



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ingeniería Agrícola
Programa de Doctorado en Recursos Hídricos y Energía para la Agricultura

**Producción de biohidrógeno sustentable a partir de
residuos orgánicos: Estudio de la fermentación oscura
del mucílago de café bajo diferentes estrategias
operacionales**

Tesis para optar al grado de Doctora en Recursos hídricos y energía
para la agricultura

CINDY YURANI CORREA VILLA
CHILLÁN-CHILE
2026

Profesor Guía: Johannes de Bruijn
Dpto. de Agroindustrias
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Agroindustrias de la Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad de Concepción, y en el Departamento de Alimentos de Ingeniería Agrícola y de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.

Profesor Guía

Dr. Johannes de Bruijn
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Gastón Merlet Venturelli
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Andrea Plaza Ramírez
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Dr. Pedro Aqueveque Muñoz
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Dra. Edith Cadena Chamorro
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Colombia

Director de Programa

Dr. Sebastián Krogh Navarro
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Dedicatoria

A Dios le dedico este logro, porque aun cuando mi corazón soñó e hizo muchos planes, aprendí que al final son tus designios los que prevalecen y que es tu voluntad la que permanece. En tus manos estuvo este proceso y todo lo que viene. Doy fe de tu gracia, que me fortaleció y me dio la resiliencia para levantarme en cada frustración y mantenerme firme y constante con este proyecto. También soy testigo de tu amor al poner en mi camino personas que iluminaron este recorrido con hermandad, amistad, risas, apoyo, sabiduría y conocimiento. A Ti sea toda la gloria.

Agradecimientos

En primer lugar, expreso mi profundo agradecimiento a mi familia por el amor, la paciencia, el apoyo y la confianza que me han dado durante todos estos años que han formado parte de mi trayectoria académica. A mi madre, gracias por su esfuerzo inalcanzable y por enseñarme con su ejemplo a ser fuerte y salir adelante. A mi esposo, le agradezco por su entrega incondicional, por acompañarme en cada jornada agotadora de laboratorio y de escritura; y por animarme siempre a confiar en Dios y en mi propio carácter. Comparto este logro con ustedes, pues cada paso ha sido posible caminando de su mano.

Siempre recordaré con gratitud el apoyo de mi suegro y su disposición para recolectar el mucílago de café, incluso estando bajo la lluvia. Asimismo, agradezco a los mayordomos de las fincas cafeteras, en especial al señor Eucinio, por su hospitalidad y colaboración constante para que no faltara material. Gracias a ellos, gran parte, este proyecto fue posible.

En el ámbito académico, agradezco al Dr. Edilson Moreno por compartir sus conocimientos y por la confianza brindada, su apoyo y orientación constante fueron de gran valor para mi formación. A mi tutor, el Dr. Johannes de Bruijn, no solo agradezco por su guía en el desarrollo de esta investigación, sino también por su apoyo, paciencia y confianza durante todo el proceso. Además, valoro profundamente su calidad humana y profesional, fundamentales para culminar este trabajo. A la comisión evaluadora, agradezco sinceramente el tiempo, la disposición

y la dedicación invertidos en la revisión de este trabajo. Sus observaciones, comentarios y recomendaciones contribuyeron a fortalecer la investigación y a mejorar la calidad del documento final.

A Chile y a la Universidad de Concepción, gracias por recibirme y hacerme sentir acogida; guardo un especial cariño al Dr. Cristian Correa y a su equipo de Laboratorio de Robótica, Anelim Bernal y Juan Pablo Sepúlveda, por brindarme su conocimiento, hospitalidad, amistad y compañerismo en este trayecto académico. De igual manera, agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), Sede Medellín, por estar pendientes, apoyarme, motivarme, y por compartir largas jornadas de trabajo, y a los profesores de la Facultad de Ciencias Agrarias y UNAL por facilitar los espacios y el apoyo necesario para mis experimentos.

Igualmente, agradezco el apoyo financiero de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), Chile (Folio N.º 21221726), y de la UNAL a través del proyecto “Centro de Excelencia (CE) para la innovación en mecanización y opciones energéticas para la agricultura familiar” (Código 52937).

Finalmente, tengo tantos momentos como personas por agradecer que no alcanzaría a escribirlo todo; sin embargo, todo este amor y apoyo quedan para siempre escritos en el libro de mi corazón.

ÍNDICE

Resumen	XVI
Abstract.....	XVIII
Capítulo I. Introducción	1
1. Introducción	1
1.1. Hipótesis	5
1.2. Objetivos	5
1.3. Bibliografía	6
Capítulo II. Marco teórico	8
2.1. Hidrógeno: Vector energético clave para afrontar los desafíos de la transición energética	8
2.2. La necesidad de hidrógeno renovable.....	12
2.3. Producción biológica de hidrógeno: Fermentación oscura como una tecnología prometedora	17
2.4. Contexto, magnitud e impactos de los residuos orgánicos: Pérdidas y desperdicios de alimentos y subproductos del café	21
2.5. Potencial de los residuos orgánicos para la producción de biohidrógeno por fermentación oscura	28
2.6. Parámetros operacionales clave en la fermentación oscura.....	33
2.6.1. pH	34
2.6.2. Temperatura.....	35
2.6.3. Modo de operación del biorreactor	36
2.6.4. Tiempo de retención hidráulica.....	38
2.6.5. Concentración de sustrato	39
2.7. Bibliografía	40
Capítulo III. Presencia de bacterias ácido lácticas en la producción de hidrógeno por fermentación oscura: Competencia o sinergia.....	52
3.1. Introducción	52
3.2. Efecto negativo de bacterias ácido lácticas en la fermentación oscura: Inestabilidad en la producción de hidrógeno	55
3.2.1. Competencia por sustrato: BAL mejores competidoras que BPH	58
3.2.2. Bacteriocinas secretadas por BAL: Las principales sustancias inhibitorias de la producción de H ₂ por FO	62

3.3. Efecto positivo de bacterias ácido lácticas en la fermentación oscura: Facilitadoras de producción de hidrógeno	67
3.4. Ácido láctico: un sustrato alternativo para la producción de hidrógeno por fermentación oscura de residuos orgánicos	74
3.5. Conclusiones	85
3.6. Bibliografía	86
Capítulo IV. Producción de biohidrógeno a partir de mucílago de café enriquecido en ácido láctico: Desempeño de la fermentación oscura semicontinua	109
4.1. Introducción	109
4.2. Metodología	113
4.2.1. Diseño experimental.....	115
4.2.2. Recolección y acondicionamiento del sustrato	117
4.2.3. Inóculo	119
4.2.4. Operación del biorreactor en modo semicontinuo	120
4.2.5. Métodos analíticos	122
4.2.6. Análisis de datos	123
4.2.6.1. Cálculo de indicadores de desempeño del proceso.....	123
4.2.6.2. Análisis estadístico	124
4.2.7. Modelamiento con lógica difusa	125
4.3. Resultados y discusión.....	127
4.3.1. Acidificación natural del mucílago de café	127
4.3.2. Producción de biohidrógeno mediante FO-LA en modo semicontinuo.....	130
4.3.3. Análisis estadístico de los factores operativos mediante metodología de superficie de respuesta	143
4.3.4. Análisis del efecto combinado del tiempo de retención hidráulica y la concentración de ácido láctico en la producción de biohidrógeno	145
4.3.5. Aplicación de lógica difusa para el modelado de la producción de biohidrógeno en FO-LA semicontinua	151
4.3.6. Consideraciones finales y proyección para futuras investigaciones.....	155
4.4. Conclusiones	157
4.5. Bibliografía	158
Capítulo V. Microbiología del proceso de fermentación oscura semicontinua para la producción de biohidrógeno: Aislamiento e identificación.....	168
5.1. Introducción	168

5.2. Metodología	171
5.2.1. Recolección de muestras	171
5.2.2. Preparación de medios de cultivo.....	172
5.2.3. Inoculación de las muestras	172
5.2.4. Dilución seriada y siembra en medios de cultivos	172
5.2.5. Aislamiento de colonias microbianas.....	173
5.2.6. Identificación bioquímica de aislados bacterianos	174
5.3. Resultados y discusión.....	176
5.3.1. Aislamiento e identificación bioquímica de aislado bacterianos	176
5.3.2. Interpretación de la microbiología del proceso de FO-LA semicontinua	179
5.3.3. Interpretación bioquímica de la conversión de ácido láctico asociadas a la producción de hidrógeno.....	186
5.4. Alcances y limitaciones del enfoque de identificación.....	191
5.5. Conclusiones	194
5.6. Bibliografía.....	196
Capítulo VI. Análisis cinético del consumo de ácido láctico y la producción de H₂ durante la fermentación oscura semicontinua con mucílago de café acidificado..	200
6.1. Introducción	200
6.2. Metodología	203
6.2.1. Recolección de muestras	203
6.2.2. Métodos analíticos	204
6.2.3. Análisis de datos y desarrollo de los modelos cinéticos.....	205
6.2.3.1. Delimitación y formulación del balance de masa	205
6.2.3.2. Variables analizadas y procesamiento de los datos.....	206
6.2.3.3 Modelo empírico para la descripción del consumo de sustrato y la formación de productos	207
6.3. Resultados y discusión.....	209
6.3.1. Producción de hidrógeno y perfil de ácidos orgánicos durante la operación del biorreactor modo semicontinuo	209
6.3.2. Análisis de la cinética del consumo de sustrato y formación de producto	211
6.3.3. Utilización del ácido láctico y mecanismos de producción de hidrógeno	221
6.4. Conclusiones	225
6.5. Bibliografía.....	227
Capítulo VII. Discusión general.....	230

Bibliografía.....	240
Anexo A. Datos experimentales crudos de fermentación oscura semicontinua	243
Anexo B. Verificación de supuestos estadísticos para los modelos de superficie de respuesta.....	248
Anexo C. Funciones de pertenencia utilizadas en el modelo de lógica difusa para HPR....	250
Anexo D. Respaldo de identificación bioquímica de aislados bacterianos	252

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Tecnologías asociadas a la producción de biohidrógeno.	18
Tabla 2-2. Características de residuos orgánicos promisorios para la producción de biohidrógeno por fermentación oscura según su composición y disponibilidad.....	32
Tabla 4-1. Factores y niveles establecidos en el diseño de composición central.	115
Tabla 4-2. Frecuencias de recambio aplicadas durante la operación semicontinua definidos por el tiempo retención hidráulica.	121
Tabla 4-3. Indicadores de desempeño y ecuaciones utilizadas para el análisis de la producción de biohidrógeno en fermentación oscura semicontinua.....	124
Tabla 4-4. Indicadores desempeño de la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura impulsada por lactato en modo semicontinuo bajo diferentes condiciones de tiempo de retención hidráulica y concentración de ácido láctico en la alimentación.	130
Tabla 4-5. Comparación del desempeño de residuos agroindustriales evaluados en sistemas de fermentación oscura impulsada por lactato.....	137
Tabla 4-6. Coeficientes de regresión y ANOVA de los modelos ajustados para la tasa de producción y rendimiento molar de hidrógeno.	143
Tabla 4-7. Validación del modelo para la producción y rendimiento molar de biohidrógeno.	144
Tabla 5-1. Muestras seleccionadas y codificación utilizada para el aislamiento e identificación bacteriana.	171
Tabla 5-2. Origen, condiciones de aislamiento y criterios de selección morfológica de los aislados bacterianos.....	176
Tabla 5-3. Resultado de la tinción de Gram e identificación bioquímica de los aislados bacterianos.....	177
Tabla 6-1. Ecuaciones empleadas para el procesamiento de datos e indicadores cinéticos.....	206
Tabla 6-2. Definición de $Z(t)$ y parámetros cinéticos del modelo de Gompertz.....	208
Tabla 6-3. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz para el consumo de sustrato y formación de productos.	213
Tabla 6-4. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz modificado reportados para la producción de H_2 en sistemas de FO-LA.	219
Tabla 6-5. Rendimientos aparentes netos respecto al ácido láctico consumido durante el post-recambio.....	222

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Beneficios claves del hidrógeno renovable en la transición energética. Elaboración propia.....	10
Figura 2-2. Tecnologías asociadas a la producción de hidrógeno..	14
Figura 2-4. Estructura del fruto de café y flujos de biomasa a lo largo de la cadena.	26
Figura 3-2. Efecto negativo de BAL sobre BPH en el proceso de FO.....	57
Figura 3-3. Sistema sintrófico compuesto por bacterias ácido lácticas y bacterias productoras de hidrógeno para la producción de hidrógeno impulsada por ácido láctico.....	82
Figura 4-1. Esquema general del procedimiento experimental desarrollado para evaluar la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura semicontinua utilizando mucílago de café enriquecido en ácido láctico.....	114
Figura 4-2. Recolección del mucílago de café fresco durante el proceso de beneficio húmedo en finca cafetera del suroeste antioqueño.....	117
Figura 4-3. Etapas preliminares para la obtención del inóculo productor de hidrógeno mediante auto-fermentación oscura.	120
Figura 4-4. Perfil de ácidos orgánicos en el mucílago de café acidificado utilizado como sustrato durante un ensayo preliminar de fermentación oscura semicontinua operado bajo condiciones de TRH de 2 días.	128
Figura 4-5. Perfil de ácidos grasos volátiles y concentración final de ácido láctico en función de los ensayos experimentales	132
Figura 4-6. Superficies y contorno de respuesta para la tasa de producción de hidrógeno en función del tiempo de retención hidráulica y la concentración de ácido láctico en la alimentación, obtenidas mediante la metodología de superficie de respuesta....	146

Figura 4-7. Superficies y contorno de respuesta para el rendimiento molar de hidrógeno en función del tiempo de retención hidráulica y la concentración de ácido láctico en la alimentación, obtenidas mediante la metodología de superficie de respuesta	148
Figura 4-8. Superficie de respuesta generada por el modelo de lógica difusa para la tasa de producción de hidrógeno en función de la interacción entre el tiempo de retención hidráulica y la concentración de ácido láctico en la alimentación.....	153
Figura 4-9. Validación del modelo de lógica difusa.....	154
Figura 5-1. Esquema del procedimiento de dilución seriada y siembra por extensión en placas con TSA y MRS suplementados con ácido láctico, bajo condiciones asépticas.....	173
Figura 5-2. Morfología colonial de aislados bacterianos representativos obtenidos en medios TSA y MRS suplementados con ácido láctico durante el proceso de fermentación oscura semicontinua..	175
Figura 5-3. Caracterización microscópica de aislados bacterianos representativos mediante tinción de Gram durante el proceso de fermentación oscura semicontinua.	178
Figura 5-4. Esquema conceptual de la relación entre las condiciones de operación, la comunidad microbiana y el desempeño del sistema semicontinuo de fermentación oscura impulsada por lactato.....	186
Figura 5-5. Esquema conceptual y metabólico de la fermentación oscura impulsada por lactato a partir de mucílago de café acidificado..	187
Figura 6-1. Producción de hidrógeno y perfil de concentración de ácidos orgánicos en función del tiempo de fermentación.....	210
Figura 6-2. Análisis cinético del consumo de sustrato y la formación de producto mediante el modelo de Gompertz modificado..	213

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

SÍMBOLOS

Símbolo	Término	Unidad	Definición
C_{AL}	Concentración de ácido láctico en la alimentación del biorreactor	g/L	Todo el manuscrito
HPR	Tasa de producción de H_2	L H_2 /d	Capítulo 4 al 7
H_{max}	Potencial de producción de H_2	mL H_2 ; L H_2 /L	Capítulo 6
HMY	Rendimiento molar de H_2	mol H_2 /mol AL	Capítulo 4 al 7
HSY	Rendimiento de H_2 en relación a SV	mL H_2 /g SV	Capítulo 4
IE	Índice de estabilidad de producción de H_2	—	Capítulo 4
p	Valor de significancia estadística	—	Tabla 4-6
R^2	Coeficiente de determinación	—	Tabla 4-6; Ecuación 6-5
$R^2_{ajustado}$	Coeficiente de determinación ajustado	—	Tabla 4-6
$R_{max,AL}$	Tasa máxima de consumo de AL	g/L·h	Capítulo 6
$R_{max,AB}$	Tasa máxima de formación de AB	g/L·h	Capítulo 6
$R_{max,AP}$	Tasa máxima de formación de AP	g/L·h	Capítulo 6
R_{max,H_2}	Tasa máxima de producción de H_2	L H_2 /h mL H_2 /L·h	Capítulo 6
$R_{max,z}$	Tasa máxima estimada por el modelo de Gompertz modificado	Según la variable	Ecuación 6-2
ST	Sólidos totales	g/L	Capítulo 4
SV	Sólidos volátiles	g/L	Capítulo 4

Símbolo	Término	Unidad	Definición
SV_{rem}	Eficiencia de remoción de SV	%	Capítulo 4
t	Tiempo	h	Capítulo 6
$t_{R_{max}}$	Tiempo asociado a la $R_{max,z}$ estimada por el modelo de Gompertz modificado	h	Ecuación 6-3
VHPR	Tasa volumétrica de hidrógeno	L H ₂ /L·d	Tabla 4-5
$Z(t)$	Variable dependiente acumulada descrita por el modelo de Gompertz modificado	Según la variable	Ecuación 6-2
Z_{max}	Máxima producción o consumo de la variable dependiente (potencial)	Según la variable	Ecuación 6-2
$Y_{H_2/AL}$	Rendimiento de H ₂ aparente neto respecto al AL consumido	mol H ₂ /mol AL	Tabla 6-5
$Y_{AC/AL}$	Rendimiento de AC aparente neto respecto al AL consumido	mol AC/mol AL	Tabla 6-5
$Y_{AP/AL}$	Rendimiento de AB aparente neto respecto al AL consumido	mol AB/mol AL	Tabla 6-5
$Y_{AB/AL}$	Rendimiento de AP aparente neto respecto al AL consumido	mol AP/mol AL	Tabla 6-5
$Y_{H_2,calc}$	Rendimiento H ₂ calculable	mol H ₂ /mol AL	Ecuación 6-10
ΔAL_{max}	Consumo máximo de ácido láctico	g/L	Capítulo 6
ΔAB_{max}	Formación máxima de ácido butírico	g/L	Capítulo 6
ΔAP_{max}	Formación máxima de ácido propónico	g/L	Capítulo 6
λ_z	Fase de latencia o tiempo de retardo estimado por el modelo de Gompertz	h	Ecuación 6-2

ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
AA	Ácido acético
ACK	Acetato quinasa
AB	Ácido butírico
ADM1	Modelo de digestión anaerobia No 1
AL	Ácido láctico
AP	Ácido propiónico
AGV	Ácidos grasos volátiles
ANOVA	Análisis de varianza
Ar	Argón
BAL	Bacterias ácido lácticas
BCD	Butiril-CoA deshidrogenasa
BPH	Bacterias productoras de hidrógeno
BioH ₂	Biohidrógeno
BuK	Butirato quinasa
C	Control: inóculo empleado en los ensayos de FO en modo semicontinuo
CaO	Óxido de calcio (cal agrícola)
CG	Cromatografía de gases
CO	Monóxido de Carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
CoAT	CoA-transferasa
CH ₄	Metano
DCC	Diseño de composición central

Abreviatura	Término
DQO	Demanda química de hidrógeno
Etf	flavoproteínas de transferencia de electrones
Fe	Hierro
Fdox	Ferredoxina oxidada
Fdred	Ferredoxina reducida
FO	Fermentación oscura
FO-LA	Fermentación oscura impulsada por lactato
GEI	Gases de efecto invernadero
H	Efluente asociado a alta HPR
H ₂	Hidrógeno
H ₂ asa	Hidrogenasa
He	Helio
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
iLHD	Lactato deshidrogenasa independiente de NAD ⁺
L	Efluente asociado a baja HPR
LctP	Lactato permeasa
LD	Lógica difusa
Mg	Magnesio
MRS	Agar Man, Rogosa y Sharpe
MSR	Metodología de superficie de respuesta
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada/reducida

Abreviatura	Término
NFOR	NADH:ferredoxina oxidorreductasa
PCD	Propionil-CoA deshidrogenasa
PFL	Piruvato:formato liasa
PFOR	Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa
PTA	Fosfato acetiltransferasa
PTB	Fosfotransbutirilasa
Ni	Niquel
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
PDA	Pérdidas y desperdicios de alimentos
RMSE	Error cuadrático medio
SMR	Suma de cuadrados de los errores
SPE	Sustancias poliméricas extracelulares
STD	Condiciones estándar de temperatura y presión
TSA	Caldo de tripticasa de soya
TSB	Agar tripticasa de soya

Resumen

La transición energética hacia la neutralidad de carbono posiciona al hidrógeno como un vector estratégico, lo que exige que su producción migre desde rutas basadas en combustibles fósiles hacia alternativas renovables. Entre ellas, la fermentación oscura en cultivos mixtos ofrece una alternativa atractiva al valorizar residuos orgánicos y promover la economía circular; sin embargo, su estabilidad se ve comprometida por la dinámica microbiana, especialmente en residuos ricos en carbohidratos donde proliferan bacterias ácido lácticas. Aunque el ácido láctico se ha descrito tradicionalmente como un inhibidor de bacterias productoras de hidrógeno (BPH), evidencia reciente indica que, bajo limitación de carbohidratos, este metabolito puede actuar como sustrato para BPH y contribuir a la estabilidad del proceso al disminuir la competencia microbiana. En esta investigación se evaluó la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura usando mucílago de café (*Coffea arabica*) acidificado naturalmente como sustrato enriquecido en ácido láctico, analizando el efecto combinado del tiempo de retención hidráulica (TRH: 0,5-3,5 días) y la concentración de ácido láctico en la alimentación (C_{AL} : 5-35 g/L) sobre el desempeño operativo, la cinética y la comunidad microbiana en un biorreactor semicontinuo operado bajo condiciones mesofílicas ($31,0 \pm 1,0$ °C) y pH 6,7. Los resultados indican que combinaciones de $TRH \leq 1$ día y C_{AL} de 10 - 20 g/L favorecieron la producción de hidrógeno y ácido butírico, con baja acumulación de ácido propiónico, consistente con el predominio de rutas fermentativas butíricas. El ajuste cinético con el modelo de Gompertz modificado evidenció coincidencia temporal entre el máximo consumo de ácido láctico y la máxima actividad

hidrogenogénica. Desde la perspectiva microbiológica, el régimen operativo actuó como una presión de selección, favoreciendo la persistencia de un núcleo funcional resiliente. Se identificaron géneros clave como *Lysinibacillus*, *Bacillus* y *Enterobacter*, cuya presencia se asoció a las altas tasas de producción de hidrógeno a TRH de 0,5 días y C_{AL} de 20 g/L. En conclusión, el acoplamiento estratégico de TRH y C_{AL} es crítico para la estabilidad y configuración funcional del consorcio microbiano durante la fermentación oscura semicontinua impulsada por lactato. Finalmente, el mucílago de café acidificado demostró ser un sustrato viable y representativo, lo que abre posibilidades para extrapolar estos principios hacia otros residuos agroindustriales ricos en ácido láctico, consolidando esta ruta como alternativa biotecnológica robusta para la producción de energía limpia.

Abstract

The energy transition toward carbon-neutral system defines hydrogen as a strategic energy vector, which requires its production to shift from fossil fuel-based routes to renewable alternatives. Among them, dark fermentation in mixed cultures offers an attractive option by valorizing organic residues and promoting a circular economy; however, process stability depends upon microbial dynamics, particularly carbohydrate-rich waste with the proliferation of lactic acid bacteria. Although lactic acid has traditionally been described as inhibitor of hydrogen-producing bacteria (HPB), recent evidence indicates that at carbohydrate limitations this metabolite can act as substrate for HPB and contributes to process stability by reducing microbial competition. In this research, biohydrogen production via dark fermentation was evaluated using naturally acidified coffee mucilage (*Coffea arabica*) as a lactic acid-enriched substrate, analyzing the combined effect of hydraulic retention time (HRT: 0.5-3.5 days) and lactic acid concentration in the feed (C_{LA} : 5-35 g/L) on operational performance, kinetics, and microbial community in a semi-continuous bioreactor operated at mesophilic conditions (31.0 ± 1.0 °C) and pH 6.7. The results indicate that $HRT \leq 1$ day and C_{LA} of 10-20 g/L favored hydrogen and butyric acid production, with low propionic acid accumulation, consistent with the predominance of butyrate-type fermentation pathways. Kinetic fitting according to the modified Gompertz model revealed temporal coincidence between maximum lactic acid consumption and maximum hydrogenogenic activity. From a microbial point of view, the operating regime acted as a selective pressure, promoting the persistence of a resilient functional core. Key genera such as *Lysinibacillus*, *Bacillus* and *Enterobacter* were

identified, whose presence was associated with high hydrogen production rates and HRT of 0.5 days and C_{LA} of 20 g/L. In conclusion, the strategic coupling of HRT and C_{AL} is critical for stability and functional configuration of the microbial consortium during lactate driven semi-continuous dark fermentation. Finally, naturally acidified coffee mucilage proved to be a viable and representative substrate, offering opportunities to extrapolate these principles to other lactic acid-rich agro-industrial waste, thereby consolidating this route as a robust biotechnological alternative for clean energy production.

Capítulo I. Introducción

1. Introducción

El uso de materias primas y fuentes energéticas — biomasa, agua, combustibles fósiles, metales y minerales — ha sustentado el desarrollo económico y social. Sin embargo, la persistencia en un modelo lineal de producción y consumo ha intensificado la extracción de recursos naturales y el uso de energía, lo que ha contribuido al incremento de residuos que, con frecuencia, se disponen sin tratamiento, con efectos adversos para el ambiente. Este escenario, junto con el crecimiento poblacional y la presión creciente de la disponibilidad de recursos, exige transitar hacia sistemas productivos más eficientes. En consecuencia, la economía circular propone ciclos regenerativos orientados a reducir el consumo de materias primas y energía, y a minimizar la generación de residuos y emisiones mediante estrategias de prevención, reutilización y valorización (Silva & Franz, 2022; Aiguobarueghian et al.,2024).

En este contexto, adquiere especial relevancia que el sector agroindustrial implemente alternativas que integren la producción de energía y la valorización de la biomasa residual, con el propósito de avanzar a modelos circulares que reduzcan la dependencia de combustibles fósiles, mitiguen emisiones de gases de efecto invernadero y mejoren la gestión de residuos (Silva & Franz, 2022; Perea-Moreno & Muñoz-Rodríguez, 2024). En conjunto, este enfoque se alinea estratégicamente con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en particular con los ODS 7, 12

y 13, adoptados por las Naciones Unidas (Ali et al., 2023). Dentro de estas alternativas, la fermentación oscura mediante consorcios microbianos se ha propuesto como una vía promisorio para la gestión y valorización de biomasa residual, mediante la conversión de materia orgánica en productos energéticos, particularmente biohidrógeno (Ghimire et al., 2015; Bastidas-Oyanedel et al., 2019; Baeyens, et al., 2020; Cheng et al., 2022; Ahmad et al., 2024).

