a la biomasa.

La resina PAD950, combinada con la configuración de tanque agitado, fue seleccionada para ser empleada en la fermentación extractiva de proceso continuo. Esta elección se basó en su notable eficiencia al aumentar la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos, su capacidad para mantener el pH constante y las

ventajas operacionales que presenta frente a la configuración de columna empacada.

Durante el proceso continuo de fermentación extractiva, en la COV de 40 g de azúcares totales/L-d, aumentó 34.82% la velocidad de producción de hidrógeno, mientras que, con una COV de 60 g, esta velocidad mejoró en un 26.8%. Resulta interesante que, a pesar de las diferencias en las concentraciones de azúcares, las velocidades de producción de hidrógeno en ambas cargas fueron similares. Adicionalmente, se detectaron variaciones en el consumo de azúcares, siendo del 88% para la carga de 40 y del 65% para la carga de 60, lo cual podría estar asociado al uso de un medio mineral reducido en sales.

Las discrepancias en el consumo de azúcares entre ambas cargas sugieren la posibilidad de que el consorcio microbiano pueda no estar creciendo y/o metabolizando de manera óptima. No obstante, aún se requieren investigaciones adicionales para confirmar y comprender a fondo las causas subyacentes de este fenómeno.

Es fundamental resaltar que el enfoque de utilizar resinas poliméricas durante la fermentación, en lugar de en un tratamiento post-fermentación, es poco común en la literatura actual. Esta investigación se posiciona, por tanto, como una aportación valiosa, abriendo caminos para futuros estudios.

8 Perspectivas

- Optimización de la concentración de sales minerales: Determinar la concentración mínima necesaria para un sistema continuo de operación sin afectar la estabilidad del consorcio microbiano, la producción de metabolitos y su crecimiento. Considerar también la variable de la concentración inicial de azúcares en la prueba. Esto permitirá el uso del fermentado con una cantidad de sales/iones que no afecte el crecimiento microbiano y disminuya la interferencia que suponen en la fermentación extractiva con resinas.
- Gestión de la biomasa: Encontrar una estrategia efectiva para mantener la biomasa dentro del reactor, sin que entre en contacto directo con la resina, para evitar problemas operacionales, como fijar la biomasa dentro del reactor.
- Realizar el modelado del matraz kitasato utilizado como tanque agitado para optimizar los parámetros de operación: velocidad de agitación y tamaño del agitador. De esta forma se podrá obtener una mejor comprensión del transporte de masa que ocurre entre la resina y los ácidos carboxílicos presentes en el medio; se podría modelar la forma del tanque y su agitador magnético, con el fin de determinar la velocidad de agitación óptima para el proceso.
- Usar diferentes adsorbentes: Se sugiere combinar dos tipos de resinas (una iónica y una polimérica) para aumentar la retención de los ácidos carboxílicos. Se deberá determinar en qué proporción son más selectivas hacia los metabolitos presentes en el fermentado.
- Estudio de las comunidades microbianas: Realizar comparaciones entre las comunidades presentes tanto en la fermentación control/estado estable y la fermentación extractiva. Se podría usar herramientas como la metatranscriptómica para identificar qué genes están activos y cómo varían entre la fermentación extractiva y la fermentación oscura control.
- Ciclos de regeneración/adsorción: Realizar pruebas para determinar cuántos ciclos de regeneración es capaz de soportar la resina antes de que su porcentaje de regeneración empiece a disminuir. A partir de este punto, se

podría desarrollar un sistema que intercambie columnas (mientras una funciona, la otra se regenera) y así realizar procesos continuos con menos interferencias.

- Si se logra optimizar el proceso con la resina A110, se podría usar el sistema de extracción de ácidos carboxílicos como una manera de controlar el pH del reactor.

