



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

OPTIMIZACIÓN HEURÍSTICA DE UN FERMENTADOR PRODUCTOR DE HIDRÓGENO
MODIFICANDO LA CARGA ORGÁNICA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
ING. ALBERTO VILLA LEYVA

TUTOR PRINCIPAL:
DR. GERMÁN BUITRÓN MENDÉZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
COMITÉ TUTOR:
DR. JAIME ALBERTO MORENO PÉREZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
DRA. GABRIELA ELEONORA MOELLER CHÁVEZ, UPEMOR

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE 2015

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Oscar Armando Monroy Hermosillo
Secretario: Dr. Oscar González Barceló
Vocal: Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez
1^{er.} Suplente: Dr. Jaime Alberto Moreno Pérez
2^{d o.} Suplente: Dr. Germán Buitrón Méndez

Lugar donde se realizó la tesis:

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PROCESOS AVANZADOS DE TRATAMIENTOS DE AGUAS, UNIDAD ACADÉMICA JURQUILLA DEL INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

TUTOR DE TESIS:

NOMBRE

FIRMA

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por su apoyo y esfuerzo por brindar educación a mí y mis hermanos. Gracias por la confianza que siempre me otorgaron. Eternamente agradecido con ustedes.

Agradezco al Dr. Germán por aceptarme en su grupo de trabajo, por sus consejos y sus enseñanzas.

Agradecido con el Dr. Ixbalank por su confianza, sus consejos y paciencia.

Al Dr. Alejandro, Dr. Iván, M.C. Gloria por compartirme sus conocimientos, sus consejos y apoyo técnico.

Al M. B. Jaime Pérez por sus consejos, su asistencia técnica, su amistad y compañerismo.

Agradezco a mis compañeros de generación de maestría y doctorado, Liz, Alfonso, compa Juan y Eliane; gracias por su amistad, su amena compañía, sus pláticas, sus chistes y sus consejos, muchas gracias. Ha sido un placer coincidir con ustedes.

A Víctor Servando y a su familia por su generosidad.

A todas las personas con las que conviví durante mi estancia en las instalaciones del LIPATA.

A mis amigos, Víctor Alfonso, Hugo, Danilo, Juanra, Heidy, Nataly, Marienne, Reyna, Yarlyn. Gracias por su gran amistad, sus palabras de aliento y su compañía. Los quiero.

A CONACYT por la beca otorgada. Al proyecto DGAPA UNAM (PAPIIT IT100113) por el financiamiento

Dedicatoria

A mis padres, Idolina y Alberto.

A mis hermanos, Dunia y Jairo.

A mi familia.

CONTENIDO

Lista de tablas.....	I
Lista de figuras.....	II
Lista de abreviaturas.....	III
1. INTRODUCCIÓN	1
2. RESUMEN	3
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1 La demanda energética y el hidrógeno	4
3.2 El hidrógeno como producto intermedio de la digestión anaerobia	5
3.3 Reacciones bioquímicas en la fermentación oscura.....	7
3.4 Factores que afectan la producción de hidrógeno vía fermentación oscura	9
3.4.1. Tipo de inóculo	9
3.4.2. Métodos de obtención de inóculo.....	11
3.4.3. Sustrato	12
3.4.4. Configuración del reactor	13
3.4.5. Nutrientes	15
3.4.6. Iones metálicos	16
3.4.7. Temperatura	16
3.4.8. pH.....	17
3.4.9. La carga orgánica.....	18
3.5 Observadores de estados	19
3.6 Optimización de la productividad de biohidrógeno	20
3.6.1. Estudios realizados utilizando estrategias de optimización en línea en la producción de hidrógeno por fermentación oscura.....	21
4. HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	24
4.1 Hipótesis.....	24
4.2 Justificación	24
4.3 Objetivos.....	25
4.3.1. Objetivo general	25
4.3.2. Objetivos específicos	25
5. METODOLOGÍA.....	25
5.1 Estrategia experimental.....	25
5.2 Inóculo y composición del agua residual sintética	26
5.3 Operación de fermentador	27
5.4 Técnicas analíticas	28
5.4.1. Medición de glucosa.....	28
5.4.2. Sólidos suspendidos volátiles	28
5.4.3. Composición de biogás	28
5.4.4. Ácidos grasos volátiles y etanol	29
5.4.5. Medición y adquisición de datos en línea	29
5.5 Modelo del reactor productor de hidrógeno	29
5.6 Observador para la estimación de la concentración de sustrato en la alimentación del reactor	32
5.7 Calibración del observador de estados.....	36
5.7.1. Diseño experimental.....	36

5.8 Validación experimental del observador de estados.....	37
5.9 Estrategia de optimización para modificar la carga orgánica	38
6. RESULTADOS	40
6.1 Comportamiento del fermentador en las diferentes condiciones de operación	40
6.1.1. Productividad del reactor.....	40
6.2 Productos microbianos solubles (PMS)	44
6.3 Sólidos suspendidos volátiles	45
6.4 Composición de biogás	47
6.5 Balance de electrones equivalentes	47
6.6 Calibración del observador de estados	48
6.7 Validación experimental del observador de estados.....	50
6.8 Implementación de la estrategia de optimización acoplada al observador de estado.....	55
7. CONCLUSIONES	59
8. BIBLIOGRAFÍA	61
9. ANEXOS.....	68
9.1 Anexo 1. Calibración de sensor de hidrógeno.	68
9.2 Anexo 2. Calibración de bomba de alimentación.....	69
9.3 Anexo 3. Balance de electrones equivalentes	70
9.4 Anexo 4. Producción del trabajo de investigación	72

Lista de Tablas

Tabla 3.1. Tipos de inóculos puros utilizados en la producción de hidrógeno por fermentación oscura.

Tabla 3.2. Comparación de pretratamientos para minimizar la actividad de bacterias consumidoras de hidrógeno.

Tabla 3.3. Técnicas de pretratamiento de sustrato aplicadas.

Tabla 3.4. Rangos de C/N y C/P estudiados.

Tabla 3.5. Estudios realizados para la evaluación del pH en la producción fermentativa de hidrógeno.

Tabla 5.1. Constantes utilizadas en el modelo.

Tabla 5.2. Condiciones nominales de operación para calibración de modelo

Tabla 6.1. Valores promedios de las condiciones de operación.

Tabla 6.2. Parámetros del polinomio de 3er orden que ajusta los valores de CO y productividad.

Tabla 6.3. Balance de DQO en las diferentes CO de operación (porcentaje con respecto al total alimentado).

Tabla 9.1. Datos de cada condición de operación para determinar el balance de DQO.

Lista de figuras

Figura 3.1. Esquema del proceso anaerobio: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

Figura 5.1. Estrategia experimental que se siguió para dar cumplimiento a los objetivos planteados.

Figura 5.2. Montaje del reactor.

Figura 5.3. Diagrama de bloques del observador acoplado para estimar la concentración S_{in} .

Figura 6.1. Relación entre la carga orgánica y la productividad del fermentador.

Figura 6.2. Porcentaje de DQO removida en forma de hidrógeno.

Figura 6.3. Rendimientos de producción de hidrógeno.

Figura 6.4. Productos microbianos solubles producidos a diferentes cargas orgánicas.

Figura 6.5. Concentración de SSV en diferentes cargas orgánicas.

Figura 6.6. Perfil de rendimiento de biomasa en las diferentes cargas orgánicas de operación.

Figura 6.7. Composición de biogás.

Figura 6.8. Flujo de hidrógeno, flujo de alimentación y TRH en cada uno de los tres experimentos.

Figura 6.9. Estimaciones de G_{luin} y los valores reales.

Figura 6.10. Comparación entre las concentraciones de SSV estimadas y reales.

Figura 6.11. Estimaciones de G_{lu} y los valores reales.

Figura 6.12. Comportamiento de la estrategia de optimización acoplada al observador de estados en un primer experimento.

Figura 6.13. Comportamiento de la estrategia de optimización acoplada al observador de estados en un segundo experimento.

Figura 9.1. Calibración del sensor de hidrógeno mediante la relación entre la fracción de hidrógeno en el gas y el voltaje producido por dicha fracción de hidrógeno.

Figura 9.2. Calibración de la bomba de alimentación mediante la relación entre el voltaje aplicado y el flujo producido.

Lista de abreviaturas

$\%H_2$	Porcentaje de hidrógeno presente en el biogás
AGV	Ácidos grasos volátiles
CO	Carga orgánica
CSTR	Reactor de flujo continuo completamente mezclado
DQO	Demanda química de oxígeno
Glu	Concentración de glucosa dentro del reactor
$\hat{G}lu$	Concentración de glucosa dentro del reactor estimada
Glu_{in}	Concentración de glucosa a la entrada del reactor
$\hat{G}lu_{in}$	Concentración de glucosa a la entrada del reactor estimada
$Prod$	Productividad del reactor
q_{H_2}	Flujo de hidrógeno
Q_{in}	Flujo de alimentación
$Q_{in, max}$	Flujo de alimentación máximo
$Q_{in, min}$	Flujo de alimentación mínimo
S_{in}	Concentración de sustrato a la entrada del reactor
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TRH	Tiempo de retención hidráulico
TRH_{max}	Tiempo de retención hidráulico máximo
TRH_{min}	Tiempo de retención hidráulico mínimo
V_r	Volumen de reacción
X	Concentración de biomasa
\hat{X}	Concentración de biomasa estimada

1. INTRODUCCIÓN

Por sus características, el hidrógeno es considerado uno de los vectores energéticos del futuro, su combustión no genera gases de efecto invernadero además de que posee un poder calorífico mayor que el de otros combustibles obtenidos a partir de hidrocarburos.

La mayor parte de la producción de hidrógeno actual se obtiene a partir de procesos termocatalíticos y a partir de recursos no renovables. Frente a esto, los procesos biológicos nacen como una alternativa para la producción de hidrógeno a partir de biomasa y recursos renovables. Entre estos procesos el que ha tenido mayor atención en la investigación es la fermentación oscura, puesto que presenta algunas ventajas frente a los otros bioprocesos, como son las mayores velocidades de producción, resistencia a perturbaciones y la utilización de aguas residuales ricas en carbohidratos como materia prima; de este modo es posible abatir dos problemas al mismo tiempo, por un lado se obtiene energía a partir de un recurso renovable y por otro lado se lleva a cabo un proceso de tratamiento de aguas residuales.

En cualquier proceso productivo se busca obtener la mayor producción en el menor tiempo posible. En la producción biológica de hidrógeno se han implementado diversas estrategias de optimización, en la mayoría de ellas se buscan las mejores condiciones de operación que maximicen la productividad. En diversos estudios se emplean algunos métodos que consisten primero en realizar diversas pruebas en laboratorio basadas en un diseño experimental, en las que se determinen las condiciones óptimas como configuración de reactor, tipo de inóculo, tipo de sustrato, temperatura y pH de operación, etc. O sea que se determinan las condiciones óptimas fuera de línea. En otros trabajos se implementan métodos estadísticos basados en datos experimentales para determinar las mejores combinaciones de condiciones de operación. Y por otro

lado destacan las técnicas de optimización en las que se determinan y actualizan en línea los valores óptimos de los parámetros de operación que permitan alcanzar la mayor productividad.

Uno de los principales retos de la producción de biohidrógeno por medio de la fermentación oscura es tener flujos de producción tales que permitan la factibilidad del proceso a gran escala. En este trabajo se presenta la aplicación de una estrategia de optimización en línea que permite maximizar la productividad de un fermentador oscuro. Dicha estrategia se basa en la relación propuesta por Ramírez-Morales *et al.* (2015), donde se evaluó el efecto de la carga orgánica en la productividad del fermentador y se presentó a la productividad como una variable dependiente de la carga orgánica aplicada al fermentador. De acuerdo a los datos experimentales obtenidos en esa investigación se encontró que a medida que la carga orgánica aumenta la productividad también tiende a aumentar hasta llegar a un máximo, después de ese máximo la productividad del reactor decrece, presentándose un decline en la productividad conforme aumentó la carga orgánica. Los datos fueron ajustados a un polinomio donde la variable dependiente es la productividad y la variable independiente es la carga orgánica, determinándose el mejor ajuste a uno 3er orden.

2. RESUMEN

La fermentación oscura se perfila como uno de los procesos biológicos más factibles para la producción de hidrógeno. Este presenta algunas ventajas sobre otros procesos biológicos productores de hidrógeno, por ejemplo, alcanza las velocidades más altas de producción además de utilizar contaminantes orgánicos, específicamente carbohidratos presentes en algunas aguas residuales.

En este trabajo se evaluó una estrategia de optimización de un fermentador productor de hidrógeno. Dicha estrategia se fundamenta en la relación existente entre la carga orgánica (gDQO/L·d) aplicada al reactor y su productividad ($LH_2/L\cdot d$). El objetivo de la estrategia es modificar la carga orgánica mediante el ajuste del flujo de alimentación; sin embargo para esto se requiere del conocimiento de la concentración de sustrato a la entrada del reactor. Para resolver este problema se utilizó un observador de estados, el cual realizaba una estimación de la concentración de sustrato a partir de las mediciones en línea de flujo de biogás y porcentaje de hidrógeno presente. Un observador de estados es un algoritmo de computadora que estima variables de estado de un sistema. En el caso del fermentador oscuro, ejemplo de variables de estado son la concentración de sustrato a la entrada del reactor y concentración de biomasa.

La estrategia de optimización permitió que el sistema productor de hidrógeno incrementara la productividad hasta en un 100%. El observador de estados representó una herramienta útil para la implementación de la estrategia de optimización, presentando errores relativos de la estimación con respecto a la concentración real de sustrato de 2.5 a 19.7%. Mediante su implementación se evita el uso de técnicas analíticas y otros equipos para la determinación de la concentración de sustrato.

3. ANTECEDENTES

3.1 La demanda energética y el hidrógeno

La demanda energética de la población mundial se incrementa a una velocidad cada vez mayor debido al crecimiento demográfico. La mayor parte de la energía utilizada es obtenida a partir de combustibles fósiles, cuya combustión genera una variedad de contaminantes, como óxidos de nitrógeno y óxidos de azufre, además de dióxido de carbono, el cual es el principal gas de efecto invernadero. Ésta demanda energética y los problemas ambientales ocasionados por los combustibles fósiles dieron inicio a la búsqueda de fuentes alternativas de energía renovables y de mejor calidad. Además, el petróleo es una fuente finita de combustibles que cada vez se vuelve más escaso y más caro. Las preocupaciones ambientales, económicas y políticas están generando un creciente interés en los biocombustibles y su producción a gran escala (Balat y Kirtay, 2010).

Como vector energético limpio y renovable, el hidrógeno es considerado como el combustible del futuro (Ren *et al.*, 2006). Recordemos que el hidrógeno no es una fuente de energía primaria que se encuentra de manera libre en la naturaleza, sino que es debe de ser fabricado, por lo tanto se considera un acarreador de energía (Balat, 2008).

El hidrógeno puede ser utilizado en celdas de combustible para producir energía eléctrica o bien puede ser usado en motores de combustión interna. Al usarse en estos, el hidrógeno presenta varias ventajas frente a los hidrocarburos convencionales, por ejemplo que no genera emisiones contaminantes y que cuenta con un poder calorífico de 122kj/g, el cual es 2.75 veces mayor que el de combustibles hechos a base de hidrocarburos (Kapdan y Kargi, 2006). La mayoría de los expertos consideran que el hidrógeno tendrá un importante papel como un portador de energía en el sector de la energía en el futuro (Balat, 2008).

El hidrógeno puede ser obtenido de diversas fuentes de energía primarias y mediante el uso de diferentes tecnologías. Actualmente, la mayor parte del hidrógeno se produce a partir de fuentes no renovables como el petróleo, el gas natural y el carbón; alrededor de 50% es obtenido utilizando las técnicas de la descomposición termocatalítica y gasificación del gas natural, aceites pesados, nafta y carbón (Logan, 2004). Por otro lado, los procesos biológicos se presentan como una alternativa para la producción de hidrógeno. Estos procesos pueden ser clasificados en tres categorías (Kapdan y Kargi, 2006): (1) bio-fotólisis del agua por algas, (2) la fermentación oscura y (3) la foto-fermentación.

La biomasa, especialmente los residuos orgánicos como los contenidos en las aguas residuales, ofrecen una manera económica y ambientalmente rentable para la producción de hidrógeno por medio de procesos biológicos. Al utilizar este tipo de sustratos orgánicos se atacan dos problemas, el tratamiento de las aguas residuales y la minimización de residuos orgánicos y por otro lado la obtención de energía. Resulta evidente que el uso del hidrógeno como vector energético ayudaría a resolver una serie de problemas ambientales, en primera instancia, el problema global con los gases de efecto invernadero (Goltsov *et al.*, 2006), después ayudaría a la solución de problemas de seguridad alimentaria, cambio climático y seguridad energética (Lin *et al.*, 2012), además del tratamiento de aguas residuales y residuos orgánicos.

3.2 El hidrógeno como producto intermedio de la digestión anaerobia

La producción biológica de hidrógeno es un fenómeno natural que se presenta en ambiente de condiciones anaerobias. Una amplia variedad de bacterias presentes en pantanos, aguas residuales y rumen de ganado son capaces de convertir la materia orgánica en hidrógeno, CO₂ y otros metabolitos como ácido acético, butírico, lactato y etanol (Reith y Wijffels, 2003). Sin embargo, este proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica envuelve la cooperación de distintas poblaciones microbianas que mantienen un proceso fermentativo estable y

autorregulado (Sterling Jr. *et al.*, 2001) conocido como digestión anaerobia. Este es un proceso que se desarrolla en una serie de etapas, cada una de ellas mediada por un consorcio microbiano (figura 3.1).