El hidrógeno, a su vez, es un insumo estratégico para diversas cadenas industriales, entre ellas, la producción de fertilizantes y la industria siderúrgica. Adicionalmente, se reconoce como un vector energético con potencial para apoyar la descarbonización y la transición hacia matrices energéticas más limpias, en la medida en que su producción se sustente en rutas sostenibles (Faye et al., 2022; Dincer, 2023). En este sentido, la obtención de biohidrógeno a partir de residuos agroindustriales adquiere especial interés, al vincular la generación de un vector energético con la valorización de materiales residuales y la reducción de impactos ambientales asociados a su disposición (Cheng et al., 2022; Ahmad et al., 2024). De manera particular, en regiones con alta actividad agroindustrial, existe la oportunidad relevante para impulsar esquemas de producción descentralizada de biohidrógeno, en los que el aprovechamiento local de residuos puede contribuir a disminuir presiones logísticas asociadas al manejo y transporte de biomasa, además de incorporar valor a estos materiales (Talapko et al., 2023).

Sin embargo, el desempeño de la fermentación oscura puede verse comprometido por la naturaleza compleja de los sustratos y por la dinámica de los consorcios

microbianos, los cuales pueden desviar el flujo de carbono hacia metabolitos alternativos o favorecer poblaciones no productoras de hidrógeno, afectando la estabilidad y la eficiencia del proceso (Navarro-Díaz et al., 2020). En particular, la acumulación de intermediarios como el ácido láctico, frecuentemente asociada a la actividad de bacterias ácido lácticas, puede constituir un punto crítico de control, ya sea por sus efectos inhibitorios o por su potencial aprovechamiento como precursor bajo estrategias operacionales específicas (Navarro-Díaz et al., 2020; García-Depraect et al., 2021).

Con base en lo expuesto, la evidencia disponible sobre el aprovechamiento del ácido láctico como precursor para la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura continúa siendo limitada, particularmente cuando se emplean consorcios microbianos autóctonos provenientes de residuos orgánicos. Asimismo, persiste un vacío en el conocimiento respecto a estrategias de operación semicontinua que permitan sostener una bioconversión eficiente y estable del ácido láctico a hidrógeno (Regueira-Marcos et al., 2025), mediante el control de variables operacionales que favorezcan: i) la predominancia de rutas metabólicas consumidoras de lactato vinculadas a la producción de hidrógeno; ii) la selección y estabilización de la comunidad microbiana funcional; y iii) la mitigación de efectos inhibitorios asociados al sustrato y a la acumulación de metabolitos. A partir de esta brecha, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo influyen el tiempo de retención hidráulica (TRH) y la concentración de ácido láctico en la alimentación (C_{AL}) en el desempeño de la producción de hidrógeno durante la fermentación oscura semicontinua de un sustrato complejo enriquecido con ácido láctico?

En consecuencia, la presente investigación evalúa el efecto conjunto del TRH y de la CAL derivado de la acidificación natural del mucílago de café, sobre la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura en cultivos mixtos operados en modo semicontinuo. El mucílago de café se considera aquí un sustrato complejo rico en carbohidratos, similar a otros residuos agroindustriales que, tras procesos espontáneos de fermentación láctica, generan matrices ricas en ácido láctico. En este sentido, la novedad de este estudio radica en evaluar la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura impulsada por lactato bajo operación semicontinua, a partir de un residuo agroindustrial poco explorado y en condiciones experimentales que se aproximan a un escenario de operación más representativo de una aplicación industrial, evitando etapas adicionales de acondicionamiento del sustrato, uso elevado de reactivos químicos o esquemas operacionales de mayor complejidad. Bajo esta perspectiva, los resultados no solo permiten determinar condiciones operativas favorables para potenciar el uso del ácido láctico como precursor y mejorar la productividad y estabilidad del bioproceso, sino que también aportan criterios transferibles para orientar estrategias de valorización energética para otros residuos orgánicos de naturaleza similar.

1.1. Hipótesis

La concentración del ácido láctico proveniente de la acidificación natural del mucílago de café y el tiempo de retención hidráulica afecta significativamente la población microbiana, el rendimiento y la tasa de producción de hidrógeno durante la fermentación oscura en modo semicontinuo.

1.2. Objetivos

Objetivo General

Estudiar la producción de hidrógeno por fermentación oscura en modo semicontinuo utilizando ácido láctico proveniente de la acidificación natural del mucílago de café.

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de la concentración del ácido láctico proveniente de la acidificación natural del mucílago de café y el tiempo retención hidráulica en la producción de hidrógeno por fermentación oscura en modo semicontinuo.
2. Identificar bioquímicamente la población microbiana involucrada en el proceso de fermentación oscura en modo semicontinuo al usar como sustrato el ácido láctico proveniente del mucílago de café generado mediante la acidificación natural.
3. Modelar el consumo de sustrato, producción de hidrógeno y formación de ácidos grasos volátiles durante la fermentación oscura del ácido láctico en un biorreactor operado en semicontinuo.

1.3. Bibliografía

- Ahmad, A., K, R., Hasan, S. W., Show, P. L., & Banat, F. (2024). Biohydrogen production through dark fermentation: Recent trends and advances in transition to a circular bioeconomy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 335–357. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.05.161>
- Aiguobarueghian, I., Adanma, U. M., Ogunbiyi, E. O., & Solomon, N. O. (2024). Waste management and circular economy: A review of sustainable practices and economic benefits. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 22(2), 1708-1719. <https://doi.org/10.305/wjarr.2024.22.2.1517>
- Ali, S. M., Appolloni, A., Cavallaro, F., D'Adamo, I., Di Vaio, A., Ferella, F., Gastaldi, M., Ikram, M., Kumar, N. M., Martin, M. A., Nizami, A.-S., Ozturk, I., Riccardi, M. P., Rosa, P., Santibanez Gonzalez, E., Sassanelli, C., Settembre-Blundo, D., Singh, R. K., Smol, M., ... Zorpas, A. A. (2023). Development Goals towards Sustainability. *Sustainability*, 15(12), 9443. <https://doi.org/10.3390/su15129443>
- Bayens, J., Zhang, H., Nie, J., Appels, L., Dewil, R., Ansart, R., Deng, Y. (2020). Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 110023. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110023>
- Bastidas-Oyanedel, J. R., Bonk, F., Thomsen, M. H., & Schmidt, J. E. (2019). The Future Perspectives of Dark Fermentation: Moving from Only Biohydrogen to Biochemicals. In J. R. Bastidas-Oyanedel & J. E. Schmidt (Eds.), *Biorefinery* (pp. 375–413). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_15
- Cheng, D., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Deng, L., Chen, Z., Ye, Y., Bui, X. T., & Hoang, N. B. (2022). Advanced strategies for enhancing dark fermentative biohydrogen production from biowaste towards sustainable environment. *Bioresource Technology*, 351, 127045. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127045>
- Dincer, I. (2023). Hydrogen 1. 0: A new age. *International Journal of Hydrogen Energy*, 488, 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.01.124>
- Faye, O., Szpunar, J., & Eduok, U. (2022). ScienceDirect A critical review on the current technologies for the generation, storage , and transportation of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(29), 13771–13802. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.02.112>
- García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., Muñoz, R., Rene, E. R., León-Becerril, E.,

- Valdez-Vazquez, I., Kumar, G., Reyes-Alvarado, L. C., Martínez-Mendoza, L. J., Carrillo-Reyes, J., & Buitrón, G. (2021). A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark fermentative processes. *Bioresource Technology*, 324, 124595. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124595>
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. In *Applied Energy* (Vol. 144, pp. 73–95). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Navarro-Díaz, M., Martinez-Sanchez, M. E., Valdez-Vazquez, I., & Escalante, A. E. (2020). A framework for integrating functional and microbial data: The case of dark fermentation H₂ production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(56), 31706–31718. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.08.189>
- Perea-Moreno, A.J., Muñoz-Rodríguez, D. (2024). Agro-industrial Wastes Valorisation to Energy and Value-Added Products for Environmental Sustainability. In: Kapoor, R.T., Sillanpää, M., Zdarta, J., Rafatullah, M. (eds) Biomass Valorization. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-8557-5_1
- Regueira-Marcos, L., Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2025). Biogenic hydrogen production from household food waste via lactate-driven dark fermentation: A comparative study of single-stage and two-stage configurations. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117672>
- Silva, C. L., & Franz, N. M. (2022). The global movement of the transition from linear production to the circular economy applied to the sustainable development of cities. *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science*. <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2022v11i2.p52-67>
- Talapko, D., Talapko, J., Erić, I., & Škrlec, I. (2023). Biological Hydrogen Production from Biowaste Using Dark Fermentation, Storage and Transportation. *Energies*, 16(8), 3321. <https://doi.org/10.3390/en16083321>

Capítulo II. Marco teórico

2.1. Hidrógeno: Vector energético clave para afrontar los desafíos de la transición energética

Los combustibles fósiles ejercen una poderosa influencia en el mercado mundial debido a su distribución, disponibilidad y volatilidad de sus precios, los cuales tienen un impacto significativo en la economía de numerosos países (IAE, 2022). Adicionalmente, la seguridad energética y el progreso socioeconómico están siendo amenazados por el previsible agotamiento de estos recursos no renovables para satisfacer la creciente demanda energética de una población en constante aumento. Esta situación es una consecuencia directa de la alta dependencia de la sociedad por los combustibles fósiles como principal fuente energética (Sharma et al., 2021).

El consumo creciente de los combustibles fósiles ha contribuido de manera significativa a acelerar los efectos negativos del cambio climático (Qureshi et al., 2023). Durante su combustión se generan gases de dióxido de carbono (CO_2) y otros gases de efecto invernadero (GEI), los cuales son liberados directamente en la atmósfera, causando un aumento de la temperatura global y la degradación del ambiente (Sharma et al., 2021). Además, los procesos de combustión producen partículas pequeñísimas de composición química variada, conocidas como material particulado, que contribuyen al desarrollo de enfermedades respiratorias y cardiovasculares, especialmente aquellas partículas con un diámetro menor o igual a $2,5\ \mu\text{m}$ (OMS, 2006). Esto representa un riesgo para la calidad de vida de las

personas, especialmente aquellas que viven en zonas urbanas, donde la industrialización y urbanización acelerada, junto con el crecimiento inusitado del parque automotor ocasionan un incremento en el ritmo de las emisiones (Pineda et al., 2018).

Lo anterior pone en coyuntura la necesidad de cambiar a un modelo energético sostenible basado principalmente en el uso de fuentes energéticas renovables para eliminar o reducir los problemas asociados al consumo de energía de origen fósil (Berenguer Sau, 2022). A pesar de la desaceleración económica causada por la pandemia de COVID-19, el año 2020 fue memorable por el incremento considerable en la capacidad energética renovable a nivel mundial, especialmente en energía solar y eólica, superando récords de años anteriores (IRENA, 2021c). Sin embargo, las tecnologías actuales aún no son suficientes para reducir de manera relevante la dependencia energética de combustibles fósiles (Faye et al., 2022), puesto que el 83% del consumo de energía primaria proviene de estos recursos, mientras que el 12,6% proviene de fuentes renovables (APPA Renovables, 2020).

Esto implica que, para lograr una transición rápida y segura hacia una economía de bajas o cero emisiones de carbono, es necesario considerar alternativas que, junto con las energías renovables, reduzcan de manera significativa la dependencia de fuentes fósiles en las próximas décadas (IRENA, 2021d). En este sentido, el hidrógeno emerge como una opción prometedora para superar los desafíos relacionados con la energía, el medio ambiente y la economía.

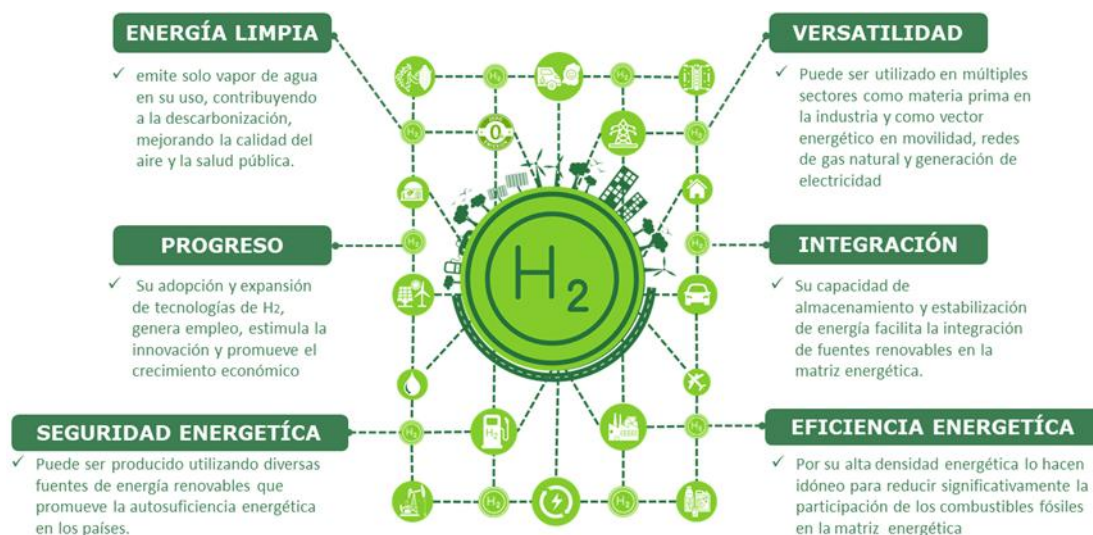


Figura 2-1. Beneficios claves del hidrógeno renovable en la transición energética. Elaboración propia.

Gracias a sus ventajas ampliamente reconocidas como vector energético e insumo para la industria (Figura 2-1), muchos países consideran que el hidrógeno es una pieza clave para alcanzar un sistema neutro en carbono para el año 2050, allanando el camino hacia un futuro más sostenible para las generaciones venideras (Dincer, 2023; Qureshi et al., 2023). Es así, que, en los últimos diez años, se están dando grandes pasos para establecer una economía basada en hidrógeno, evidenciados en el aumento de aplicaciones tecnológicas, particularmente en el sector transporte, y en el desarrollo de ambiciosos planes nacionales de infraestructura de carga y producción (Vásquez et al, 2018; IRENA, 2021b).

En América Latina, Chile fue pionero al lanzar su Estrategia Nacional de Hidrógeno en 2020, seguido por Colombia en 2021 y Argentina, Brasil, Panamá y Uruguay en 2023 (IEA, 2024). La formulación y el despliegue de estas estrategias han permitido estructurar hojas de ruta, conformar carteras de proyectos y orientar instrumentos

regulatorios y de financiamiento para el desarrollo del hidrógeno, además de contribuir a la atracción de inversión (Gischler et al., 2023). En términos prospectivos, la región podría aprovechar su alta disponibilidad de recursos renovables para la producción hidrógeno, con el fin de apoyar la descarbonización de sectores intensivos en emisiones —como refinación, fertilizantes y siderurgia— y, paralelamente, posicionarse como proveedor competitivo de hidrógeno y derivados hacia mercados de Norteamérica, Europa y Asia, impulsando el desarrollo de capacidades técnicas, la creación de empleo y el crecimiento de la economía (Gallardo, et al., 2022; IEA, 2024).

En particular, Chile ha avanzado notablemente en la estructuración de proyectos orientados a la exportación, con la meta de convertirse en un actor relevante del hidrógeno renovable hacia 2030. Un caso temprano de implementación es la planta piloto Haru Oni, ubicada en la región de Magallanes (Patagonia chilena), inaugurada en 2022. Este proyecto aprovecha el recurso eólico de la zona para producir hidrógeno renovable que, combinado con CO₂ capturado de la atmósfera, permite sintetizar combustibles neutros en carbono (e-fuels) destinados a mercados internacionales, como Alemania. Este hito evidencia el avance en capacidades técnicas especializadas y la capacidad de atraer inversión estratégica (IEA, 2024; Gomes et al., 2024).

En contraste, países como Colombia, México y Brasil han priorizado inicialmente el hidrógeno como herramienta para la descarbonización doméstica de sus economías, contemplando la exportación como una meta de mediano o largo plazo.

En Colombia, a partir de la adopción de la estrategia nacional en 2021 y su actualización en 2024, se han anunciado más de 30 proyectos piloto y precomerciales; algunos ya operan, incluyendo producción piloto de hidrógeno en la Refinería de Cartagena (Ecopetrol) y demostraciones de movilidad con buses impulsados por hidrógeno en Bogotá (IEA, 2024; Gomes et al., 2024).

Estos casos ilustran que, si bien América Latina aún enfrenta desafíos estructurales —como costos de producción, consolidación de demanda y desarrollo de infraestructura—, ya se observan señales claras de despliegue tecnológico, aprendizaje institucional y articulación público-privada. La superación de estas barreras será determinante para materializar las oportunidades identificadas y asegurar la viabilidad económica y ambiental de la transición hacia una economía regional del hidrógeno (Gomes et al., 2024).

2.2. La necesidad de hidrógeno renovable

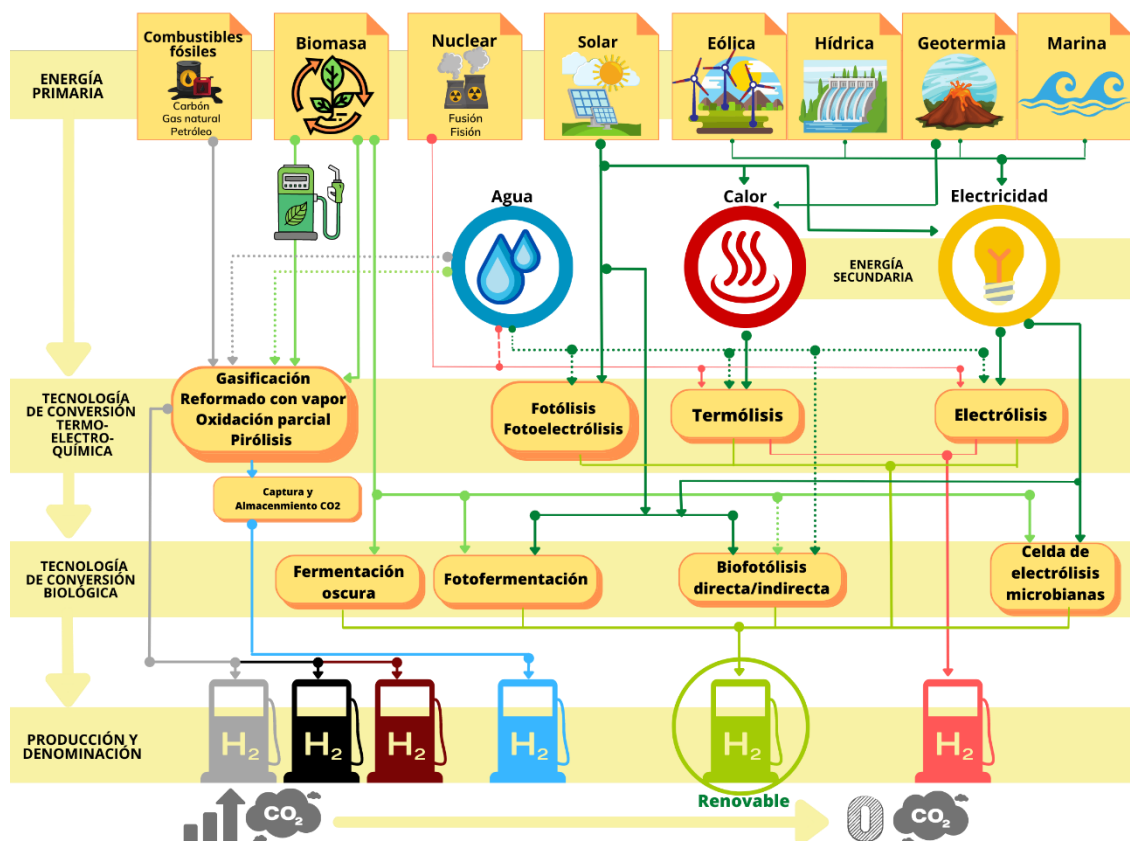
A pesar de ser uno de los elementos químicos más comunes en la naturaleza, el hidrógeno no se encuentra disponible en su forma pura (H_2) de manera libre. En su lugar, está asociado con otros elementos y debe ser extraído de diversas fuentes hidrogenadas, lo que requiere procesos que consumen energía (Sharma et al., 2021). Esta situación complica y plantea desafíos para su adopción masiva y no contaminante, debido a que actualmente el 95% del hidrógeno a nivel mundial, destinado principalmente como insumo a la industria, proviene de los combustibles fósiles (IRENA, 2021a), siendo el reformado de gas natural con vapor y gasificación

del carbón una de las tecnologías de producción más empleadas (Hermesmann & Müller, 2022). No obstante, estas tecnologías emiten niveles elevados de CO₂, que equivalen alrededor de 10 kg de CO_{2eq}/kg H₂ (Hydrogen Council, 2021). En el año 2020, se utilizaron aproximadamente 120 Mt/año de hidrógeno, y se estima que esta cifra aumentará a 530 Mt/año en 2050 (Hermesmann & Müller, 2022). Por lo tanto, resulta crucial que las futuras demandas de hidrógeno no dependan de los combustibles fósiles, ya que esto resultaría en un incremento significativo de las emisiones de CO₂. Dicho enfoque sería contradictorio con el objetivo de reducir o eliminar la dependencia energética de los combustibles fósiles y mitigar los efectos del cambio climático (Vásquez et al., 2018).

Dentro de este contexto, se hace evidente la necesidad de garantizar que las tecnologías asociadas a la producción de hidrógeno sean amigables con el ambiente y eficientes, con el fin de consolidar el hidrógeno como un vector energético completamente limpio y sostenible (IRENA, 2021d). En este sentido, se está llevando a cabo investigaciones y aplicaciones de diversas tecnologías para la producción comercial de hidrógeno a partir de fuentes renovables (Figura 2-2).

Específicamente, se están realizando esfuerzos para reducir los costos y mejorar la eficiencia de producción de hidrógeno renovable mediante la electrólisis del agua, que es una de las tecnologías renovables más maduras y preferenciales por muchos países, junto con la tecnología de reformado de gas natural con captura y almacenamiento del CO₂, para asegurar un suministro sostenible y competitivo de hidrógeno a mediano plazo (Hydrogen Council, 2021; IRENA, 2021d). Ambas

tecnologías permitirán producir hidrógeno con emisiones menos de 1,5 kg CO_{2eq}/kg H₂ (Hydrogen Council, 2021), siempre y cuando la electrólisis utilice electricidad suministrada por fuentes renovables como la energía hidroeléctrica, solar y eólica (Sharma et al., 2021).



Las Líneas verdes son rutas de producción de hidrógeno renovable. Los colores de H₂ indican si su producción es sostenible o no, donde los colores grises, negros y marrón, es un H₂ no sostenible que proviene de combustibles fósiles, pero cuando una parte del CO₂ es secuestrado, el color es azul y es poco sostenible. En cambio, el color verde, es el H₂ obtenido por fuentes renovables, aunque se asocia principalmente a la tecnología de electrolisis, y el color rosado es el H₂ generado a partir de la energía nuclear. Ambos colores de producción son sostenibles por provenir de tecnologías bajas o cero emisiones de CO₂.

Figura 2-2. Tecnologías asociadas a la producción de hidrógeno. Modificado de Vásquez et al., 2018 y Dahiya et al., 2021.

Debe señalarse que aproximadamente el 3,9% del hidrógeno a nivel mundial proviene de la electrólisis (Baeyens et al., 2020); y a pesar de sus beneficios, su uso se ha visto limitado debido a los altos precios del hidrógeno renovable en comparación con el hidrógeno obtenido mediante tecnologías basadas en combustibles fósiles, ya que su producción requiere grandes cantidades de energía para la disociación de las moléculas de agua en hidrógeno y oxígeno (Sharma et al., 2021). Según estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Energías Renovables (IRENA, siglas en inglés), considerando diferentes niveles de costos de la electricidad, el costo de producción hidrógeno oscilará entre 2,13 y 5,11 USD/kg H₂, durante el período comprendido entre 2020 y 2030 (IRENA, 2021d). En contraste, el costo de producción de hidrógeno a través del reformado de gas natural o de la oxidación parcial de hidrocarburo con y sin captura de CO₂, es de aproximadamente 2,08 - 2,27 USD/kg H₂ y 1,63 -1,34 USD/ kg H₂, respectivamente (Sharma et al., 2021). Se espera que esta tecnología sea cada vez más competitiva a medida que se expanda la infraestructura de energías renovables, como la energía solar y eólica, y se incremente la capacidad de los electrolizadores, gracias al impulso y apoyo tanto del sector privado como gubernamental (Hydrogen Council, 2021; IRENA, 2021d). De hecho, IRENA proyecta que para el periodo entre el año 2040 y 2050, el costo de producción será entre 1,08 a 3,33 USD/kg H₂ (IRENA, 2021d).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que una expansión de esta tecnología generará un impacto considerable en otros aspectos como una mayor demanda de minerales y metales necesarios para respaldar las tecnologías de generación de

electricidad renovable y los electrolizadores (Hermesmann & Müller, 2022; Hydrogen Council, 2022). Esto podría afectar la viabilidad económica y sostenibilidad de la producción de hidrógeno renovable, ya que algunos de estos elementos son escasos y su extracción puede tener impactos ambientales negativos. Además, estos materiales a menudo se concentran en regiones geográficas específicas que podría generar desequilibrios geopolíticos y riesgos en la cadena de suministro (Luderer et al., 2019).

Por lo tanto, para respaldar la transición energética global a largo plazo, es necesario considerar una combinación de tecnologías asociadas a la producción de hidrógeno renovable, en lugar de depender exclusivamente de una solución. En este sentido, en las últimas dos décadas, ha suscitado mucho interés en las tecnologías asociadas a la producción biológica de hidrógeno como una alternativa sostenible para las futuras necesidades energéticas, ya que pueden utilizar una fuente renovable abundante y baja en costos, son respetuosas con el ambiente, no son demandantes energéticamente, no requieren de condiciones de operación exigentes, permiten la producción descentralizada de hidrógeno y se pueden utilizar en áreas remotas o aisladas donde el acceso a otras fuentes de energía puede ser limitado (Singh & Das, 2019; Akhlaghi & Najafpour-Darzi, 2020; Sivaramakrishnan et al., 2021).

2.3. Producción biológica de hidrógeno: Fermentación oscura como una tecnología prometedora

El hidrógeno renovable puede producirse biológicamente mediante biofotólisis directa e indirecta, fotofermentación, fermentación oscura y celdas de electrólisis microbiana (Sivaramakrishnan et al., 2021). Estos procesos involucran microorganismos que convierten las moléculas de agua y sustratos orgánicos en hidrógeno, mediante la acción de dos enzimas claves, hidrogenasa y nitrogenasa (Akhlaghi & Najafpour-Darzi, 2020). Durante el proceso de conversión biológica, el CO₂ liberado durante la conversión biológica, puede ser fácilmente capturado y secuestrado lo que contribuye a la mitigación de emisiones (Hallenbeck, 2009). Se ha estimado que la aplicación de estas tecnologías puede reducir las emisiones de CO₂ entre 7,31 y 9,37 kg CO₂/kg H₂ (Manish & Banerjee, 2008). Además, se proyecta que el costo de producción de biohidrógeno de la fermentación oscura y fotofermentación se sitúe en torno a 2,57 y 2,83 USD /kg H₂, lo que lo convierte en una opción potencialmente competitiva frente a las fuentes de energías convencionales (Sharma et al., 2021). Cada una de estas tecnologías tiene sus fundamentos bioquímicos particulares, ventajas y desventajas, que se resumen en la Tabla 2-1.