9 Bibliografía

- [1] H. S. Lee and B. E. Rittmann, "Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen," *Biotechnol Bioeng*, vol. 102, no. 3, pp. 749–758, Feb. 2009, doi: 10.1002/bit.22107.
- [2] B. Gopalakrishnan, N. Khanna, and D. Das, "Chapter 4 - Dark-Fermentative Biohydrogen Production," in *Biohydrogen (Second Edition)*, Second Edition., A. Pandey, S. V. Mohan, J.-S. Chang, P. C. Hallenbeck, and C. Larroche, Eds., in Biomass, Biofuels, Biochemicals. , Elsevier, 2019, pp. 79–122. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64203-5.00004-6>.
- [3] R. Łukajtis *et al.*, "Hydrogen production from biomass using dark fermentation," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 91. Elsevier Ltd, pp. 665–694, Aug. 01, 2018. doi: 10.1016/j.rser.2018.04.043.
- [4] R. Palomo-Briones, "Estrategias de control de las comunidades microbianas durante la fermentación oscura," 2018.
- [5] O. García-Depraect, I. Valdez-Vázquez, E. R. Rene, J. Gómez-Romero, A. López-López, and E. León-Becerril, "Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics," *Bioresour Technol*, vol. 282, pp. 236–244, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.02.100.
- [6] G. Davila-Vazquez, S. Arriaga, F. Alatraste-Mondragón, A. De León-Rodríguez, L. M. Rosales-Colunga, and E. Razo-Flores, "Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives," *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, vol. 7, no. 1. pp. 27–45, Jan. 2008. doi: 10.1007/s11157-007-9122-7.

- [7] Y. Chen, J. J. Cheng, and K. S. Creamer, "Inhibition of anaerobic digestion process: A review," *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 10, pp. 4044–4064, Jul. 2008. doi: 10.1016/j.biortech.2007.01.057.
- [8] M. A. Z. Bundhoo and R. Mohee, "Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review," in *International Journal of Hydrogen Energy*, Elsevier Ltd, May 2016, pp. 6713–6733. doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.03.057.
- [9] E. Elbeshbishy, B. R. Dhar, G. Nakhla, and H. S. Lee, "A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 79, Elsevier Ltd, pp. 656–668, 2017. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.075.
- [10] B. Wang, W. Wan, and J. Wang, "Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production," *Int J Hydrogen Energy*, vol. 33, no. 23, pp. 7013–7019, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.09.027.
- [11] E. W. J. Van Niel, P. A. M. Claassen, and A. J. M. Stams, "Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*," *Biotechnol Bioeng*, vol. 81, no. 3, pp. 255–262, Feb. 2003, doi: 10.1002/bit.10463.
- [12] S.-T. Yang, H. Huang, A. Tay, W. Qin, L. De Guzman, and E. C. San Nicolas, "Chapter 16. Extractive Fermentation for the Production of Carboxylic Acids," 2007.
- [13] A. S. Jatoi *et al.*, "A review on extractive fermentation via ion exchange adsorption resins opportunities, challenges, and future prospects," *Biomass Conversion and Biorefinery*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021. doi: 10.1007/s13399-021-01417-w.
- [14] T. Eregowda, E. R. Rene, J. Rintala, and P. N. L. Lens, "Volatile fatty acid adsorption on anion exchange resins: kinetics and selective recovery of acetic acid," *Separation Science and Technology*

- (*Philadelphia*), vol. 55, no. 8, pp. 1449–1461, May 2020, doi: 10.1080/01496395.2019.1600553.
- [15] S. Rebecchi, D. Pinelli, L. Bertin, F. Zama, F. Fava, and D. Frascari, “Volatile fatty acids recovery from the effluent of an acidogenic digestion process fed with grape pomace by adsorption on ion exchange resins,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 306, pp. 629–639, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.cej.2016.07.101.
 - [16] B. G. Garrett, K. Srinivas, and B. K. Ahring, “Performance and stability of amberlite™ IRA-67 ion exchange resin for product extraction and pH control during homolactic fermentation of corn stover sugars,” *Biochem Eng J*, vol. 94, pp. 1–8, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.bej.2014.11.004.
 - [17] S. C. Karekar, K. Srinivas, and B. K. Ahring, “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 Rep*, vol. 12, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.biteb.2020.100568.
 - [18] P. Badhwar, P. Kumar, and K. K. Dubey, “Extractive Fermentation for Process integration and amplified pullulan production by *A. pullulans* in Aqueous Two Phase Systems,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-018-37314-y.
 - [19] H. Y. Cai, Q. Y. Wu, W. Y. Ouyang, L. Zhang, H. Y. Hu, and W. L. Wang, “Adsorption of Low-Molecular-Weight Carboxylic Acids to Anion Exchange Resins with Various Properties and the Mechanisms of Interaction,” *ACS ES and T Water*, vol. 3, no. 1, pp. 60–69, Jan. 2023, doi: 10.1021/acsestwater.2c00376.
 - [20] M. F. Rahman, W. B. Anderson, S. Peldszus, and P. M. Huck, “Ion-Exchange Treatment of Perfluorinated Carboxylic Acids in Water: Comparison of Polystyrenic and Polyacrylic Resin Structures and