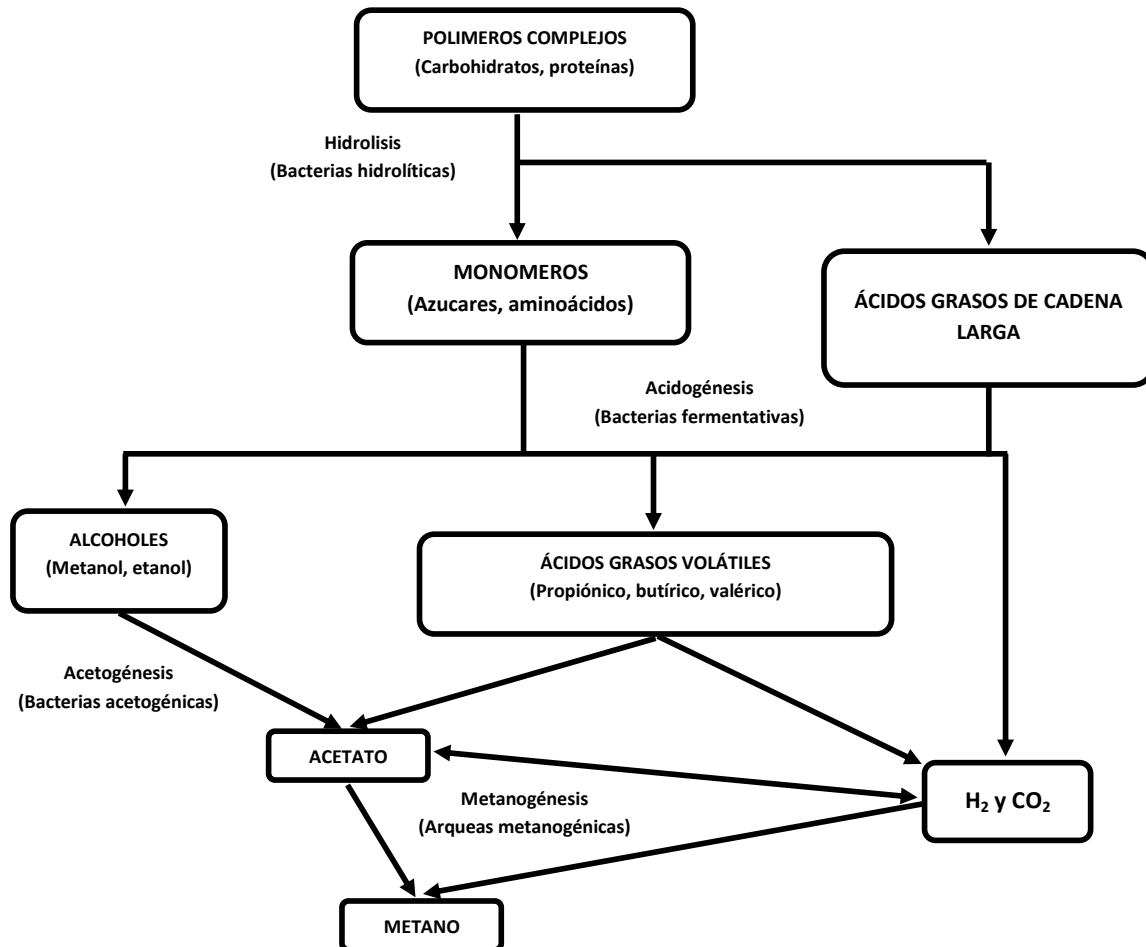


Figura 3.1. Esquema del proceso anaerobio: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (McCarty y Smith, 1986).

En la primera etapa, las bacterias hidrolíticas rompen los polímeros complejos como carbohidratos y proteínas en azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga. En la siguiente etapa, la acidogénesis, las bacterias fermentativas descomponen los azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga en hidrógeno, CO₂, ácidos grasos volátiles y alcoholes. Después, en la etapa de acetogénesis, los alcoholes y los ácidos grasos volátiles son transformados en

acetato. En este punto el hidrógeno y el acetato pueden ser utilizados o producidos por algunos grupos microbianos como las bacterias homoacetogénicas, que producen acetato a partir de hidrógeno y dióxido de carbono (Muller, 2003). Finalmente, en la metanogénesis, las bacterias metanogénicas producen metano y CO₂ a partir de hidrógeno, CO₂ y acetato, siendo entonces las bacterias metanogénicas las consumidoras de hidrógeno.

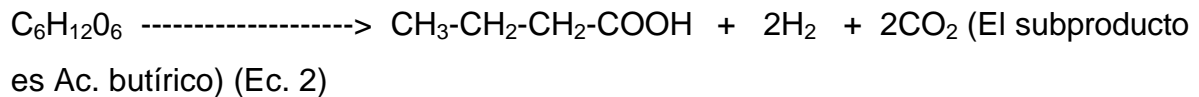
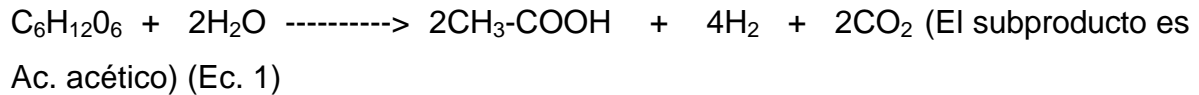
Cuando el objetivo es obtener hidrógeno a partir de la materia orgánica es necesario crear un ambiente específico propicio para el desarrollo de las bacterias productoras de hidrógeno y al mismo tiempo se minimice o elimine la actividad de las bacterias consumidoras (Reith y Wijffels, 2003), inhibiendo así el proceso de la digestión anaerobia subsecuente a la etapa de fermentación obteniéndose una mezcla gaseosa compuesta por hidrógeno y CO₂ como productos gaseosos. Tal mezcla puede ser sometida a un proceso de purificación para incrementar el porcentaje de hidrógeno y secuestrar el CO₂. El CO₂ secuestrado puede ser utilizado en otros procesos productivos, por ejemplo, incorporarse a los sistemas de cultivo de microalgas donde es utilizado como fuente de carbono (Wang *et al.*, 2013).

3.3 Reacciones bioquímicas en la fermentación oscura

De los diferentes procesos biológicos para la producción de hidrógeno, la fermentación oscura representa el más atractivo por el potencial de utilizar aguas residuales y residuos orgánicos como fuente de materia orgánica además de tener más altas tasas de producción en comparación a la fotofermentación (Wang y Wan, 2009).

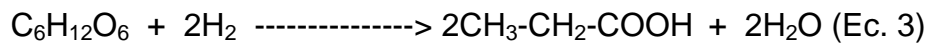
El rendimiento (Y_{H_2} , mol H₂/mol glucosa) de la producción de hidrógeno está en función de los subproductos de la fermentación, cuando las condiciones de la fermentación son adecuadas para la producción de hidrógeno los principales subproductos son los ácido acético y butírico. Cuando el subproducto es ácido

acético la producción teórica que se tiene es de 4 moles H₂/mol glucosa, mientras que cuando se obtiene ácido butírico la producción teórica es 2 moles H₂/mol glucosa. Las relaciones estequiométricas quedan de la siguiente manera:

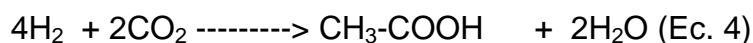


En la práctica los rendimientos se encuentran alrededor de 2 moles H₂/mol glucosa.

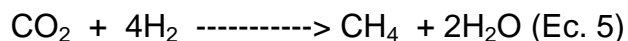
En el proceso también se llevan a cabo reacciones de consumo de hidrógeno. Una de las reacciones consumidoras de hidrógeno sucede cuando el producto es ácido propiónico:



lo que indica que se consumen un mol de hidrógeno por cada mol de ácido propiónico producido. También se consume hidrógeno cuando se produce ácido acético mediante el fenómeno de la homoacetogénesis,



o bien en el procesos de la metanogénesis,



Uno de los objetivos en un proceso fermentativo productor de hidrógeno se enfoca en el logro de mayores producciones, evitando el consumo del hidrógeno durante el mismo proceso.

3.4 Factores que afectan la producción de hidrógeno vía fermentación oscura

3.4.1. Tipo de inóculo

3.4.1.1 Cultivo puro

Se han realizado diversas pruebas de producción de hidrógeno con diferentes tipos de cultivos puros (tabla 3.1). Los géneros más estudiados son *Clostridium* y *Enterobacter*. La mayoría de los trabajos realizados con cultivos puros se han llevado a cabo en sistemas por lotes utilizando glucosa como sustrato (Wang y Wan, 2009).

Los resultados mostrados en la tabla 3.1 indican que cuando se utiliza glucosa como sustrato e inóculos puros el rendimiento práctico de moles de hidrógeno por mol de glucosa se encuentra alrededor de 2.0.

Por un lado cuando se utilizan cultivos puros, el rendimiento de hidrógeno es favorecido a bajas concentraciones de sustrato mientras que la producción acumulada de hidrógeno es favorecida a altas concentraciones de sustrato (Bisailon *et al.*, 2006). Resulta más apropiado utilizar cultivos puros cuando el objetivo es examinar los factores limitantes y los efectos de las manipulaciones genéticas; en estos cultivos es posible controlar la ruta fermentativa así como los productos del proceso por medio de la elección de los microorganismos (Hallenbeck, 2009).

3.4.1.1 Cultivo mixto

Diferentes tipos de bacterias productoras de hidrógeno se encuentran dispersas de manera natural en los ambientes en forma de consorcios microbianos. Se han realizado ensayos con cultivos mixtos obtenidos de diversas fuentes como suelo

natural, lodo de digestión anaerobia, compost aerobio, lodo de plantas de tratamiento de aguas residuales y sedimentos lacustres (Maintinguer *et al.*, 2008).

Tabla 3.1. Tipos de inóculos puros utilizados en la producción de hidrógeno por fermentación oscura (Wang y Wan, 2009).

Inóculo	Sustrato	Configuración de reactor	Máximo rendimiento de hidrógeno
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glucosa	Por lotes	2.0 mol/mol glucosa
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Glucosa	Continuo	1.08 mol/mol glucosa
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Xilosa	Por lotes	0.73 mol/mol xilosa
<i>Clostridium butyricum</i> CGS2	Almidón	Por lotes	9.95 mmol/g COD
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH4	Sacarosa	Por lotes	2.07 mol/mol hexosa
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	Desechos quitinosos	Por lotes	2.2 mol/mol sustrato
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Biomasa celulósica	Por lotes	2.3 mol/mol glucosa
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Lactosa	Continuo	3.0 mol/mol lactosa
<i>Clostridium</i> sp. strain no. 2	Celulosa	Continuo	0.3 mol/mol glucosa
<i>Clostridium</i> sp. Fanp2	Glucosa	Por lotes	0.2 mol/L medio
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	Glucosa	Por lotes	1.0 mol/mol glucosa
<i>Enterobacter aerogenes</i> NBRC 13534	Glucosa	Por lotes	0.05 mol/L medio
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Glucosa	Por lotes	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	Glicerol	Por lotes	0.6 mol/mol glicerol
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Almidón	Por lotes	1.09 mol/mol almidón
<i>Enterobacter aerogenes</i> E 82005	Melaza	Continuo	3.5 mol/mol azúcar
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Glucosa	Continuo	-
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Sacarosa	Por lotes	6 mol/mol sacarosa
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Celobiosa	Por lotes	5.4 mol/mol celobiosa
<i>Escherichia coli</i> MC13-4	Glucosa	Por lotes	1.2 mol/mol glucosa
<i>Escherichia coli</i>	Glucosa	Por lotes	2.0 mol/mol glucosa
<i>Escherichia coli</i>	Glucosa	Continuo	2.0 mol/mol glucosa
<i>Pseudomonas</i> sp. GZ1	Lodos residuales	Por lotes	0.007 mol/g TDQO
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> KU001	Glucosa	Por lotes	2.4 mol/mol glucosa
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	Almidón	Continuo	-
<i>Thermotoga elfii</i>	Glucosa	Por lotes	84.9 mmol/L medio
<i>Hydrogen-producing bacterial</i> B49	Glucosa	Por lotes	0.1 mL/L cultivo
<i>Ruminococcus albus</i>	Glucosa	Por lotes	2.52 mol/mol glucosa
<i>Hafnia alvei</i>	Glucosa	Por lotes	-
<i>Ethanoligenens harbinense</i> YUAN-3	Glucosa	Continuo	1.93 mol/mol glucosa

Frecuentemente se desconoce la composición microbiológica de los cultivos mixtos, la cual depende de la fuente del inóculo y del historial del mismo. Esto provoca dificultad al momento de comparar un estudio con otro (Hallenbeck, 2009). Los cultivos mixtos son más prácticos a la hora de usarse por su forma más simple de operar y fácil de controlar, y además de su capacidad para trabajar con residuos orgánicos como sustratos (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). La misma complejidad característica de los cultivos mixtos puede proporcionarles la

habilidad para adaptarse a una variedad de fuentes de carbono y nutrientes de aguas residuales domiciliarias e industriales (Lin *et al.*, 2012).

3.4.2. Métodos de obtención de inóculo

Con el fin tener una mayor producción de hidrógeno por medio de la fermentación, los cultivos mixtos pueden ser sometidos a ciertos pretratamientos, mediante estos se intenta suprimir la actividad de las bacterias consumidoras de hidrógeno tanto como sea posible mientras se conserve la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno (Wang y Wan, 2009). Los principales pretratamientos reportados incluyen choque térmico, uso de ácidos, bases, aireación, congelamiento y descongelamiento, cloroformo, sodio 2-bromoetanosulfato o ácido 2-bromoetanosulfónico y yodopropano (tabla 3.2). De estos pretratamientos el más usado es el choque térmico (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005).

Tabla 3.2. Comparación de pretratamientos para minimizar la actividad de bacterias consumidoras de hidrógeno (Wang y Wan, 2008).

Inóculo	Pretratamientos de inóculo estudiados	Sustrato utilizado	Configuración de reactor	Máximo rendimiento de hidrogeno	Pretratamiento de mejor resultado
Lodo digerido	Acido, base, choque térmico, aireación y cloroformo	Glucosa	Por lotes	1.8 mol/mol glucosa	Choque térmico
Estiércol de ganado	Congelamiento y descongelamiento, acido, choque térmico y sodio 2-bromoetanosulfato	Glucosa	Por lotes	1.0 mol/mol glucosa	Ácido
Gránulos metanogénicas	Acido, choque térmico y cloroformo	Glucosa	Por lotes	1.2 mol/mol glucosa	Cloroformo
Lodo digerido de aguas residuales	Choque térmico, aireación, acido, base, ácido 2-bromoetanosulfonico e yodopropano	Sacarosa	Por lotes	6.12 mol/mol sacarosa	Base
Lodo anaerobio	Sodio 2-bromoetanosulfato, ácido, choque térmico y sus cuatro combinaciones	Aguas residuales de industria láctea	Por lotes	0.0317 mmol/g COD	Sodio 2-bromoetanosulfato

La premisa en la que se basan estos pretratamientos es en que las bacterias productoras de hidrógeno (principalmente género *Clostridium*) tienen la capacidad de formar esporas cuando las condiciones ambientales y de disponibilidad de

nutrientes no son adecuadas para su crecimiento y desarrollo, y que son capaces de reactivarse cuando se presentan condiciones idóneas.

3.4.3. Sustrato

Entre los sustratos más utilizados se encuentran la glucosa, sacarosa y almidón, sin embargo en años recientes se han iniciado estudios en la utilización de residuos sólidos orgánicos y aguas residuales (Kapdan y Kargi, 2006). Se ha demostrado que en un rango apropiado, un incremento en la concentración de sustrato (S_{in}) incrementa la producción de hidrógeno del sistema fermentativo, sin embargo concentraciones más altas al rango podrían inhibir la producción de hidrógeno (Vanginkel *et al.*, 2005).

Algunos sustratos no resultan adecuados para la producción de biohidrógeno debido a su estructura compleja; para solucionar este problema se han ideado algunos pretratamientos al sustrato para facilitar su metabolización por las bacterias productoras de hidrógeno (Wang y Wan, 2009). En la tabla 3.3 se muestran algunos estudios donde se comparan varias técnicas de pretratamiento de sustrato para la producción de hidrógeno por fermentación oscura.

Tabla 3.3. Técnicas de pretratamiento de sustrato aplicadas.

Inóculo	Configuración del reactor	Técnica de pretratamiento	Pretratamiento de mejor resultado	Máximo rendimiento de hidrógeno
<i>Clostridium bifermentans</i>	Por lotes	Congelamiento y descongelamiento, ultrasonido, acidificación, esterilización de e inhibición de metanogénicas	Congelamiento y descongelamiento	2.1 mmol/g DQO
<i>Clostridium bifermentans</i>	Por lotes	Congelamiento y descongelamiento, sonicación, acidificación y esterilización	Congelamiento y descongelamiento	4.1 g/kg Solidos disueltos
<i>Pseudomonas</i> sp. GZ1	Por lotes	Esterilización, microondas y ultrasonificación	Esterilización	15.02 mL/g DQO Total

3.4.4. Configuración del reactor

La configuración del reactor se considera un factor crucial en el desempeño global del proceso fermentativo productor de hidrógeno. Este factor influye en el microambiente que se genera dentro del reactor, en la población microbiana, el comportamiento hidrodinámico y el contacto entre microorganismos y sustrato (Venkata Mohan, 2009).

Como se observa en las tablas de la 3.1 a la 3.3, la mayoría de los estudios para la producción de hidrogeno vía fermentación han sido realizados en reactores de operación por lotes, sin embargo, en la operación a gran escala se requiere que los procesos sean en continuo por razones de ingeniería práctica (Wang y Wan, 2009). Entre los sistemas continuos, los reactores continuos de tanque agitado (CSTR) son ampliamente usados. Estos sistemas presentan ciertas ventajas, por las cuales son ampliamente usados: asegurar un máximo mezclado y homogeneidad (Hallenbeck, 2009), favorecen la transferencia de masa, la salida del biogás y se permite un efectivo control del pH, factores que han permitido incrementar la productividad de hidrógeno. Además, por alcanzar una mezcla completa y poder tener un control del TRH se puede asegurar el completo consumo de los carbohidratos y un incremento en la tasa de rendimiento.

El reactor CSTR es un sistema representativo de los reactores a bases de biomasa suspendidas. En los CSTR convencionales el tiempo de retención de sólidos (TRS) y el tiempo de retención hidráulico (TRH) son iguales, con lo que a TRH cortos se podría provocar el lavado de la biomasa suspendida en el reactor. Sin embargo, este punto se vuelve una ventaja al considerar que un TRS suficientemente pequeño asegura que el proceso de metanogénesis no tome lugar; ya que debido al lento crecimiento de las especies microbianas metanogénicas estas son lavadas (Ntaikou et al., 2010).

Por otro lado, tenemos los biorreactores por lotes, que constan de tres etapas de operación, llenado, reacción y vaciado total. Las principales desventajas de estos

tipos de biorreactores en la producción de hidrógeno son su baja eficiencia y los largos tiempos de inactividad y arranque que presentan (Ntaikou et al., 2010), por lo cual su principal uso son las pruebas en laboratorio.

La alternativa que se presenta a los reactores por lotes son los reactores por lotes secuenciales, los cuales se caracterizan por operar en una serie de etapas cíclicas. Las etapas son: llenado, reacción, decantación y vaciado. En la primera etapa, llenado, se introduce el sustrato al reactor; en la segunda etapa se lleva a cabo la mezcla y la reacción entre los microorganismos y el sustrato. La tercera etapa, decantación, permite la separación de los microorganismos de la fase líquida y su retención dentro del reactor, por lo tanto el incremento del TRS. Finalmente, en la etapa de vaciado se extrae un porcentaje de la fase líquida del reactor. Uno de los problemas que se presenta en este tipo de reactores es que por el mismo efecto del incremento en el TRS se da lugar al crecimiento de poblaciones metanogénicas, originando un decremento en la producción de hidrógeno.