Entre las distintas tecnologías disponibles para la producción de biohidrógeno, la fermentación oscura (FO) operada en cultivos mixtos se ha posicionado como una opción especialmente prometedora y sostenible por ofrecer numerosas ventajas, ya

que permite la valorización de una amplia variedad de residuos orgánicos, al mismo tiempo contribuye a reducir su impacto ambiental.

Tabla 2-1. Tecnologías asociadas a la producción de biohidrógeno.

Tecnología	Fundamento	Ventajas	Desventajas
Biofotólisis directa	Microalgas verdes, bajo condiciones anaerobias y luz, escinden moléculas de agua en H ₂ y O ₂ mediante la acción de la enzima hidrogenasa.	- Uso de recursos naturales como luz solar y el agua. - Altos rendimientos de H₂. - Proceso libre de emisiones de CO₂.	- Cultivo costoso para un crecimiento óptimo (infraestructura y control ambiental). - Baja tasa de producción de H₂ por sensibilidad al oxígeno. - Requiere grandes superficies:
Biofotólisis indirecta	Microalgas y cianobacterias fijan CO ₂ y generan carbohidratos mediante fotosíntesis. Estos se convierten en H ₂ en condiciones oscuras y anaerobias por las enzimas hidrogenasa y nitrogenasa.	- Uso de energía solar como fuente renovable. - Reducción de emisiones de CO₂. - El proceso en dos etapas reduce inhibición por O₂. - Altos rendimientos.	- Conversión limitada de fotones causa baja tasa de producción. - La aplicación de dos etapas aumenta la complejidad y los costos del proceso. - Riesgo de oxidación del H₂ por enzimas captadoras.
Fotofermentación	Bacterias purpúreas no del azufre generan H ₂ bajo luz y condiciones anaerobias fermentando sustratos orgánicos mediante la enzima nitrogenasa.	- Buena conversión del sustrato. - Altos rendimientos. - Aprovechamiento de energía solar. - Sensibilidad menor al O₂.	- Costosa configuración y operación de biorreactores. - Baja eficiencia lumínica. - Altas demandas energéticas. - Requiere superficies extensas. - Limitaciones en la variedad de sustrato.
Celda de electrólisis microbiana	Bacterias electrogénicas en el ánodo transforman materia orgánica en electrones y protones. Estos fluyen hacia el cátodo, donde se genera hidrógeno con ayuda de corriente externa.	- Altos rendimientos. - Requerimiento de energía menor que la electrólisis convencional. - Tratamiento simultáneo de aguas residuales.	- Bajas tasas de producción - Necesidad de electrodos de gran área. - Requiere de bacterias especializadas. - Infraestructura costosa y compleja. - Alto consumo eléctrico.
Fermentación oscura	En condiciones anaerobias, bacterias fermentativas producen H ₂ en ausencia de luz mediante la enzima hidrogenasa, a partir de diversos sustratos orgánicos.	- Altas tasas de producción. - Configuración y operación simple del biorreactor. - Alta flexibilidad en la elección de sustratos (residuos orgánicos). - Bajo consumo energético. - Poca sensibilidad al O₂.	- Bajos rendimientos por conversión limitada del sustrato. - Restricciones termodinámicas. - Acumulación de subproductos (ácidos orgánicos). - Sensibilidad a condiciones de operación (pH, temperatura y concentración de sustrato).

Fuente: Akhlaghi & Najafpour-Darzi, 2020; Sivaramakrishnan et al., 2021.

La FO se destaca por su alta tasa de producción de hidrógeno, su facilidad de operación y la configuración sencilla de los biorreactores utilizados. Además, se caracteriza de no estar supeditado de etapas de esterilización del sustrato y ser independiente de la luz, lo que la hace aún más atractiva desde el punto de vista energético y ambiental. Durante el proceso, bacterias anaerobias facultativas y obligadas, sin la ayuda de la luz, transforman las fuentes de carbono y energía contenida en los residuos orgánicos para generar hidrógeno. Estas características la convierten en una tecnología clave para el desarrollo de una economía circular y limpia (Sen et al., 2019; Castelló et al., 2020; Menzel et al., 2020, Ahmad et al., 2024).

Aunque el proceso de producción de biohidrógeno mediante FO en cultivos mixtos puede generar rendimientos menores en comparación con otras tecnologías, su aplicación resulta prometedora para impulsar el desarrollo del concepto de biorrefinería debido a su capacidad de integración con otras tecnologías, siendo está el corazón de esta sinergia (Bastidas-Oyanedel et al., 2019). Como se muestra en la Figura 2-3, la FO no solo produce hidrógeno, sino también subproductos como CO₂, ácidos orgánicos de cadena corta (ácidos grasos volátiles, AGV) y alcoholes durante la bioconversión anaerobia de los sustratos contenidos en los residuos orgánicos a hidrógeno. Estos subproductos, en lugar de ser considerados desechos, pueden ser aprovechados por otras tecnologías para la producción adicional de hidrógeno, aumentando significativamente la eficiencia global de la generación de energía (Bastidas-Oyanedel et al., 2019).

Se ha demostrado que utilizar los efluentes solubles de FO como sustratos para celdas de electrólisis microbianas y fotofermentación es más eficiente que utilizar directamente la biomasa haciendo que sean más factibles (Akhlaghi & Najafpour-Darzi, 2020; Menzel et al., 2020; Ndayisenga et al., 2020). Además, estos subproductos tienen una amplia valorización en la industria ya que se pueden utilizar en la fabricación de plásticos, combustibles líquidos y moléculas biológicas activas, reduciendo así la dependencia de productos petroquímicos en los procesos de síntesis química (Bastidas-Oyanedel et al., 2019).

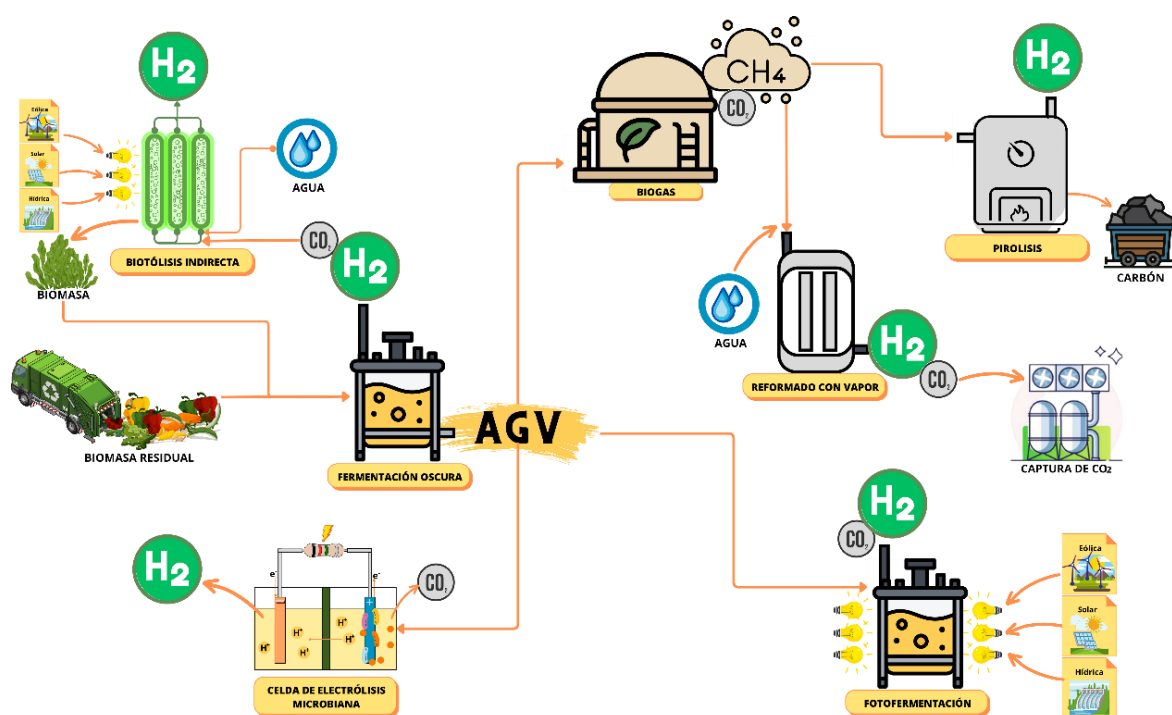


Figura 2-3. Interacción de diferentes tecnologías asociadas a la producción de biohidrógeno con la fermentación oscura. Elaboración propia.

2.4. Contexto, magnitud e impactos de los residuos orgánicos: Pérdidas y desperdicios de alimentos y subproductos del café

La transición y la seguridad energética no constituyen los únicos desafíos críticos a los que se enfrentan actualmente las naciones. La generación de residuos orgánicos representa, asimismo, un reto de gran magnitud por sus múltiples impactos ambientales, económicos y sociales, dado que su acumulación y manejo inadecuado amenazan la sostenibilidad de los sistemas alimentarios y agroindustriales, comprometiendo el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en especial los vinculados con la gestión de residuos, el agua limpia y saneamiento, la energía asequible y no contaminante y la acción por el clima (ODS 12, 6, 7 y 13).

Los residuos orgánicos derivados de las pérdidas y desperdicios de alimentos (PDA) constituyen una preocupación prioritaria: a nivel global, cerca de un tercio de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde o se desperdicia a lo largo de la cadena de valor, desde la producción primaria hasta el consumo final, mientras millones de personas padecen hambre (Wang et al., 2021). Esta problemática no solo evidencia un componente social crítico, sino también una ineficiencia en el uso de recursos como el agua, el suelo y la energía, así como pérdidas económicas para los actores involucrados en la cadena de suministro de alimentos (Durán-Sandoval & Durán-Romero, 2024). Además, constituye una fuente relevante de emisiones de GEI, especialmente metano (CH₄) y CO₂ (Scherhauser et al., 2018). De hecho, entre el 8% y el 10% de las emisiones de GEI se atribuyen a las PDA

(Durán-Sandoval & Durán-Romero, 2024), proporción que podría multiplicarse por tres en el 2050 (Ruiz et al., 2019).

En América Latina y el Caribe, las PDA alcanzan cerca de 127 millones de toneladas al año, lo que equivale al 34 % de la producción total de los alimentos en la región. La mayoría de los impactos ocurren en los eslabones de la producción y consumo, donde se estima que el 28% de las pérdidas y el 28% de los desperdicios tienen lugar, respectivamente. A pesar de los avances logrados en la estimación de las PDA en la región desde 2015, todavía más del 40% de estas no se han cuantificado (Ruiz et al., 2019). En Chile, se estima que la PDA asciende a 5,18 millones de toneladas de alimentos, equivalentes a 295 kg per cápita (Durán-Sandoval & Durán-Romero, 2024), mientras que en Colombia con una oferta nacional disponible de alimentos de 28,5 millones de toneladas, aproximadamente 9,76 millones de toneladas se pierden y se desperdician, de estas, 1,5 millones de toneladas se desperdiciados en los hogares, equivalentes a 32 kg per cápita (DNP, 2016).

En general, solo una fracción mínima de estos residuos son gestionados y valorizados, siendo el método predominante de tratamiento la disposición en vertederos, con tasas superiores al 90 %. En contraste, tecnologías más sostenibles como el compostaje y la digestión anaerobia tienen una implementación muy limitada, con tasas de uso entre el 1 % y el 6 %, y menos del 0,6 %, respectivamente (Wang et al., 2021). En este contexto, la gestión inadecuada de residuos orgánicos se ha convertido en un desafío clave para la mayoría de los países latinoamericanos.

Bajo este diagnóstico, resulta pertinente considerar los residuos agroindustriales generados en las etapas de producción y transformación, dado que en la región una proporción relevante de las PDA ocurre en estos eslabones, ya sea por mermas cuantitativas o por pérdidas de calidad de los alimentos que derivan en subproductos y fracciones orgánicas residuales (Ruiz et al., 2019). Además, la producción y la transformación agroindustrial generan residuos adicionales que no necesariamente se clasifican como PDA, pero que suelen presentarse como corrientes más concentradas —por volumen y carga orgánica— en puntos específicos de generación y que, cuando no se gestionan adecuadamente, pueden generar impactos ambientales y socioeconómicos negativos. En este grupo, los subproductos del café constituyen un caso representativo por varias razones, entre las cuales destacan: su generación sostenida y de gran volumen a lo largo de la cadena, desde el cultivo hasta la taza; su concentración localizada en países productores y en instalaciones de poscosecha y transformación, lo que facilita su identificación y potencial recolección; su elevada carga orgánica y el riesgo de impactos locales cuando se disponen sin tratamiento; y su potencial de valorización en esquemas de bioeconomía circular (Pongsiriyakul et al., 2024).

El café (*Coffea*) es uno de los productos agrícolas más comercializados a nivel mundial, consolidándose como la segunda bebida más consumida (Trujillo-González et al., 2024). Se cultiva en más de 70 países con climas tropicales y subtropicales, con Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia y Etiopía como los principales productores (Tsigkou et al., 2025). La Organización Internacional del Café estimó una producción de 178,0 millones de sacos de grano de café (60 kg)

para el año 2023/24. Asimismo, indicó que el consumo se concentra en países no productores (120,5 millones de sacos) con una participación destacada de Europa y Norteamérica a nivel regional, superando en más del doble el registrado en los países productores (56,5 millones; ICO, 2023).

La globalización del café ha contribuido a la modernización de su cadena de valor mediante innovación e industrialización, con impactos económicos relevantes. Se ha estimado que los agricultores aportan el 21%, los recolectores el 10%, los comerciantes el 18%, los procesadores el 29% y los minoristas el 22% del valor en la cadena (Parente-Laverde, 2020). En países no productores como el Reino Unido, por ejemplo, la facturación anual de la industria del café alcanza £7,2 mil millones, con un crecimiento promedio cercano al 7% durante los últimos seis años (Gosalvitr et al., 2023). En Colombia, el sector cafetero fue una de las primeras actividades económicas en penetrar mercados internacionales (Parente-Laverde, 2020) y el 52,3% de la producción de café se concentra en Antioquia, Meta, Tolima, Nariño y Córdoba, constituyendo una fuente estratégica de ingresos para la economía rural. Se ha reportado que el sector representa alrededor del 15% del PIB agrícola y genera aproximadamente 2,5 millones de empleos directos e indirectos. Además, esta actividad sustenta los medios de vida de cerca de 25 millones de familias campesinas, y aproximadamente 540.000 familias dependen directamente del cultivo del café (Betancourt et al., 2024).

Aunque el café cumple un papel económico fundamental, su cadena —aun mayoritariamente lineal— genera grandes volúmenes de subproductos de

composición heterogénea, desde el cultivo hasta el consumo final, que a menudo se eliminan de forma inadecuada (Acevedo et al., 2021; Duarte et al., 2021). En los países productores se concentran los principales impactos negativos, ya que, por cada 100 kg de fruto de café cosechado, menos del 6% de la biomasa se destina a la bebida, mientras que el resto se considera de escaso o nulo valor económico, que representan un riesgo significativo de contaminación (Basic et al., 2019; Duarte et al., 2021).

Para ilustrar lo anterior, la Figura 2-4 muestra la estructura del fruto de café y los principales flujos a lo largo de la cadena. Tras la recolección, los frutos de café se procesan a granos verdes durante el procesamiento poscosecha (beneficio) y trillado (Pongsiriyakul et al., 2024). En el beneficio, se remueven la piel externa y la pulpa, y luego el mucílago; después del lavado y secado se obtiene el café pergamino seco. En el trillado se retira el pergamino seco para acceder al grano verde, cubierto por una membrana delicada y translúcida denominada película plateada. Finalmente, los granos se destinan al tostado y molienda o a la fabricación de café instantáneo (Gmünder et al., 2020).

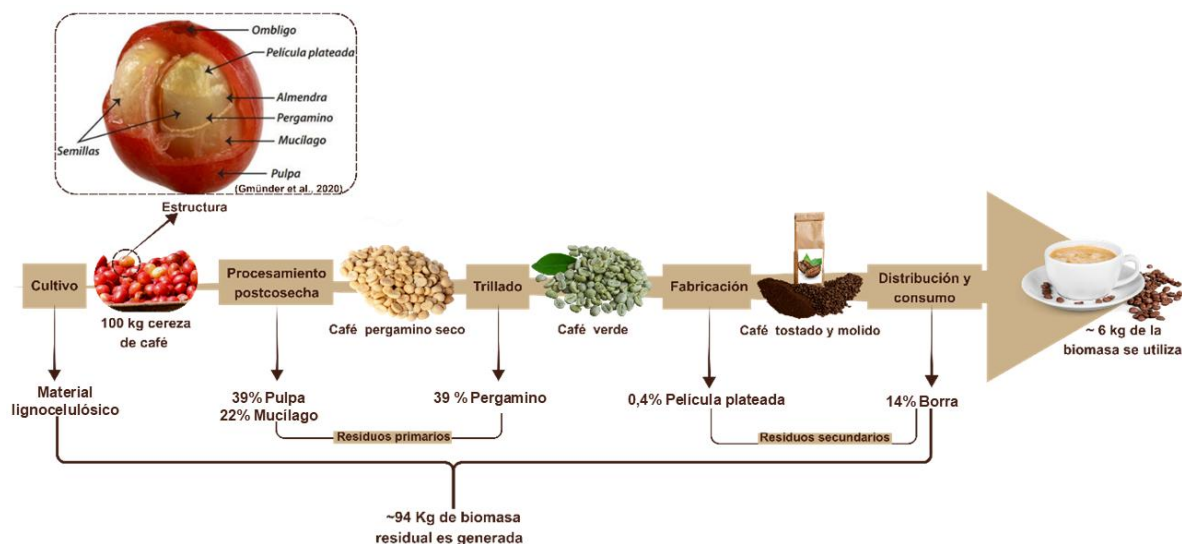


Figura 2-4. Estructura del fruto de café y flujos de biomasa a lo largo de la cadena.

Cada subproducto presenta características y composiciones químicas variables, en particular la pulpa, la cáscara, el mucílago y el pergamino, que se ven significativamente afectadas por diversos factores, como la especie, el método de procesamiento, la ubicación geográfica, el clima y las condiciones del suelo. En este sentido, el manejo deficiente de una cantidad masiva de estos residuos desde el cultivo hasta la preparación de la bebida, incrementa las cargas orgánicas y los impactos locales (Pongsiriyakul et al., 2024). A escala global, se ha estimado que el procesamiento del fruto, tostado y consumo generan 40,68 millones de toneladas de subproductos cada año (base seca; ICO, 2024), de las cuales alrededor de 20,5 millones de toneladas se originan durante el procesamiento. Una fracción importante de estos subproductos se concentran en Suramérica, con predominio de Brasil, considerando que este país aporta más del 71% de la producción anual de café en la región (Weldesemayat Sileshi et al., 2025).

En la práctica, una parte de los subproductos del café se destina a usos de bajo valor, principalmente en aplicaciones agrícolas como enmienda de suelos, compost o fertilizantes. Sin embargo, su aprovechamiento directo no siempre es adecuado, ya que algunos subproductos contienen compuestos bioactivos —p. ej., cafeína, taninos y ácidos fenólicos— que pueden generar efectos fitotóxicos y contaminar suelo y agua cuando se manejan de forma inadecuada (Pongsiriyakul et al., 2024). Lo anterior resulta especialmente desafiante para muchos caficultores, debido a las limitaciones económicas y tecnológicas que dificultan la adopción de sistemas más sostenibles, pues con frecuencia, el precio pagado por el café no cubre los costos de producción primaria ni garantiza condiciones dignas, afectando la rentabilidad y promoviendo el abandono de la actividad (Basic et al., 2019). Por ello, es relevante avanzar hacia principios de economía circular y promover la adopción de tecnologías que permitan revalorizar los residuos generados en cada etapa de la cadena, reduciendo su impacto ambiental y generando nuevas oportunidades económicas y de empleo, especialmente en comunidades caficultoras (ICO, 2024).

En respuesta a políticas globales orientadas a reducir emisiones de GEI y la dependencia de combustibles fósiles, ha crecido la adopción de alternativas energéticas sostenibles (Setter et al., 2020; Duarte et al., 2021). Entre ellas, el uso de biomasa residual destaca como opción económica y ambientalmente favorable por su abundancia y disponibilidad, ayudando a reducir sustancialmente las emisiones de GEI (Ahmad et al., 2024). En este contexto, la generación de biocombustibles sólidos, líquidos y gaseosos a partir de residuos de café, mediante procesos térmicos, químicos y biológicos, se ha investigado ampliamente para

agregar valor y evitar su disposición inadecuada (Moreno-Cárdenas et al., 2019; Duarte et al., 2021; Setter et al., 2020; Pongsiriyakul et al., 2024). Dentro de estos subproductos, el mucílago de café— rico en carbohidratos y nitrógeno— se perfila como sustrato idóneo para bioprocesos de valorización energética (Pongsiriyakul et al., 2024).

2.5. Potencial de los residuos orgánicos para la producción de biohidrógeno por fermentación oscura

Los azúcares simples, tales como glucosa, sacarosa y lactosa, son los sustratos más investigados en FO por los altos rendimientos de hidrógeno y constituir una fuente de carbono preferencial para la mayoría de BPH (Grause et al., 2012; Łukajtis et al., 2018; Castelló et al., 2020). No obstante, el uso de sustratos puros para fines energéticos es costoso y controversial desde la perspectiva de la seguridad alimentaria, lo que compromete la viabilidad económicamente a gran escala (Grause et al., 2012; Łukajtis et al., 2018; Akhlaghi & Najafpour-Darzi, 2020).

Algo similar ocurre al comparar cultivos puros con cultivos mixtos. Si bien los primeros — en particular *Clostridium* spp — muestran rendimientos elevados debido a que su operación es exigente por requerir sustratos simples, esterilización, aporte de nutrientes y anaerobiosis estrictas, aumentando los costos y la complejidad del proceso de FO (Łukajtis et al., 2018; Wainaina et al., 2019; Ziara et al., 2019). Por el contrario, los cultivos mixtos aportan diversidad metabólica y mayor resiliencia frente a variaciones de pH, oxígeno y composición del sustrato, permiten prescindir

de la esterilización y simplifican la operación y el control del proceso (Balachandar et al., 2013; Corbari et al., 2019; Navarro-Díaz et al., 2020). En consecuencia, múltiples revisiones sitúan la FO con cultivos mixtos como la opción más prometedora para la producción de biohidrógeno a gran escala (Balachandar et al., 2013; Bundhoo, 2019; Ghimire, et al., 2015; Guo et al., 2010; Łukajtis et al., 2018; Akhlaghi & Najafpour-Darzi, 2020; Cheng et al., 2022).

En este contexto, los residuos orgánicos se perfilan como el sustrato idóneo para la producción de biohidrógeno por FO, no solo por su amplia disponibilidad y diversidad de procedencias, sino también por su composición rica en carbohidratos —azúcares, almidón, celulosa—, así como en nutrientes (nitrógeno y fósforo) y micronutrientes (Fe, Mg, Ni) esenciales para el metabolismo y el crecimiento microbiano (Ghimire et al., 2015; Lucas et al., 2015). Estas características composicionales, a menudo acompañadas de comunidades microbianas autóctonas, favorecen la conversión fermentativa sin la necesidad de suministrar cultivos puros de BPH ni sustratos de alta pureza.

La producción de biohidrógeno mediante FO se ha investigado empleando una variedad de residuos orgánicos tales como fracciones orgánicas de residuos urbanos y municipales, residuos agrícolas y efluentes agroindustriales, abarcando la optimización de condiciones operativas, composición y codigestión, la aplicación de cultivos mixtos de diversa procedencia y su integración con otras tecnologías, las cuales han sido analizadas en numerosas revisiones (Li & Fang, 2007; Ren et al., 2009; Guo et al., 2010; Balachandar et al., 2013; Wong et al., 2014; Ghimire et

al., 2015; Panagiotopoulos, 2015; Urbaniec & Bakker, 2015; Bundhoo, 2019; Castelló et al., 2020; Shanmugam et al., 2021; Singh et al., 2021; Cheng et al., 2022; Hosseinzadeh et al., 2022).

Sobre esta base, Bundhoo (2019) compiló resultados de FO en residuos agrícolas provenientes de los cultivos de maíz, arroz, soja, trigo, caña de azúcar, remolacha, cassava, cebada, sorgo y aceite de palma, con el propósito de estimar el potencial de producción de biohidrógeno y bioenergético a escala mundial. El potencial de biohidrógeno más alto corresponde a la paja de arroz con 58,002 Mm³ H₂ por año, seguido de la paja de trigo con 34,680 Mm³ H₂ por año, equivalentes a 623 PJ y 373 PJ por año, respectivamente. El potencial aumenta cuando se aplican pretratamientos a matrices lignocelulósicas al liberar azúcares fermentables; sin embargo, los pretratamientos elevan los costos del proceso, en función del contenido de lignocelulosa del residuo. En contraste, los residuos con un alto contenido de almidón requieren pretratamientos simples y menos costosos (Cheng et al., 2022). Por tanto, la idoneidad del sustrato varía ampliamente, por lo que los criterios deben basarse en su biodegradabilidad y en la fracción de carbohidratos fermentables (Castelló et al., 2020).

En numerosas investigaciones, el pretratamiento del sustrato no fue imprescindible para lograr una evolución satisfactoria del bioproceso debido a la presencia de consorcios microbianos en los mismos residuos, que facilitaron la hidrólisis de polímeros a compuestos solubles y posteriormente fermentados por BPH, gracias al sinergismo con grupos hidrolíticos y otras funciones auxiliares (Guo et al., 2010;

Cabrol et al., 2017; Dahiya et al., 2021). No obstante, también se han reportado efectos negativos cuando los residuos orgánicos se emplean como fuente de inóculo, por la presencia de microorganismos consumidores y competidores que deprimen la producción de biohidrógeno, como arqueas metanogénicas y bacterias ácido lácticas (BAL; Corbari et al., 2019; Dahiya et al., 2021). De ahí que sea común aplicar pretratamientos al inóculo para enriquecer BPH. Con todo, las BAL han mostrado efectos contrastantes: algunos estudios indican que su presencia no es necesariamente perjudicial y puede resultar beneficiosa bajo ciertas condiciones (Correa-Villa et al., 2024), aspecto que se abordará con mayor detalle en el Capítulo 3.