- Impact of Sulfate on Their Performance,” *ACS ES and T Water*, vol. 2, no. 7, pp. 1195–1205, Jul. 2022, doi: 10.1021/acsestwater.1c00501.
- [21] J. C. Crittenden, R. R. Trussell, D. W. Hand, K. J. Howe, and G. Tchobanoglous, *MWH’s Water Treatment*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. doi: 10.1002/9781118131473.
- [22] V. Elhami, E. C. Antunes, H. Temmink, and B. Schuur, “Recovery Techniques Enabling Circular Chemistry from Wastewater,” *Molecules*, vol. 27, no. 4, p. 1389, Feb. 2022, doi: 10.3390/molecules27041389.
- [23] E. Reyhanitash, S. R. A. Kersten, and B. Schuur, “Recovery of Volatile Fatty Acids from Fermented Wastewater by Adsorption,” *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 5, no. 10, pp. 9176–9184, Oct. 2017, doi: 10.1021/acssuschemeng.7b02095.
- [24] A. Ahmad, I. Othman, H. Taher, and F. Banat, “Lactic acid recovery from date pulp waste fermentation broth by ions exchange resins,” *Environ Technol Innov*, vol. 22, May 2021, doi: 10.1016/j.eti.2021.101438.
- [25] A. Senthuran, V. Senthuran, R. Hatti-Kaul, and B. Mattiasson, “Lactate production in an integrated process configuration: reducing cell adsorption by shielding of adsorbent.,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 65, no. 6, pp. 658–63, Nov. 2004, doi: 10.1007/s00253-004-1638-y.
- [26] Y.-S. Jun *et al.*, “Adsorption of Pyruvic and Succinic Acid by Amine-Functionalized SBA-15 for the Purification of Succinic Acid from Fermentation Broth,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 111, no. 35, pp. 13076–13086, Sep. 2007, doi: 10.1021/jp072606g.
- [27] P. Nuñez-Valenzuela, “Fermentación extractiva como estrategia para incrementar la co-producción de H₂ y ác. carboxílicos en la fermentación oscura,” IPICYT, San Luis Potosí, 2021.
- [28] J. de J. Montoya-Rosales *et al.*, “Coping with mass transfer constrains in dark fermentation using a two-phase partitioning bioreactor,”

Chemical Engineering Journal, vol. 445, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.cej.2022.136749.

- [29] J. Antonio, A. Orozco, J. René, and R. Méndez, “‘Título de la tesis’ Tesis que presenta Environmental Applications of Functionalized Activated Carbon with Iron Oxyhydroxide Nanoparticles,” 2013.
- [30] APHA/AWWA/WEF, “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,” *Methods*. 2012.
- [31] G. Davila-Vazquez, F. Alatríste-Mondragón, A. de León-Rodríguez, and E. Razo-Flores, “Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH,” *Int J Hydrogen Energy*, vol. 33, no. 19, pp. 4989–4997, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.06.065.
- [32] A. Detman *et al.*, “Dynamics of dark fermentation microbial communities in the light of lactate and butyrate production,” *Microbiome*, vol. 9, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/s40168-021-01105-x.
- [33] J. de J. Montoya-Rosales, A. Ontiveros-Valencia, D. A. Esquivel-Hernández, C. Etchebere, L. B. Celis, and E. Razo-Flores, “Metatranscriptomic Analysis Reveals the Coexpression of Hydrogen-Producing and Homoacetogenesis Genes in Dark Fermentative Reactors Operated at High Substrate Loads,” *Environ Sci Technol*, vol. 57, no. 31, pp. 11552–11560, Aug. 2023, doi: 10.1021/acs.est.3c02066.
- [34] A. M. Lopez-Hidalgo, A. Smoliński, and A. Sanchez, “A meta-analysis of research trends on hydrogen production via dark fermentation,” *Int J Hydrogen Energy*, vol. 47, no. 27, pp. 13300–13339, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.ijhydene.2022.02.106.
- [35] A. Peña, N. S. Ilvia Sánchez, H. Álvarez, M. Calahorra, and J. Ramírez, “Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEMS Yeast Res*, vol. 15, no. 2, Mar. 2015, doi: 10.1093/femsyr/fou005.