En un estudio realizado por (Seengenyoung *et al.* 2014) se realizó la comparación de un reactor por lotes secuencial y un CSTR en las mismas condiciones de operación (tipo de inóculo, temperatura, pH, tipo de alimento, carga orgánica (CO), encontrándose mejor estabilidad del sistema CSTR en cuanto a las productividad ($LH_2/L \cdot d$), remoción de DQO y producción de metabolitos microbianos.

Los sistemas por lotes han sido usados para determinar condiciones iniciales de operación, sin embargo, para que la producción de hidrógeno sea un proceso industrialmente viable se requiere que el proceso sea continuo.

3.4.5. Nutrientes

El nitrógeno y el fósforo son nutrientes esenciales para el desarrollo y la reproducción microbiana. Estos son utilizados por las bacterias para la síntesis de ácidos nucleicos y enzimas. El nitrógeno y el fósforo deben encontrarse en cantidades suficientes y disponibles, de otra forma serían limitantes para las bacterias productoras de hidrógeno.

El nitrógeno amoniacal es el más usado en la preparación de aguas residuales sintéticas y ha sido el más estudiado para determinar rangos óptimos de nitrógeno que maximicen la producción hidrógeno por fermentación oscura. Entre las fuentes de nitrógeno utilizadas están el cloruro de amonio (NH_4Cl) y el bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3).

Los rangos estudiados acerca de la concentración de nitrógeno amoniacal son muy variados, se han encontrado concentraciones óptimas de operación desde 0.01 g N/L (Bisaillon *et al.*, 2006) hasta 7.0 g N/L (Salerno *et al.*, 2006). Tales diferencias en la concentración óptima se deben al tipo de inóculo utilizado y al rango de nitrógeno al que el inóculo fue aclimatado.

Tabla 3.4. Rangos de C/N y C/P estudiados (Wang y Wan, 2008).

Inóculo	Sustrato	Configuración de reactor	C/N		C/P		Máximo rendimiento de H_2
			Rango estudiado	Óptimo	Rango estudiado	Óptimo	
Lodos activados residuales	Sacarosa	Por lotes	40-130	47	-	-	4.8 mol/mol sacarosa
Lodo anaerobio	Polvo de trigo	Por lotes	20-200	200	50-1000	1000	281 mL/g almidón
Lodo anaerobio	Efluente de molino de aceite de palma	Por lotes	45-95	74	450-650	559	6.33 L/L sustrato

Un factor a considerarse es la relación C/N y C/P, de tal manera que las cantidades de nitrógeno y fósforo se encuentren disponibles de acuerdo a las concentraciones de carbono. Al igual que las concentraciones óptimas de

nitrógeno, se han encontrado relaciones óptimas de C/N y C/P en diversos estudios (tabla 3.4).

3.4.6. Iones metálicos

Concentraciones traza de iones metálicos son necesarias para la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno, sin embargo, altas concentraciones podrían inhibirlas (Li y Fang, 2007). Entre los metales importantes para el crecimiento y desarrollo de las bacterias productoras de hidrógeno se encuentran Mg, Mn, Fe, Co, Mo, Ni, Zn y Ca. De estos, el Fe^{2+} ha sido el ion metálico más estudiado en la producción fermentativa de hidrógeno probablemente porque su presencia es esencial para la enzima hidrogenasa. Las concentraciones óptimas de Fe^{2+} reportadas para la producción hidrógeno varían en un amplio rango, probablemente debido a los diferentes tipos de inóculos y sustratos utilizados en los estudios. Yang y Shen (2006) reportan una concentración óptima de 55.3 mg Fe^{2+} /L utilizando lodo anaerobio como inóculo y almidón como sustrato, mientras que Zhang *et al* (2005) usando cereal triturado como inóculo y sacarosa como fuente de carbono reportan una concentración óptima de 589.5 mg Fe^{2+} /L.

3.4.7. Temperatura

Como en todo proceso microbiológico, la temperatura es uno de los factores que más influyen sobre la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno. Varios estudios reportan temperaturas óptimas de operación en rangos mesofílicos (35-40 °C), mientras que otros establecen condiciones óptimas en rangos termofílicos (50-60 °C) (Li & Fang, 2007). Resulta difícil realizar una comparación entre los estudios realizados debido a las diferencias en el tipo de reactor, el tipo de sustrato, tipo de inóculo utilizado, entre otras variaciones en las condiciones de operación.

El efecto de la temperatura podría originar cambios en la ruta metabólica de la producción de hidrógeno por fermentación oscura, que implica cambios en la

proporción de los subproductos. Valdez-Vazquez *et al* (2005) reportan que el butirato fue el subproducto predominante a 37 °C y el acetato a 55 °C. Por otro lado Yu *et al* (2002) indican que a los 20 °C el acetato fue el principal subproducto y que su producción disminuyó a 55° C e incrementó la producción de propionato y etanol, los cuales no son convenientes en el proceso fermentativo de producción de hidrógeno.

3.4.8. pH

El pH es uno de los parámetros clave en el proceso de producción de hidrógeno, ya que a bajos pH se inhibe la actividad de la hidrogenasa, y por lo tanto hay cambios en las rutas metabólicas (Dabrock *et al.*, 1992). El pH permite suprimir la actividad de las bacterias metanogénicas (Haandel y Lettinga, 1994). Fang y Liu (2002) investigaron el efecto del pH en la conversión de glucosa a hidrógeno por un cultivo mixto de bacterias fermentativas, evaluaron el intervalo de 4.0-7.0 con incrementos de 0.5, determinando un óptimo de 5.5. En la tabla 3.5 se muestran otros estudios que han evaluado el efecto de pH en la producción fermentativa de hidrógeno.

Tabla 3.5. Estudios realizados para la evaluación del pH en la producción fermentativa de hidrógeno (Wang and Wan, 2009).

Inóculo	Sustrato	Configuración del reactor	pH	
			Rango estudiado	Óptimo
Lodo anaerobio digerido	Papilla de arroz	Por lotes	4.0-7.0	4.5
Lodo anaerobio	Sacarosa	Por lotes	4.7-6.3	5.5
Lodo anaerobio	Sacarosa	Por lotes	4.5-7.5	5.5
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Sacarosa	Por lotes	4.5-7.5	6.0
Cultivo mixto	Sacarosa	Continuo	3.4-6.3	4.2
Lodo anaerobio	Glucosa	Continuo	4.0-7.0	4.2
Cultivo mixto	Sacarosa	Continuo	6.1-9.3	7.0

3.4.9. La carga orgánica

La carga orgánica (CO) introducida a un reactor depende de S_{in} y del TRH, por lo tanto una modificación en alguno de estos dos parámetros implica un cambio en la CO.

La carga orgánica es un parámetro que influye sobre la tasa de producción de hidrógeno en los sistemas CSTR, sin embargo en la literatura existe controversia en cuanto cuál es la CO en la que se obtiene la mayor producción de hidrógeno. Estudios reportan que se obtiene mejores resultados a cargas altas mientras que otros muestran lo contrario (Kraemer y Bagley, 2007).

Shen *et al.* (2009) plantean que existe una CO óptima en la cual se maximiza el rendimiento y que esta se encuentra próxima a la CO que causa sobrecarga del sistema con respecto al consumo de glucosa. Además indica que por debajo de la CO de sobrecarga, la productividad de hidrógeno se relaciona de forma lineal con respecto a la CO.

En el estudio realizado por Hafez *et al.* (2010) llevaron a cabo la evaluación de un fermentador productor de hidrógeno acoplado a un sedimentador, lo que permitía desacoplar el TRH del TRS. Llevaron a cabo la evaluación del reactor a diferentes CO manteniendo el TRH constante a 8 h y cambiando S_{in} . De acuerdo a sus resultados la CO a la que se obtuvo la mayor productividad (35.6 $\text{LH}_2/\text{L}\cdot\text{d}$) fue de 103 $\text{gDQO}/\text{L}\cdot\text{d}$, después de éste punto de operación al incrementarse la CO la productividad presentó una caída.

De acuerdo a la literatura, antes de llegar al punto de saturación, la productividad de hidrógeno se incrementa conforme se aumenta la CO, pero ocurre lo opuesto con la tasa de rendimiento de hidrógeno, la cual disminuye a altas CO.

Ren *et al.* (2006) reportan que en la operación de un fermentador a escala piloto la productividad de hidrógeno y biogás aumentó cuando elevó la CO de 3.11 a 68.21

kgCOD/m³·d, pero se presentó una disminución en la productividad a cargas orgánicas mayores, observando así un punto en el que el sistema alcanza una máxima productividad y después de éste el sistema se satura y la productividad disminuye.

Los estudios realizados plantean que existe una CO óptima para determinadas condiciones de operación y sin considerarse la dinámica de proceso. Las perturbaciones que lleguen a afectar al proceso pueden dar origen a una CO óptima diferente de la que se había determinado inicialmente.

3.5 Observadores de estados

Con el objetivo de optimizar las condiciones de operación y obtener productos de calidad en los bioprocesos, es importante su monitoreo y control. Debido a la complejidad de estos procesos se requiere la mayor información posible acerca de sus variables de estado (Hulhoven *et al.*, 2006). Las variables de estado o simplemente estados de un sistema dinámico son el conjunto mínimo de variables que determinan las condiciones pasadas, presentes y futuras del sistema (Kuo, 1996).

En los bioprocesos, para algunas variables de estado como oxígeno disuelto, pH y temperatura pueden ser fácilmente conocidos puesto que se dispone de sensores precisos y económicos, pero para otros estados claves como concentración de biomasa, productos y sustrato, que no son fácilmente accesibles para su determinación en línea se requiere de equipos y dispositivos más sofisticados y costosos, además de que su análisis requiere de tiempo y costo por mantenimiento y consumo de reactivos (Dochain *et al.*, 2009; Hulhoven *et al.*, 2006). Entonces se propone estimar estas variables de estado que no están disponibles. Este proceso de estimación se denomina observación y el dispositivo, “sensor software” o algoritmo de computadora que estima u observa las variables

de estado se llama un observador de estado, o simplemente observador (Ogata, 2010).

Los observadores son algoritmos computacionales que combinan un modelo matemático con algunas señales medibles en línea por algún dispositivo, y con esto proporcionan estimaciones continuas de las variables no disponibles (Hulhoven *et al.*, 2006; Mohd Ali *et al.*, 2015)

3.6 Optimización de la productividad de biohidrógeno

Como en cualquier otro proceso productivo, en los procesos biológicos de producción de hidrógeno se busca obtener las mayores cantidades del producto en el menor tiempo posible. Las primeras estrategias de optimización de la productividad de biohidrógeno que se desarrollan son la búsqueda de condiciones de operación en las que se maximice la productividad; por ejemplo, la configuración del reactor, el tipo de inóculo a utilizar, determinación los sustratos más apropiados, temperatura y pH de operación y determinación de factores que inhiben el proceso biológico.

Otro tipo de optimización fuera de línea se basa en determinar condiciones de operaciones óptimas utilizando métodos estadísticos, por ejemplo Cuetos *et al.* (2007) emplean una metodología de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas del proceso (TRH y porcentaje de sólidos totales) para la producción de hidrógeno en un procesos fermentativo. En otro estudio (Jo *et al.*, 2008), utilizaron un diseño de experimento y la metodología de superficie de respuesta para estimar las condiciones óptimas de S_{in} , temperatura y pH que optimizaran la producción de hidrógeno.

Por otro lado, se encuentran otros métodos de optimización mediante los cuales se busca determinar y actualizar en línea los valores óptimos de los parametros de operación para obtener una productividad máxima deseada. La optimización en

tiempo real es una estrategia de optimización de procesos que ha recuperado interés en los últimos años. La aproximación tradicional es la optimización repetitiva basada en un modelo que describe la relación entre las entradas y las salidas del proceso. Dicho modelo es adaptado usando las mediciones disponibles, de manera que la optimización numérica se lleve a cabo considerando el modelo actualizado. Dado un proceso que se requiere optimizar, se plantea un problema de optimización para calcular el valor óptimo de uno o un conjunto de parámetros (S_{in} , flujo de alimentación, TRH, etc.) que permitan alcanzar la función objetivo (minimizar la emisión de contaminante, minimizar tiempos de operación, maximizar eficiencia, maximizar productividad, etc.). Debido a que en los reactores biológicos las condiciones de operación varían con el tiempo, el problema de optimización debe ser resuelto a intervalos cortos de tiempo, de manera que los valores óptimos de los parámetros de operación se actualicen de acuerdo a los cambios que suceden en el proceso.

3.6.1. Estudios realizados utilizando estrategias de optimización en línea en la producción de hidrógeno por fermentación oscura

Los reportes en literatura de investigaciones sobre la implementación de estrategias de optimización en la producción de hidrógeno vía fermentación oscura es escasa. En la revisión bibliográfica fueron encontradas tres investigaciones, las cuales se describen a continuación.

En una investigación realizada por Aceves-Lara *et al.* (2010) la producción de hidrógeno fue incrementada en un 75% (de 4.72 a 8.27 mL H₂/L·min) utilizando una estrategia de lazo cerrado basada en un modelo de control predictivo (MCP). El experimento se llevó a cabo en un reactor CSTR con un volumen útil de 1.27 L, con condiciones de agitación de 100 rpm, temperatura de 37°C y pH de 5.5. El MCP es un tipo de algoritmo de control que a partir de un modelo predice las respuestas futuras del sistema (Morari y Lee, 1999). Este tipo de algoritmos trata de mantener la producción del sistema sobre una trayectoria ideal, alineando los parámetros de la producción con la intención de satisfacer las condiciones para las

que fue diseñado originariamente el sistema. Sin embargo, a lo largo del proceso pueden darse ciertos cambios que hagan que el resultado final no sea el adecuado. Para solucionarlo, estos algoritmos son capaces de predecir en el instante de tiempo t cómo se encontrará la planta en el instante de tiempo $t+1$ de seguir bajo las mismas condiciones. Cuando se ha detectado una desviación de los resultados, se realizan una serie de cambios sobre los parámetros y se vuelve a evaluar el resultado del proceso hasta que la predicción indique que la producción se mantendrá dentro de la trayectoria óptima (Nieves et al., 2011). En el caso de este estudio el parámetro sobre el que se realizaban los cambios fue el flujo de entrada al reactor. El MCP era alimentado con las variables de estado del sistema (concentración de biomasa, glucosa, acetato, propionato, butirato, dióxido de carbono e hidrógeno disueltos en la fase líquida), las cuales fueron estimadas mediante un observador asintótico a partir del análisis del flujo y la composición del biogás. El diseño de los observadores asintóticos se basa en el balance de masa y de energía de los procesos, con la ventaja de no requerir el modelo cinético (Dochain, 2003). En este estudio en particular, se destaca que el uso de observadores permitió utilizar sensores baratos y fiables (flujo de biogás y composición de biogás), lo cual resulta interesante desde el punto de vista industrial.

Ramírez-Morales *et al.* (2015) desarrollaron un experimento en el que una estrategia de optimización en tiempo real y en lazo cerrado que tomaba decisiones sobre el caudal de alimentación que maximizara la producción de hidrógeno. La estrategia se fundamentó en un ajuste polinomial de tercer orden sobre la relación encontrada entre las dinámicas de entrada y salidas del proceso y los hallazgos en bibliografía, que indican cargas orgánicas óptimas cercanas a un límite de sobrecarga del sistema donde se maximiza la productividad. El polinomio ajustado mostraba una relación entre la carga orgánica aplicada al sistema y la productividad de hidrógeno, alcanzando un punto máximo de productividad a cierta carga orgánica. En esta aplicación, el objetivo fue maximizar la productividad un reactor CSTR, por lo que se planteó un problema de optimización en el cual, el flujo de entrada fue considerada como la variable a optimizar. El flujo

de entrada óptimo debía ser tal que el TRH debía permanecer dentro de un intervalo definido, entre un valor mínimo y máximo predeterminados. Adicionalmente, la productividad máxima se debía mantener lo más estable posible alrededor de un valor promedio, por lo que una restricción adicional en la solución del problema fue que la desviación estándar de la productividad máxima promedio fuera menor a un valor máximo especificado. El problema de optimización se planteó como:

$$\max_{Q_{in}} Prod (CO(G_{in}, Q_{in}))$$

Sujeto a las siguientes restricciones:

$$TRH_{min} \leq TRH \leq TRH_{max}$$

$$\sigma (Prod) < \sigma_{max}$$

Donde *Prod* es la productividad del proceso (LH₂/L·d), *CO* es la carga orgánica (gDQO/L·d), *G_{in}* es la concentración de la glucosa a la entrada (g/L), *Q_{in}* es el flujo de entrada (mL/min), *TRH* es el tiempo de retención hidráulico (h) y σ es la desviación estándar de la productividad.

Para resolver el problema de optimización anterior e implementar su solución se propuso un algoritmo. La implementación del algoritmo se llevó a cabo en una computadora personal y como ambiente de desarrollo se utilizó Matlab.

El periodo de muestreo considerado para hacer las lecturas del flujo de biogás producido y la fracción de volumen de hidrógeno fue de 10 segundos, mientras que el periodo de optimización considerado fue de 10 minutos. El problema de optimización propuesto fue resuelto utilizando la función *fminbnd* de Matlab, la cual encontraba el valor óptimo del flujo de entrada *Q_{in}* que maximizara la producción de hidrógeno dentro de un intervalo fijo definido por [TRH_{min}, TRH_{max}]. Se logró

obtener una máxima productividad de 24.4 LH₂/L·d bajo restricciones de TRH no menor a 4 h y no mayor a 12 h.

4. HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

La aplicación de una estrategia de optimización en línea permitirá maximizar la productividad de hidrógeno de un fermentador continuo de tanque agitado.

4.2 Justificación

La producción de hidrógeno por medio de procesos biológicos se perfila como una de las mejores alternativas de obtención de hidrógeno. Entre estos bioprocesos, la fermentación oscura representa una de las más atractivas debido al uso de los contaminantes orgánicos presentes en las aguas residuales y residuos orgánicos como materia prima.

Uno de los principales retos de la producción de biohidrógeno por medio de la fermentación oscura es tener flujos de producción tales que permitan la factibilidad del proceso a gran escala. Para maximizar la eficiencia de un reactor productor de hidrogeno a partir de aguas residuales, es importante establecer condiciones de operación óptimas, esto se puede lograr implementando una estrategia de optimización en línea que permita maximizar y mantener constante la velocidad de producción de hidrógeno.