Desde esta perspectiva, los residuos orgánicos son una matriz interesante por la presencia de microorganismos autóctonos o endógenos altamente especializados, con potencial para mejorar la eficiencia del proceso, aportar enzimas con la capacidad de metabolizar sustratos diversos y habilitar la biosíntesis de productos de alto valor, como entre ellos el biohidrógeno, ácidos orgánicos y alcoholes (Kumar et al., 2016; Villa Montoya et al., 2019). En consonancia, Villa Montoya et al. (2019) demostraron, en residuos de café, la presencia de consorcios microbianos, formados por bacterias y hongos con genes funcionales asociados al metabolismo hidrolítico y fermentativo, con capacidad para degradar lignina y fenoles bajo distintas condiciones operativas y producir biohidrógeno, ácido láctico, ácido acético y etanol; entre las especies predominantes se identificaron *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces* spp., y *Kazachstania* spp. De igual manera, Moreno-Cárdenas et al. (2019) aislaron los géneros *Kocuria*, *Streptococcus*,

Brevibacillus y *Micrococcus* a partir de la codigestión del mucilago de café y residuos de frivers, observando que los cultivos puros de cada género presentaron producciones de biohidrógeno inferiores a los alcanzados por el consorcio nativo, lo que sugiere una ventaja ecológica de la coexistencia comunitaria en la FO.

En términos generales, el potencial de los residuos orgánicos para la producción de biohidrógeno está determinado principalmente por su disponibilidad y por su composición química, particularmente en relación con el contenido de carbohidratos, preferiblemente azúcares fermentables. Por tanto, diversos residuos orgánicos pueden considerarse sustratos promisorios para la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura. La Tabla 2-2 resume ejemplos de residuos relevantes y sus principales características de interés en función de su disponibilidad y composición.

Tabla 2-2. Características de residuos orgánicos promisorios para la producción de biohidrógeno por fermentación oscura según su composición y disponibilidad.

Sustrato	Fuente	Disponibilidad	Composición	referencias
Mucílago de café	Beneficio húmedo del café	Se generan ~0,5-0,6 L/kg café producido	pH 4,9–5,6; Humedad 85–91%; Carbohidratos 82,7–85,9 % b.s., dominados por azúcares reductores; Presencia de K, Ca y P. pH 3,5 - 4,4; Humedad 93-95%;	a
Suero de queso ácido	Industria láctea	Se generan ~9 L/L queso procesado	Lactosa 66-72%; Ata DQO (50-80 g/L); Proteínas 8-15%; Minerales 7-15%; Ácido láctico 10-13%. pH <4,0;	b
Vinaza de tequila	Industria tequilera	se generan ~10–12 L/L de tequila producido	Alta materia orgánica (DQO>60 g/L); Adecuada biodegradabilidad; Carbohidratos 14,5 -25 g/L; Presencia de K, Ca; Mg y P.	c

Sustrato	Fuente	Disponibilidad	Composición	referencias
Desperdicios y residuos de alimentos	Distribución y consumo de alimentos (hogares, restaurantes, etc.).	Alta generación a lo largo de la cadena alimentaria	pH 4,5-6,5; Humedad 60-90%; Carbohidratos 40-60%; Proteínas 7-30%; Lípidos 10-40%; Composición variable según origen (país, región geográfica, etc.).	d
Orojo de manzana	Industria de jugo, sidra, vino	Representa 20-30% de la masa de la fruta fresca	Humedad 70-85%.; Carbohidratos 48,0-62,0%; Glucosa (2,5-12,4%), fructosa (18-31%) y sacarosa (3,4-24%). Presencia de celulosa (44%), hemicelulosa (4-24%) y lignina (15-23%).	e
Residuos de Frutas y verduras	Mercados, centrales de abasto/ agroindustria	Muy alta; generación diaria y estacional	pH 4,0-7,4; Humedad 80-90%; Carbohidratos 50-96,9%; Presencia de celulosa (4,0-26,9%); hemicelulosa (3,1-15,3%), lignina (3,0-12%); Proteínas 2,7-25,5%; Lípidos 1,0-22,3%; Composición variable según origen (país, región geográfica, etc.).	f

Datos presentados en porcentajes corresponde a unidades de concentración m/m; b.s: base seca; DQO: Demanda química de oxígeno.

Referencias: a) Puerta-Quintero et al (2011); Rangel et al. (2021) b) Aranda-Jaramillo et al. (2023); Ordoñez-Frías et al. (2024); c) García-Depraect et al. (2017); García-Depraect & León-Becerril (2023); d) Kannah et al. (2020); Gbiete et al. (2024) e) Iqbal et al. (2021); Yunusa y Karapinar (2025) f) Słopiecka et al. (2022); Edwiges et al. (2018)

2.6. Parámetros operacionales clave en la fermentación oscura

La FO es un proceso biológico altamente sensible a las condiciones de operación, ya que variables como la temperatura, el pH y el tiempo de retención hidráulica (TRH), entre otras, influyen de manera determinante sobre la estabilidad del proceso, la selección de la comunidad microbiana, las rutas metabólicas predominantes y, en consecuencia, sobre el rendimiento y la tasa de producción de hidrógeno (Bastidas-Oyanedel et al., 2019; Ahmad et al., 2024). A continuación, se describe los principales parámetros operacionales que condicionan la producción de hidrógeno mediante FO.

2.6.1. pH

El pH es uno de los parámetros más críticos en sistemas de FO con cultivo mixtos, ya que influye directamente en la composición microbiana, la actividad enzimática y la formación de los metabolitos (Feng et al., 2018; Łukajtis et al., 2018). Aunque la FO puede desarrollarse en un amplio rango de pH del medio, aproximadamente entre 3,0 y 11,0, se ha reportado que la máxima producción de hidrógeno suele ocurrir a valores entre 5,0 a 7,0 (Bastidas-Oyanedel et al., 2019). Por ello, el monitoreo y control del pH resulta fundamental para mantener la estabilidad del sistema, especialmente considerando que la producción de hidrógeno está intrínsecamente ligada a la generación de ácidos orgánicos como ácido acético y butírico (Łukajtis et al., 2018). Sin embargo, una disminución excesiva del pH, asociada a la acumulación de ácidos orgánicos puede inhibir la actividad de BPH y desviar las rutas metabólicas hacia productos menos favorables para la producción de hidrógeno, como ácido láctico o etanol (Detman et al., 2021). No obstante, el ácido láctico no solo puede actuar como un metabolito asociado a la inestabilidad del proceso, sino también como sustrato para la producción de hidrógeno en un intervalo de pH entre 5,0 y 7,0 (García-Depraect et al., 2021), aspecto que se desarrolla con mayor detalle en los Capítulos 3 y 4. Debe considerarse, además, que el intervalo óptimo de pH puede variar según el tipo de sustrato y la fuente de inóculo. En sistemas alimentados con residuos orgánicos, el pH también actúa como una presión de selección ecológica que condiciona la coexistencia entre BPH y otros microorganismos fermentativos, afectando con ello la estabilidad funcional del proceso (Detman et al., 2021).

2.6.2. Temperatura

La temperatura es otro parámetro clave que afecta el desempeño de la FO, debido a su influencia directa sobre el crecimiento microbiano y la actividad metabólica, lo que repercute en la selección de poblaciones microbianas y en la eficiencia de conversión del sustrato en hidrógeno (Łukajtis et al., 2018; García-Depraect et al., 2021). La FO puede desarrollarse bajo condiciones psicrófilas, mesófilas, termófilas e incluso hipertermófilas; sin embargo, los intervalos mesofílicos (30–40 °C) y termofílico (50–60 °C) han sido los más estudiados para la producción de hidrógeno (Gupta et al., 2024). En particular, la mayoría de los estudios sobre producción de hidrógeno a partir de ácido láctico se han realizado en condiciones mesofílicas, lo que sugiere que la actividad de BPH capaces de consumir ácido láctico estaría favorecida dentro de un rango relativamente de temperatura entre 30-40°C (García-Depraect et al., 2021).

La operación bajo condiciones mesofílicas presenta ventajas asociadas a una demanda energética moderada y a una mayor estabilidad del consorcio microbiano, especialmente cuando se emplean residuos orgánicos como sustrato. Estas condiciones suelen favorecer comunidades más diversas y resilientes, aunque no siempre conducen a la máxima tasas de producción (Ghimire et al., 2015; Ferreira et al., 2020). En cambio, la operación termofílica puede aumentar la velocidad de hidrólisis y fermentación, mejorar la transferencia de masa y restringir el desarrollo de ciertos microorganismos consumidores de hidrógeno, lo que en algunos casos se traduce en una mayor productividad (Jariyaboon et al., 2023; Ferreira et al.,

2020). No obstante, también puede incrementar la sensibilidad del sistema frente a perturbaciones y elevar los requerimientos energéticos para el control térmico (Ghimire et al., 2015).

2.6.3. Modo de operación del biorreactor

La FO puede desarrollarse bajo distintos modos de operación del biorreactor, entre ellos discontinuo, semicontinuo y continuo, cada uno con implicaciones específicas sobre la dinámica del sistema y desempeño del proceso (Fontanille, 2020; Mokhtarani et al., 2025).

Los biorreactores operados en modo discontinuo se utilizan principalmente para evaluar el potencial hidrogenogénico de un sustrato, estudiar rutas metabólicas y explorar condiciones iniciales de operación (Fontanille, 2020). Además, presentan un diseño simple y de bajo costo, lo que facilita el control de parámetros como el pH y la temperatura (Łukajtis et al., 2018). Sin embargo, su aplicación se concentra principalmente a escala de laboratorio, debido a que su capacidad para representar condiciones sostenidas de operación es limitada. Durante este tipo de operación, el volumen de fermentación se mantiene prácticamente constante, ya que no existe ingreso ni salida de la corriente semilíquida. En consecuencia, el sustrato se consume progresivamente y los metabolitos solubles se acumulan en el interior del biorreactor, lo que puede inhibir la actividad microbiana y reducir la productividad del proceso (Fontanille, 2020). Por esta razón, la operación discontinua presenta limitaciones para evaluar el comportamiento del sistema bajo condiciones cercanas a una operación prolongada o escalable (Fontanille, 2020; Mokhtarani et al., 2025).

En contraste, la operación continua permite una alimentación permanente del sustrato y una descarga simultánea del efluente, lo que ofrece ventajas para mantener condiciones operacionales más estables en el tiempo y evaluar la productividad del sistema en condiciones cercanas a una aplicación industrial (Fontanille, 2020). Bajo este régimen, el biorreactor puede alcanzar un estado estacionario, caracterizado por un volumen y composición relativamente constante del medio de fermentación, así como por una productividad sostenida en el tiempo (Mokhtarani et al., 2025). Sin embargo, requiere un control más estricto de las variables operativas y puede ser más susceptible al lavado de la biomasa celular o a inestabilidades (Srivastava & Gupta, 2011; de Almeida Silva et al., 2020).

Por su parte, la operación semicontinua puede considerarse un régimen intermedio que combina la simplicidad del modo discontinuo con la posibilidad de alimentar el sustrato de manera intermitente y remover periódicamente una fracción equivalente del medio de fermentación, manteniendo un volumen de operación constante (Srivastava & Gupta, 2011; Fontanille, 2020). De este modo, se logra un efecto de dilución similar al de una operación continua, pero a pulsos, sin necesidad de alcanzar un estado estacionario (Srivastava & Gupta, 2011; de Almeida Silva et al., 2020). Esta modalidad no solo permite prolongar la productividad del proceso, sino que además la biomasa celular remanente en el biorreactor actúa como inóculo para cada nuevo ciclo de alimentación, lo que favorece la adaptación microbiana y permite mitigar, en cierta medida, el agotamiento del sustrato y la acumulación excesiva de metabolitos solubles observados en sistemas discontinuos (Bornazi,

2001; de Almeida Silva et al., 2020; Srivastava & Gupta, 2011). Estas características resultan especialmente útiles en estudios con sustratos complejos como los residuos orgánicos para la producción de biohidrógeno (Almeida Silva et al., 2020; Kim & Cho, 2025)

2.6.4. Tiempo de retención hidráulica

En sistemas semicontinuos y continuos, el tiempo de retención hidráulica (TRH) constituye un parámetro crítico, ya que corresponde al tiempo promedio durante el cual el sustrato permanece dentro del biorreactor (Łukajtis et al., 2018; Mokhtarani et al., 2025). En consecuencia, el TRH condiciona simultáneamente la disponibilidad de sustrato, la remoción de productos, el lavado de biomasa celular y la selección de microorganismos con distintas tasas de crecimiento y capacidades metabólicas. Por ello, la determinación de un TRH adecuado resulta fundamental para favorecer el crecimiento de BPH y alcanzar una producción estable y eficiente, dependiendo en gran medida del sustrato utilizado y de la respuesta de la comunidad microbiana (Łukajtis et al., 2018; Gupta et al., 2024).

Por ejemplo, en FO de residuos alimentarios en modo semicontinuo se han evaluado TRH de 72, 24, 12 y 6 h, observándose que el mayor porcentaje de hidrógeno en el gas generado y la máxima producción volumétrica se obtuvieron a un TRH de 24 h, lo que indica que valores excesivamente bajos no necesariamente maximizan el desempeño del sistema (Moreno-Andrade et al., 2015). De manera complementaria, en otro estudio con residuos de comida se evaluaron un TRH entre 8 y 48 h, encontrándose que el mayor porcentaje de hidrógeno en el gas y la mayor

tasa específica de producción ocurrieron a 48 h, mientras que la disminución del TRH incrementó la tasa de producción, pero redujo el contenido de hidrógeno en el gas y favoreció cambios en la comunidad microbiana, con predominio de *Clostridium* a TRH altos y de *Enterobacter* y *Lactobacillus* a TRH más bajos (Santiago et al., 2019).

2.6.5. Concentración de sustrato

La concentración del sustrato es una variable operacional importante en la FO, ya que determina la disponibilidad de carbono y energía para la comunidad microbiana que participa en el proceso. En general, un aumento moderado de la concentración del sustrato puede estimular la actividad fermentativa y favorecer la producción de hidrógeno (Ghimire et al., 2015; Elbeshbishy et al., 2017; Park et al., 2021). Sin embargo, la formación de hidrógeno no aumenta indefinidamente con el incremento del sustrato, ya que existe un límite en la cantidad de materia orgánica que una comunidad microbiana puede procesar eficientemente dentro del biorreactor. Cuando el sustrato se encuentra en exceso, BPH pueden disminuir la biosíntesis de hidrógeno o desviar parte del flujo de carbono y electrones hacia otros productos fermentativos, como ácido propiónico o etanol. Asimismo, la cantidad de sustrato puede modificar la competencia entre las BPH y otros microorganismos, favoreciendo el predominio de grupos no hidrogenogénicos y, en consecuencia, el desvío del flujo de carbono y electrones hacia productos distintos del hidrógeno (Elbeshbishy et al., 2017; Park et al., 2021). Además, la concentración del sustrato en la alimentación no debe analizarse únicamente en términos de cantidad, sino también en relación con la composición y biodegradabilidad del residuo. En

sistemas que emplean residuos orgánicos complejos, un aumento en la concentración del sustrato implica no solo una mayor disponibilidad de compuestos fermentables, sino también acidificación excesiva, mayor entrada de sólidos, compuestos recalcitrantes y metabolitos solubles preformados, factores que pueden modificar la respuesta del consorcio microbiano y la concentración de productos en el sistema (Ghimire et al., 2015; Gupta et al., 2024; Mokhtarani et al., 2025).

2.7. Bibliografía

- Acevedo, M.-A., Peñaloza-Quintero, I., & Morales-Fonseca, D. (2021). Aprovechamiento de los polisacáridos de la pulpa de café residual para la obtención de bioetanol como estrategia hacia la bioeconomía. *Gestión y Ambiente*, 24, 100–113. <https://doi.org/10.15446/ga.v24nsupl3.99983>
- Ahmad, A., K, R., Hasan, S. W., Show, P. L., & Banat, F. (2024). Biohydrogen production through dark fermentation: Recent trends and advances in transition to a circular bioeconomy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 335–357. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.05.161>
- Aranda-Jaramillo, B., León-Becerril, E., Aguilar-Juárez, O., Castro-Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2023). Feasibility Study of Biohydrogen Production from Acid Cheese Whey via Lactate-Driven Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(644), 1–12. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070644>
- Asociación de Empresas de Energías Renovables (APPA Renovables). Estudio del impacto macroeconómico de las energías renovables en España 2020. Madrid: APPA Renovables; 2020.
- Akhlaghi, N., & Najafpour-Darzi, G. (2020). A comprehensive review on biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(43), 22492–22512. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.182>
- Baeyens, J., Zhang, H., Nie, J., Appels, L., Dewil, R., Ansart, R., & Deng, Y. (2020). Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 110023. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110023>
- Balachandar, G., Khanna, N., & Das, D. (2013). Biohydrogen Production from Organic Wastes by Dark Fermentation. In *Biohydrogen* (pp. 103–144). Elsevier

B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00006-4>

- Basic, Commerce Equitable France, The Repenser les Filières Collective, & France, M. Havelaar. (2019). Café: la historia de un éxito que oculta una crisis. Estudio de la sostenibilidad del café. Síntesis. *Cuaderno de Comercio Justo*, 11, 1–23.
- Bastidas-Oyanedel, J. R., Bonk, F., Thomsen, M. H., & Schmidt, J. E. (2019). The Future Perspectives of Dark Fermentation: Moving from Only Biohydrogen to Biochemicals. In J. R. Bastidas-Oyanedel & J. E. Schmidt (Eds.), *Biorefinery* (pp. 375–413). Springer Nature. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_15
- Berenguer Sau, J. (2022). Industria y transición energética. *Cataluña Económica*, 559, 34–37.
- Betancourt, J. A., Florez-Yepes, G. Y., & Garcés-Gómez, Y. A. (2024). Agricultural Productivity and Multidimensional Poverty Reduction in Colombia: An Analysis of Coffee, Plantain, and Corn Crops. *Earth*, 5(4), 623–639. <https://doi.org/10.3390/earth5040032>
- Bornazi, W. (2001). Fermentação semicontínua. En W. Schmidell, U. de Almeida Lima, W. Borzani, & E. Aquarone (Eds.), *Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica* (Vol. 2, pp. 219–222). Editora Blücher.
- Bundhoo, Z. M. A. (2019). Potential of bio-hydrogen production from dark fermentation of crop residues: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(32), 17346–17362. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.098>
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>
- Castelló, E., Nunes Ferraz-Junior, A. D., Andreani, C., Anzola-Rojas, M. del P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Gomes, S. D., Maintinguer, S. I., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Schiappacasse-Dasati, M., Tapia-Venegas, E., Valdez-Vázquez, I., Vesga-Baron, A., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 119). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>
- Cheng, D., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Deng, L., Chen, Z., Ye, Y., Bui, X. T., & Hoang, N. B. (2022). Advanced strategies for enhancing

dark fermentative biohydrogen production from biowaste towards sustainable environment. *Bioresource Technology*, 351, 127045. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127045>

Corbari, S. D. M. L., Andreani, C. L., Torres, D. G. B., Eng, F., & Gomes, S. D. (2019). Strategies to improve the biohydrogen production from cassava wastewater in fixed-bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(32), 17214–17223. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.242>

Correa-Villa, C., Moreno-Cárdenas, E., & de Bruijn, J. (2024). Presence of lactic acid bacteria in hydrogen production by dark fermentation: competition or synergy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(380), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04167-9>

Dahiya, S., Chatterjee, S., Sarkar, O., & Mohan, S. V. (2021). Renewable hydrogen production by dark fermentation: Current status, challenges and perspectives. In *Bioresource Technology* (Vol. 321). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124354>

de Almeida Silva, M. C., Monteggia, L. O., Alves Barroso Júnior, J. C., Granada, C. E., & Giongo, A. (2020). Evaluation of semi-continuous operation to hydrogen and volatile fatty acids production using raw glycerol as substrate. *Renewable Energy*, 153, 701–710. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.152>

Departamento Nacional de Planeación (DNP). (2016). *Pérdida y desperdicio de alimentos en Colombia*. Dirección de Seguimiento y Evaluación de Políticas Públicas.

Detman, A., Laubitz, D., Chojnacka, A., Wiktorowska-Sowa, E., Piotrowski, J., Salamon, A., Kaźmierczak, W., Błaszczuk, M. K., Barberan, A., Chen, Y., Łupikasza, E., Yang, F., & Sikora, A. (2021). Dynamics and complexity of dark fermentation microbial communities producing hydrogen from sugar beet molasses in continuously operating packed bed reactors. *Frontiers in Microbiology*, 11(612344), 19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612344>

Dincer, I. (2023). Hydrogen 1. 0: A new age. *International Journal of Hydrogen Energy*, 488, 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.01.124>

Duarte, A., Uribe, J. C., Sarache, W., & Calderón, A. (2021). Economic, environmental, and social assessment of bioethanol production using multiple coffee crop residues. *Energy*, 216. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.119170>

Durán-Sandoval, D. J., & Durán-Romero, G. (2024). Legislación sobre pérdida y

desperdicio de alimentos en Chile y la UE: un análisis comparativo. *Revista de Fomento Social*, 79(3), 495–529. <https://doi.org/10.32418/rfs.2024.310.5284>

Edwiges, T., Frare, L., Mayer, B., Lins, L., Triolo, J. M., Flotats, X., & Costa, M. S. de M. (2018). Influence of chemical composition on biochemical methane potential of fruit and vegetable waste. *Waste Management*, 71, 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.037>

Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G., & Lee, H. S. (2017b). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 656–668.

Faye, O., Szpunar, J., & Eduok, U. (2022). A critical review on the current technologies for the generation, storage, and transportation of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(29), 13771–13802. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.02.112>

Feng, K., Li, H., & Zheng, C. (2018). Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresource Technology*, 270, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.035>

Ferreira, T. B., Rego, G. C., Ramos, L., Menezes, C. A., & Silva, E. L. (2020). Improved dark fermentation of cane molasses in mesophilic and thermophilic anaerobic fluidized bed reactors by selecting operational conditions. *International Journal of Energy Research*, 44(13), 10442–10452. <https://doi.org/10.1002/er.5673>

Fontanille, P. (2020). Hydrogen generation in bioreactors. In *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes* (pp. 183–208). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817384-8.00008-x>

García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., Muñoz, R., Rene, E. R., León-Becerril, E., Valdez-Vazquez, I., Kumar, G., Reyes-Alvarado, L. C., Martínez-Mendoza, L. J., Carrillo-Reyes, J., & Buitrón, G. (2021). A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: the key to unlocking enhanced dark fermentative processes. *Bioresource Technology*, 324, 124595. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124595>

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

- García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2023). Use of a Highly Specialized Biocatalyst to Produce Lactate or Biohydrogen and Butyrate from Agro-Industrial Resources in a Dual-Phase Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(787), 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090787>
- Gbiete, D., Narra, S., Kongnine, D. M., Narra, M.-M., & Nelles, M. (2024). Insights into biohydrogen production through dark fermentation of food waste: Substrate properties, inocula, and pretreatment strategies. *Energies*, 17(24), 6350. <https://doi.org/10.3390/en17246350>
- Gallardo, R., Martínez, J., & Pérez, L. (2022). Hydrogen opportunities in Latin America: Regional competitiveness and export potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 158, 112142. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112142>
- Gischler, C., Boeck Daza, EF, Galeano, P., Ramírez, M., Gonzalez, J., Cubillos, F., Hartmann, N., Pradelli, V., Márquez, JS, Gutiérrez, JA, Juárez Hermosillo, JG, Alonso Rodriguez, C., Souilla, L. y Rabinovich, J. (2023). *Unlocking Green and Just Hydrogen in Latin America and the Caribbean*. <https://doi.org/10.18235/0004948>
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. In *Applied Energy* (Vol. 144, pp. 73–95). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Gmünder, S., Toro, C., Rojas Acosta, J. M., & Rodríguez-Valencia, N. (2020). Huella Ambiental del Café en Colombia. *Huella Ambiental del Café en Colombia*. <https://doi.org/10.38141/cenbook-0007>
- Gomes, I., Patonia, A., Gogorza, A., Caratori, L., Gama, N., Diazgranados, L., ... & Carlino, H. (2024). Hydrogen for the 'low hanging fruits' of South America: Decarbonising hard-to-abate sectors in Brazil. *Argentina, Colombia, and Chile*.
- Gosalvitir, P., Cuéllar-Franca, R. M., Smith, R., & Azapagic, A. (2023). An environmental and economic sustainability assessment of coffee production in the UK. *Chemical Engineering Journal*, 465, 142793. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142793>
- Grause, G., Igarashi, M., Kameda, T., & Yoshioka, T. (2012). Lactic acid as a substrate for fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(22), 16967–16973. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.08.096>

- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrre, H., & Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660–10673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Gupta, S., Fernandes, A., Lopes, A., Grasa, L., & Salafranca, J. (2024). Microbes and parameters influencing dark fermentation for hydrogen production. *Applied Sciences*, 14(23), 10789. <https://doi.org/10.3390/app142310789>
- Hallenbeck, P. C. (2009). Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7379–7389. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.080>
- Hermesmann, M., & Müller, T. E. (2022). Green, Turquoise, Blue, or Grey? Environmentally friendly Hydrogen Production in Transforming Energy Systems. *Progress in Energy and Combustion Science*, 90, 100996. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2022.100996>
- Hosseinizadeh, A., Zhou, J. L., Li, X., Afsari, M., & Altaee, A. (2022). Techno-economic and environmental impact assessment of hydrogen production processes using bio-waste as renewable energy resource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 156, 111991. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2021.111991>
- Hydrogen Council. (2021). *Hydrogen decarbonization pathways*. <https://hydrogencouncil.com/en/hydrogen-decarbonization-pathways/>
- IEA. (2022). World Energy Outlook 2022. In *International Energy Agency*.
- IEA. (2024). Global Hydrogen Review 2024 - Transport by pipeline. In *Global Hydrogen Review 2024*. In *International Energy Agency (IEA)*. www.iea.org/reports/global-hydrogen-review-2024
- ICO. (2023). *Coffee report and outlook. December 2023*. In International Coffee Organization. https://icocoffee.org/documents/cy2023-24/Coffee_Report_and_Outlook_December_2023_ICO.pdf
- ICO. (2024). *Beyond Coffee: Towards a Circular Economy in Coffee*. In international Coffee Organization. https://www.ico.org/documents/cy2023-24/CDR_Overview_2022_23.pdf
- Iqbal, A., Schulz, P., & Rizvi, S. H. (2021). Valorization of bioactive compounds in fruit pomace from agro-fruit industries: Present insights and future challenges. *Food Bioscience*, 44(Part A), 101384.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101384>

IRENA. (2021a). *Green hydrogen supply: A guide to policy*. International Renewable Energy Agency (IRENA).

IRENA. (2021b). *Green hydrogen supply: A guide to policy. International Renewable Energy Agency, Abu Dhabi*.

IRENA. (2021c). *Renewable Capacity Statistics 2021*. International Renewable Energy Agency (IRENA).

IRENA. (2021d). *World Energy Transitions Outlook: 1.5°C Pathway*. International Renewable Energy Agency (IRENA).