- [36] J. de J. Montoya-Rosales *et al.*, “Coping with mass transfer constrains in dark fermentation using a two-phase partitioning bioreactor,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 445, p. 136749, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.cej.2022.136749.

Anexo 1. Fotografías y diagramas de reactor en lote y de sistema de extracción



Figura I. Fotografía de un matraz Kitasato adaptado para funcionar como tanque agitado. 1) Entrada del fermentado procedente del reactor; 2) Salida del tanque, por la cual el fermentado retorna al reactor; 3) Salida de gas conectada a una probeta con agua para medir el gas generado dentro del matraz mediante desplazamiento de volumen; 4) Filtro que impide el paso de la resina al reactor.

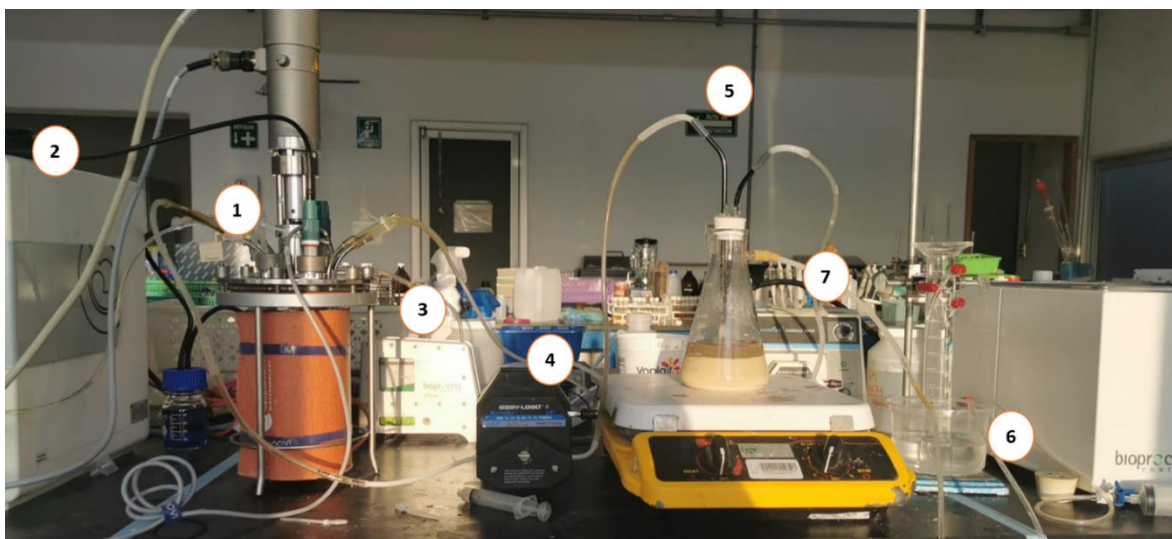


Figura II. Fotografía del sistema de fermentación extractiva en lote con tanque agitado y resina PAD950. 1) Reactor; 2) Controlador de pH y temperatura; 3) Contador de producción de hidrógeno; 4) Bomba que transporta el fermentado del reactor al tanque; 5) Tanque agitado conteniendo la resina; 6) Sistema para medir el volumen de gas generado en el tanque agitado; 7) Bomba que retorna el fermentado del tanque conteniendo la resina al reactor.