4.3 Objetivos

4.3.1. Objetivo general

Evaluar en el laboratorio una estrategia de optimización en línea que maximice la productividad de hidrógeno de un fermentador continuo de tanque agitado.

4.3.2. Objetivos específicos

- Calibrar el modelo de un observador de estados recolectando datos de un fermentador productor de hidrógeno operando bajo diferentes condiciones de carga orgánica.
- Validar experimentalmente el observador de estados mediante su implementación en laboratorio.
- Evaluar una estrategia de optimización en línea de la productividad de hidrógeno en un fermentador modificando la carga orgánica.

5. METODOLOGÍA

5.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental se basa en tres fases generales (Figura 5.1), mediante esta estrategia se dio cumplimiento a los objetivos planteados en el proyecto de investigación.

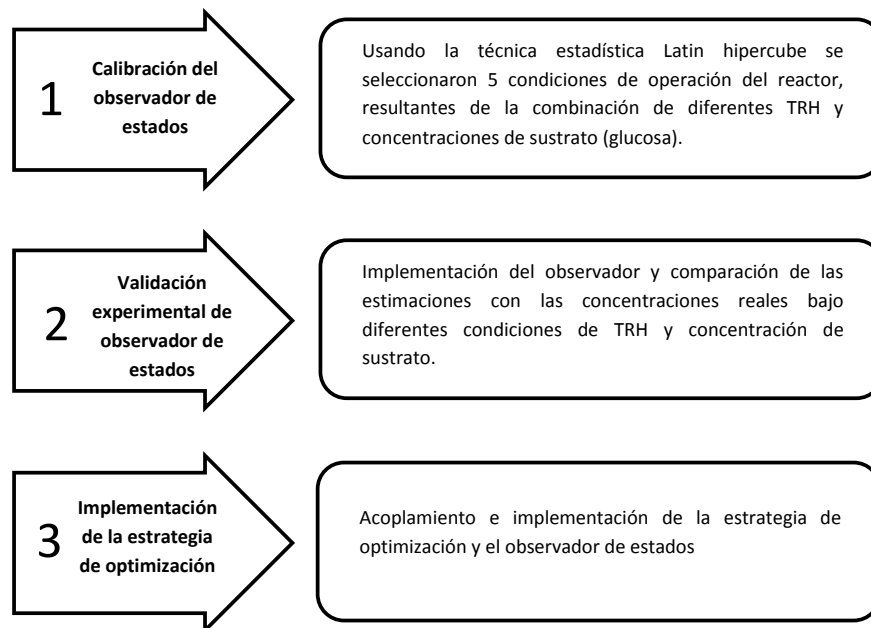


Figura 5.1. Estrategia experimental que se siguió para dar cumplimiento a los objetivos planteados.

5.2 Inóculo y composición del agua residual sintética

Como inóculo se utilizó lodo anaerobio granular de un reactor UASB que trata agua residual de una cervecera el cual fue sometido a un tratamiento térmico descrito por Buitrón y Carvajal (2010), éste tratamiento ayuda a eliminar las arqueas consumidores de hidrógeno mientras que las bacterias productoras resisten las altas temperaturas mediante la formación de esporas.

Como fuente de carbono en el agua residual sintética se utilizó glucosa. Por cada gramo de glucosa se agregaron 50 mg de K_2HPO_4 y 104 mg de NH_4Cl , manteniendo siempre una relación C:N:P de 400:6.8:2.8. Por cada litro de agua residual sintética se agregaron las siguientes sales minerales (adaptado de Mizuno *et al.*, 2000): 0.4 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 20 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 20 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 2 mg H_3BO_4 , 2 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ and 2 mg $ZnCl_2$. Se prepararon soluciones minerales concentradas de las cuales tomaba una cantidad para hacerse llegar a la concentración deseada. La solución de alimentación se preparó con agua del grifo y se mantuvo refrigerada a 4°C para minimizar su biodegradación.

5.3 Operación de fermentador

Se operó un reactor continuo de tanque agitado (CSTR, por sus siglas en inglés) con un volumen de reacción de 0.9 L equipado con un biocontrolador ez-Control (Applikon® Biotechnology, Schiedam, The Netherland). El biocontrolador permitió mantener las siguientes condiciones de operación: una temperatura de 35° C, una agitación de 100 rpm y a un pH de 5.5 mediante la adición de una solución de NaOH y HCl, además del nivel del agua en el fermentador (figura 5.2).

El reactor se arrancó en modalidad de lote secuencial con una concentración de 15 g/L de glucosa y 4g/L de SSV del inóculo resultante del tratamiento térmico del lodo. Se realizaron 5 ciclos de 12 h con un volumen de intercambio del 50% y un tiempo de sedimentación de 30 min, y posteriormente se realizó el cambio a sistema continuo. El caudal de alimentación se suministró por medio de una bomba peristáltica (Masterflex, Barnant, Illinois, USA; ver calibración en Anexo 2).

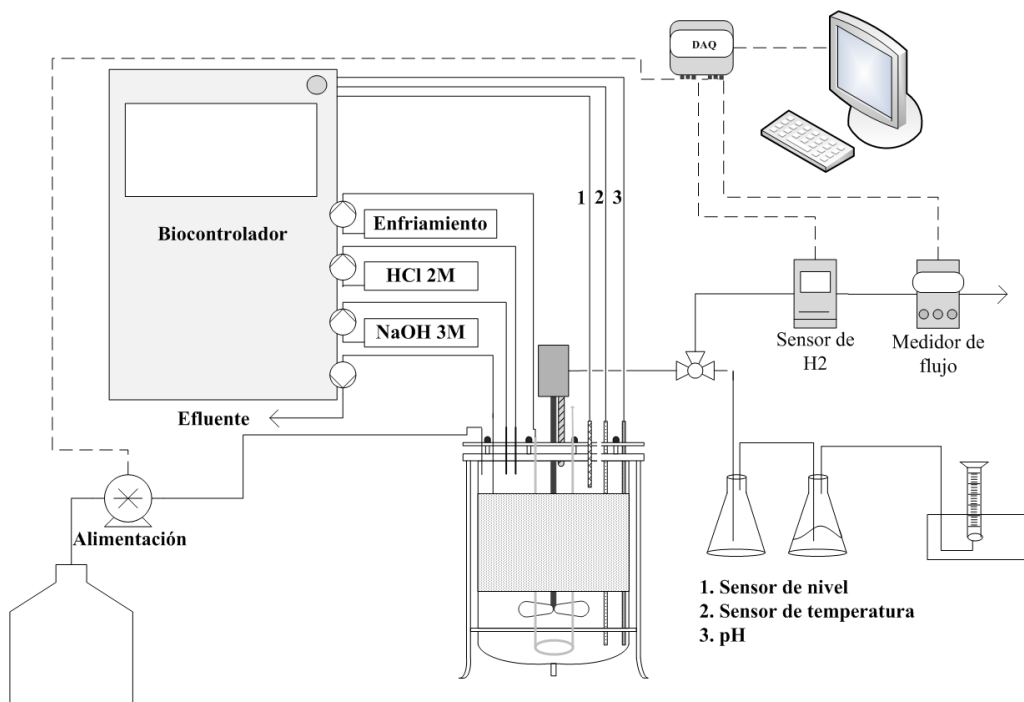


Figura 5.2. Montaje del reactor.

5.4 Técnicas analíticas

5.4.1. Medición de glucosa

La determinación de la concentración de glucosa en el influente y el efluente se realizó mediante el método Dubois *et al.* (1956). En tubos de ensayo de 10 mL se adicionaron 0.5 mL de la muestra previamente pasada a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatman®, 55 mm de diámetro de filtro y 1.6 µm de diámetro de poro), 0.5 mL de fenol al 5% y posteriormente 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se agitaron los tubos, se dejaron enfriar por 10 min y se determinó la concentración en espectrofotómetro Hach®.

El método Dubois se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y a altas temperaturas. Bajo estas condiciones, ocurren una serie de reacciones comenzando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos.

5.4.2. Sólidos suspendidos volátiles

La determinación de los SSV se realizó mediante la técnica descrita por los métodos estándar (APHA *et al.*, 2012).

5.4.3. Composición de biogás

La composición de biogás se determinó por cromatografía de gases, cromatógrafo SRI-8610C equipado con un detector de conductividad térmica y dos columnas empacadas de acero inoxidable (6' X 1/8" sílice gel y 6' X 1/8" corte molecular 13X). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 90 °C y 150 °C, respectivamente. Como gas acarreador se utilizó nitrógeno a un flujo de 20 mL/min.

5.4.4. Ácidos grasos volátiles y etanol

Las muestras eran filtradas con filtros de membrana de nitrato de celulosa (0.45 μm), se acidificaban con ácido clorhídrico 2 N y se almacenaban a 4 °C para su posterior análisis. La determinación de la concentración de los ácidos grasos volátiles (ácido acético, butírico, isobutírico, propiónico, isoválérico) y etanol se realizó mediante un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización por flama y una columna capilar de sílice Zebron ZB-FFPA de 0.53 mm de diámetro interno y 15 m de largo. Las temperaturas de operación del inyector y del detector fueron 190 °C y 210 °C, respectivamente. Como gas acarreador se usó nitrógeno a un flujo de 9.5 mL/min.

Se inyectaban 2 μL de muestra al cromatógrafo. Las áreas arrojadas se comparaban con las curvas de calibración y a partir de esto se calculaban las concentraciones de AGV y el etanol.

5.4.5. Medición y adquisición de datos en línea

Para la medición de flujo de biogás se utilizó un medidor de flujo (ADM 2000, Agilent Technologies, Inc.) conectado al puerto serial COM1 de la computadora.

La determinación del porcentaje de hidrógeno en línea se realizó mediante un analizador HY-OPTIMA (modelo 700 H2scan; ver calibración en Anexo 1), el cual estaba conectado a la computadora por medio de una tarjeta de adquisición de datos (DAQ NI-USB-6008 National Instruments).

5.5 Modelo del reactor productor de hidrógeno

El reactor productor de hidrógeno degrada glucosa y los productos principales son acetato, butirato, propionato, etanol, biomasa y biogás constituido por hidrógeno y dióxido de carbono. Mediante el desarrollo de un balance de masas, el reactor productor de hidrógeno queda modelado por el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias (Aceves-Lara *et al.*, 2010; Torres Zúñiga *et al.*, 2015)

$$\frac{d}{dx} \begin{bmatrix} Glu \\ Ace \\ Pro \\ Bu \\ EtOH \\ X \\ CO_2 \\ H_2 \end{bmatrix} = Kr - D \begin{bmatrix} Glu - Glu_{in} \\ Ace \\ Pro \\ Bu \\ EtOH \\ X \\ CO_2 \\ H_2 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ qCO_{2,gas} \\ qH_{2,gas} \end{bmatrix} \quad (Ec 6)$$

Donde $Glu, Ace, Pro, Bu, EtOH, X, CO_2$ y H_2 representan las concentraciones en g/L de glucosa, acetato, propionato, butirato, etanol, biomasa, dióxido de carbono e hidrógeno, respectivamente, en la fase líquida. El vector $r \in \mathbb{R}^2$ describe las cinéticas de las reacciones biológicas involucradas (en g/L-d), D es la tasa de dilución (d^{-1}) y $qCO_{2,gas}$ y $qH_{2,gas}$ representan las velocidades de flujo de bióxido de carbono e hidrógeno expresados en g/L-d, respectivamente. Finalmente, $K \in \mathbb{R}^{8 \times 4}$ representa la matriz de los coeficientes pseudo-estequiométricos.

Las rutas metabólicas son descritas por un conjunto de reacciones que ocurren en paralelo. De esta manera, el vector r se compone de la velocidad específica de absorción de la glucosa multiplicada por la concentración de biomasa dentro del reactor. Cada elemento r_l sigue una habitual cinética de Monod:

$$r_l = \frac{\mu_{maxl} Glu}{K_{Glu,l} + Glu} X; \quad l = 1, 2.$$

Además, las ecuaciones diferenciales para la fase gaseosa con la constante con el volumen de gas constante son:

$$\frac{dCO_{2,gas}}{dt} = - \frac{CO_{2,gas} Q_{gas}}{V_{gas}} + \rho CO_2 \frac{V}{V_{gas}}, \quad (Ec 7)$$

$$\frac{dH_{2,gas}}{dt} = - \frac{H_{2,gas} Q_{gas}}{V_{gas}} + \rho H_2 \frac{V}{V_{gas}}, \quad (Ec 8)$$

con

$$Q_{gas} = q_{H_2,gas} + q_{CO_2,gas} = \frac{RT_{amb}}{P_{atm} - p_{vap,H_2O}} V \left(\frac{\rho_{H_2}}{MH_2} + \rho_{CO_2} \right), \quad (Ec 9)$$

$$\rho_{H_2} = K_L \alpha_{H_2} \left(H_2 - M_{H_2} K_{H,H_2} \rho_{H_2,gas} \right), \quad (Ec 10)$$

$$\rho_{H_2,gas} = \frac{H_{2,gas} RT_{reac}}{M_{H_2}}, \quad (Ec 11)$$

$$\rho_{CO_2} = K_L \alpha_{CO_2} \left(CO_2 - M_{CO_2} K_{H,CO_2} \rho_{CO_2,gas} \right), \quad (Ec 12)$$

$$\rho_{CO_2,gas} = CO_{2,gas} RT_{reac}, \quad (Ec 13)$$

donde $CO_{2,gas}$ y H_2 son, respectivamente, la concentración de dióxido de carbono, en mol/L, y la concentración de hidrógeno, en g/L, en la fase líquida. Las constantes del modelo se muestran en la tabla 5.1.

Como se muestra en la ecuación (9), el flujo de biogás total en la salida del reactor es la suma de los flujos de hidrógeno y dióxido de carbono. Dichos flujos son calculados considerando la transferencia de masa de la fase líquida a la fase gaseosa. Las concentraciones de dióxido de carbono e hidrógeno en la interfase líquida-gas en equilibrio son calculadas considerando la Ley de Henry. Las presiones parciales de los dos gases pueden ser calculadas usando la ley general de los gases ideales.

Tabla 5.1. Constantes utilizadas en el modelo.

Parámetro	Descripción	Valor
V	Volumen de reacción de la fase líquida (L)	0.9
V_{gas}	Volumen de la fase gaseosa (L)	0.35
T_{amb}	Temperatura ambiental (°K)	298
P_{atm}	Presión atmosférica (bar)	1.013
P_{vap,H_2O}	Presión de vapor de agua (bar)	0.0557
M_{H_2}	Masa molar de hidrógeno (g/mol)	2.01588
$k_L a_{H_2}$	Coefficiente global de transferencia de masa del hidrógeno (d^{-1})	3065
$k_L a_{CO_2}$	Coefficiente global de transferencia de masa del dióxido de carbono (d^{-1})	2000
K_{H,H_2}	Coefficiente de la Ley de Henry para el hidrógeno ($Mbar^{-1}$)	7.38×10^{-4}
K_{H,CO_2}	Coefficiente de la Ley de Henry para el dióxido de carbono ($Mbar^{-1}$)	0.0271
R	Constante de los gases ideales ($bar/°KM$)	8.314×10^{-2}
T_{reac}	Temperatura del reactor (°K)	308

5.6 Observador para la estimación de la concentración de sustrato en la alimentación del reactor

El observador considerado en este trabajo es el propuesto por (Torres Zúñiga et al., 2015), el cual consiste en un observador Luenberger acoplado a un observador Super-twisting (figura 5.3).

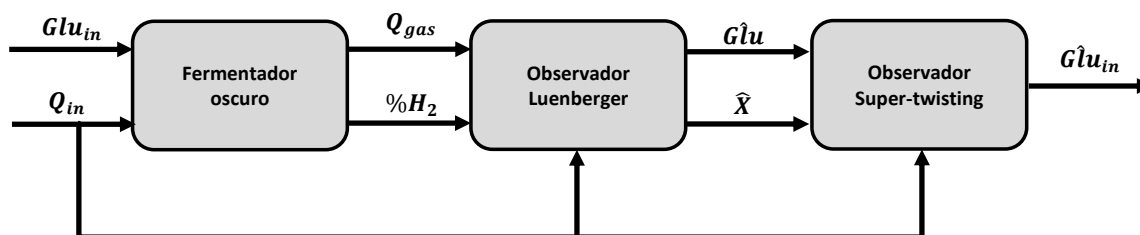


Figura 5.3. Diagrama de bloques del observador acoplado para estimar la concentración S_{in} .

Primero, considerando el vector de estados $x \in \mathbb{R}^4$ definida como

$$x = \begin{bmatrix} Glu \\ X \\ H_2 \\ H_{2,gas} \end{bmatrix} .$$

Definamos además $u = Q_{in}$ como la entrada controlada y $w = Glu_{in}$ como disturbio. Por lo tanto, un sistema no lineal reducido se puede expresar como

$$\frac{dx}{dt} = f(x, u, w) \quad (\text{Ec 14})$$

Mediante la linealización del modelo anterior alrededor de un punto de operación (x^*, u^*, w^*) , se obtiene el siguiente modelo lineal reducido:

$$\frac{d\bar{x}(t)}{dt} = A\bar{x}(t) + B_U\bar{u}(t) + B_W\bar{w}(t) \quad (\text{Ec 15})$$

Dónde:

- $A \in \mathbb{R}^{4 \times 4}$ es la matriz Jacobiana $\left. \frac{\partial f}{\partial x} \right|_{(x^*, u^*, w^*)}$,
- $B_U \in \mathbb{R}^4$ es la matriz Jacobiana $\left. \frac{\partial f}{\partial u} \right|_{(x^*, u^*, w^*)}$,
- $B_W \in \mathbb{R}^4$ es la matriz Jacobiana $\left. \frac{\partial f}{\partial w} \right|_{(x^*, u^*, w^*)}$,
- $\bar{x}(t) = x(t) - x^*$
- $\bar{u}(t) = u(t) - u^*$
- $\bar{w}(t) = w(t) - w^*$

Un observador Luenberger de la forma

$$\frac{d\hat{x}}{dt} = A\hat{x}(t) + B_u\bar{u}(t) + L(\bar{y}(t) - \hat{y}(t)) \quad (\text{Ec 16})$$

es usado para estimar la concentración de glucosa y las biomasa dentro del reactor, mediante la minimización del efecto del disturbio w en el error de la estimación. El observador Luenberger consiste en una copia del modelo linealizado alrededor de un punto de operación (x^*, u^*, w^*) más un término de corrección.