Jariyaboon, R., Hayeeyunu, S., Usmanbaha, N., Ismail, S., O-thong, S., Mamimin, C., & Kongjan, P. (2023). Thermophilic dark fermentation for simultaneous mixed volatile fatty acids and biohydrogen production from food waste. *Fermentation*, 9(7), 636. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070636>

Kannah, R. Y., Merrylin, J., Poornima Devi, T., Kavitha, S., Sivashanmugam, P., Gopalakrishnan Kumar, S., & Banu, J. R. (2020). Valorization of food waste: Biofuels and value-added products recovery. *Bioresource Technology Reports*, 11, 100524. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100524>

Kim, G., & Cho, K. (2025). Comparative analysis of H₂ production and microbial communities during dark fermentation of food waste under varying temperature and cultivation modes. *Bioresource Technology Reports*, 31(102279), 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2025.102279> Received

Kumar, G., Bakonyi, P., Kobayashi, T., Xu, K. Q., Sivagurunathan, P., Kim, S. H., Buitrón, G., Nemestóthy, N., & Bélafi-Bakó, K. (2016). Enhancement of biofuel production via microbial augmentation: The case of dark fermentative hydrogen. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57, 879–891. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.107>

Li, C., & Fang, H. H. P. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(1), 1–39. <https://doi.org/10.1080/10643380600729071>

Lucas, S. D. M., Peixoto, G., Mockaitis, G., Zaiat, M., & Gomes, S. D. (2015). Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: Kinetic evaluation and technological feasibility. *Renewable Energy*, 75, 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.10.025>

- Luderer, G., Pehl, M., Arvesen, A., Gibon, T., Bodirsky, B. L., De Boer, H. S., ... & Hertwich, E. G. (2019). Environmental co-benefits and adverse side-effects of alternative power sector decarbonization strategies. *Nature Communications*, 10(1), 5229.
- Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- Manish, S., & Banerjee, R. (2008). Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(1), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.026>
- Menzel, T., Neubauer, P., & Junne, S. (2020). Role of microbial hydrolysis in anaerobic digestion. *Energies* 13(21), 5555. <https://doi.org/10.3390/en13215555>
- Mokhtarani, B., Zanganeh, J., & Moghtaderi, B. (2025). A review on biohydrogen production through dark fermentation, process parameters and simulation. *Energies*, 18(5), 1092. <https://doi.org/10.3390/en18051092>
- Moreno-Cárdenas, E. L., Zapata-Zapata, A. D., & Kim, D. (2019). Hydrogen production from coffee mucilage in dark fermentation with organic waste. *Energies*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/en12010071>
- Navarro-Díaz, M., Martínez-Sánchez, M. E., Valdez-Vázquez, I., & Escalante, A. E. (2020). A framework for integrating functional and microbial data: The case of dark fermentation H₂ production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(56), 31706–31718. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.08.189>
- Ndayisenga, F., Yu, Z., Zheng, J., Wang, B., Liang, H., Phulpoto, I. A., Habiyakare, T., & Zhou, D. (2020). Microbial electrohydrogenesis cell and dark fermentation integrated system enhances biohydrogen production from lignocellulosic agricultural wastes: Substrate pretreatment towards optimization. In *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (pp. 343–365). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111078>
- OMS. (2006). *Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. Actualización mundial 2005*.
- Ordoñez-Frías, E. j, Muñoz-Páez, K. M., & Buitrón, G. (2024). Biohydrogen production from fermented acidic cheese whey using lactate: Reactor

- performance and microbial ecology analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.06.307>
- Panagiotopoulos, I. A. (2015). Dark Fermentative Hydrogen Production from Lignocellulosic Biomass. In Z. Fang, R. L. Smith, & J. Q. Xinhua (Eds.), *Production of hydrogen from renewable resources* (Springer, Vol. 5, pp. 3–38). Biofuels and Biorefineries. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7330-0_1
- Parente-Laverde, A.-M. (2020). Value chain and economic development: The case of the Colombian coffee industry. *Organizations and Markets in Emerging Economies*, 11(1), 173–188. <https://doi.org/10.15388/omee.2020.11.29>
- Park, J. H., Chandrasekhar, K., Jeon, B. H., Jang, M., Liu, Y., & Kim, S. H. (2021). State-of-the-art technologies for continuous high-rate biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 320(124304), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124304>
- Perea-Moreno, A.J., Muñoz-Rodríguez, D. (2024). Agro-industrial Wastes Valorisation to Energy and Value-Added Products for Environmental Sustainability. In: Kapoor, R.T., Sillanpää, M., Zdarta, J., Rafatullah, M. (Eds.) *Biomass Valorization*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-8557-5_1
- Pineda, B. E., Muñoz, C. H., & Gil, H. (2018). Relevant aspects of the mobility and its relationship with environment in the Valle de Aburrá: a review. *Ingeniería y Desarrollo*, 36(2), 489–508. <https://doi.org/10.14482/inde.36.2.10403>
- Pongsiriyakul, K., Wongsurakul, P., Kiatkittipong, W., Premashthira, A., Kuldilok, K., Najdanovic-Visak, V., Adhikari, S., Cognet, P., Kida, T., & Assabumrungrat, S. (2024). Upcycling Coffee Waste: Key Industrial Activities for Advancing Circular Economy and Overcoming Commercialization Challenges. *Environmental Research*, 12(2851), 1–69. <https://doi.org/10.57647/j.ijrowa.2024.1303.33>
- Puerta-Quintero, G. I., & Rios-Arias, S. (2011). Composición Química del Mucílago de Café, según el Tiempo de Fermentación y Refrigeración. *Cenicafé*, 62(2), 23–40.
- Qureshi, F., Yusuf, M., Arham, M., Ibrahim, H., Chukwuemeka, B., Kamyab, H., Rahman, M. M., Kumar, A., & Chelliapan, S. (2023). A state of the art review on the latest trends in hydrogen production, storage, and transportation techniques. *Fuel*, 340(127574), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.127574>

- Rangel, C. J., Hernández, M. A., Mosquera, J. D., Castro, Y., Cabeza, I. O., & Acevedo, P. A. (2021). Hydrogen production by dark fermentation process from pig manure , cocoa mucilage, and coffee mucilage. *Biomass Conversión and Biorefinery*, 11, 241–250. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00618-z>
- Ren, N. Q., Liu, B. F., Ding, J., & Xie, G. J. (2009). Hydrogen production with *R. faecalis* RLD-53 isolated from freshwater pond sludge. *Bioresource Technology*, 100(1), 484–487. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.009>
- Ruiz, E., Moreno, J., & Suárez, R. (2019). Buenas prácticas corporativas en materia de reducción de pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe. In *Banco Interamericano de Desarrollo (BID)*. https://foretica.org/Buenas_practicas_corporativas_en_materia_de_reducción_de_perdidas_y_desperdicios_de_alimentos_en_América_Latina_y_el_Carib_e_es_es.pdf
- Scherhauser, S., Moates, G., Hartikainen, H., Waldron, K., & Obersteiner, G. (2018). Environmental impacts of food waste in Europe. *Waste Management*, 77, 98–113. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.04.038>
- Sen, B., Aravind, J., Lin, C., & Lay, C. (2019). Biohydrogen Production Perspectives from Organic Waste with Focus on Asia. In J. R. Bastidas-Oyanedel & J. E. Schmidt (Eds.), *Biorefinery* (pp. 413–435). Springer Nature. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5>
- Setter, C., Borges, F. A., Cardoso, C. R., Mendes, R. F., & Oliveira, T. J. P. (2020). Energy quality of pellets produced from coffee residue: Characterization of the products obtained via slow pyrolysis. *Industrial Crops and Products*, 154, 112731. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112731>
- Shanmugam, S., Mathimani, T., Rene, E. R., Edwin Geo, V., Arun, A., Brindhadevi, K., & Pugazhendhi, A. (2021). Biohythane production from organic waste: Recent advancements, technical bottlenecks and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(20), 11201–11216. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2020.10.132>
- Sharma, S., Agarwal, S., & Jain, A. (2021). Significance of hydrogen as economic and environmentally friendly fuel. *Energies*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/en14217389>
- Singh, T., Alhazmi, A., Mohammad, A., Srivastava, N., Haque, S., Sharma, S., Singh, R., Yoon, T., & Gupta, V. K. (2021). Integrated biohydrogen production via lignocellulosic waste: Opportunity, challenges & future prospects. *Bioresource Technology*, 338, 125511.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125511>

- Singh, V., & Das, D. (2019). Potential of hydrogen production from biomass. In *Science and Engineering of Hydrogen-Based Energy Technologies: Hydrogen Production and Practical Applications in Energy Generation* (pp. 123–164). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814251-6.00003-4>
- Slopiecka, K., Liberti, F., Massoli, S., Bartocci, P., & Fantozzi, F. (2022). Chemical and physical characterization of food waste to improve its use in anaerobic digestion plants. *Energy Nexus*, 5, 100049. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100049>
- Srivastava, A. K., & Gupta, S. (2011). Fed-Batch Fermentation - Design Strategies. In *Comprehensive Biotechnology*, (2nd ed, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00112-4>
- Sivaramakrishnan, R., Shanmugam, S., Sekar, M., Mathimani, T., Incharoensakdi, A., Kim, S. H., Parthiban, A., Edwin Geo, V., Brindhadevi, K., & Pugazhendhi, A. (2021). Insights on biological hydrogen production routes and potential microorganisms for high hydrogen yield. *Fuel*, 291, 120136. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120136>
- Trujillo-González, J. M., Jiménez-Ballesta, R., Silva-Parra, A., Torres-Mora, M. A., & García Navarro, F. J. (2024). A comprehensive review of composting from coffee waste: Revalorisation of coffee residue in Colombia. *International Journal of Recycling Organic Waste in Agriculture*, 13(3), 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.57647/j.ijrowa.2024.1303.33>
- Tsigkou, K., Demissie, B. A., Hashim, S., Ghofrani-Isfahani, P., Thomas, R., Mapinga, K. F., Kassahun, S. K., & Angelidaki, I. (2025). Coffee processing waste: Unlocking opportunities for sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 210(115263), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2024.115263>
- Urbaniec, K., & Bakker, R. R. (2015). Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation – A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(9), 3648–3658. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2015.01.073>
- Vásquez, R., Salinas, F., & Gesellschaft Deutsche. (2018). *Tecnologías del Hidrógeno y perspectivas para Chile* (Gesellschaft Deutsche (Ed.); GIZ). www.minenergia.cl
- Villa Montoya, A. C., Cristina da Silva Mazareli, R., Delforno, T. P., Centurion, V. B., Sakamoto, I. K., Maia de Oliveira, V., Silva, E. L., & Amâncio Varesche, M. B.

- (2019). Hydrogen, alcohols and volatile fatty acids from the co-digestion of coffee waste (coffee pulp, husk, and processing wastewater) by applying autochthonous microorganisms. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(39), 21434–21450. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.115>
- Wainaina, S., Lukitawesa, Kumar Awasthi, M., & Taherzadeh, M. J. (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. In *Bioengineered* (Vol. 10, Issue 1, pp. 437–458). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>
- Wang, Y., Yuan, Z., & Tang, Y. (2021). Enhancing food security and environmental sustainability: A critical review of food loss and waste management. *Resources, Environment and Sustainability*, 4(100023), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2021.100023>
- Weldesemayat Sileshi, G., Barrios, E., Lehmann, J., & Tubiello, F. N. (2025). An organic matter database (OMD): Consolidating global residue data from agriculture, fisheries, forestry and related industries. *Earth System Science Data*, 17, 369–391. <https://doi.org/10.5194/essd-17-369-2025>
- Wong, Y. M., Wu, T. Y., & Juan, J. C. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 471–482. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.03.008>
- Yunusa, U. M., & Karapinar, I. (2025). Comparative optimization of apple pomace pretreatment conditions to maximize sugar generation for dark fermentative biohydrogen production. *Bioresource Technology Reports*, 31, 102191. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2025.102191>
- Ziara, R. M. M., Miller, D. N., Subbiah, J., & Dvorak, B. I. (2019). Lactate wastewater dark fermentation: The effect of temperature and initial pH on biohydrogen production and microbial community. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(2), 661–673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.045>

Capítulo III. Presencia de bacterias ácido lácticas en la producción de hidrógeno por fermentación oscura: Competencia o sinergia

Este capítulo ha sido publicado como: Correa-Villa, C., Moreno-Cárdenas, E. & de Bruijn, J. Presence of lactic acid bacteria in hydrogen production by dark fermentation: competition or synergy. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 40, 380 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04167-9>

3.1. Introducción

En la producción de H₂ por FO se han identificado diversas bacterias BPH pertenecientes al orden *Clostridiales*, la familia *Enterobacteriaceae* y el género *Bacillus*. Estas bacterias tienen la capacidad de producir H₂ y AGV, principalmente ácido acético y ácido butírico, mediante la descomposición anaerobia de fuentes de carbono ricas en carbohidratos (Kumar et al., 2013; Song et al., 2013; Moreno et al., 2019; Saleem et al., 2020; Detman et al., 2021; Sivaramakrishnan et al., 2021). Recientemente, la utilización de consorcios microbianos o cultivos mixtos ha ganado prominencia en la investigación de FO debido a las limitaciones técnicas y económicas inherentes de la aplicación de cultivos puros durante la producción de H₂ a gran escala (Bundhoo & Mohee, 2016; Litti et al., 2021; Policastro et al., 2021; Dzulkarnain et al., 2022). Estudios han demostrado que los cocultivos de aislados puros pueden ser más efectivos que los monocultivos, ya que los efectos sinérgicos contribuyen positivamente el proceso de FO, como mantener las condiciones

anaerobias necesarias para BPH estrictas y evitar el uso de gases inertes o agentes reductores (Elsharnouby et al., 2013; Ergal et al., 2020). Sin embargo, la estabilidad y eficiencia de producción de H_2 mediante FO en cultivos mixtos pueden verse comprometidas por la presencia de diferentes grupos microbianos y sus interacciones (Detman et al., 2021; Rupani et al., 2022).

Para abordar los desafíos asociados por la presencia de microorganismos indeseables en cultivos mixtos, se han propuesto estrategias como el pretratamiento del inóculo y el enriquecimiento posterior con cultivos de BPH (Ramírez-Morales et al., 2015; Wang & Yin, 2017; Yang et al., 2019; Dzulkarnain et al., 2022). Si bien los métodos de pretratamiento han demostrado efectividad en muchos casos, su eficacia puede variar considerablemente dependiendo del sistema y las condiciones aplicadas (Karim et al., 2021; Cheng et al., 2023; Hidalgo et al., 2023; Campos-Flores et al., 2024). Sin embargo, persisten desafíos significativos, como la disminución de la diversidad microbiana y la susceptibilidad a invasiones de otros microorganismos a través del sustrato (Cabrol et al., 2017; Toledo-Cervantes et al., 2022).

Uno de estos microorganismos son las BAL, que pueden provenir del sustrato o pueden sobrevivir y persistir en el inóculo tras el pretratamiento (Song et al., 2012; Kim et al., 2014; Jang et al., 2015; Etchebehere et al., 2016; Cabrol et al., 2017; García-Depraect et al., 2019a; Campos-Flores et al., 2024). La presencia y dominancia de estas bacterias en la comunidad productora de H_2 ha sido reportada como indeseable debido a su asociación con una menor productividad y estabilidad

en el proceso de FO (Detman et al., 2021). Sin embargo, otros estudios sugieren que su presencia puede ser beneficiosa, proporcionando una mayor estabilidad en la producción de H₂ (Dzulkarnain et al., 2022).

Sikora et al. (2013) fueron los primeros en demostrar la dualidad en el papel de las BAL en el proceso de FO, donde solo tres estudios citados por ellos mostraron su efecto positivo. La disyuntiva en la literatura sobre el papel de las BAL aún persiste (Villanueva-Galindo et al., 2023), pero un número creciente de estudios reportan una relación positiva con BPH que conduce una producción de H₂ mejorada (Figura 3-1; Cabrol et al., 2017; García-Depraect et al., 2021).

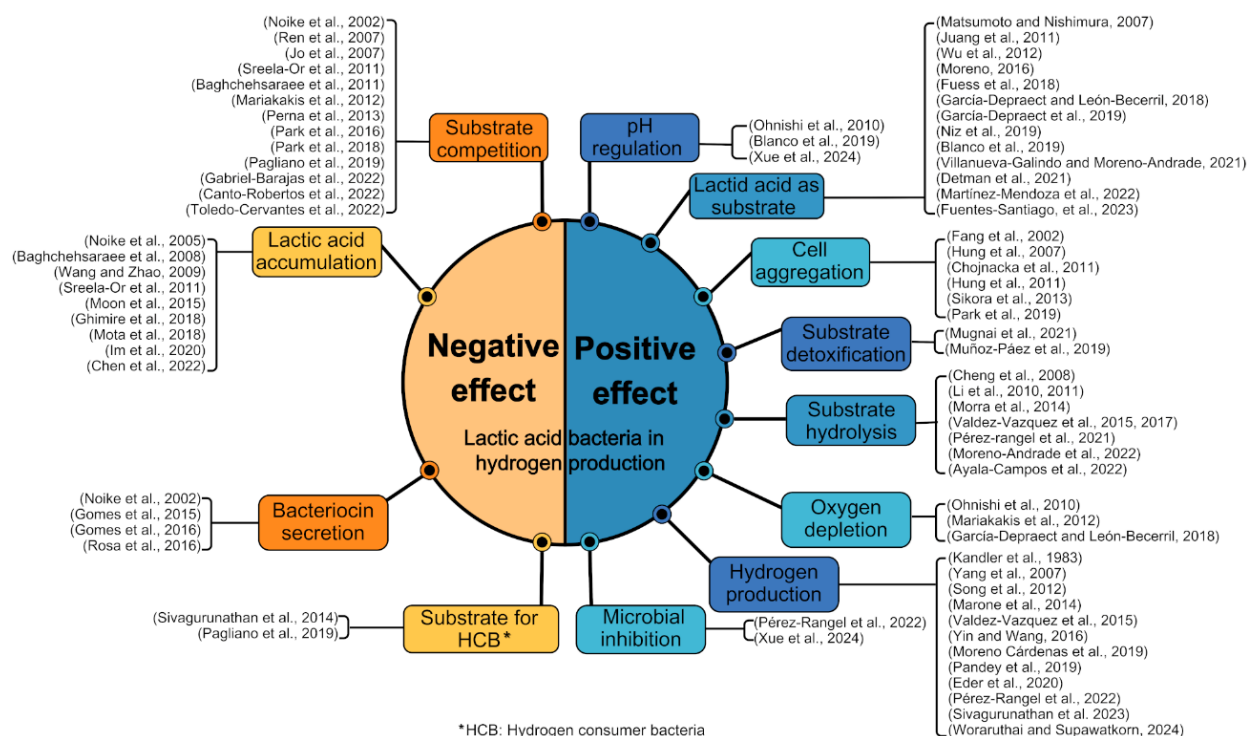


Figura 3-1. Disyuntiva del efecto de las bacterias ácido lácticas en el proceso de fermentación oscura.

Esto sugiere que las interacciones ecológicas entre BAL y BPH aún no están claramente definidas. Las interacciones negativas, como la competencia y el amensalismo, son comunes y favorecen el crecimiento de BAL por la secreción de bacteriocinas y la competencia por el sustrato, lo que inhiben el crecimiento de BPH y resulta en una fermentación láctica sin producción de H_2 . Por el contrario, las interacciones positivas, como el comensalismo y mutualismo, favorecen la eficiencia del proceso de FO mediante la regulación del pH, consumo de oxígeno, agregación celular, hidrólisis y desintoxicación del sustrato (García-Depraect et al., 2021).

Dentro este orden de ideas, este artículo de revisión es un análisis exhaustivo de la literatura existente que busca explorar el papel de las BAL y el ácido láctico en la producción de H_2 por FO, bajo tres escenarios: BAL como las principales responsables de la inestabilidad del proceso de FO, BAL como facilitadoras y ácido láctico como sustrato alternativo para impulsar la producción de H_2 . Además, mostramos cómo estas interacciones microbianas entre BAL y BPH influyen en la producción de H_2 y cómo aprovecharlas para avanzar hacia una producción de H_2 más eficiente.

3.2. Efecto negativo de bacterias ácido lácticas en la fermentación oscura: Inestabilidad en la producción de hidrógeno

Los residuos orgánicos y las aguas residuales se han reportado como sustratos idóneos para proporcionar los nutrientes necesarios (carbono, nitrógeno, minerales y vitaminas) de manera económica para el crecimiento y la viabilidad celular de la comunidad microbiana productora de hidrógeno (Lucas et al., 2015). Incluye, por

ejemplo, el uso de aguas residuales del procesamiento del almidón de yuca (Andreani et al., 2019), melazas de la remolacha azucarera (Detman et al., 2021; Pérez-rangel et al., 2021), residuos de alimentos (Fuentes et al., 2018; Xue et al., 2024); lactosuero (Lucas et al., 2015; Muñoz-Páez et al., 2023), vinaza de caña de azúcar (Cardoso Ribeiro et al., 2022), residuos de plátano (Mazareli et al., 2020), vinaza de tequila (Niz et al., 2019; Toledo-Cervantes et al., 2022) y paja de trigo (Pérez-Rangel et al., 2021; Ayala-Campos et al., 2022). Sin embargo, estos sustratos complejos también favorecen el crecimiento de otros microorganismos, como las BAL (Cabrol et al., 2017).

Las BAL son un grupo de organismos funcionalmente relacionados y filogenéticamente diversos, compuesto por cocos o bacilos Gram positivos, reconocidos por su habilidad de fermentar carbohidratos y producir ácido láctico como principal producto. Probablemente, son el grupo más abundante y extendido en la naturaleza (Salminen & Von Wright, 2004). Generalmente, las BAL no forman esporas, son inmóviles y catalasas negativas. Aunque estas bacterias prefieren ambientes anaerobios, muchas pueden sobrevivir y crecer en condiciones aerobias (Ghaffar et al., 2014).

Las BAL más frecuentemente encontradas en sistemas de FO de cultivos mixtos incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Levilactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Sporolactobacillus*, *Weissella* y *Bifidobacterium* (Ren et al., 2007; Mariakakis et al., 2012; Laothanachareon et al., 2014; Gomes et al., 2015; Etchebehere et al., 2016; Rosa et al., 2016; Jia et al.,

2019; Pagliano et al., 2019; Santiago et al., 2019; Cieciora-Włoch et al., 2020; Chen et al., 2022; Gabriel-Barajas et al., 2022; Toledo-Cervantes et al., 2022; Canto-Robertos et al., 2023). Se ha informado que estas especies tienen un efecto perjudicial sobre la producción de hidrógeno y, curiosamente, predominan en diversos sustratos y en diferentes condiciones del proceso como pH, temperatura, velocidad de carga orgánica (VOR), TRH, entre otros (Villanueva-Galindo et al., 2023). Como se ilustra en la Figura 3-2, las BAL limitan el metabolismo y el crecimiento de BPH debido a la competencia por sustrato y la producción de una serie de metabolitos, como ácido láctico y bacteriocinas (Chen et al., 2021).

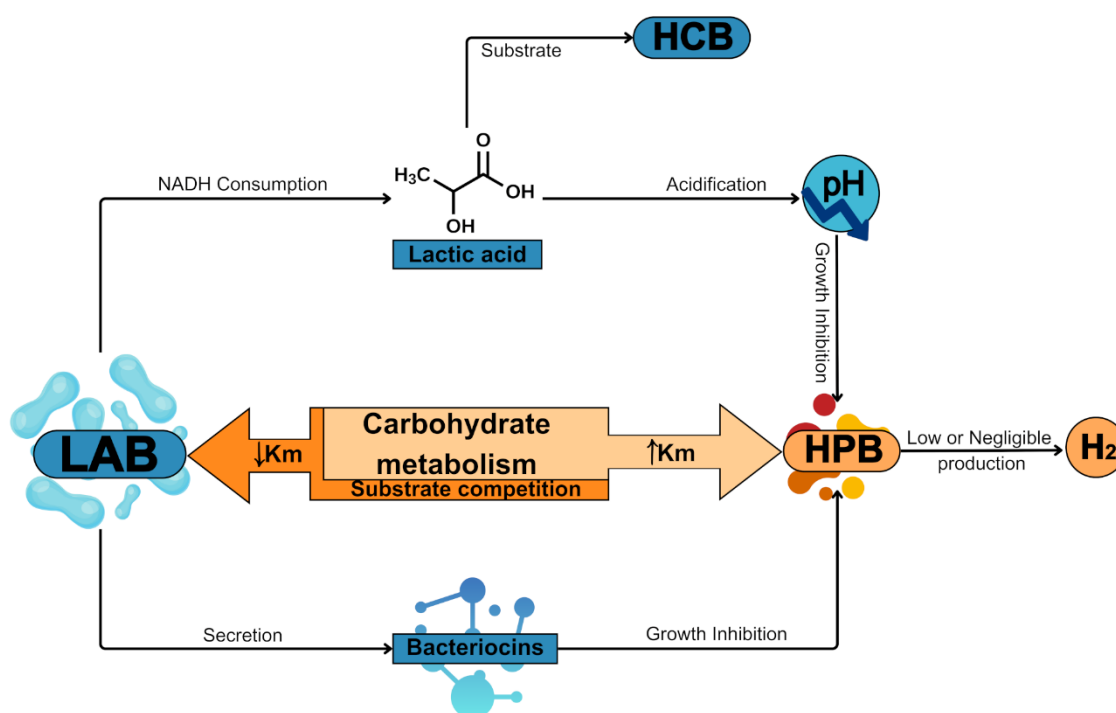


Figura 3-2. Efecto negativo de BAL sobre BPH en el proceso de FO.

3.2.1. Competencia por sustrato: BAL mejores competidoras que BPH

Los sustratos orgánicos fermentables como los carbohidratos son la fuente preferencial en la producción de H_2 en sistemas de FO. Cuando BPH y BAL coexisten, los carbohidratos se convierten en el foco de competencia (Fuentes-Santiago et al., 2023). Las BAL son mejores competidoras debido a la alta afinidad por el sustrato, alta tasa de crecimiento, alta tasa de producción de ácido y tolerancia al ácido. Estas estrategias permiten a las BAL competir con otros microorganismos, y dominar en comunidades microbianas (Salminen & Von Wright, 2004; Teusink & Molenaar, 2017; Park et al., 2018; Ohnishi et al., 2022; Fuentes-Santiago et al., 2023).

La competencia por el sustrato entre BPH y BAL ha llevado a la identificación de factores que influyen en la producción de H_2 . Se ha observado que bajas concentraciones de carbohidratos solubles, (p. ej. la galactosa), y alto niveles de ácido láctico pueden disminuir la producción de H_2 debido al cambio en la composición microbiana de *Clostridium* sp. a BAL como *Sporolactobacillus* y *Lactobacillus* (Park et al., 2016). Para evitar una desventaja para BPH, se recomienda mantener las concentraciones de carbohidratos solubles superior de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Park et al., 2016, 2018). Este hallazgo fue confirmado por una serie de pruebas por lotes de cultivos puros y cocultivos de *Clostridium butyricum* y *Lactobacillus casei* a diferentes concentraciones iniciales de glucosa y galactosa ($0,5\text{-}5,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Este resultado mostró que mientras *L. casei* tenía una constante de saturación media (K_m) más baja, *C. butyricum* exhibió una mayor tasa máxima de

consumo de sustrato que *L. casei*, independientemente del tipo de sustrato utilizado (Park et al., 2018).

Si bien la afinidad por el sustrato y la tasa de absorción son factores críticos para comprender la dinámica de la competencia, Ohnishi et al. (2022) explicaron que la reducción en la producción de H_2 en cocultivos de *Megasphaera elsdenii*, *Clostridium butyricum* y BAL con glucosa se debió a diferencias en sus tasas de crecimiento. En los experimentos, BAL mostraron una tasa de crecimiento significativamente mayor durante la fase logarítmica en comparación con BPH. Esta rápida proliferación de BAL no solo redujo la disponibilidad del sustrato para BPH, sino que también inhibió la producción de H_2 , lo que resultó en una disminución del 44% en los cultivos de *M. elsdenii* y una inhibición aún mayor de los cultivos de *C. butyricum*. Estos hallazgos resaltan cómo BAL, debido a su alta tasa de crecimiento durante la fase logarítmica, pueden competir eficazmente por sustratos fermentables, lo que permite su rápido dominio en la comunidad microbiana.

De manera similar, una relación C/N inadecuada puede influir en la dominancia de BPH y BAL en el proceso. Está bien establecido que una relación C/N óptima es crítica para el crecimiento microbiano y la producción efectiva de H_2 . Se encontró que la suplementación de nitrógeno a la vinaza de tequila mejoraba la producción de H_2 y aumentaba la presencia de *Clostridia* en comparación con la vinaza de tequila no suplementada, donde BAL se convirtió en la población dominante en la comunidad microbiana (García-Depraect et al., 2023b). La dinámica competitiva entre ambas poblaciones puede explicarse por la teoría de selección r/K. El

estratega r es favorecido por la rápida reproducción debido a su mayor tasa de consumo de sustrato, mientras que el estrategia K exhibe longevidad y típicamente mayor eficiencia energética debido a su mayor afinidad por el sustrato. Por lo tanto, BPH actúan como estrategia r, enriqueciéndose en condiciones de alta disponibilidad de sustrato. Por el contrario, las BAL, como estrategias K, prosperan mejor en condiciones de baja concentración de sustrato (Park et al., 2016, 2018; García-Depraect et al., 2023).

El tipo de carbohidrato también influye en la competencia entre BAL y BPH. Chatellard et al. (2016) observaron que las pentosas fueron los carbohidratos monoméricos preferidos para la producción de H₂, una con baja producción de ácido láctico, lo que condujo a una comunidad dominada por miembros de *Clostridium* sp. Por el contrario, las hexosas se convirtieron principalmente en ácido láctico (>70%) y se asociaron con un bajo rendimiento de H₂ y producción de ácido butírico, ya que BAL eran los representantes más abundantes de la comunidad.

Además, se ha sugerido que la disponibilidad de micronutrientes esenciales en los sustratos también puede ser un factor determinante en la competencia entre BPH y BAL, lo que podría explicar el aumento de las abundancias relativas de las BAL en el proceso de FO (Gabriel-Barajas et al., 2022; Toledo-Cervantes et al., 2022). Es así como Gabriel-Barajas et al. (2022) manifestaron que el aumento de la abundancia de *Pediococcus ethanolidurans* y *Lactobacillus manihotivorans* durante el proceso de FO con vinazas de tequila podría estar asociado a la competencia por manganeso (Mn²⁺). En este sentido Petrov et al. (2017), encontraron que el Mn²⁺

causó un incremento fuerte en la actividad de la β -fructosidasa de *Lactobacillus paracasei*, lo que resultó en una producción mejorada de ácido láctico a partir de la inulina.

Algunos estudios describen el efecto de la suplementación con micronutrientes en la dinámica de la comunidad microbiana del proceso (Mariakakis et al., 2012; Yang & Wang, 2018; Cieciora-Włoch et al., 2020; García-Depraet et al., 2023). En experimentos realizados por Cieciora-Włoch et al. (2020), la adición de óxido férrico (Fe_2O_3) a la pulpa de remolacha aumentó la abundancia de *Clostridiales* y producción de H_2 . Sin embargo, la suplementación con Fe_2O_3 también condujo a un aumento de la concentración de ácido láctico y a una mayor abundancia relativa *Olsonella* sp. Por el contrario, sin Fe_2O_3 , la abundancia relativa de *Lactobacillus* sp. fue mayor, pero con la adición de Fe_2O_3 , su abundancia relativa disminuyó significativamente, lo que sugiere que la adición de Fe_2O_3 dificultó el crecimiento de *Lactobacillus* sp., a diferencia de *Olsonella* sp. Luego, Mariakakis et al. (2012) encontraron que la suplementación de melaza con sales de hierro Fe^{2+} aumentó el predominio de *Clostridium butyricum*, mejoró la producción de H_2 y eliminó *Olsenella* sp, la cual dominó en los ensayos no suplementados con este micronutriente. Por lo tanto, los autores sugirieron que *Olsenella* sp. fue la responsable del incremento del ácido láctico y fue el principal competidor de BPH por el sustrato. Se observó un efecto similar para *Enterococcus* sp., cuya presencia se redujo con la adición de Fe^{2+} , lo que resultó en un mayor predominio de *Clostridium sensu* y un aumento de la producción de H_2 a partir del pasto (Yang & Wang, 2018).

3.2.2. Bacteriocinas secretadas por BAL: Las principales sustancias inhibitorias de la producción de H₂ por FO

Uno de los trabajos pioneros en proporcionar evidencia de la inestabilidad de la producción de H₂ causada por BAL fue realizado por Noike et al. (2002). Los investigadores descartaron que las interacciones entre BAL y BPH estuvieran relacionadas principalmente por la competencia de sustrato, ya que no se observó una producción simultánea de H₂ y ácido láctico en sus experimentos con residuos orgánicos provenientes de la fabricación del tofu a 37°C y pH de 7,0 y 8,0. En cambio, se encontró que el cese de la producción de H₂ era causado por sustancias inhibitorias secretadas por las BAL aisladas del residuo, que inhiben el crecimiento de las BPH.

Como resultado, Noike et al. (2002) plantearon la hipótesis de que las bacteriocinas, eran las sustancias responsables de este efecto inhibitorio de BAL sobre BPH. Se realizaron experimentos con cultivos de *Clostridium acetolobutylicum* a los que les adicionaron soluciones con y sin tripsina del sobrenadante del cultivo *Lactobacillus paracasei*, nisina y agua como control. Estos experimentos permitieron a Noike et al (2002) confirmar su hipótesis al observar la recuperación de la producción de H₂ de la cepa *Clostridium acetolobutylicum*, ya que la tripsina es una enzima peptidasa utilizada para inactivar las bacteriocinas, al igual que la nisina, lo que permitió contrarrestar el efecto inhibitorio.

Las bacteriocinas son péptidos difusibles de origen ribosomal con actividad antimicrobiana secretados por diversos tipos de bacterias. Se cree que su principal fuente son las BAL (Gomes et al., 2016; García-Bayona & Comstock, 2018; Chen et al., 2021). Estos péptidos antimicrobianos desempeñan un papel crucial al proporcionar una ventaja competitiva y favorecer la colonización del entorno, eliminando o inhibiendo a otras bacterias (Gomes et al., 2016; Castelló et al., 2020). Se ha observado que su actividad antimicrobiana a menudo se dirige contra bacterias relacionadas con la cepa productora o contra bacterias que se encuentran en entornos similares, son tolerantes a altas temperaturas y activas en un amplio rango de pH (Ghanbari and Jami, 2013; Chen et al., 2021). Las bacteriocinas interactúan con la célula diana a través de receptores de superficie específicos, lo que conduce a una variedad de mecanismos para destruir las células sensibles, como la formación de poros, la inhibición de la síntesis de la pared celular, la degradación del peptidoglicano, la inhibición de la síntesis de proteínas, y la actividad de la nucleasa y ADN-girasa (García-Bayona & Comstock, 2018).

Un considerable número de estudios han citado a Noike et al. (2002) para respaldar sus hallazgos sobre la baja producción de H₂ en presencia y predominio de BAL en la comunidad microbiana de FO, así como también la acumulación de ácido láctico al final del proceso (Kim et al., 2006; Jo et al., 2007; Kim et al., 2009; Im et al., 2012; Rafrafi et al., 2013; Perna et al., 2013; Kim et al., 2014; Park et al., 2016; Andreani et al., 2019; Santiago et al., 2019; Poirier et al., 2020; Canto-Robertos et al., 2023; Hangri et al., 2024). Sin embargo, una cantidad limitada de investigaciones ha corroborado los hallazgos obtenidos por Noike et al. (2002) en relación al fenómeno

de amensalismo causado por las bacteriocinas secretadas por BAL en sistemas de FO (Gomes et al., 2015, 2016; Rosa et al., 2016; Pérez-Rangel et al., 2021, 2022).

En las investigaciones realizadas por Gomes et al. (2015) y Rosa et al. (2016), se identificaron a *Lactococcus* sp. y *Lactobacillus* sp. con actividad bacteriocinogénica que se aislaron de reactores anaerobios de lecho fluidizado alimentados con lactosuero y aguas residuales de harina de yuca, respectivamente. Estas cepas estuvieron presentes en la etapa de bajo rendimiento y tasa de producción de H₂ del biorreactor, que operó a una temperatura de 30°C y un pH entre 4,0 y 5,0. En contraste, Gomes et al. (2016) confirmaron que las bacteriocinas nisina A y nisina Z detectadas en muestras de aguas residuales de harina de yuca crudas eran estables al calor. Estos investigadores concluyeron que la presencia de estos compuestos en los deshechos podría haber contribuido al bajo desempeño en la producción de H₂ del biorreactor, operado a un pH 6,5 y una temperatura de 25°C.

La actividad antimicrobiana de cepas de BAL como *Lactobacillus plantarum* LB1, *Pediococcus acidilactici* LB4, *Lactobacillus pentosus* LB7, *Enterococcus faecium* F, *Enterococcus gallinarum* G y cepas de BPH como *Clostridium beijerinckii* B, aisladas de un biorreactor productor de H₂ alimentado con paja de trigo y operado a una temperatura de 37°C y un pH inicial de 6,5, fueron estudiados por Pérez-Rangel et al. (2021). Los autores observaron que las cepas de BAL no afectaron *Clostridium beijerinckii* B, pero el crecimiento de las cepas de *Enterococcus* fue inhibido por las otras cepas de BAL. Además, Pérez-Rangel et al. (2021) detectaron que *Pediococcus acidilactici* LB4 fue ligeramente inhibido por de *C. beijerinckii*.

En consecuencia, estos resultados permitieron a Pérez-Rangel et al. (2021) concluir que la coexistencia entre *Lactobacillus* y *Clostridium*, como miembros dominantes de la comunidad microbiana del proceso de FO, no fue antagónica, sino que se correlacionó positivamente con la producción de H₂. De manera similar, Detman et al. (2021) observaron que una coexistencia entre especies de *Lactobacillus* y *Clostridium* fue favorable para la producción de H₂ a partir de la melaza de remolacha azucarera, pero destacaron que es importante establecer un equilibrio entre BAL y BPH dentro de la comunidad microbiana durante el proceso para lograr una producción estable de H₂ con una tendencia a que BPH prevalezcan.

Según Pérez-Rangel et al. (2022), los efectos inhibitorios de las cepas bacterianas aisladas previamente por Pérez-Rangel et al. (2021) se debieron principalmente a sustancias proteicas como las bacteriocinas, pero a diferencia de los resultados de Noike et al. (2002), la actividad microbiana de estas sustancias inhibitorias se dirigió específicamente en contra de cepas de BAL. De ambos estudios (Noike et al., 2002; Pérez-Rangel et al., 2022), se puede deducir que el espectro de inhibición de las bacteriocinas producidas por BAL dependerá del tipo de cepas presentes inicialmente en el consorcio y pueden conducir a la selección espontánea de cepas específicas durante el proceso.

Existen numerosas bacteriocinas producidas por BAL y cada una tiene un espectro de inhibición particular: algunas se limitan a la inhibición intraespecífica, mientras otras pueden inhibir géneros, familias y órdenes (García-Bayona & Comstock, 2018). Su efecto inhibitorio se centra principalmente en bacterias Gram positivas

pero, algunas bacterias Gram negativas también pueden ser inhibidas (Laslo et al., 2020; Mokoena et al., 2021). Esto se debe a que bacterias Gram negativas son más resistentes gracias a la composición de su membrana externa (Parada et al., 2007).

Sin duda, las bacteriocinas cumplen una función importante en la comunidad microbiana (Riley & Wertz, 2002). El conocimiento sobre estas toxinas proteicas en sistemas de FO se basa en metodologías aplicadas en ambientes físicamente estructurados, como la superficie de una placa de agar o cultivos líquidos. En estos estudios, las cepas crecen como colonias individuales o dos cepas crecen en el mismo medio de cultivo, permitiendo en condiciones óptimas la producción de la sustancia inhibitoria o la inhibición de la cepa sensible. Es importante destacar que la función que desempeñan las bacteriocinas puede variar con las ambientales, tanto factores bióticos como abióticos (Riley & Wertz, 2002).

Por ejemplo, se ha encontrado que la pediocina es activa en un rango de pH de 5,0 a 10,0, siendo inestable a un valor de pH menor de 5,0 (Kwon et al., 2002), mientras que la nisina es menos estable y su actividad disminuyó significativamente en un rango de pH de 2,0 a 6,0 (Tan et al., 2015). Según, Noonpakdee et al. (2003), su actividad inhibidora se redujo en un 97% al aumentar el pH de 3,0 a 5,0 y estuvo ausente a pH 7,0. Esto enfatiza la necesidad de continuar profundizando en este fenómeno antagónico, especialmente, en ambientes no estructurados como son los residuos orgánicos, dadas las condiciones operativas del proceso FO y la presencia de múltiples especies.

3.3. Efecto positivo de bacterias ácido lácticas en la fermentación oscura: Facilitadoras de producción de hidrógeno

En contraste con los resultados previos que destacan los efectos adversos de BAL en la FO, otras investigaciones han revelado otra perspectiva, sugiriendo que estos microorganismos podrían mejorar la producción de H₂ al proporcionar un entorno favorable. De acuerdo con estas investigaciones, la presencia de BAL podría mejorar la eficiencia del proceso de FO de diversas maneras.

García-Depraect y León-Becerril (2018) identificaron los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* como las principales BAL involucradas en el consumo de oxígeno residual dentro del biorreactor. En un estudio posterior, los mismos autores enfatizaron que el inóculo utilizado fue efectivo para remover el oxígeno residual durante las primeras horas de incubación, con *Lactobacillus* sp., junto con otras bacterias anaerobias facultativas como *Klebsiella* sp. y *Enterobacter* sp., participando activamente. Esto creó un ambiente anóxico necesario para la producción de H₂ a partir de varios residuos agroindustriales, como la vinaza de tequila y el suero de queso (García-Depraect & León-Becerril, 2023). Esta observación concuerda con las sugerencias previas de Mariakakis et al. (2012) y Ohnishi et al. (2010), quienes destacan la importancia de la presencia de miembros del género *Lactobacillus* para eliminar el oxígeno disuelto residual, creando así un ambiente favorable para los anaerobios estrictos productores de H₂ como las especies *Clostridium* y *Megasphaera*.

La eliminación de oxígeno es crucial para el crecimiento de BPH anaerobias estrictas y la actividad de las enzimas hidrogenasas. En este sentido, la capacidad de BAL para adaptarse en ambientes aeróbicos, junto con BPH anaerobias facultativas como *Enterobacter* sp. y *Bacillus* sp., proporcionan un efecto protector para las BPH anaerobias estrictas. Este efecto se logra manteniendo las concentraciones de oxígeno indetectables en el sistema sin la necesidad de aplicar gases inertes, lo que mejora significativamente la relación entre costo-eficiencia del proceso (García-Depraect & León-Becerril, 2023).

Además, las BAL pueden producir sustancias poliméricas extracelulares (SPE), que son esenciales para la agregación celular en sistemas celulares suspendidos e inmovilizados. El proceso de granulación no solo aumenta y mantiene la biomasa microbiana, sino que también protege a los microbios contra sustancias tóxicas o condiciones desfavorables (Pugazhendhi et al., 2018). Los estudios sobre la producción de H₂ en configuraciones de biorreactores especializados, como el manto de lodos anaeróbicos de flujo ascendente (UASB, siglas en Inglés), han identificado especies como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Sporolactobacillus* en el microbioma involucrado en la formación de biomasa granular junto con BPH (Fang et al., 2002; Hung et al., 2007, 2011; Chojnacka et al., 2011; Hunag et al., 2012; Sikora et al., 2013; Park et al., 2019).

Lo anterior se puede respaldar con los hallazgos de Hung et al. (2011), quienes analizaron la estructura, composición y morfología microbiana de gránulos productores de H₂ en un biorreactor de lecho de lodo granular agitado (AGSB). Sus

resultados demostraron que *Clostridium* sp. y *Streptococcus* sp. formaron una red rígida dentro de la biomasa granular, donde agregados de *Streptococcus* sp. constituyeron el núcleo. Esta interacción, atribuida a las SPE producidas, fue un factor crucial en la formación de lodo granular a THR corto, donde la presencia de *Streptococcus* sp. proporcionó estabilidad a los consorcios productores de H₂. Más adelante, Pugazhendhi et al. (2018) explicaron que la relación sintrófica entre las poblaciones formadoras de biopelículas y productoras de H₂, como *Sporolactobacillus* y *Clostridium* respectivamente, permite la retención de biomasa y la producción estable de H₂ a THR corto, proporcionando resistencia al esfuerzo cortante causado por agitación vigorosa.

Respecto al hidrólisis del sustrato, este es un paso crítico para la producción de H₂ a partir de residuos orgánicos (Villanueva-Galindo et al., 2023), y las BAL desempeñan un papel significativo. Varios estudios han demostrado que la capacidad hidrolítica de las BAL puede ser beneficiosa para la hidrólisis del sustrato, mejorando así la eficiencia de la producción de H₂ (Cheng et al., 2008; Adav et al., 2009; Li et al., 2010, 2011; Morra et al., 2014; Valdez-Vazquez et al., 2015, 2017; Pérez-Rangel et al., 2021, 2023; Ayala-Campos et al., 2022; Moreno-Andrade et al., 2022). Por ejemplo, el género *Lactobacillus* fue un miembro crucial en los consorcios microbianos productores de H₂ al degradar sustratos lignocelulósicos (p. ej., rastrojo de maíz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar y bagazo de agave), convirtiéndose junto con *Clostridium* sp. los miembros predominantes durante la mayor productividad de H₂, donde *Lactobacillus* spp. se asoció con la degradación de hemicelulosa (Ayala-Campos et al., 2022). La actividad xilanolítica de las

especies de *Enterococcus* respalda aún más su participación en la producción de H₂ a partir de paja de trigo sin tratamiento (Valdez-Vázquez et al., 2015, 2017).

Pérez-rangel et al. (2021) sugieren que la alta productividad de H₂ a partir de sustratos lignocelulósicos se debió a la división de labores metabólicas entre *Lactobacillus* sp. y *Clostridium* sp. Este fenómeno también se observó con *Bifidobacterium* sp. y *Clostridium* sp., que fueron abundantes en la comunidad microbiana durante la conversión eficiente del almidón y producción de H₂ (Cheng et al., 2008). Además, la presencia de *Enterococcus* sp, se correlacionó positivamente con una mayor hidrólisis del sustrato durante la fermentación de desechos de comida (Moreno-Andrade et al., 2022). Adav et al. (2009) informaron que *Enterococcus saccharolyticus* y *Clostridium butyricum* formaron un consorcio funcional para hidrolizar eficazmente la celobiosa y producir H₂. Además, se ha informado de la selección espontanea de los géneros *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* en el consorcio, las cuales participaron eficientemente en la degradación de residuos de frutas y verduras, y la producción de H₂ (Morra et al., 2014).

De manera que, las fuentes de carbono estructuralmente complejas, como la lignocelulosa, influyen significativamente en las interacciones bacterianas. Durante su degradación se requiere de la acción coordinada de múltiples enzimas, promoviendo una mayor cooperación entre bacterias. Esta interacción cooperativa resulta en un crecimiento sinérgico en comparación con fuentes de carbono más simples (p.ej., glucosa), donde el antagonismo es más común (Deng & Wang, 2016).

Por lo tanto, la complejidad del sustrato puede facilitar la coexistencia de BPH y BAL. En este escenario, cada población podría aprovechar sus respectivos nichos para llevar a cabo la hidrólisis del sustrato a productos fermentables necesarios para el crecimiento de ambas, estableciendo una relación sinérgica que mejora la eficiencia de la producción de H₂.

Además, la acidificación desencadenada principalmente por la degradación de los azúcares a ácidos orgánicos también estimula la cooperación entre BAL y BPH, regulado el pH al proporcionar un microambiente ácido favorable para BPH, dado que la producción de H₂ es óptima a pH ácido (Cabrol et al., 2017; Xue et al., 2024). Ohnishi et al., (2010) manifestaron que la presencia de *Megasphaera elsdenii* en el consorcio evitó la caída del pH al consumir ácido láctico producido por *Lactobacillus* spp, estabilizando la producción de H₂ y permitiendo el crecimiento de ambas en el biorreactor.

La rápida y elevada acidificación del sustrato causada principalmente por BAL puede ser un obstáculo para el proceso (Cabrol et al., 2017; García-Depraect et al., 2021). Sin embargo, Xue et al., (2024) sugirieron que la drástica disminución inicial del pH en el sistema de FO, causada por la alta acidificación a concentraciones elevadas de residuos alimentarios (60 a 120 g/L SV), estimuló la actividad metabólica de BPH, aumentando la producción de H₂ en comparación con concentraciones más bajas (10 a 40 g/L SV), que tuvieron una acidez insuficiente y dificultó la dominancia de BPH. De manera similar, Moreno (2016) señaló que la acidificación en la etapa inicial durante la FO del mucilago de café y residuos de

frutas y verduras permitió la selección de BPH con un mayor rendimiento de producción de H_2 . Este enfoque podría generar un ahorro de tiempo y disminuir los costos de pretratamiento del inóculo para eliminar bacterias irrelevantes para la producción de H_2 , como arqueas metanogénicas, enriqueciendo la comunidad microbiana con BPH tolerantes a altas concentraciones de ácido, capaces de consumir ácido (Xue et al., 2024).

Los productos metabólicos de BAL diferentes de los ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético), como las bacteriocinas, el peróxido de hidrógeno y el diacetilo, también pueden limitar el crecimiento de microorganismos indeseables, promoviendo la coexistencia de BAL y BPH dentro del consorcio al mejorar las interacciones sinérgicas, con el ácido láctico como intermediario para la producción de H_2 por FO a partir de residuos orgánicos (García-Depraect, Valdez-Vázquez et al., 2019; Pérez-Rangel et al., 2022). Por ejemplo, Morra et al. (2014) concluyeron que las bacteriocinas producidas por las BAL actúan como un factor selectivo para BPH perteneciente al género *Clostridium*, permitiendo su coexistencia con BAL como *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* spp. y *Staphylococcus* sp. durante la producción de H_2 a través de FO a partir de una mezcla de estiércol y residuos de frutas y verduras.

Las BAL también contribuyen a la degradación de sustancias nocivas presentes en el sustrato, mejorando potencialmente el rendimiento del proceso. Pocos estudios reconocen su papel en la desintoxicación del sustrato para la producción de H_2 (Muñoz-Páez et al., 2019; Valdez-Vázquez et al., 2020; Mugnai et al., 2021). Valdez-

Vázquez et al. (2020) destacaron la alta capacidad de decoloración de *Lactobacillus* sp. en presencia de glucosa, demostrando su papel activo en el efluente textil durante la producción de H₂. De manera similar, Muñoz-Páez et al. (2019) reportaron sobre la activa participación de *Lactobacillus* sp. en el consorcio microbiano capaz de producir hidrógeno a través de la fermentación de la xilosa en presencia de derivados de furano (p.ej., furfural y 5-hidroximetilfurfural). Estos agentes y otras sustancias desfavorables, como compuestos fenólicos, son subproductos comunes del pretratamiento de sustrato para aumentar la solubilidad de los carbohidratos. Su presencia puede inhibir muchas bacterias mediante la permeabilización y desestabilización de la membrana o inhibición de enzimas extracelulares. Las BAL han demostrado capacidad enzimática para metabolizar compuestos fenólicos (Rodríguez et al., 2009; Filannino et al., 2015; Yaqi Wang et al., 2021), las cuales han sido identificadas como miembros claves en consorcios para producción de H₂ con sustratos que contiene compuestos fenólicos como vinaza de tequila (García-Depraect & León-Becerril, 2018) y aguas residuales de almazara (Mugnai et al., 2021). Sin embargo, las BAL no son ampliamente reconocidas por su alta capacidad de degradación, lo que indica la necesidad de más investigación, ya que su eficiencia y eficacia puede depender de las condiciones ambientales (Yaqi Wang et al., 2021).

Aunque las BAL pueden influir positivamente en la generación de H₂, generalmente no son reconocidas como productoras directas de H₂ (Etchebehere et al., 2016; Novik et al., 2017). Sin embargo, algunos estudios han confirmado la capacidad de ciertas BAL, incluyendo *Lactobacillus* spp. (Kandler et al. 1983; Yang et al. 2007;

Pandey et al. 2019; Sivagurunathan et al. 2023); *Lactococcus* spp. (Marone et al., 2014); *Streptococcus* sp. (Moreno et al., 2019); y *Enterococcus* spp. (Song et al. 2012; Valdez-Vazquez et al. 2015; Yin & Wang 2016; Eder et al. 2020; Pérez-Rangel et al. 2022; Woraruthai & Supawatkorn 2024) para convertir una fuente de carbono en H₂. Por ejemplo, *Enterococcus faecalis* VT-H1, como lo demostraron Woraruthai y Supawatkorn (2024), produjo H₂ con un rendimiento de 2,22 mol H₂/mol glucosa en cultivo puro en condiciones óptimas (pH 7,0; 30 °C). De manera similar, Yin y Wang (2016) informaron que *Enterococcus faecium* INET2 logró un rendimiento de hidrógeno de 1,16 mol H₂/mol glucosa (pH 7,0, 35 °C). Además, *Lactobacillus delbrueckii* mostró un rendimiento de hidrógeno de 1,63 mol H₂/mol glucosa (pH 6,5, 37 °C) (Sivagurunathan et al. 2023). Esto resalta la importancia de explorar las BAL como productoras de H₂, ya que la formación de H₂ representa un patrón de fermentación inusual en estas bacterias. Hasta la fecha, algunos estudios han asociado estas características bioquímicas atípicas y la presencia de una estructura enzimática específica, como la hidrogenasa, para la producción de H₂ en BAL (Woraruthai y Supawatkorn 2024). Estos hallazgos subrayan la diversidad funcional de las BAL en la producción de H₂ durante la FO, ofreciendo nuevas perspectivas para el desarrollo del bioproceso.