La salida medida del proceso de producción de hidrógeno es la velocidad de flujo de biogás en la salida del reactor. Dicha medición de la salida está definida como:

$$y(t) = C_x(t) = \frac{RT_{amb}}{P_{atm} - \rho_{vap,H_2O}} v \left(\frac{\rho_{H_2}}{M_{H_2}} \right). \quad (\text{Ec 17})$$

Considerando las ecuaciones (10) y (11), la matriz C toma la siguiente forma:

$$C = [0 \quad 0 \quad C_{H_2} \quad C_{H_2,gas}]$$

con:

$$C_{H_2} = \frac{RT_{amb} V k_L a_{H_2}}{(P_{atm} - \rho_{vap,H_2O}) M_{H_2}}$$

y

$$C_{H_2,gas} = \frac{R^2 T_{amb} V k_L a_{H_2} K_{H,H_2} T_{reac}}{(P_{atm} - \rho_{vap,H_2O}) M_{H_2}}$$

La medición de la salida está definida en términos de \bar{x} como sigue:

$$\bar{y}(t) = y(t) - Cx^* = C\bar{x}(t). \quad (\text{Ec 18})$$

Por otro lado, las dinámicas del modelo de la glucosa definidas como:

$$\begin{aligned} \frac{dGlu}{dt} &= -k_{11}r_1 - k_{12}r_2 - (Glu - Glu_{in})D \\ &= Glu_{in}D + h(Glu, X) \end{aligned}$$

donde $h(Glu, X) = k_{11}r_1 + k_{12}r_2 - DGlu$ y k_{1j} (para $j = 1, 2$) son los correspondientes elementos de las matriz K .

$DGlu_{in}$ es desconocida, pero asumiendo que la derivada $d(Glu_{in}D)/dt$ existe en todo momento y es uniformemente acotada por una constante, su dinámica se puede modelar de la siguiente manera:

$$\frac{d(Glu_{in}D)}{dt} = \delta_2(t),$$

De esta manera, las dinámicas de Glu y $DGlu_{in}$ se modelan por el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias:

$$\frac{d}{dt}Glu = Glu_{in}D + h + \delta_1(t), \quad |\delta_1| \leq c_1, c_1 > 0 \quad (\text{Ec 19})$$

$$\frac{d}{dt}(Glu_{in}D) = \delta_2(t), \quad |\delta_2| \leq c_2, c_2 > 0$$

donde $\delta_2(t)$ captura las incertidumbre acerca de $DGlu_{in}$ mientras que $\delta_1(t)$ captura las incertidumbre acerca de r, Glu y X .

Un observador super-twisting de la forma

$$\frac{d}{dt} G\hat{lu} = (G\hat{lu}_{in}D) + h(Glu, X) + \gamma_1\phi_1(\epsilon_1), \quad (\text{Ec 20})$$

$$\frac{d}{dt}(G\hat{lu}_{in}D) = \gamma_2\phi_2(\epsilon_1),$$

es usado para estimar Glu_{in} . El observador super-twisting consiste en una copia del modelo no lineal original más un término de corrección. El error de estimación es definida como $\epsilon_1 = Glu - \widehat{Glu}$ y las funciones de corrección ϕ_1 y ϕ_2 están definidas como:

$$\phi_1(\epsilon_1) = |\epsilon_1|^{\frac{1}{2}} \text{sign}(\epsilon_1)$$

$$\phi_2(\epsilon_1) = \frac{1}{2} \text{sign}(\epsilon_1)$$

Hay que señalar que los estados Glu y X usados por el observador super-twisting para calcular la función $h(Glu, X)$ y la estimación del error ϵ_1 son, respectivamente, los estados estimados \hat{x}_1 y \hat{x}_2 por el observador Luenberger.

5.7 Calibración del observador de estados

5.7.1. Diseño experimental

Con el objetivo de identificar los parámetros del modelo del fermentador productor de hidrógeno, este fue operado en cinco condiciones nominales resultante de la combinación de diferentes TRH y S_{in} (tabla 5.2). Las cinco condiciones de operación fueron seleccionadas de acuerdo a un diseño experimental basado en

el método de hipercubo latino (Saltelli *et al.*, 2008). La operación del reactor en las diferentes condiciones se llevó a cabo en el orden como se indica en la tabla 5.2. Los análisis fueron realizados en condiciones de estado estacionario. Con el objetivo de evitar el efecto de una condición sobre la condición posterior se estableció una condición estándar a la cual se regresaba la operación del reactor previo a la siguiente condición. La condición estándar fue $Glu_{in} = 15$ g/L y un TRH = 8 h.

Los datos que se utilizaron para la calibración del observador fueron las mediciones de Glu_{in} y Glu , Q_{in} , flujo de biogás, biomasa en forma de SSV y %H₂ y %CO₂ en biogás. Se realizó el balance de DQO lo cual permitió verificar las mediciones.

Tabla 5.2. Condiciones nominales de operación para calibración de modelo

Glu_{in} (g/L)	TRH (h)	CO (gDQO/L·d)
15	8	48.0
10	10	25.6
20	8	64.0
15	10	38.4
25	6	106.7

5.8 Validación experimental del observador de estados

Para la validación experimental del observador de estados se operó el reactor a diferentes condiciones de S_{in} y TRH. Como parámetro para evaluar el observador se determinó error relativo entre el valor real determinado por la técnica analítica y el valor de la estimación. El error relativo fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Error relativo de estimación de } Glu_{in} = \frac{|Glu_{in t_n} - \overline{G\hat{u}}_{in}|}{Glu_{in T_n}} * 100$$

con

$$\overline{G\hat{u}}_{in} = \hat{G\hat{u}}_{in t_n} + \hat{G\hat{u}}_{in t_{n-1}} + \hat{G\hat{u}}_{in t_{n+1}}$$

donde Glu_{in} es la concentración real de glucosa a la entrada del reactor, $G\hat{u}_{in}$ es la concentración estimada y t es el tiempo al que realiza la determinación de la concentración real por medio de la técnica analítica (t igualmente aplica para el concentración de biomasa y glucosa dentro del reactor).

$$\text{Error relativo de estimación de biomasa} = \frac{|X_t - \hat{X}|}{X} * 100$$

Donde X es la concentración real de biomasa (en forma de SSV), \hat{X} es la concentración estimada.

$$\text{Error relativo de estimación de } Glu = \frac{|Glu - G\hat{u}|}{Glu} * 100$$

Donde Glu es la concentración de glucosa dentro del reactor y $G\hat{u}$ es la concentración estimada.

5.9 Estrategia de optimización para modificar la carga orgánica

La estrategia de optimización está basada en la propuesta por Ramírez-Morales *et al.* (2015) modificada, la cual está fundamentada en la relación entre la CO y la productividad del fermentador y en la que Q_{in} es la variable a optimizar. El problema de optimización propuesto es:

$$\max_{Q_{in}} Prod(CO(S_{in}, Q_{in})) \quad (Ec 21)$$

sujeto a la siguiente restricción:

$$TRH_{min} \leq TRH \leq TRH_{max} \quad (Ec 22)$$

donde TRH_{min} y TRH_{max} comprenden el intervalo de trabajo de TRH. El TRH_{min} y el TRH_{max} que se manejaron en este trabajo fueron 5 h y 12 h, respectivamente.

Para resolver el problema de optimización fue utilizado el siguiente algoritmo:

1. Fijar el TRH_{min} y TRH_{max} y calcular $Q_{in,min}(TRH_{max})$ y $Q_{in,max}(TRH_{min})$.
2. Utilizar los datos experimentales (CO y productividad) para aproximar la función $Prod(CO)$. Esta función fue la función objetivo a maximizar.
3. Leer el flujo total de biogás, Q_{gas} (L/d) y la fracción de hidrogeno ($\%H_2$) de la tarjeta DAQ y calcular la productividad, $Prod$, actual de la siguiente manera:

$$Prod = \frac{Q_{gas} \%H_2}{V_r} \quad (Ec 23)$$

donde V_r (L) representa el volume de trabajo del reactor.

4. Si han transcurrido 10 minutos calcular el promedio de Q_{gas} , $\%H_2$ y $Prod$ y estimar $G\hat{l}u_{in}$.
5. Si no, esperar 10 segundos (periodo de muestreo) y regresar al paso 3.

6. Calcular $Prod$ y CO basado en las lecturas de Q_{in} y $G\hat{u}_{in}$ de la siguiente manera:

$$TRH = \frac{V_r}{Q_{in}} \quad (\text{Ec 24})$$

$$CO = \frac{Q_{in}G\hat{u}_{in} * 1.67}{V_r} \quad (\text{Ec 25})$$

7. Si ha transcurrido un tiempo igual a 2 TRH (tiempo dado para permitir que el observador converja), resolver el problema de optimización (Ec 21) sujeto a la condición establecida (Ec 22).
8. Si no, pasar al paso 3.
9. Transmitir a la bomba el Q_{in} óptimo calculado y regresar al paso 3.

6. RESULTADOS

6.1 Comportamiento del fermentador en las diferentes condiciones de operación

6.1.1. Productividad del reactor

De acuerdo al diseño experimental se plantearon cinco condiciones de operación, sin embargo en la condición de $CO=106.7$ gDQO/L·d ($Glu_{in} = 25$ gr/L, $TRH=6$ h) se presentó una disminución en el consumo de glucosa del 97 al 81%, lo que significó una sobrecarga en el sistema. Entonces se optó por realizar la operación del reactor en una condición extra, la cual se determinó disminuyendo Glu_{in} la cual representaría el 80% de la condición en la que se presentó la sobrecarga. Los

parámetros de operación de la condición adicionada fueron, $TRH = 6$ h y $Glu_{in} = 20$ g/L ($CO = 84.1$ gDQO/L-d). Las condiciones mostradas en la tabla 6.1 son condiciones nominales, las condiciones con los valores reales, incluyendo la condición extra, se presentan en la tabla 6.1.

La productividad aumentó de manera lineal con respecto a la CO hasta el punto de operación de 84.1 gDQO/L-d (figura 6.1), en la que se obtuvo una productividad de 23.0 ± 0.66 LH₂/L-d con un 97.9 de consumo de glucosa. A esta condición de CO y productividad, el rendimiento en LH₂/g DQO agregado fue de 0.27 en LH₂/g DQO. Dicho rendimiento representa el 58% del teórico (0.47 LH₂/g DQO) de acuerdo a la estequiometría si toda la reacción se dirige únicamente a la producción de ácido acético (Ec 1). Ambos resultados tanto de productividad como rendimiento son similares a los ya reportados por Ramírez-Morales *et al.* (2015), que trabajó en condiciones similares a los de este trabajo.

A una CO de 97.9 gDQO/L-d se presentó una caída en la productividad a 21.3 ± 0.7 LH₂/L-d con un 81.5% de consumo de glucosa. Los resultados concuerdan con otros estudios (Hafez *et al.*, 2010; Ramírez-Morales *et al.*, 2015), donde se reporta una CO donde se alcanza una máxima productividad y a CO mayores se presenta una caída tanto en la productividad como en el consumo de glucosa. Se determinó no operar el reactor COs mayores debido a que se ha reportado que resulta irreversible la recuperación del sistema después de ser sometido a sobrecargas de CO (Mariakakis *et al.*, 2011).

$$Productividad = a_3 OLR^3 + a_2 OLR^2 \quad (Ec 26)$$

La relación entre la CO y la productividad se ajustó a un polinomio de 3er orden (26) (Ramírez-Morales *et al.*, 2015), donde la CO es la variable independiente y la productividad es la variable dependiente. Este polinomio fue considerado como la función objetivo a resolver en el proceso de optimización. Para el ajuste polinomial

se consideraron únicamente los coeficientes de tercero y segundo orden, puesto que de este manera se minimiza el intervalo de confianza de los parámetros del polinomio, además se comprobó que los términos de orden uno y cero no contribuyen significativamente al momento de calcular la productividad máxima (Tabla 6.2) (Ramírez-Morales et al., 2015).

Al igual que se obtuvo la mayor productividad de hidrógeno en la condición de 84.1 gDQO/L-d, también se alcanzó el mayor porcentaje de remoción de de DQO en forma de hidrógeno (20%) (figura 6.2).

Tabla 6.1. Valores promedios de las condiciones de operación.

Glu_{in} (g/L)	TRH (h)	Carga orgánica (gDQO/L-d)
14.0	8.1	44.3
10.3	10.0	26.4
20.4	8.0	65.9
14.4	10.4	39.6
23.3	6.1	84.1
18.9	5.8	97.9

El rendimiento de hidrógeno, Y_{H_2} , no fue afectado significativamente con respecto a los cambios en la CO (figura 6.3). El valor promedio de promedio de Y_{H_2} de todas las condiciones de CO fue de 2.13 ± 0.26 molH₂/mol glucosa. En la CO de mayor productividad, 84.1 gDQO/L-d se obtuvo un rendimiento más estable (2.4 ± 0.13).

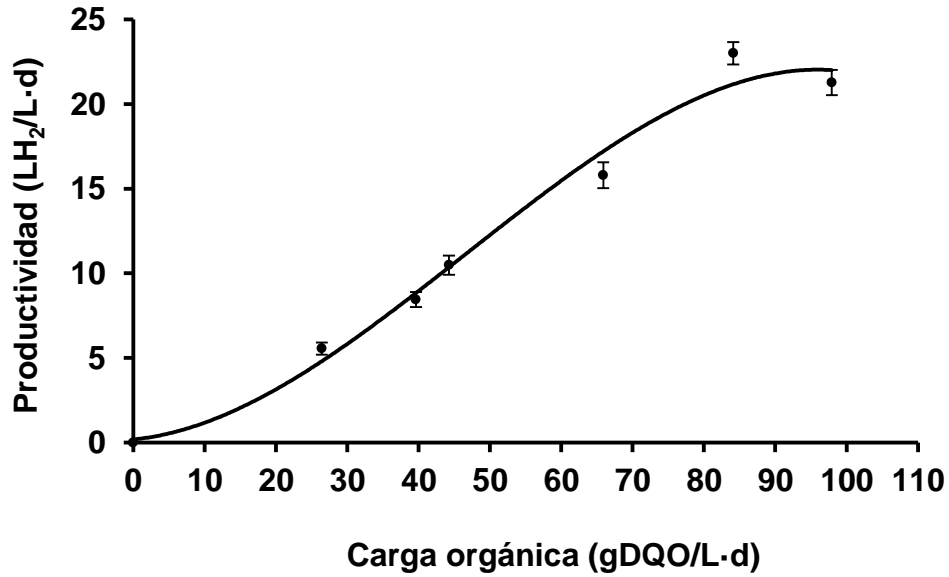


Figura 6.1. Relación entre la carga orgánica y la productividad del fermentador.

Tabla 6.2. Parámetros del polinomio de 3er orden que ajusta los valores de CO y productividad.

Parámetro	Valor	Intervalos de confianza (95%)	Variación (%)
a_2	-5.3253×10^{-5}	$[-5.83 \times 10^{-5}, -4.81 \times 10^{-5}]$	9.65
a_3	7.4784×10^{-3}	$[7.02 \times 10^{-3}, 7.93 \times 10^{-3}]$	6.11

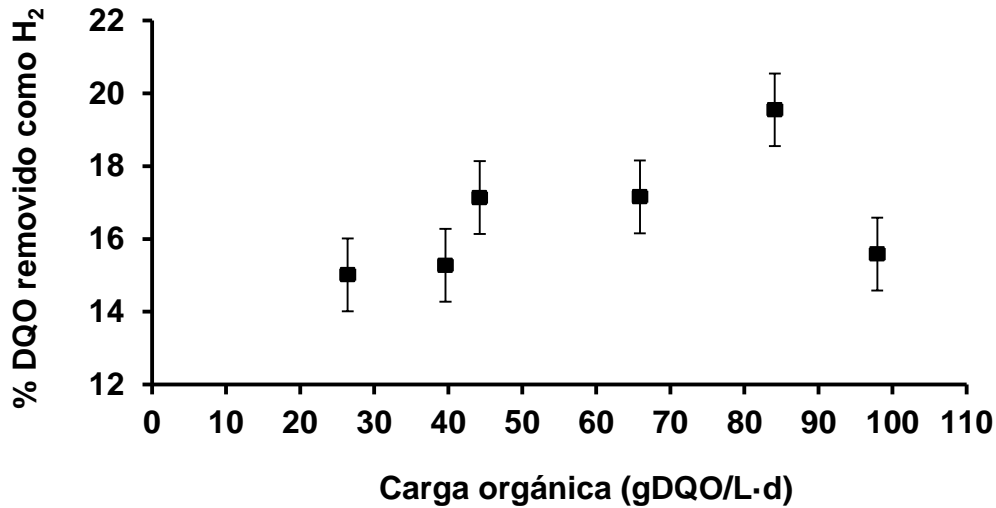


Figura 6.2. Porcentaje de DQO removida en forma de hidrógeno.

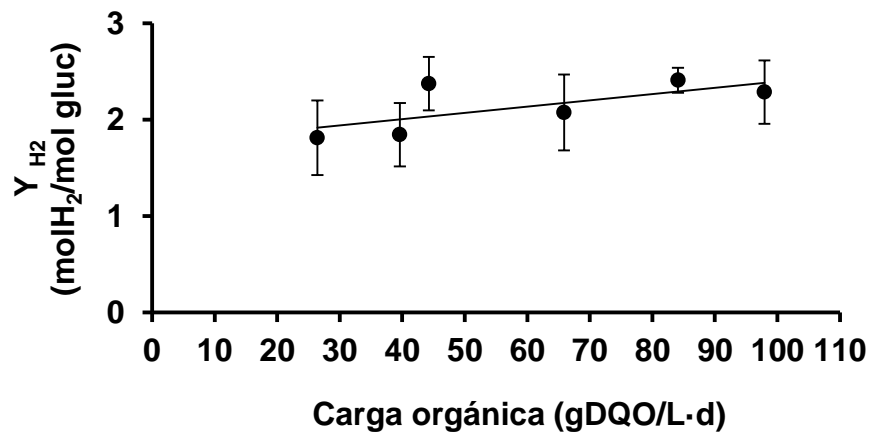


Figura 6.3. Rendimientos de producción de hidrógeno.

6.2 Productos microbianos solubles (PMS)

El ácido butírico fue el metabolito que se produjo en mayor concentración en todas las condiciones, seguido del ácido acético (figura 6.4), los cuales son los subproductos más deseados en la producción de hidrógeno. Con respecto a la producción total de productos microbianos solubles (AGV y etanol), el ácido butírico se presentó en proporciones de 56 a 64% (m/m) y el ácido acético de 23 a 33%. Se produjeron en menores concentraciones el etanol y el ácido propiónico,

los cuales son desfavorables en el proceso fermentativo de producción de hidrógeno, puesto que parte de la glucosa pasa directamente a etanol mediante la fermentación alcohólica y para la producción de ácido propiónico se consume tanto glucosa como hidrógeno. El etanol se presentó en proporciones del 4 al 12.9%, obteniéndose la mayor en la condición de CO 97.9 gDQO/L·d, esto debido a que la sobrecarga del reactor presenta un cambio en los metabolitos microbianos, incrementándose la producción de etanol (Hafez *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2006). El ácido propiónico se presentó en porcentajes del 2 al 7%.

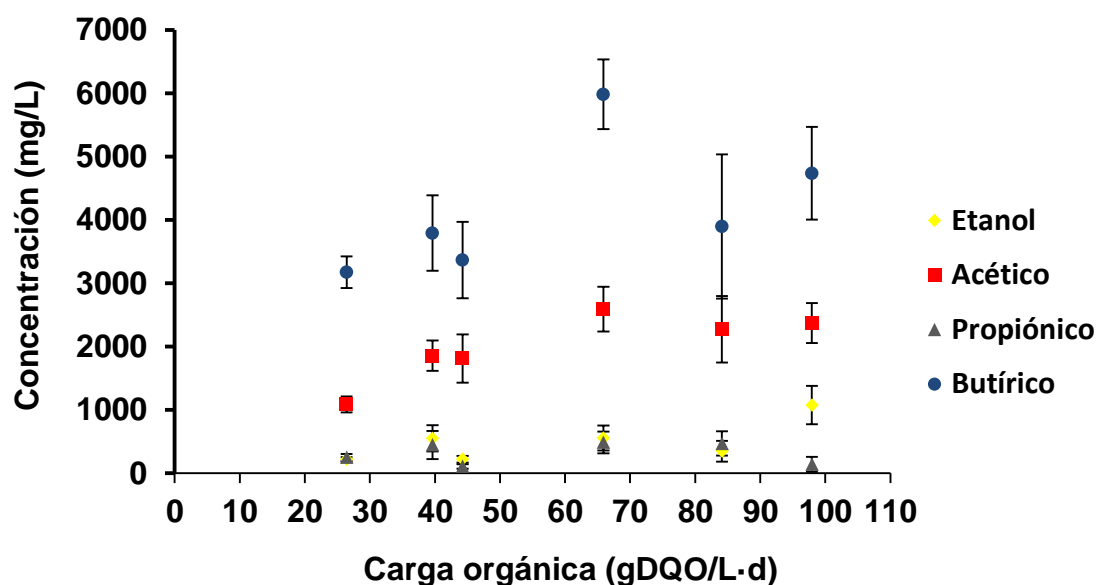


Figura 6.4. Productos microbianos solubles producidos a diferentes cargas orgánicas.

6.3 Sólidos suspendidos volátiles

La concentración de SSV osciló de 1.2 a 2.1 g/L (figura 6.5), obteniéndose la mayor concentración en una CO de 39.6 gDQO/L·d ($S_{in} = 10$ g/L y TRH = 10 horas). Los resultados no muestran una relación entre la concentración de SSV y la CO. Por otro lado, se presentó una relación entre la CO y el rendimiento de biomasa por sustrato consumido (Y) (figura 6.6). Los datos muestran una relación inversa entre la CO y Y hasta la CO donde se obtuvo la mayor productividad;

teniendo un incremento en Y en la condición de CO más alta. En la condición donde se obtuvo la mayor productividad de hidrógeno (CO = 84.1 gDQO/L-d) el rendimiento de la biomasa fue el menor (0.9 gSSV/gGluc), lo que indica una mayor presencia de microorganismos productores de hidrógeno que de otro tipo (Hafez *et al.*, 2010; Ramírez-Morales *et al.*, 2015).

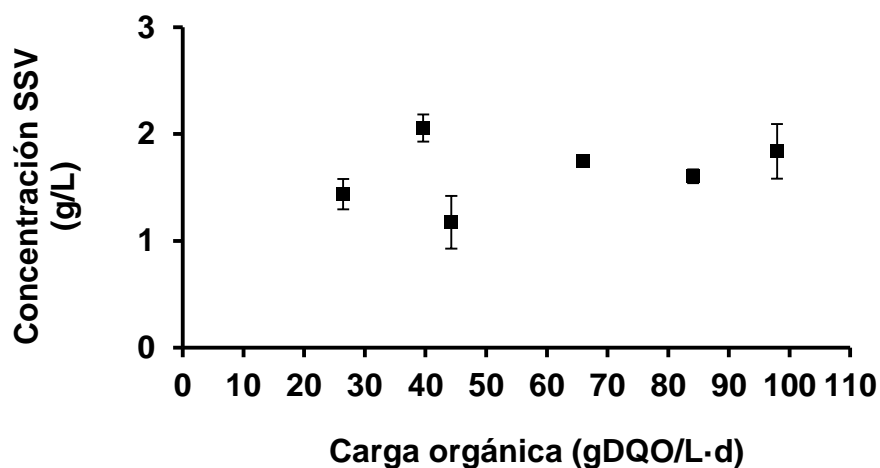


Figura 6.5. Concentración de SSV en diferentes cargas orgánicas.

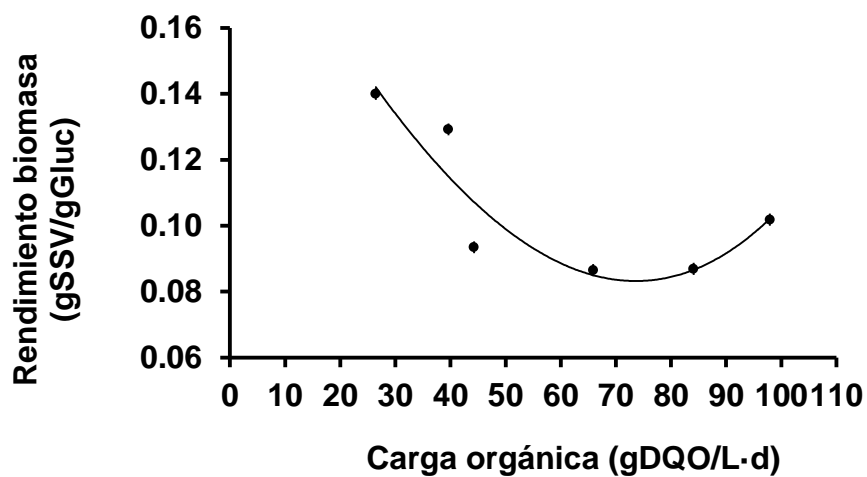


Figura 6.6. Perfil de rendimiento de biomasa en las diferentes cargas orgánicas de operación.

6.4 Composición de biogás

El porcentaje de hidrógeno en el biogás permaneció constante en todas las condiciones, oscilando en valores del 61 al 64% (figura 6.7). Incluso en la condición donde se presentó un consumo de sustrato de 81.5%, el hidrógeno se presentó en las mismas proporciones. Estos resultados difieren de los encontrados por Hafez *et al.* 2010), donde se encontró que a medida que se aumenta la CO y cuando el reactor se sobrecarga con respecto al consumo de sustrato hay una disminución en el porcentaje de hidrógeno en el biogas. La diferencia en los resultados posiblemente se deba a que en el caso del estudio que aquí se presenta el sistema no fue sobrecargado más allá del consumo de 81.5% de sustrato, mientras que en Hafez *et al.* (2010) el reactor se sobrecargó hasta consumos de 40.5%. El metano no fue detectado en todo el periodo experimental, lo que indica la eficiencia del tratamiento térmico utilizado para la eliminación de las Arqueas productoras de metano.

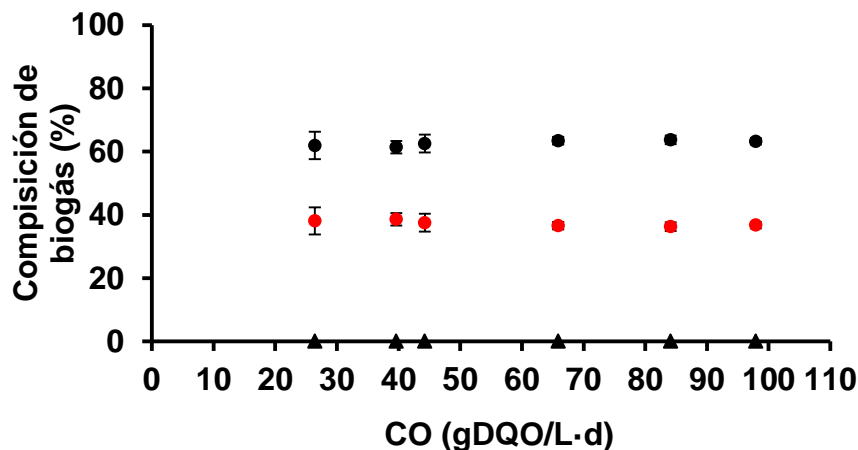


Figura 6.7. Composición de biogás (▲ CH₄; ● CO₂; ● H₂).

6.5 Balance de electrones equivalentes

Entre el 88 y el 106% de DQO (tabla 6.3) se recuperó mediante el balance de masa (para cálculo de balance ver Anexo 3). La variación con respecto al 100% se

puede deber a errores en los equipos de medición o la no contabilización de algún subproducto (ácido valérico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido láctico, etc.). Hacia la producción de hidrógeno se utilizó entre 15 y el 19.5%, siendo el mayor utilizado en la condición de donde se obtuvo la mayor productividad (84.1 gDQO/L·d). En la condición de sobrecarga se presentó el mayor desvío de DQO a la producción de etanol (9.1%), proceso desfavorable para la producción de hidrógeno, sin embargo, en esa condición no se utilizó el porcentaje más bajo para la producción de hidrógeno; esto se presentó en la condición de menor CO (26.5 gDQO/L·d).

Tabla 6.3. Balance de DQO en las diferentes CO de operación (porcentaje con respecto al total alimentado).

CO (gDQO/L·d)	H ₂	Biomasa	Etanol	Ac. acét.	Ac. prop.	Ac. but.	Glu	Total recuperado
44.3	17.1	11.2	3.2	13.0	13.0	41.1	6.6	93.3
26.4	15.0	18.5	4.1	10.6	10.6	52.4	0.5	104.6
65.9	17.2	11.3	4.7	13.1	13.1	48.7	1.5	99.5
39.6	17.0	19.0	7.4	12.9	12.9	44.8	0.6	106.0
97.9	15.7	10.5	9.1	10.2	10.2	34.7	18.4	99.4
84.1	19.5	11.3	3.3	12.5	12.5	35.3	2.3	88.2

6.6 Calibración del observador de estados

Los parámetros pseudo-estquiométricos del modelo (Ec. 6) fueron calculados de acuerdo a la metodología propuesta por Aceves-Lara *et al.* (2008) y Bernard y Bastin (2005). La matriz de los parámetros pseudo-estquiométricos usados en este trabajo resultó de la siguiente manera:

$$k = \begin{bmatrix} -1 & -1 \\ 0 & 0.3228 \\ 0.0205 & 0.0174 \\ 0.3028 & 0.2737 \\ 0.0242 & 0.0219 \\ 0.0829 & 0.1069 \\ 0.0049 & 0.0087 \\ 0.0351 & 0 \end{bmatrix}$$

Los parámetros cinéticos fueron computados de manera que se minimizara el error cuadrado entre los datos experimentales y los datos producidos por el modelo. Los parámetros cinéticos utilizados fueron:

$$\mu_{max1} = 37.3197$$

$$K_{Glu1} = 0.2896$$

$$\mu_{max2} = 27.2416$$

$$K_{Glu2} = 0.2596$$

donde K_{Glu1} y K_{Glu2} están expresados en g/g-d, y μ_{max1} y μ_{max2} están expresados en g/L.

Las ganancias de corrección del observador Luenberger (Ec.16), L y las ganancias del observador super-twisting (Ec. 20), Γ , quedaron de la siguiente manera:

$$L = \begin{bmatrix} 422.0012 \\ 1.3570 \\ 0.2071 \\ 0.0792 \end{bmatrix}$$

$$\Gamma = \begin{bmatrix} 0.5006 \\ 1.9633 \end{bmatrix} \times 10^6$$

Ambas ganancias, L y Γ , fueron calculadas para minimizar el error de estimación de acuerdo a la metodología propuesta por (Torres Zúñiga *et al.*, 2015).

6.7 Validación experimental del observador de estados

Se llevaron a cabo tres periodos de validación experimental, a), b) y c). Las entradas al observador, flujo de hidrógeno (q_{H_2}) y Q_{in} , y el TRH para cada experimento se presentan en la figura 6.8.

En el primer periodo experimental (figura 6.9a) el fermentador fue operado a dos concentraciones nominales de Glu_{in} , 20 g/L (días 0-7) y 10 g/L (días 7-11). El observador converge a la concentración real al día 1. Una vez que el observador super-twisting convergió la estimación presentó un error relativo tan bajo como del 5.1%.

En el segundó experimento (figura 6.9b) se operó a tres condiciones nominales de Glu_{in} , 15 g/L (días 0-2), 10 g/L (días 2-7) y 20 g/L (días 8-10). En el tercer periodo se operó a 10 g/L (días 0-3) y a 15 g/L (días 3-6) (figura 6.9c). Una vez que la

concentración en la entrada del reactor cambió el observador super-twisting convergió a un valor preciso con respecto a la concentración real.

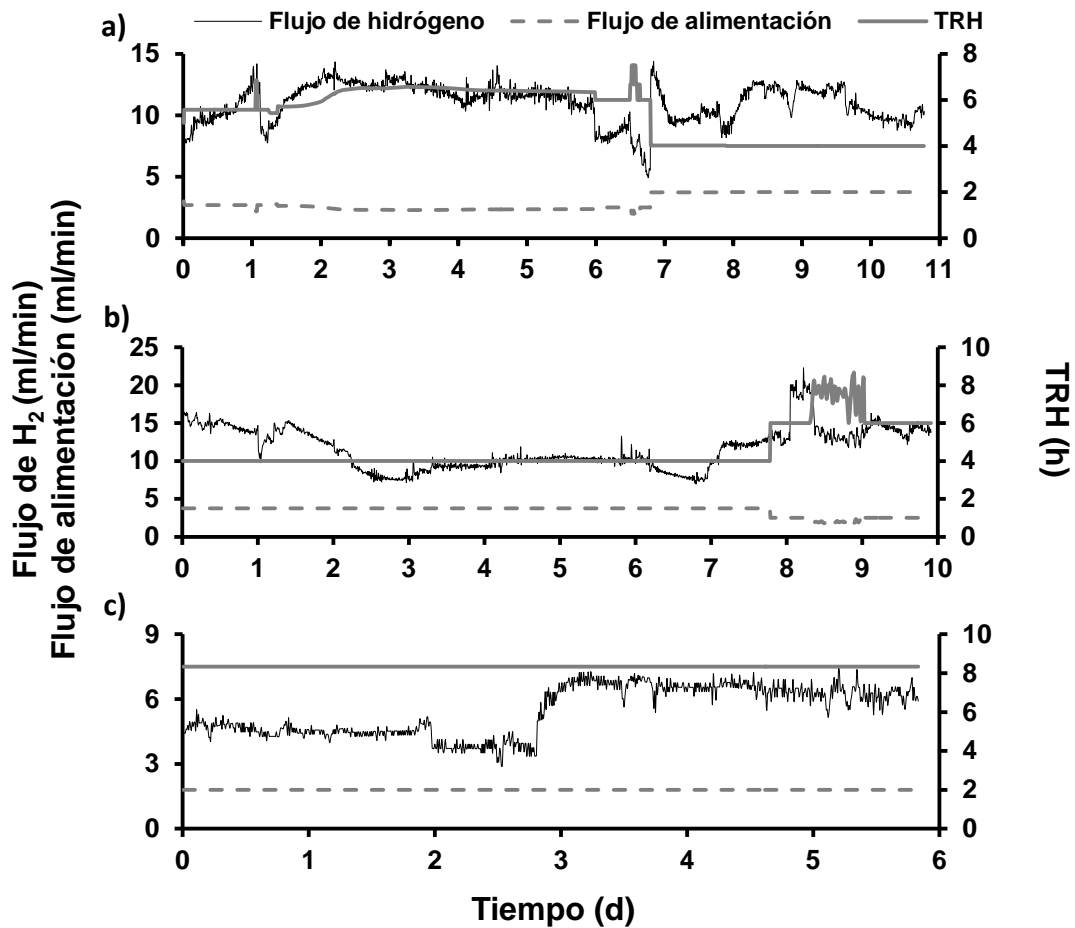


Figura 6.8. Flujo de hidrógeno, flujo de alimentación y TRH en cada uno de los tres experimentos.

En el segundo y tercer periodo el observador super-twisting logra converger a la concentración real, Glu_{in} , 0.5 días después de iniciar. En todas las condiciones la estimación es precisa, con errores relativos entre 2.5 y 19.7%., los cambios consecutivos en el TRH (figura 6.8b), o sea cambios en Q_{in} , provocan variaciones repentinos en los valores de \hat{Glu}_{in} (días 8-9 en figura 6.9b), lo cual no es favorable, ya que la estimación debe permanecer tan constante y aproximada a la

real como sea posible. Una vez que el TRH permaneció constante (días 9-10 en figura 6.8b) \hat{Glu}_{in} converge a Glu_{in} (días 9-10 en figura 6.9b). El TRH debe de permanecer constante por un periodo de tiempo para permitir que la estimación se aproxime a un valor aproximado al real.