3.4. Ácido láctico: un sustrato alternativo para la producción de hidrógeno por fermentación oscura de residuos orgánicos

Ácido láctico, un subproducto en sistemas de FO, ha sido tradicionalmente considerado un obstáculo para la producción eficiente de H_2 a partir de sustratos ricos en carbohidratos (Castelló et al., 2020; Guo et al., 2010; Hawkes et al., 2002). Esto se debe, en parte, a que la formación de ácido láctico no está directamente relacionada con las vías de producción de H_2 durante la degradación de carbohidratos, ya que los equivalentes reductores generados se oxidan principalmente mediante la formación de ácido láctico en lugar de H_2 (Blanco et al., 2019; Detman et al., 2021; Regueira-marcos et al., 2023). Por otra parte, BAL, debido a su ubicuidad en sistemas de FO, son las principales bacterias responsables de la producción y acumulación del ácido láctico. Como se mencionó previamente, estas bacterias compiten con BPH por el sustrato, lo que limita la disponibilidad del sustrato destinado a la producción de H_2 .

Adicionalmente, los niveles de ácido láctico también contribuyen a las fallas del bioproceso, dado que puede inhibir la producción de H_2 a través de su actividad antimicrobiana y la disminución de pH (Castillo Martinez et al., 2013; Stanojević-Nikolić et al., 2016; Feng et al., 2018; Coban, 2020). Se ha observado que la producción de H_2 disminuyó a mediada que aumentó la concentración de ácido láctico (Noike et al., 2002, 2005; Jo et al., 2007; Baghchehsaraee et al., 2009; Wang and Zhao, 2009; Baghchehsaraee et al., 2010, 2011; Sreela-Or et al., 2011; Moon et al., 2015; Park et al., 2016; Ghimire et al., 2018; Mota et al., 2018; Im et al., 2020; Chen et al., 2022). Sin embargo, algunos estudios identificaron umbrales específicos de concentración de ácido láctico que pueden inhibir o mejorar la

producción H_2 . Por ejemplo, Park et al. (2016) señalaron que la producción de H_2 a partir de galactosa cesó cuando la concentración de ácido láctico alcanzó 0,86 g/L.

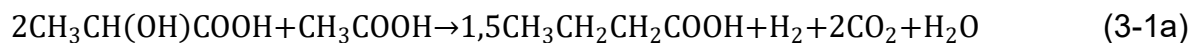
En contraste, Baghchehsaraee et al. (2009) y Kim et al. (2012) demostraron que el cultivo mixto produjo más H_2 y ácido butírico cuando se aumentaron las concentraciones iniciales de ácido láctico hasta 5 y 8 g/L en medios que contenía almidón y glucosa, respectivamente, en comparación con medios sin adición de ácido láctico. Ambos estudios observaron un consumo del ácido láctico por el cultivo. Baghchehsaraee et al. (2009) sugirieron que proporcionar altas concentraciones de ácido láctico condujo a una acumulación de equivalentes reductores, lo que favoreció aún más la producción de H_2 . No obstante, Kim et al. (2012) señalaron que concentraciones de ácido láctico de 16 g/L afectaron la actividad de la BPH, lo que se reflejó en un aumento del 40% en la fase de retraso y un rendimiento de H_2 insignificante, concluyendo que es necesario definir una concentración adecuada de ácido láctico. En cambio, Noblecourt et al. (2018) señalaron que concentraciones de 29 g/L de ácido láctico no impactaron negativamente en la producción de H_2 en residuos de alimentos prefermentados, ya que fue consumido por el consorcio.

Cabe señalar que el efecto potencial del ácido láctico sobre la producción de H_2 se pasaba por alto hasta que un conjunto de estudios en forma independiente observó un patrón de cambios en la concentración de ácido láctico durante el periodo de operación de biorreactores de FO en cultivos mixtos que procesaron sustratos como aguas residuales, residuos de alimentos, vinazas, suero de queso, mucílago de

café, melazas, residuos de frutas y verdura. Inicialmente, se registró un aumento de la concentración de ácido láctico con nula producción de H_2 a medida que los carbohidratos presentes en el sustrato fueron consumidos. Sin embargo, posteriormente, la concentración acumulada de ácido láctico disminuyó e incluso llegó a agotarse en el sistema. Durante este suceso, se observó que se produjo la tasa más alta de producción de H_2 . Al final de la fermentación, el ácido butírico fue el metabolito soluble dominante, mientras que el ácido acético tuvo diferentes variaciones, aumentando o disminuyendo su concentración (Lee et al., 2008; Kim et al., 2009; Ohnishi et al., 2010; Juang et al., 2011; Dareioti et al., 2014; Gomez-Romero et al., 2014; Moreno, 2016; Fuess et al., 2017; García-Depraect et al., 2017; Andreani et al., 2019; Blanco et al., 2019; Niz et al., 2019; Villanueva-Galindo & Moreno-Andrade, 2021; Martínez-Mendoza et al., 2022; Regueira-Marcos et al., 2023; Aranda-Jaramillo et al., 2023; Dudek et al., 2024; Xue et al. 2024). Por lo tanto, este comportamiento en los patrones de producción de H_2 y metabolitos solubles no puede explicarse simplemente por el consumo de los carbohidratos (Martínez-Mendoza et al., 2022). Esto sugiere que la comunidad microbiana no solo utilizó las rutas metabólicas convencionales propuestas en la producción fermentativa de H_2 a partir de los carbohidratos como la glucosa, sino que también empleó las rutas metabólicas que direccionaron a una mayor producción de H_2 a través del consumo de ácido láctico producido a partir de los carbohidratos (Juang et al., 2011; Regueira-Marcos et al., 2023). Esta vía metabólica podría representar una estrategia para recuperar el flujo de electrones desviado en la producción de ácido láctico y dirigirlo hacia la formación de H_2 (Regueira-Marcos et al., 2023).

Estudios demostraron la capacidad de ciertas BPH para utilizar el ácido láctico como otra fuente de carbono diferente a los carbohidratos, lo que muestra la relevancia de las vías de producción de H₂ que utilizan ácido láctico. Entre las principales BPH capaces de fermentar el ácido láctico se encuentran varias especies de *Clostridium* como *C. acetobutyricum* (Diez-Gonzalez et al., 1995), *C. diolis* (Matsumoto & Nishimura, 2007), *C. termitidis*, *C. beijerinckii* (Gomez-Flores et al., 2017), *C. butyricum* (Detman et al., 2019), *C. tyrobutyricum* (Jo et al., 2008; Wu et al., 2012), y especies de *Megasphaera*, en particular, *M. elsdenii* (Ohnishi et al., 2010, 2022).

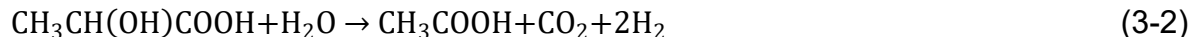
El ácido láctico puede transformarse en H₂ y ácido acético o ácido butírico. Sin embargo, se ha informado que para la conversión óptima del ácido láctico tanto por cultivos puros como por cultivos mixtos es esencial la presencia de ácido acético como una fuente externa de carbono (Matsumoto & Nishimura, 2007; Wu et al., 2012; Grause et al., 2012; García-Depraect & León-Becerril, 2018; Detman et al., 2021; Fuentes-Santiago et al., 2023). Esto se debe a que la reacción de conversión de ácido láctico y acético a H₂ y ácido butírico es energéticamente más favorable en comparación a las reacciones de conversión del ácido láctico como único sustrato a H₂ y ácido acético o ácido butírico (Ecuación 3-1, 3-2 y 3-3, respectivamente; Matsumoto & Nishimura, 2007 Jo et al., 2008; Saady, 2013; Wu et al., 2012).



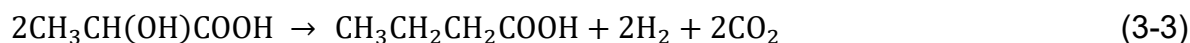
$$\Delta G^\circ = -56,6 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^{\circ} = -183,9 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^{\circ} = -4,2 \text{ kJ/mol}$$

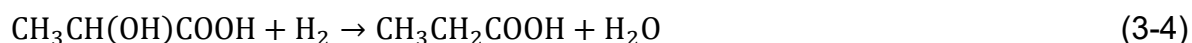


$$\Delta G^{\circ} = -64,1 \text{ kJ/mol}$$

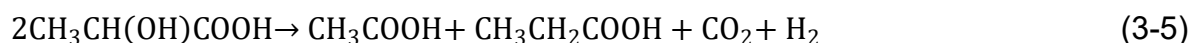
Así, la preferencia termodinámica por la conversión del ácido láctico podría explicar parcialmente la ocurrencia del aumento y disminución simultánea del ácido acético y ácido láctico, acompañada de una alta producción de ácido butírico y liberación de H_2 durante los procesos de FO en cultivos mixtos (García-Depraect, Valdez-Vázquez, et al., 2019). Según Blanco et al. (2019) y Aranda-Jaramillo et al. (2023), la producción de H_2 a partir del lactato y acetato podría explicar el 74,5 a 75% del volumen total de H_2 producido en sus experimentos. Además, Fuentes-Santiago et al. (2023) notaron que la combinación del ácido láctico y acético fue el sustrato preferencial de la comunidad microbiana productora de H_2 en vez de los carbohidratos, logrando rendimientos de H_2 en términos de DQO inicial que fueron casi cinco veces mayores utilizando ácido láctico y ácido acético que carbohidratos.

Aunque la formación de ácidos acético y butírico durante la producción de H_2 está bien documentada, el ácido propiónico ha asociado comúnmente con el consumo del H_2 en lugar de su generación (Sivagurunathan et al., 2014; Pagliano et al., 2019; Laikova et al., 2024). Esto se debe a las rutas metabólicas más prevalentes para la síntesis de ácido propiónico, como la ruta del acrilato, que requieren NADH para la

conversión de ácido láctico en ácido propiónico, donde el NADH puede derivarse del consumo de H₂ (Ecuación 3-4; Prabhu et al., 2012; Gonzalez-Garcia et al., 2017; Asunis et al., 2019; Zhao et al., 2024). La ruta del acrilato se ha identificado en bacterias no relacionadas, incluidas *Clostridium propionicum*, *M. elsdenii*, y *Prevotella ruminicola* (Gonzalez-Garcia et al., 2017).



Sin embargo, estudios recientes han señalado una correlación notable entre el aumento de los niveles de ácido propiónico y la alta producción de H₂ a partir del consumo de ácido láctico (Ohnishi et al., 2022; Villanueva-Galindo et al., 2024). Ohnishi et al. (2022) observaron un patrón similar en cultivos de *M. elsdenii*, donde el H₂ producido podría provenir de vías metabólicas que convierten el ácido láctico en ácidos propiónico y acético (Ecuación 3-5). Estos hallazgos revelan que la relación entre el metabolismo del ácido láctico y la producción de H₂ es bastante compleja y puede variar según la composición de la comunidad microbiana y las condiciones de fermentación.



Otro aspecto que muestra fuertemente la relevancia de las rutas metabólicas capaces de transformar el ácido láctico en H₂ como suceso muy común en la FO fue la caracterización de la comunidad microbiana, que explicó simultáneamente el comportamiento en el perfil de los metabolitos solubles y la producción de H₂ (Fuess

et al., 2018; García-Depraect & León-Becerril, 2018; Detman et al., 2021; Fuentes-Santiago et al., 2023; Dudek et al., 2024). De acuerdo con el análisis de la comunidad microbiana, la codominancia de los miembros de BAL y BPH fue crucial para la producción de H_2 , inducida por carbohidratos y ácido láctico, respectivamente. Además, se observó una transición significativa de poblaciones productoras de ácido láctico a productoras de H_2 utilizando el ácido láctico acumulado por la fermentación de carbohidratos por BAL (Detman et al., 2021; Fuentes-Santiago et al., 2023).

El mecanismo exacto de este fenómeno aún se desconoce, pero hasta ahora, su explicación se basa en la hipótesis inicialmente propuesta por Sikora et al. (2013) y posteriormente reforzada por García-Depraect et al. (2017), respecto a la producción de H_2 por alimentación cruzada de lactato similar a la comunidad microbiana de gastrointestinal humana. Esto sugiere que la secuencia ecológica observada, modulada por interacciones competitivas y cooperativas, condujo a la selección de una comunidad microbiana dominada por una asociación sinérgica entre BAL y BPH, resultando en vías metabólicas acopladas con éxito para el crecimiento y funcionamiento general de la comunidad microbiana dentro del biorreactor, donde el ácido láctico fue el recurso común que impulsó la producción de H_2 por FO (Fuentes-Santiago et al., 2023; García-Depraect, Valdez-Vázquez, et al., 2019), como se ilustra en la Figura 3-3.

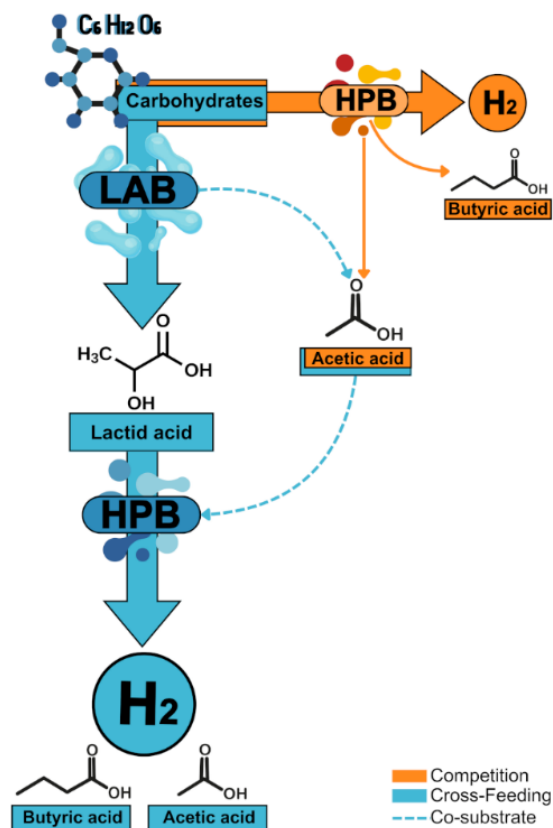


Figura 3-3. Sistema sintrófico compuesto por bacterias ácido lácticas (LAB) y bacterias productoras de hidrógeno (HPB) para la producción de hidrógeno (H_2) impulsada por ácido láctico.

Con este enfoque, estudios recientes apoyan el papel clave del ácido láctico en la asociación bacteriana entre BAL y BPH en la producción de H_2 por FO utilizando residuos agroindustriales, como residuos de frutas y verduras (Martínez-Mendoza et al., 2022; García-Depraect & León-Becerril, 2023), residuos de alimentos (Regueira-Marcos et al., 2023; García-Depraect & León-Becerril, 2023; Xue et al., 2024), vinaza de tequila (García-Depraect & León-Becerril, 2023), suero de queso (Aranda-Jaramillo et al., 2023; García-Depraect & León-Becerril, 2023), bagazo de agave (Dudek et al., 2024), entre otros, donde el ácido láctico fue un precursor importante para la producción de H_2 . Esto requirió la presencia de carbohidratos

para una fermentación secuencial de dos pasos: la producción y el consumo de ácido láctico entre estos microorganismos favorecieron una conversión eficiente del sustrato, lo que resultó en mejores tasas de producción y rendimientos de H₂ (Regueira-Marcos et al., 2023; Martínez-Fraile et al., 2024; Xue et al., 2024).

Por lo tanto, aunque puede ser muy tentador sugerirlo, la coexistencia entre BAL y BPH establecida por la alimentación cruzada de lactato forma un sistema sintrófico que puede reducir la competencia mediante la asignación eficiente de recursos (Figura 3-3). En este sistema, los carbohidratos actúan como el recurso primario. Dado que las BAL son competidoras más eficientes en la utilización de los carbohidratos, las BPH se adaptan para utilizar otra fuente de carbono, como el ácido láctico, como recurso secundario. Esta estrategia permite a BPH persistir en la comunidad microbiana sin gastar energía en la competencia impuesta por las BAL, lo cual podría llevar a su eliminación. Las BPH, capaces de utilizar el ácido láctico como recurso secundario, pueden, de esta manera, vencer la competencia impuesta por las BAL (Pham et al., 2022). De esta manera, la ruta de producción de H₂ impulsada por lactato puede ayudar a mitigar los efectos inhibitorios causados por la invasión y colonización de BAL en el proceso de FO al utilizar sustratos que sustentan su crecimiento, como suero de queso y residuos de alimentos (Aranda-Jaramillo et al., 2023; García-Depraect & León-Becerril, 2023, Martínez-Fraile et al., 2024).

De acuerdo con Fuess et al. (2018), la ruta metabólica del ácido láctico sirve como un mecanismo utilizado por las bacterias para obtener energía y reemplazar la

conversión directa de carbohidratos en condiciones de baja disponibilidad de estos. En este contexto, las BAL son actores claves en la dinámica microbiana en los sistemas de FO alimentados con residuos orgánicos, proporcionando una fuente de carbono alternativa y prometedora para producir H_2 (Fuess et al., 2018). Este fenómeno está recibiendo gran atención ya que es una estrategia adecuada que podría proporcionar una estabilidad en procesos de FO (Blanco et al., 2019), gracias a que estudios del microbioma intestinal han argumentado que la alimentación cruzada, el intercambio de metabolitos entre diferentes microorganismos, emerge como el mecanismo clave para establecer comunidades microbianas comensales que sean estables, resilientes a perturbaciones y resistentes a la invasión de microorganismos no relevantes (Culp & Goodman, 2023).

Es así como, la integración de BAL y BPH mediante alimentación cruzada de lactato representa un enfoque prometedor e innovador para optimizar la producción de H_2 en sistemas FO. Este fenómeno está recibiendo considerable atención ahora, ya que no solo mejora la eficiencia de la conversión del sustrato, sino que también contribuye a la estabilidad y resiliencia de la comunidad microbiana dentro del biorreactor (Blanco et al., 2019). Las investigaciones futuras deben centrarse en dilucidar los mecanismos precisos que subyacen a esta interacción, así como en comprender varios factores como las características del sustrato, las condiciones de cultivo (p. ej., pH, nutrientes, temperatura) y operación (p. ej., TRH, OLR). Este conocimiento es crucial para aprovechar al máximo el potencial del ácido láctico como sustrato alternativo para la producción sostenible de H_2 a partir de residuos orgánicos (García-Depraect et al., 2021).

3.5. Conclusiones

La presente revisión destaca el doble papel de las bacterias lácticas en la producción de hidrógeno mediante la fermentación oscura. En este contexto, las bacterias lácticas pueden actuar como competidoras al consumir eficientemente los sustratos disponibles, lo que limita la producción de hidrógeno. Sin embargo, también pueden desempeñar un papel facilitador al establecer interacciones sinérgicas con las bacterias productoras de hidrógeno, aumentando así la eficiencia de la generación de hidrógeno.

Este análisis destaca que el ácido láctico producido por bacterias ácido lácticas puede utilizarse como sustrato alternativo para las bacterias productoras de hidrógeno, lo que representa un cambio conceptual respecto a lo previamente reportado. Las rutas metabólicas tradicionales basadas en la conversión de carbohidratos pueden complementarse o incluso reemplazarse mediante la conversión de ácido láctico en hidrógeno, lo que no solo mejora la eficiencia del proceso, sino que también mejora la estabilidad del sistema al reducir la competencia microbiana, permitiendo que el ácido láctico se convierta en un recurso valioso para la producción de hidrógeno en lugar de un inhibidor.

Desde una perspectiva aplicada, este estudio sugiere que la cooperación sinérgica entre las bacterias ácido lácticas y las bacterias productoras de hidrógeno en el proceso de fermentación oscura puede mejorar significativamente la viabilidad de convertir residuos agroindustriales en hidrógeno. Sin embargo, es crucial que la

investigación futura aborde la optimización de las condiciones operativas (p. ej., pH, composición del sustrato, temperatura), así como el diseño de sistemas integrados para desacoplar la fermentación en dos etapas: fermentación láctica seguida de hidrogenesis impulsada por ácido láctico. Este enfoque mejoraría la conversión general de carbohidratos en hidrógeno al optimizar la concentración de ácido láctico en el proceso de fermentación oscura, maximizar la producción de hidrógeno y estabilizar la comunidad microbiana. Dicha estrategia facilitaría el desarrollo de inóculos especializados adecuados para aplicaciones de producción de hidrógeno a gran escala.

3.6. Bibliografía

- Adav, S. S., Lee, D. J., Wang, A., & Ren, N. (2009). Functional consortium for hydrogen production from cellobiose: concentration-to-extinction approach. *Bioresource Technology*, 100(9), 2546–2550. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.014>
- Akhlaghi, N., & Najafpour-Darzi, G. (2020). A comprehensive review on biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(43), 22492–22512. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.182>
- Andreani, C. L., Tonello, T. U., Mari, A. G., Leite, L. C. C., Campaña, H. D., Lopes, D. D., Rodrigues, J. A. D., & Gomes, S. D. (2019). Impact of operational conditions on development of the hydrogen-producing microbial consortium in an AnSBBR from cassava wastewater rich in lactic acid. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(3), 1474–1482. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.155>
- Ayala-Campos, O. R., Sanchez, A., Rebollar, E. A., & Valdez-Vazquez, I. (2022). Plant-associated microbial communities converge in fermentative hydrogen production and form a core microbiome. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(46), 20049–20063. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.04.155>
- Asunis, F., De Gioannis, G., Isipato, M., Muntoni, A., Poletti, A., Pomi, R., Rossi, A., & Spiga, D. (2019). Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. *Bioresource*

Technology, 289(121722), 1–11.

- Aranda-Jaramillo, B., León-Becerril, E., Aguilar-Juárez, O., Castro-Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2023). Feasibility Study of Biohydrogen Production from Acid Cheese Whey via Lactate-Driven Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(644), 1–12. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070644>
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., & Margaritis, A. (2009). Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(6), 2573–2579. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.010>
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., & Margaritis, A. (2010). Fermentative hydrogen production by diverse microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(10), 5021–5027. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.072>
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., & Margaritis, A. (2011). Revivability of fermentative hydrogen producing bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(3), 2086–2092. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.038>
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., & Reid, G. (2008). The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(15), 4064–4073. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.069>
- Bastidas-Oyanedel, J. R., Bonk, F., Thomsen, M. H., & Schmidt, J. E. (2019). The Future Perspectives of Dark Fermentation: Moving from Only Biohydrogen to Biochemicals. In J. R. Bastidas-Oyanedel & J. E. Schmidt (Eds.), *Biorefinery* (pp. 375–413). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_15
- Blanco, V. M. C., Oliveira, G. H. D., & Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. *Renewable Energy*, 139, 1310–1319. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>
- Bundhoo, M. A. Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16), 6713–6733. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2016.03.057>
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses:

useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>

Campos-Flores, R. C., Reyna-Gómez, L. M., Suárez-Vázquez, S. I., Robledo-Olivo, A., & Cruz-López, A. (2024). Effect of Inoculum Pretreatment and Operational Mode of Reactor on BioH₂ Production from Nixtamalization (Nejayote) and Abattoir Wastewater. *Waste and Biomass Valorization*, 15(4), 2145–2158. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02279-1>

Canto-Robertos, M., Quintal-Franco, C., Ponce-Caballero, C., Vega-De Lille, M., & Moreno-Andrade, I. (2023). Inhibition of hydrogen production by endogenous microorganisms from food waste. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 40(1), 137–150. <https://doi.org/10.1007/s43153-022-00235-5>

Cardoso Ribeiro, J., Mota, V. T., Maia de Oliveira, V., Dacanai, G. C., & Zaiat, M. (2022). Hydrogen and organic acid production from dark fermentation of sugarcane vinasse without buffers in mesophilic and thermophilic conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 97(6), 1585–1596. <https://doi.org/10.1002/jctb.7003>

Castelló, E., Nunes Ferraz-Junior, A. D., Andreani, C., Anzola-Rojas, M. del P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Gomes, S. D., Maintinguer, S. I., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Schiappacasse-Dasati, M., Tapia-Venegas, E., Valdez-Vázquez, I., Vesga-Baron, A., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: possible causes and solutions. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 119). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>

Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Domínguez González, J. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 30(1), 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>

Chatellard, L., Trably, E., & Carrère, H. (2016). The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. *Bioresource Technology*, 221, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.084>

Chen, H., Wu, J., Huang, R., Zhang, W., He, W., Deng, Z., Han, Y., Xiao, B., Luo, H., & Qu, W. (2022). Effects of temperature and total solid content on biohydrogen production from dark fermentation of rice straw: Performance and microbial community characteristics. *Chemosphere*, 286(131655), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131655>

- Chen, Y., Yin, Y., & Wang, J. (2021). Recent advance in inhibition of dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(7), 5053–5073. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.096>
- Cheng, C. H., Hung, C. H., Lee, K. S., Liao, P. Y., Liang, C. M., Yang, L. H., Lin, P. J., & Lin, C. Y. (2008). Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 5242–5249. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.017>
- Cheng, W. xin, Wang, L. ling, Xu, Y., Li, S. jia, Wang, Q., Chen, R. ping, & Yu, L. (2023). Performance and mechanism of different pretreatment methods for inoculated sludge in biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 383(129234), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129234>
- Chojnacka, A., Błaszczyk, M. K., Szczesny, P., Nowak, K., Sumińska, M., Tomczyk-Zak, K., Zielenkiewicz, U., & Sikora, A. (2011). Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. *Bioresource Technology*, 102(21), 10057–10064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.063>
- Cieciura-Włoch, W., Borowski, S., & Domański, J. (2020). Dark fermentative hydrogen production from hydrolyzed sugar beet pulp improved by iron addition. *Bioresource Technology*, 314(123713). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123713>
- Coban, H. B. (2020). Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(4), 569–591. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>
- Culp, E. J., & Goodman, A. L. (2023). Cross-feeding in the gut microbiome: ecology and mechanisms. *Cell Host and Microbe*, 31(4), 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.03.016>
- Dareioti, M. A., Vavouraki, A. I., & Kornaros, M. (2014). Effect of pH on the anaerobic acidogenesis of agroindustrial wastewaters for maximization of bio-hydrogen production: a lab-scale evaluation using batch tests. *Bioresource Technology*, 162, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.149>
- Deng, Y. J., & Wang, S. Y. (2016). Synergistic growth in bacteria depends on substrate complexity. *Journal of Microbiology*, 54(1), 23–30. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5461-9>
- Detman, A., Laubitz, D., Chojnacka, A., Wiktorowska-Sowa, E., Piotrowski, J.,