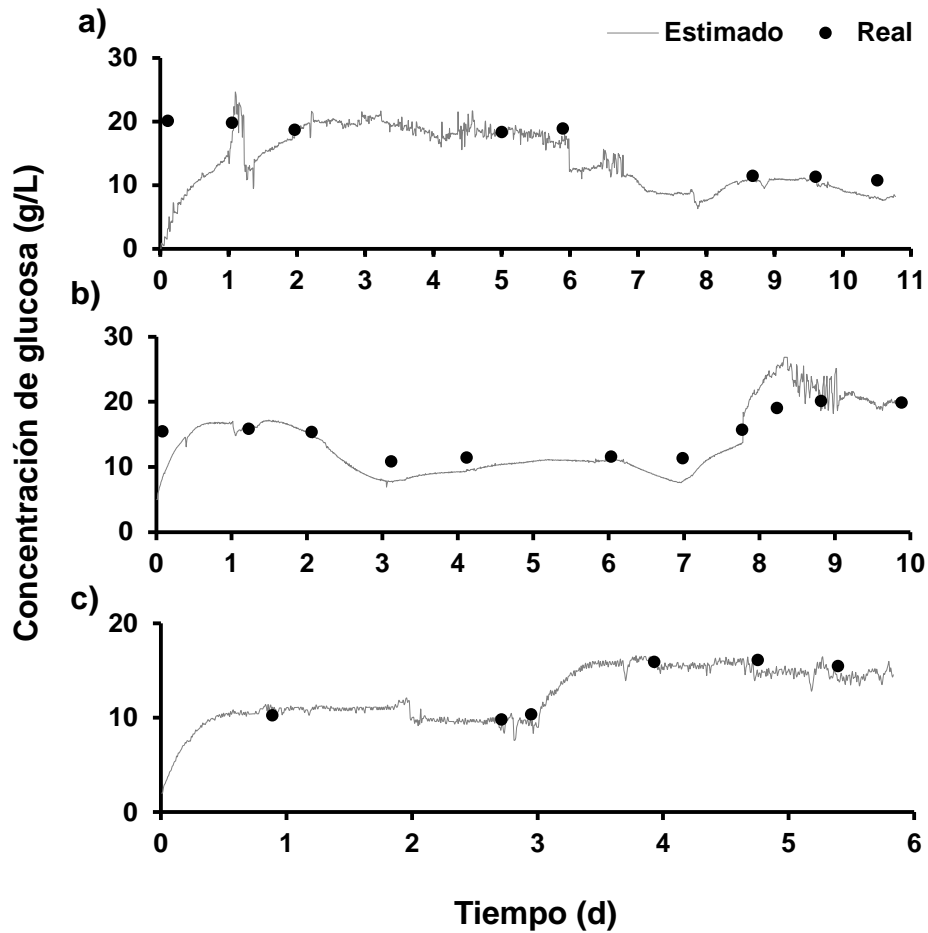


Figura 6.9. Estimaciones de Glu_{in} y los valores reales.

En cuanto a la estimación de X (SSV), la estimación más aproximada a la real fue en la condición de TRH = 6 h y $Glu_{in} = 20$ g/L (figura 6.10a, días 0-9), con un error relativo de 9.8%. En la misma condición en el segundo experimento (figura 6.10b) en los días 8-10, se presenta una sobrestimación de la concentración de SSV, esto cuando se presentan los cambios repentinos en el TRH.

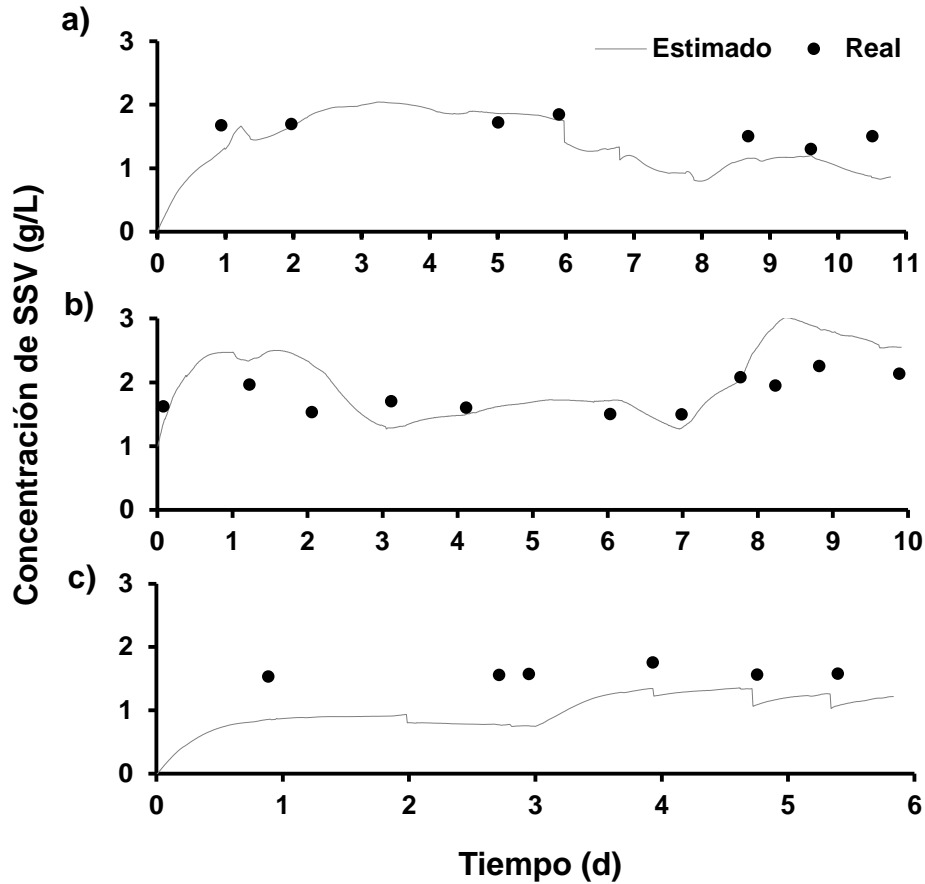


Figura 6.10. Comparación entre las concentraciones de SSV estimadas y reales.

En el tercer experimento \hat{X} fue por debajo de 1 g/L en la primera condición (figura 6.10c), pero cuando Glu_{in} cambia (días 3-6 en figura 6.9c) y q_{H_2} se incrementa se presenta una mejora en la estimación de X . Este comportamiento es de esperarse puesto que el modelo del reactor considera que un incremento en la producción de hidrógeno está relacionado a un incremento en la concentración de biomasa.

En la mayoría de las condiciones $G\hat{l}u$ estuvo por arriba de la concentración real (figura 6.11), por ejemplo, en el experimento b) en los días 0-8 $G\hat{l}u$ estuvo alrededor de 0.5 g/L y la concentración real se presentó en valores menores a 0.25 g/L. Este resultado se debe a que los parámetros del modelo no explican el comportamiento dinámico fuera de rango de los datos que se utilizaron para

calcular dichos parámetros. En el experimento a), Glu se presenta por encima de 1 g/L, y $\hat{G}lu$ está alrededor a 0.3 g/L debido a que el modelo considera que la glucosa es completamente consumida. En general el error relativo es grande, el error mínimo se obtuvo en la primera condición, 66.6%, mientras que en la tercera condición el error fue de 144.5%.

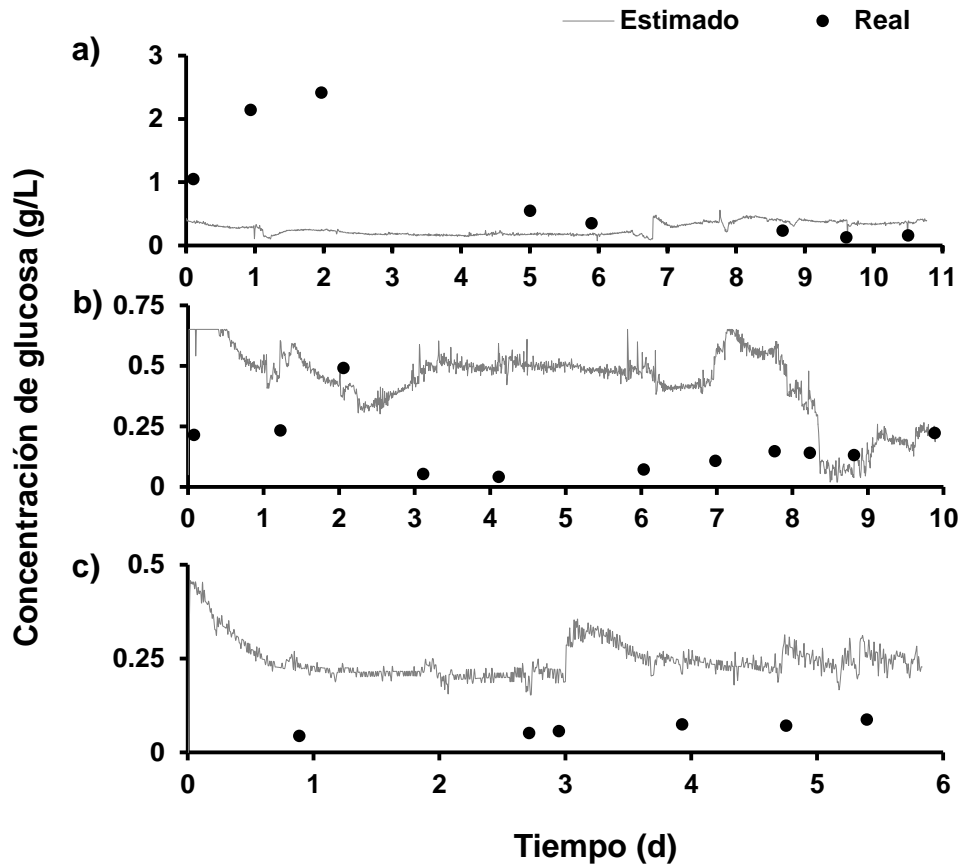


Figura 6.11. Estimaciones de Glu y los valores reales.

Incluso cuando las estimaciones del observador Luenberger (\hat{X} y $\hat{G}lu$), no son precisas, $\hat{G}lu_{in}$ (estimada por el observador super-twisting) presenta valores próximos a la concentración real.

6.8 Implementación de la estrategia de optimización acoplada al observador de estado

En un primer experimento (figura 6.12), al momento que la estrategia de optimización es implementada el Q_{in} es cambiado (figura 6.12b) con el objetivo de modificar la CO. La activación de la estrategia optimización se lleva a cabo después de un tiempo de retraso que fue fijado por el operador del reactor; este tiempo de retraso es para permitir la convergencia del observador. Una vez modificada la CO se logra incrementar la productividad en un 90%, de 10 a 19 $LH_2/L\cdot d$ (figura 6.12a). Al momento que la optimización se lleva a cabo automáticamente un cambio en la CO de 37.5 a 76.6 $gDQO/L\cdot d$ (figura 6.12a), la cual es considerada la óptima de acuerdo a la relación Prod y CO. En este mismo instante la estimación de la glucosa a la entrada del reactor decrece y el observador entra en una fase transitoria hasta converger a la concentración real (figura 6.12c). Esto puede ser explicado por el cambio en Q_{in} , el cual es una entrada a la estrategia de observación. La glucosa fue completamente consumida, que como antes se ha mencionado (figura 6.12c), es un factor importante para el correcto desempeño del observador.

La estimación de SSV permanece alrededor de 1.5 g/L incluso cuando se llevó a cabo el ajuste en Q_{in} . Previo al ajuste de Q_{in} la concentración de SSV real era de 2 g/L y después bajó a 1.5 g/L, valor al que el observador convergió. Antes de la optimización, los valores de $G\hat{I}u$ se presentaron alrededor de 0.2 g/L, valor por encima de la concentración real; después de la optimización se presentó un incremento en $G\hat{I}u$ llegando a valores de 0.5 g/L; sin embargo la concentración real permaneció debajo de 0.1 g/L.

En un segundo experimento la estrategia de optimización se implementa, se lleva a cabo la optimización después del tiempo de retraso, la carga orgánica se modifica (figura 6.13a) y la productividad se incrementa en un 100%, de 10 a 20 $LH_2/L\cdot d$. Después de la optimización el valor de $G\hat{I}u$ disminuye pero el observador logra converger nuevamente hasta presentar un error relativo de 12% y el

consumo de glucosa se presenta en un 93.5%. Después de la optimización y que la concentración de glucosa aumentó (figura 6.13c), el consumo de glucosa fue de 79.4% y el observador presentó un error relativo de estimación de 19.3%.

Cuando la CO real es de 100 gDQO/L·d al día 4.8 (figura 6.13a), el reactor se encuentra sobrecargado razón por la cual el consumo de sustrato fue de 79.4%. La carga orgánica estimada es de 81 gDQO/L·d. Entonces se presenta el siguiente escenario; el optimizador no aumenta la CO puesto que no puede incrementar el Q_{in} por la restricción de TRH (ec. 17), y por otro lado la CO observada (81 gDQO/L·d) está por debajo de la CO óptima de acuerdo a los datos experimentales (84.1 gDQO/L·d), entonces el algoritmo no considera modificar Q_{in} (disminuirlo) para disminuir la CO.

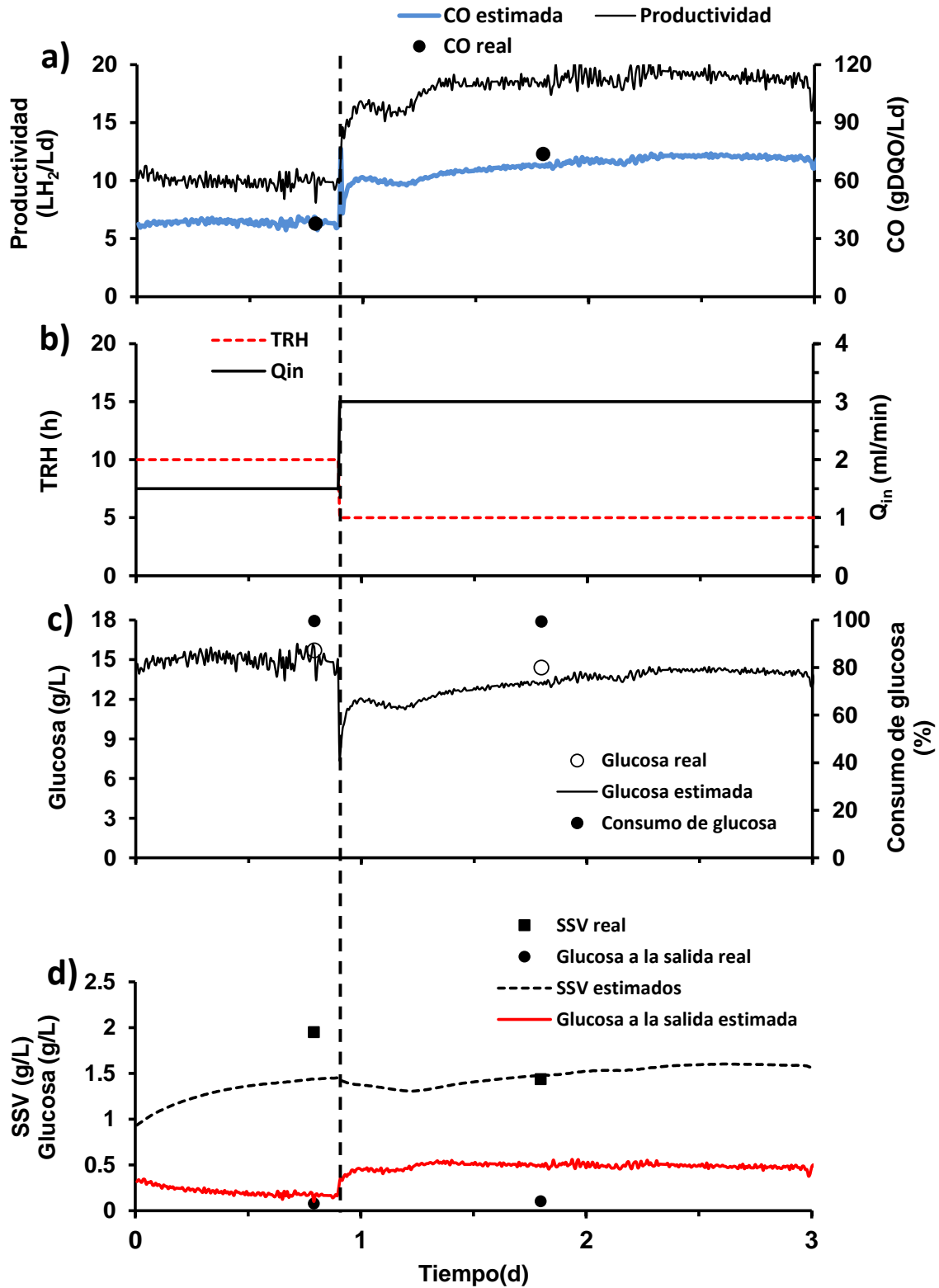


Figura 6.12. Comportamiento de la estrategia de optimización acoplada al observador de estados en un primer experimento.

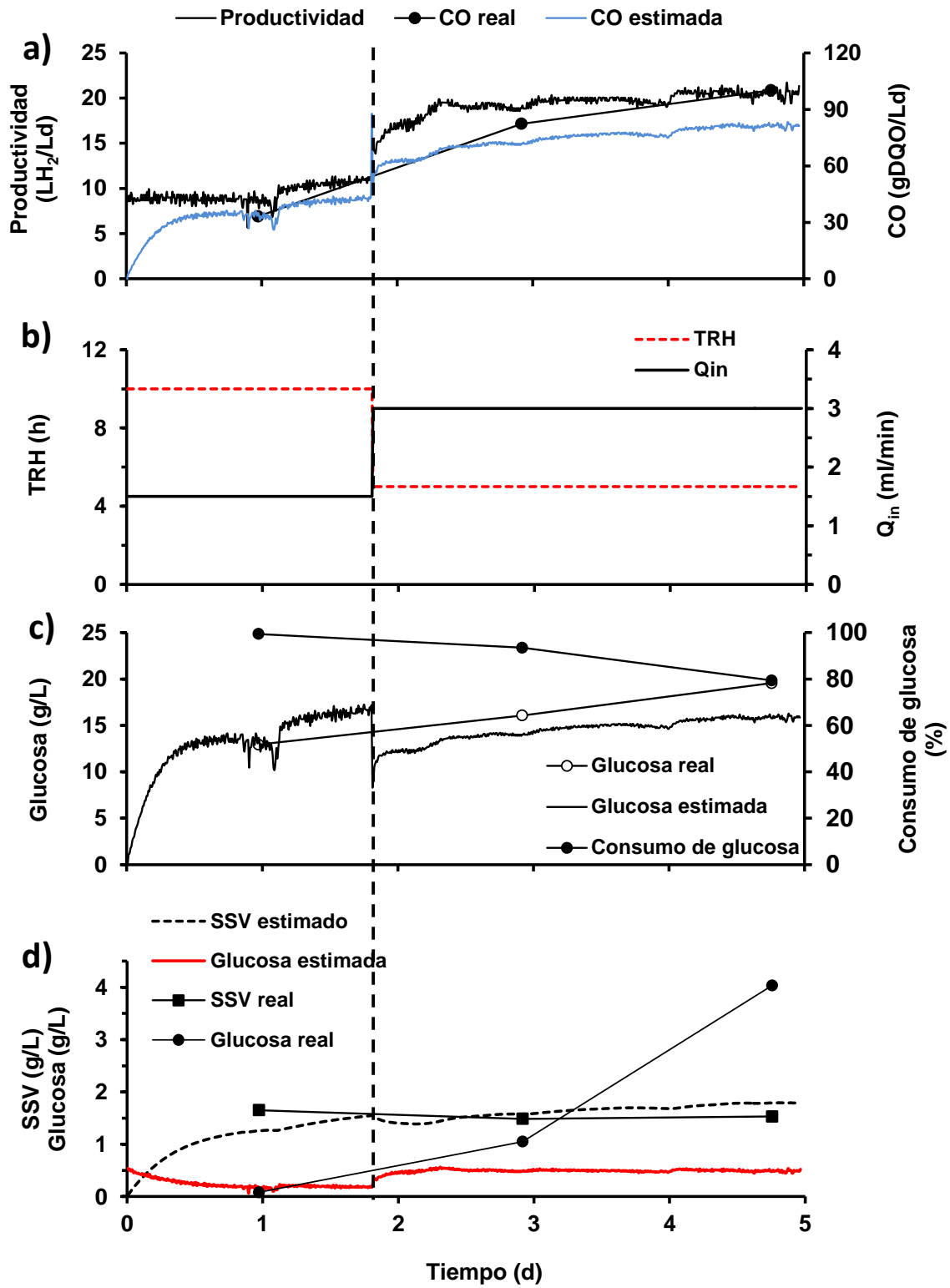


Figura 6.13. Comportamiento de la estrategia de optimización acoplada al observador de estados en un segundo experimento.

7. CONCLUSIONES

La mayor productividad del fermentador, $23.0 \text{ LH}_2/\text{L}\cdot\text{d}$ se presentó a una carga orgánica de $84.1 \text{ gDQO}/\text{L}\cdot\text{d}$, mientras que en la CO de $98 \text{ gDQO}/\text{L}\cdot\text{d}$, se observó una disminución tanto en la productividad como en el consumo de sustrato.

El observador fue una herramienta útil en la implementación de la estrategia de optimización propuesta evitando el uso de técnicas analíticas y otros instrumentos para determinar la concentración de sustrato en la alimentación, presentando errores relativos entre 2.5 y 19.7%, con respecto a la técnica analítica aplicada.

La validación experimental del observador mostró precisión al converger y estimar la concentración de glucosa a la entrada del reactor. Incluso cuando las estimaciones de biomasa y glucosa dentro del fermentador no son precisas, las estimaciones de glucosa a la entrada presentan valores próximos a la concentración real.

Fue posible maximizar la productividad de hidrógeno de un fermentador continuo de tanque agitado con respecto a la operación del reactor sin implementar una estrategia de optimización en línea. La estrategia de optimización acoplada al observador de estados permitió incrementar la productividad hasta en un 100% (de 10 a $20 \text{ LH}_2/\text{L}\cdot\text{d}$) mediante la modificación de la carga orgánica.

El consumo completo del sustrato es un factor importante a considerar en el desempeño de la estrategia de observación.

Resulta conveniente realizar una ampliación del rango de los datos a utilizar para la calibración del modelo, con el objetivo de que se pueda describir de manera más precisa algunos resultados, como la estimación de la glucosa dentro del fermentador.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aceves-Lara, C.-A., Latrille, E., Bernet, N., Buffière, P., Steyer, J.-P., 2008. A pseudo-stoichiometric dynamic model of anaerobic hydrogen production from molasses. *Water Res.* 42, 2539–2550. doi:10.1016/j.watres.2008.02.018
- Aceves-Lara, C.-A., Latrille, E., Steyer, J.-P., 2010. Optimal control of hydrogen production in a continuous anaerobic fermentation bioreactor. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 10710–10718. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.02.110
- APHA, A.P.H.A., AWWA, A.W.W.A., WEF, W.E.F., 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22 edition. ed. American Water Works Assn, Washington, DC.
- Balat, H., Kirtay, E., 2010. Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 7416–7426. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.04.137
- Balat, M., 2008. Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 4013–4029. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.05.047
- Bernard, O., Bastin, G., 2005. Identification of reaction networks for bioprocesses: determination of a partially unknown pseudo-stoichiometric matrix. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27, 293–301. doi:10.1007/s00449-005-0407-3
- Bisaillon, A., Turcot, J., Hallenbeck, P., 2006. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 1504–1508. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.06.016
- Buitrón, G., Carvajal, C., 2010. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresour. Technol.* 101, 9071–9077. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.127
- Cuetos, M.J., Gómez, X., Escapa, A., Morán, A., 2007. Evaluation and simultaneous optimization of bio-hydrogen production using 32 factorial design and the desirability function. *J. Power Sources* 169, 131–139. doi:10.1016/j.jpowsour.2007.01.050

- Dabrock, B., Bahl, H., Gottschalk, G., 1992. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1233–1239.
- Dochain, D., 2003. State and parameter estimation in chemical and biochemical processes: a tutorial. *J. Process Control* 13, 801–818. doi:10.1016/S0959-1524(03)00026-X
- Dochain, D., Couenne, F., Jallut, C., 2009. Enthalpy based modelling and design of asymptotic observers for chemical reactors. *Int. J. Control* 82, 1389–1403. doi:10.1080/00207170802236085
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, Pa., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Fang, H.H.P., Liu, H., 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour. Technol.* 82, 87–93. doi:10.1016/S0960-8524(01)00110-9
- Goltsov, V., Veziroglu, T., Goltsova, L., 2006. Hydrogen civilization of the future—A new conception of the IAHE. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 153–159. doi:10.1016/j.ijhydene.2005.04.045
- Guiot, S.R., Podruzny, M.F., McLean, D.D., 1989. Assessment of macroenergetic parameters for an anaerobic upflow biomass bed and filter (UBF) reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1277–1288.
- Haandel, A.C. van, Lettinga, G., 1994. *Anaerobic sewage treatment: a practical guide for regions with a hot climate.*
- Hafez, H., Nakhla, G., El. Naggat, M.H., Elbeshbishy, E., Baghchehsaraee, B., 2010. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 81–92. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.10.051
- Hallenbeck, P.C., 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 7379–7389. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.12.080

- Hulhoven, X., Wouwer, A.V., Bogaerts, P., 2006. Hybrid extended Luenberger-asymptotic observer for bioprocess state estimation. *Chem. Eng. Sci.* 61, 7151–7160. doi:10.1016/j.ces.2006.06.018
- Jo, J.H., Lee, D.S., Park, D., Choe, W.-S., Park, J.M., 2008. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresour. Technol.* 99, 2061–2066. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.027
- Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 569–582. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.09.015
- Kraemer, J.T., Bagley, D.M., 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnol. Lett.* 29, 685–695. doi:10.1007/s10529-006-9299-9
- Kuo, B.C., 1996. *Sistemas de control automático*. Pearson Educación.
- Li, C., Fang, H.H.P., 2007. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 37, 1–39. doi:10.1080/10643380600729071
- Lin, C.-Y., Lay, C.-H., Sen, B., Chu, C.-Y., Kumar, G., Chen, C.-C., Chang, J.-S., 2012. Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *Int. J. Hydrog. Energy* 37, 15632–15642. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.072
- Logan, B.E., 2004. Peer reviewed: extracting hydrogen and electricity from renewable resources. *Environ. Sci. Technol.* 38, 160A–167A.
- Maintinguer, S., Fernandes, B., Duarte, I., Saavedra, N., Adorno, M., Varesche, M., 2008. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 4309–4317. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.06.053
- Mariakakis, I., Bischoff, P., Krampe, J., Meyer, C., Steinmetz, H., 2011. Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *Int. J. Hydrog. Energy* 36, 10690–10700. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.06.008
- McCarty, P.L., Smith, D.P., 1986. Anaerobic wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 20, 1200–1206. doi:10.1021/es00154a002

- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Noike, T., 2000. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour. Technol.* 73, 59–65. doi:10.1016/S0960-8524(99)00130-3
- Mohd Ali, J., Ha Hoang, N., Hussain, M.A., Dochain, D., 2015. Review and classification of recent observers applied in chemical process systems. *Comput. Chem. Eng.* 76, 27–41. doi:10.1016/j.compchemeng.2015.01.019
- Morari, M., Lee, J.H., 1999. Model predictive control: past, present and future. *Comput. Chem. Eng.* 23, 667–682.
- Muller, V., 2003. Energy Conservation in Acetogenic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6345–6353. doi:10.1128/AEM.69.11.6345-6353.2003
- Nieves, J., Santos, I., Bringas, P.G., 2011. Modelo predictivo de control en fundiciones de alta precisión: un nuevo enfoque para la fase de predicción. *Rev. Metal.* 47, 341–354. doi:10.3989/revmetalm.1059
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., Lyberatos, G., 2010. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. *Waste Biomass Valorization* 1, 21–39. doi:10.1007/s12649-009-9001-2
- Ogata, K., 2010. *Ingeniería de control moderna*. Pearson Educación, Madrid.
- Ramírez-Morales, J.E., Torres Zúñiga, I., Buitrón, G., 2015. On-line heuristic optimization strategy to maximize the hydrogen production rate in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochem.* 50, 893–900. doi:10.1016/j.procbio.2015.03.003
- Reith, J., Wijffels, R.H., 2003. *Bio-methane & bio-hydrogen: status and perspectives of biological methane and hydrogen production*. Dutch Biological Hydrogen Foundation, Petten.
- Ren, N., Li, J., Li, B., Wang, Y., Liu, S., 2006. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 2147–2157. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.02.011

- Salerno, M.B., Park, W., Zuo, Y., Logan, B.E., 2006. Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Res.* 40, 1167–1172. doi:10.1016/j.watres.2006.01.024
- Saltelli, A., Ratto, M., Andres, T., Campolongo, F., Cariboni, J., Gatelli, D., Saisana, M., Tarantola, S., 2008. *Global Sensitivity Analysis: The Primer*. John Wiley & Sons.
- Seengenyong, J., O-Thong, S., Prasertsan, P., 2014. Comparison of ASBR and CSTR reactor for hydrogen production from palm oil mill effluent under thermophilic condition. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 05, 177–183. doi:10.4236/abb.2014.53022
- Shen, L., Bagley, D.M., Liss, S.N., 2009. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 3689–3696. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.03.006
- Sterling Jr., M.C., Lacey, R.E., Engler, C.R., Ricke, S.C., 2001. Effects of ammonia nitrogen on H₂ and CH₄ production during anaerobic digestion of dairy cattle manure. *Bioresour. Technol.* 77, 9–18. doi:10.1016/S0960-8524(00)00138-3
- Torres Zúñiga, I., Vargas, A., Latrille, E., Buitrón, G., 2015. Robust observation strategy to estimate the substrate concentration in the influent of a fermentative bioreactor for hydrogen production. *Chem. Eng. Sci.* 129, 126–134. doi:10.1016/j.ces.2015.02.042
- Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H.M., 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 1000–1013. doi:10.1016/j.rser.2008.03.003
- Valdez-Vazquez, I., Riosleal, E., Esparzagarcia, F., Cecchi, F., Poggivaraldo, H., 2005. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrog. Energy* 30, 1383–1391. doi:10.1016/j.ijhydene.2004.09.016

- Vanginkel, S., Oh, S., Logan, B., 2005. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *Int. J. Hydrog. Energy* 30, 1535–1542. doi:10.1016/j.ijhydene.2004.09.017
- Venkata Mohan, S., 2009. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 7460–7474. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.05.062
- Wang, J., Wan, W., 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 799–811. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.11.015
- Wang, J., Wan, W., 2008. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 2934–2941. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.03.048
- Wang, X., Nordlander, E., Thorin, E., Yan, J., 2013. Microalgal biomethane production integrated with an existing biogas plant: A case study in Sweden. *Appl. Energy* 112, 478–484. doi:10.1016/j.apenergy.2013.04.087
- Wu, S.-Y., Hung, C.-H., Lin, C.-N., Chen, H.-W., Lee, A.-S., Chang, J.-S., 2006. Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 934–946. doi:10.1002/bit.20800
- Yang, H., Shen, J., 2006. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic biohydrogen production from soluble starch. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 2137–2146. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.02.009
- Yu, H., Zhu, Z., Hu, W., Zhang, H., 2002. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *Int. J. Hydrog. Energy* 27, 1359–1365.
- Zhang, Y., Liu, G., Shen, J., 2005. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. *Int. J. Hydrog. Energy* 30, 855–860. doi:10.1016/j.ijhydene.2004.05.009
- Venkata Mohan, S., 2009. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards

optimization☆. Int. J. Hydrog. Energy 34, 7460–7474.
doi:10.1016/j.ijhydene.2009.05.062

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1. Calibración de sensor de hidrógeno.

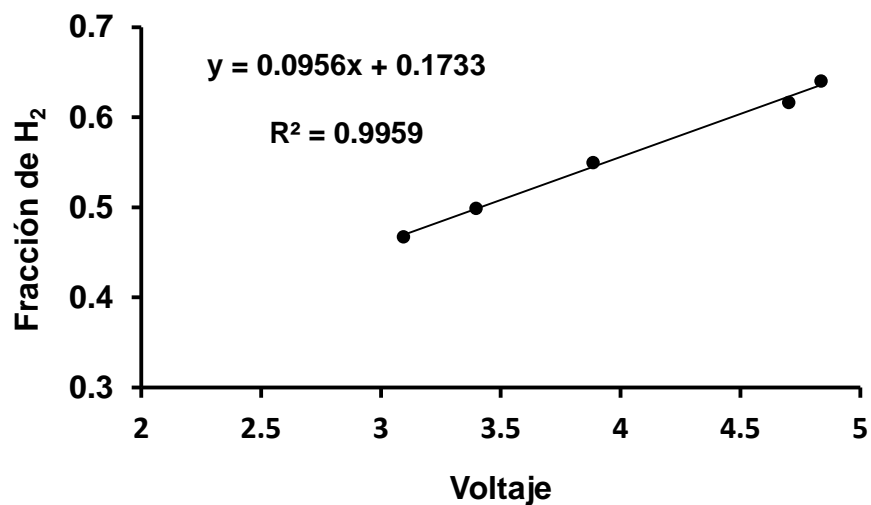


Figura 9.1. Calibración del sensor de hidrógeno mediante la relación entre la fracción de hidrógeno en el gas y el voltaje producido por dicha fracción de hidrógeno.

9.2 Anexo 2. Calibración de bomba de alimentación

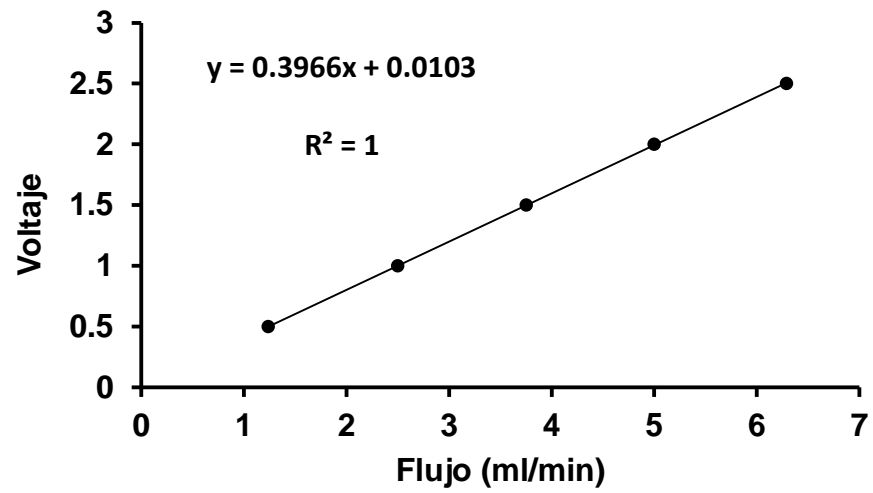


Figura 9.2. Calibración de la bomba de alimentación mediante la relación entre el voltaje aplicado y el flujo producido.

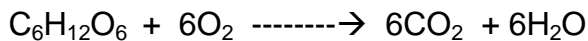
9.3 Anexo 3. Balance de electrones equivalentes

El balance de DQO se plantea a partir de un balance ordinario de materia, quedando representado por la DQO de cada uno de los componentes en la siguiente ecuación:

Glucosa en alimento = AGV's + Etanol + Hidrógeno + Biomasa + Glucosa en salida

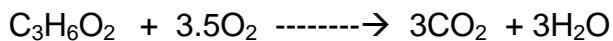
La DQO de cada componente está dada por su oxidación completa. Mediante la estequiometría de la oxidación, la DQO de cada componente son las siguientes:

1) Glucosa



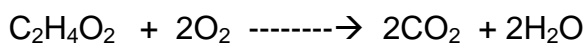
DQO = 1.07 gO₂/g glucosa

2) Ácido propiónico



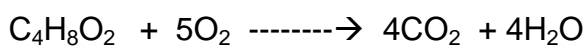
DQO = 1.51 gO₂/g ac. propiónico

3) Ácido acético



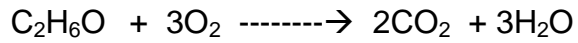
DQO = 1.07 gO₂/g ac. acético

4) Ácido butírico



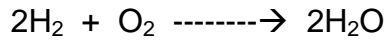
DQO = 1.82 gO₂/g ac. butírico

5) Etanol



DQO = 2.09 gO₂/g etanol

6) Hidrógeno



DQO = 8 gO₂/g hidrógeno

7) Biomasa

DQO = 1.42 gO₂/gSSV (Guiot et al., 1989)

Tabla 9.1. Datos de cada condición de operación para determinar el balance de DQO.

CO (gDQO/L-d)	Consumo de glucosa (%)	SSV (mg/L)	Etanol (mg/L)	Ac. acét.	Ac. prop.	Ac. but.	Productividad (LH ₂ /L-d)	Balance de DQO
44.3	97.1±3.6	1175±0.247	222±53	1811±380	110±35	3368+602	10.5+0.57	93.3
26.4	99.5±0.2	1437±0.142	217±36	1089±127	254±53	3175+250	5.6+0.36	104.6
65.9	98.5±0.5	1743±0.043	557±196	2591±354	488±172	5985+551	15.8+0.77	99.5
39.6	99.5±0.2	2056±0.127	551±208	1857±242	447±223	3794+597	8.5+0.44	106.0
97.9	81.5±3.1	1838±0.256	1077±301	2373±317	141±120	4738+732	21.3+0.74	99.4
84.1	97.5±1.7	1605±0.064	346±164	2273±525	470±192	3901+1139	23.0+0.66	88.2

9.4 Anexo 4. Producción del trabajo de investigación

Congresos

- Experiental validation of a coupled nonlinear observer in a hydrogen production dark fermenter. Exposición oral. The XIV International Congress of the Mexican Hydorgen Society. Cancún, Q. Roo, September 30 – October 4, 2014.
- Heuristic optimization of hydrogen producer dark fermenter modifying the organic loading rate. Exposición oral. 4th IWA Mexico Young Water Professionals Conference 2015. Guanajuato, Gto., México, 27 - 29 April.

Artículos en preparación

- Alberto Villa-Leyva, Ixbalank Torres-Zúñiga, Alejandro Vargas, Germán Buitrón. Experimental validation of an observer to estimate the substrate at the input of a hydrogen production dark fermenter.