- Salamon, A., Kaźmierczak, W., Błaszczuk, M. K., Barberan, A., Chen, Y., Łupikasza, E., Yang, F., & Sikora, A. (2021). Dynamics and complexity of dark fermentation microbial communities producing hydrogen from sugar beet molasses in continuously operating packed bed reactors. *Frontiers in Microbiology*, 11(612344), 19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612344>
- Detman, A., Mielecki, D., Chojnacka, A., Salamon, A., & Błaszczuk, M. K. (2019). Converting lactate and acetate to butyrate: *Clostridium butyricum* and microbial communities from dark fermentation bioreactors. *Microbial Cell Factories*, 18(36), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1085-1>
- Diez-gonzalez, F., Russell, J. B., & Hunter, J. B. (1995). The role of an NADH-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *Clostridium acetobutylicum* strain P262. *Arch. Microbiol.*, 164, 36–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02568732>
- Dincer, I. (2023). Hydrogen 1.0: a new age. *International Journal of Hydrogen Energy*, 488, 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.01.124>
- Dudek, K., Guzmán, C. L. Á., & Valdez-Vazquez, I. (2024). Microbial activity of lactic acid bacteria and hydrogen producers mediated by pH and total solids during the consolidated bioprocessing of agave bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(70), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03888-1>
- Dzulkarnain, E. L. N., Audu, J. O., Wan Dagang, W. R. Z., & Abdul-Wahab, M. F. (2022). Microbiomes of biohydrogen production from dark fermentation of industrial wastes: current trends, advanced tools and future outlook. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(16). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00504-8>
- Eder, A. S., Magrini, E., Spengler, A., Tonioli Dasilva, J., Beal, L. L., & Suelen, P. (2020). Environmental technology & Innovation comparison of hydrogen and volatile fatty acid production by *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterobacter aerogenes* singly, in co-cultures or in the bioaugmentation of microbial consortium from sugarcane. *Environmental Technology & Innovation*, 18, 100638. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100638>
- Elsharnouby, O., Hafez, H., Nakhla, G., & El Naggar, M. H. (2013). A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12), 4945–4966. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.032>
- Ergal, Ī., Gräf, O., Hasibar, B., Steiner, M., Vukotić, S., Bochmann, G., Fuchs, W., &

- Rittmann, S. K. M. R. (2020). Biohydrogen production beyond the Thauer limit by precision design of artificial microbial consortia. *Communications Biology*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01159-x>
- Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., Cabrol, L., Carminato, V. M., Carrillo-Reyes, J., Cisneros-Pérez, C., Fuentes, L., Moreno-Andrade, I., Razo-Flores, E., Filippi, G. R., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., & Zaiat, M. (2016). Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 3371–3384. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7325-y>
- Fang, H. H. P., Liu, H., & Zhang, T. (2002). Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(1), 44–52. <https://doi.org/10.1002/bit.10174>
- Feng, K., Li, H., & Zheng, C. (2018). Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresource Technology*, 270, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.035>
- Filannino, P., Bai, Y., Di, R., Gobetti, M., & Michael, G. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, 46, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.018>
- Fuentes, L., Braga, L., Castelló, E., & Etchebehere, C. (2018). Work scheme to isolate the different micro-organisms found in hydrogen-producing reactors: a study of effectiveness by pyrosequencing analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 96–110. <https://doi.org/10.1111/jam.13763>
- Fuentes-Santiago, V., Valdez-Vazquez, I., Vital-Jácome, M., Zavala-Méndez, M., Razo-Flores, E., & Carrillo-Reyes, J. (2023). Carbohydrates/acid ratios drives microbial communities and metabolic pathways during biohydrogen production from fermented agro-industrial wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(110302), 9. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110302>
- Fuess, L. T., Ferraz, A. D. N., Machado, C. B., & Zaiat, M. (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. *Bioresource Technology*, 247, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>
- Fuess, L. T., Kiyuna, L. S. M., Ferraz, A. D. N., Persinoti, G. F., Squina, F. M., Garcia, M. L., & Zaiat, M. (2017). Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an

innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Applied Energy*, 189, 480–491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>

Gabriel-Barajas, J. E., Arreola-Vargas, J., Toledo-Cervantes, A., Méndez-Acosta, H. O., Rivera-González, J. C., & Snell-Castro, R. (2022). Prokaryotic population dynamics and interactions in an AnSBBR using tequila vinasses as substrate in co-digestion with acid hydrolysates of *Agave tequilana* var. *azul* bagasse for hydrogen production. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 413–428. <https://doi.org/10.1111/jam.15196>

García-Bayona, L., & Comstock, L. E. (2018). Bacterial antagonism in host-associated microbial communities. *Science*, 361(6408), 12. <https://doi.org/10.1126/science.aat2456>

García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., Muñoz, R., Rene, E. R., León-Becerril, E., Valdez-Vazquez, I., Kumar, G., Reyes-Alvarado, L. C., Martínez-Mendoza, L. J., Carrillo-Reyes, J., & Buitrón, G. (2021). A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: the key to unlocking enhanced dark fermentative processes. *Bioresource Technology*, 324, 124595. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124595>

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

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

García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2023). Use of a Highly Specialized Biocatalyst to Produce Lactate or Biohydrogen and Butyrate from Agro-Industrial Resources in a Dual-Phase Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(787), 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090787>

García-Depraect, O., Mena-Navarro, V., Muñoz, R., Rene, E. R., & León-Becerril, E. (2023b). Effect of nitrogen and iron supplementation on the process performance and microbial community structure of a hydrogen-producing reactor continuously fed with tequila vinasse. *Fuel*, 334(2). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.126736>

- García-Depraect, O., Mirzazada, I., Martínez-Mendoza, L. J., Regueira-Marcos, L., & Muñoz, R. (2023a). Biotic and abiotic insights into the storage of food waste and its effect on biohydrogen and methane production potential. *Journal of Water Process Engineering*, 53(103840), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103840>
- García-Depraect, O., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., & León-Becerril, E. (2019a). Effect of process parameters on enhanced biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway. *Bioresource Technology*, 273, 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.056>
- García-Depraect, O., Valdez-Vázquez, I., Rene, E. R., Gómez-Romero, J., López-López, A., & León-Becerril, E. (2019b). Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: metabolic and microbial community dynamics. *Bioresource Technology*, 282, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.100>
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N., & Mehmood, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.03.002>
- Ghanbari, M., & Jami, M. (2013). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: a promising approach to seafood biopreservation. In *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (pp. 380–404). InTech. <https://doi.org/10.5772/50705>
- Ghimire, A., Trably, E., Frunzo, L., Pirozzi, F., Lens, P. N. L., Esposito, G., Cazier, E. A., & Escudie, R. (2018). Effect of total solids content on biohydrogen production and lactic acid accumulation during dark fermentation of organic waste biomass. *Bioresource Technology*, 248, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.062>
- Gomes, B. C., Rosa, P. R. F., Etchebehere, C., Silva, E. L., & AmâncioVaresche, M. B. (2015). Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(28), 8650–8660. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.035>
- Gomes, S. D., Fuess, L. T., Mañunga, T., De Lima Gomes, P. C. F., & Zaiat, M. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(19), 8120–8131. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.186>

- Gomez-Flores, M., Nakhla, G., & Hafez, H. (2017). Hydrogen production and microbial kinetics of *Clostridium termitidis* in monoculture and co-culture with *Clostridium beijerinckii* on cellulose. *AMB Express*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0256-2>
- Gomez-Romero, J., Gonzalez-Garcia, A., Chairez, I., Torres, L., & García-Peña, E. I. (2014). Selective adaptation of an anaerobic microbial community: biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 12541–12550. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.050>
- Gonzalez-Garcia, R. A., Mccubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L. K., & Marcellin, E. (2017). Microbial Propionic Acid Production. *Fermentation*, 3(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/fermentation3020021>
- Goren, Y. A., Dincer, I., & Khalvati, A. (2023). A comprehensive review on environmental and economic impacts of hydrogen production from traditional and cleaner resources. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(6), 111187. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111187>
- Grause, G., Igarashi, M., Kameda, T., & Yoshioka, T. (2012). Lactic acid as a substrate for fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(22), 16967–16973. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.08.096>
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrre, H., & Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660–10673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Hangri, S., Derbal, K., Policastro, G., Panico, A., Contestabile, P., Pontoni, L., Race, M., & Fabbicino, M. (2024). Combining pretreatments and co-fermentation as successful approach to improve biohydrogen production from dairy cow manure. *Environmental Research*, 246, 118118. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118118>
- Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1339–1347. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00090-3)
- Hidalgo, D., Pérez-Zapatero, E., & Martín-Marroquín, J. M. (2023). Comparative effect of acid and heat inoculum pretreatment on dark fermentative biohydrogen production. *Environmental Research*, 239(117433), 1–10.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117433>

- Hunag, W. H., Shieh, G. S., & Wang, F. S. (2012). Optimization of fed-batch fermentation using mixture of sugars to produce ethanol. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.06.007>
- Hung, C. H., Cheng, C. H., Guan, D. W., Wang, S. T., Hsu, S. C., Liang, C. M., & Lin, C. Y. (2011). Interactions between *Clostridium* sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14), 8704–8711. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.010>
- Hung, C. H., Lee, K. S., Cheng, L. H., Huang, Y. H., Lin, P. J., & Chang, J. S. (2007). Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(3), 693–701. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0854-7>
- Im, S., Lee, M. K., Yun, Y. M., Cho, S. K., & Kim, D. H. (2020). Effect of storage time and temperature on hydrogen fermentation of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(6), 3769–3775. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.215>
- Im, W. T., Kim, D. H., Kim, K. H., & Kim, M. S. (2012). Bacterial community analyses by pyrosequencing in dark fermentative H₂-producing reactor using organic wastes as a feedstock. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(10), 8330–8337. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.167>
- IRENA. (2021). Green hydrogen supply: a guide to policy making. In International Renewable Energy Agency. International Renewable Energy Agency.
- Jang, S., Kim, D. H., Yun, Y. M., Lee, M. K., Moon, C., Kang, W. S., Kwak, S. S., & Kim, M. S. (2015). Hydrogen fermentation of food waste by alkali-shock pretreatment: Microbial community analysis and limitation of continuous operation. *Bioresource Technology*, 186, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.031>
- Jia, X., Wang, Y., Ren, L., Li, M., Tang, R., Jiang, Y., & Hou, J. (2019). Early warning indicators and microbial community dynamics during unstable stages of continuous hydrogen production from food wastes by thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(57), 30000–30013. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.082>

- Jo, J. H., Jeon, C. O., Lee, D. S., & Park, J. M. (2007). Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *Journal of Biotechnology*, 131(3), 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.492>
- Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology*, 99(14), 6666–6672. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.067>
- Juang, C., Whang, L., & Cheng, H. (2011). Bioresource Technology Evaluation of bioenergy recovery processes treating organic residues from ethanol fermentation process. *Bioresource Technology*, 102(9), 5394–5399. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.069>
- Karim, A., Islam, M. A., Mishra, P., Yousuf, A., Faizal, C. K. M., & Khan, M. M. R. (2021). Technical difficulties of mixed culture driven waste biomass-based biohydrogen production: Sustainability of current pretreatment techniques and future prospective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 151(111519), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111519>
- Kandler, O., Schillinger, U., & Weiss, N. (1983). *Lactobacillus bifermentans* sp. nov., nom. rev., an Organism Forming CO₂ and H₂ from lactic acid. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(3), 408–412. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80025-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80025-3)
- Kim, D. H., Jang, S., Yun, Y. M., Lee, M. K., Moon, C., Kang, W. S., Kwak, S. S., & Kim, M. S. (2014). Effect of acid-pretreatment on hydrogen fermentation of food waste: microbial community analysis by next generation sequencing. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(29), 16302–16309. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.004>
- Kim, D., Kim, S., & Shin, H. (2009). Enzyme and microbial technology hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.06.013>
- Kim, S. H., Han, S. K., & Shin, H. S. (2006). Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, 41(1), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.06.013>
- Kim, T. H., Lee, Y., Chang, K. H., & Hwang, S. J. (2012). Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresource Technology*, 103(1), 136–141.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.093>

- Kumar, P., Patel, S. K. S., Lee, J. K., & Kalia, V. C. (2013). Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1543–1561. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.007>
- Kwon, A., Young, D., Koo, M., Ryoo, C. R., Kang, C. H., Min, K. H., & Kim, W. J. (2002). Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in kimchi and its characteristics. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 96–105.
- Laikova, A. A., Zhuravleva, E. A., Kovalev, A. A., Shekhurdina, S. V., Parshina, S. N., & Litt, Y. V. (2024). Biohydrogen Production by Mono- Versus Co- and Mixed Cultures. In J. C. Soccol, C.R., Brar, S.K., Permaul, K., Pakshirajan, K., de Carvalho (Ed.), *Biohydrogen - Advances and Processes. Biofuel and Biorefinery Technologies*, vol 13 (pp. 83–123). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-49818-3_5
- Laathanachareon, T., Kanchanasuta, S., Mhuanthong, W., Phalakornkule, C., Pisutpaisal, N., & Champreda, V. (2014). Analysis of microbial community adaptation in mesophilic hydrogen fermentation from food waste by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *Journal of Environmental Management*, 144, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.019>
- Laslo, É., György, É., & András, C. D. (2020). Bioprotective potential of lactic acid bacteria. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 13(1), 118–130. <https://doi.org/10.2478/ausal-2020-0007>
- Lee, Z., Li, S., Lin, J., Wang, Y., Kuo, P., & Cheng, S. (2008). Effect of pH in fermentation of vegetable kitchen wastes on hydrogen production under a thermophilic condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5234–5241. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.006>
- Li, S. L., Lin, J. S., Wang, Y. H., Lee, Z. K., Kuo, S. C., Tseng, I. C., & Cheng, S. S. (2011). Strategy of controlling the volumetric loading rate to promote hydrogen-production performance in a mesophilic-kitchen-waste fermentor and the microbial ecology analyses. *Bioresource Technology*, 102(18), 8682–8687. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.067>
- Li, S. L., Whang, L. M., Chao, Y. C., Wang, Y. H., Wang, Y. F., Hsiao, C. J., Tseng, I. C., Bai, M. Der, & Cheng, S. S. (2010). Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(1), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.033>

- Litti, Y. V., Kovalev, D. A., Kovalev, A. A., Merkel, A. Y., Vishnyakova, A. V., Russkova, Y. I., & Nozhevnikova, A. N. (2021). Auto-selection of microorganisms of sewage sludge used as an inoculum for fermentative hydrogen production from different substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(58), 29834–29845. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.06.174>
- Lucas, S. D. M., Peixoto, G., Mockaitis, G., Zaiat, M., & Gomes, S. D. (2015). Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: kinetic evaluation and technological feasibility. *Renewable Energy*, 75, 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.10.025>
- Mariakakis, I., Meyer, C., & Steinmetz, H. (2012). Fermentative hydrogen production by molasses; effect of hydraulic retention time, organic loading rate and microbial dynamics. In D. Minic (Ed.), *Hydrogen Energy - Challenges and Perspectives* (pp. 121–148). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/47750>
- Marone, A., Izzo, G., Mentuccia, L., Massini, G., Paganin, P., Rosa, S., Varrone, C., & Signorini, A. (2014). Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production. *Renewable Energy*, 68, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.01.013>
- Martínez-Mendoza, L. J., Lebrero, R., Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2022). Influence of key operational parameters on biohydrogen production from fruit and vegetable waste via lactate-driven dark fermentation. *Bioresource Technology*, 364(August). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128070>
- Matsumoto, M., & Nishimura, Y. (2007). Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(3), 236–241. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.236>
- Mazareli, R. C. d. S., Villa-Montoya, A. C., Delforno, T. P., Centurion, V. B., Maia de Oliveira, V., Silva, E. L., & Amâncio Varesche, M. B. (2020). Metagenomic analysis of autochthonous microbial biomass from banana waste: screening design of factors that affect hydrogen production. *Biomass and Bioenergy*, 138(105573), 12. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105573>
- Mokoena, M. P., Omatola, C. A., & Olaniran, A. O. (2021). Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. *Molecules*, 26(22). <https://doi.org/10.3390/molecules26227055>
- Moon, C., Jang, S., Yun, Y. M., Lee, M. K., Kim, D. H., Kang, W. S., Kwak, S. S., & Kim, M. S. (2015). Effect of the accuracy of pH control on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 179, 595–601.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.128>

- Moreno-Andrade, I., Berrocal-Bravo, M. J., & Valdez-Vazquez, I. (2022). Biohydrogen production from food waste and waste activated sludge in codigestion: influence of organic loading rate and changes in microbial community. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 98(1), 230–237. <https://doi.org/10.1002/jctb.7238>
- Moreno, E. L., Zapata-Zapata, A. D., & Kim, D. (2019). Hydrogen production from coffee mucilage in dark fermentation with organic wastes. *Energies*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/en12010071>
- Moreno, E. (2016). Estudio del proceso de generación de biohidrógeno mediante fermentación anaerobia de residuos orgánicos agrícolas. (Doctoral dissertation). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Morra, S., Arizzi, M., Allegra, P., La Licata, B., Sagnelli, F., Zitella, P., Gilardi, G., & Valetti, F. (2014). Expression of different types of [FeFe]-hydrogenase genes in bacteria isolated from a population of a bio-hydrogen pilot-scale plant. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(17), 9018–9027. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.009>
- Mota, V. T., Ferraz Júnior, A. D. N., Trably, E., & Zaiat, M. (2018). Biohydrogen production at pH below 3.0: is it possible? *Water Research*, 128, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.060>
- Mugnai, G., Borruso, L., Mimmo, T., Cesco, S., Luongo, V., Frunzo, L., Fabbricino, M., Pirozzi, F., Cappitelli, F., & Villa, F. (2021). Dynamics of bacterial communities and substrate conversion during olive-mill waste dark fermentation: Prediction of the metabolic routes for hydrogen production. *Bioresource Technology*, 319(124157), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124157>
- Muñoz-Páez, K. M., Alvarado-Michi, E. L., Buitrón, G., & Valdez-Vazquez, I. (2019). Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 4, 2289–2297. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.04.139>
- Muñoz-Páez, K. M., Vargas, A., & Buitrón, G. (2023). Feedback control-based strategy applied for biohydrogen production from acid cheese whey. *Waste and Biomass Valorization*, 14(2), 447–460. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01865-z>

- Nikolaidis, P., & Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67, 597–611. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044>
- Niz, M. Y. K., Etchelet, I., Fuentes, L., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2019). Extreme thermophilic condition: an alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(41), 22876–22887. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.015>
- Noblecourt, A., Christophe, G., Larroche, C., & Fontanille, P. (2018). Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. *Bioresource Technology*, 247, 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.199>
- Noike, T., Ko, I. B., Yokoyama, S., Kohno, Y., & Li, Y. Y. (2005). Continuous hydrogen production from organic waste. *Water Science and Technology*, 52(1–2), 145–151. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0510>
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., & Ohba, M. (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12). [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00120-9)
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., & Panyim, S. (2003). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 81(2), 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00219-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00219-2)
- Novik, G., Meerovskaya, O., & Savich, V. (2017). Waste degradation and utilization by lactic acid bacteria: use of lactic acid bacteria in production of food additives, bioenergy and biogas. In D. N. Karunaratne & G. Pamunuwa (Eds.), *Food Additives* (pp. 105–146). InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69284>
- Ohnishi, A., Bando, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2010). Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(16), 8544–8553. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.113>
- Ohnishi, A., Hasegawa, Y., Abe, S., Bando, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2012). Hydrogen fermentation using lactate as the sole carbon source: Solution for “blind spots” in biofuel production. *RSC Advances*, 2(22), 8332–8340. <https://doi.org/10.1039/c2ra20590d>
- Ohnishi, A., Hasegawa, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2022). Biohydrogen production by mixed culture of *Megasphaera elsdenii* with lactic acid bacteria

- as Lactate-driven dark fermentation. *Bioresource Technology*, 343(126076), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126076>
- Pagliano, G., Ventorino, V., Panico, A., Romano, I., Pirozzi, F., & Pepe, O. (2019). Anaerobic process for bioenergy recovery from dairy waste: Meta-analysis and enumeration of microbial community related to intermediates production. *Frontiers in Microbiology*, 9(3229), 1–15.
- Pandey, A., Srivastava, S., Rai, P., & Duke, M. (2019). Cheese whey to biohydrogen and useful organic acids: a non-pathogenic microbial treatment by *L. acidophilus*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42752-3>
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 521–542. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132007000300018>
- Park, J. H., Kim, D. H., Kim, S. H., Yoon, J. J., & Park, H. D. (2018). Effect of substrate concentration on the competition between *Clostridium* and *Lactobacillus* during biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(25), 11460–11469. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.150>
- Park, J. H., Lee, S. H., Ju, H. J., Kim, S. H., Yoon, J. J., & Park, H. D. (2016). Failure of biohydrogen production by low levels of substrate and lactic acid accumulation. *Renewable Energy*, 86, 889–894. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.09.016>
- Park, J. H., Park, J. H., Sim, Y. B., Kim, S. H., & Park, H. D. (2019). Formation of a dynamic membrane altered the microbial community and metabolic flux in fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, 282, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.124>
- Pérez-Rangel, M., Barboza-Corona, J. E., Navarro-Díaz, M., Escalante, A. E., & Valdez-Vazquez, I. (2021). The duo *Clostridium* and *Lactobacillus* linked to hydrogen production from a lignocellulosic substrate. *Water Science and Technology*, 83(12), 3033–3040. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.186>
- Pérez-Rangel, M., Barboza-Corona, J. E., & Valdez-Vazquez, I. (2023). Effect of the organic loading rate and temperature on hydrogen production via consolidated bioprocessing of raw lignocellulosic substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(92), 35907–35918. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.05.329>
- Pérez-Rangel, M., Valdez-Vazquez, I., Martínez-Zavala, S. A., Casados-Vázquez, L.

- E., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2022). Evaluation of inhibitory compounds produced by bacteria isolated from a hydrogen-producing bioreactor during the self-fermentation of wheat straw. *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 1989–2001. <https://doi.org/10.1111/jam.15708>
- Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D. M., Borzacconi, L., Varesche, M. B., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2013). Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(1), 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.10.022>
- Petrov, K., Popova, L., & Petrova, P. (2017). High lactic acid and fructose production via Mn²⁺-mediated conversion of inulin by *Lactobacillus paracasei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(11), 4433–4445. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8238-0>
- Pham, V. T., Greppi, A., Chassard, C., Braegger, C., & Lacroix, C. (2022). Stepwise establishment of functional microbial groups in the infant gut between months and years: a prospective cohort study. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.948131>
- Poirier, S., Steyer, J., Bernet, N., & Trably, E. (2020). Mitigating the variability of hydrogen production in mixed culture through bioaugmentation with exogenous pure strains. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(4), 2617–2626. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.116>
- PolICASTRO, G., Carraturo, F., Compagnone, M., Giugliano, M., Guida, M., Luongo, V., Napolitano, R., & Fabbricino, M. (2021). A preliminary study on a novel bioaugmentation technique enhancing lactic acid production by mixed cultures fermentation. *Bioresource Technology*, 340(125595), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125595>
- Prabhu, R., Altman, E., & Eitemana, M. A. (2012). Lactate and acrylate metabolism by *Megasphaera elsdenii* under batch and steady-state conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8564–8570. <https://doi.org/10.1128/AEM.02443-12>
- Pugazhendhi, A., Kumar, G., & Sivagurunathan, P. (2018). Microbiome involved in anaerobic hydrogen producing granules: a mini review. *Biotechnology Reports*, 20, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00301>
- Qureshi, F., Yusuf, M., Arham, M., Ibrahim, H., Chukwuemeka, B., Kamyab, H., Rahman, M. M., Kumar, A., & Chelliapan, S. (2023). A State-of-The-Art Review on the Latest trends in Hydrogen production , storage , and transportation

techniques. *Fuel*, 340(127574), 1–18.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.127574>

Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., Giudici-Orticoni, M. T., & Steyer, J. P. (2013). Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12), 4975–4985.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.008>

Ramírez-Morales, J. E., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. *Water Science and Technology*, 71(9), 1271–1285. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.104>

Regueira-Marcos, L., García-Depraect, O., & Muñoz, R. (2023). Elucidating the role of pH and total solids content in the co-production of biohydrogen and carboxylic acids from food waste via lactate-driven dark fermentation. *Fuel*, 338(127238), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127238>

Ren, N., Xing, D., Rittmann, B. E., Zhao, L., Xie, T., & Zhao, X. (2007). Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1112–1125. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01234.x>

Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*, 56, 117–137.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>

Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landate, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J. M., & Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 79–90.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025>

Rosa, P. R. F., Gomes, B. C., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2016). Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 284, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.088>

Rupani, P. F., Embrandiri, A., Rezania, S., Wang, S., Shao, W., Domínguez, J., & Appels, L. (2022). Changes in the microbiota during biological treatment of palm oil mill waste: A critical review. *Journal of Environmental Management*, 320(115772), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115772>

- Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Saleem, A., Umar, H., Shah, T. A., & Tabassum, R. (2020). Fermentation of simple and complex substrates to biohydrogen using pure *Bacillus cereus* RTUA and RTUB strains. *Environmental Technology and Innovation*, 18, 100704. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100704>
- Salminen, S., & von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (3rd Ed). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780824752033>
- Santiago, S. G., Trably, E., Latrille, E., Buitrón, G., & Moreno-Andrade, I. (2019). The hydraulic retention time influences the abundance of *Enterobacter*, *Clostridium* and *Lactobacillus* during the hydrogen production from food waste. *Letters in Applied Microbiology*, 69(3), 138–147. <https://doi.org/10.1111/lam.13191>
- Sen, B., Aravind, J., Lin, C., & Lay, C. (2019). Biohydrogen production perspectives from organic waste with focus on Asia. In J. R. Bastidas-Oyanedel & J. E. Schmidt (Eds.), *Biorefinery* (pp. 413–435). Springer Nature. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5>
- Sharma, S., Agarwal, S., & Jain, A. (2021). Significance of hydrogen as economic and environmentally friendly fuel. *Energies*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/en14217389>
- Sikora, A., Baszczyk, M., Jurkowski, M., & Zielenkiewicz, U. (2013). Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia: on purpose or by coincidence? In *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50364>
- Sivagurunathan, P., Sahoo, P. C., Kumar, M., Prakash Gupta, R., Bhattacharyya, D., & Ramakumar, S. S. V. (2023). Unrevealing the role of metal oxide nanoparticles on biohydrogen production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Bioresource Technology*, 367, 128260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128260>
- Sivagurunathan, P., Sen, B. and Lin, C.Y. (2014). Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(33), 19232–19241. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.03.260>
- Sivaramakrishnan, R., Shanmugam, S., Sekar, M., Mathimani, T., Incharoensakdi,

- A., Kim, S. H., Parthiban, A., Edwin Geo, V., Brindhadevi, K., & Pugazhendhi, A. (2021). Insights on biological hydrogen production routes and potential microorganisms for high hydrogen yield. *Fuel*, 291, 120136. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120136>
- Song, Z. X., Li, W. W., Li, X. H., Dai, Y., Peng, X. X., Fan, Y. T., & Hou, H. W. (2013). Isolation and characterization of a new hydrogen-producing strain *Bacillus* sp. FS2011. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(8), 3206–3212. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.001>
- Song, Z., Wang, Z., Wu, L., Fan, Y., & Hou, H. (2012). Effect of microwave irradiation pretreatment of cow dung compost on bio-hydrogen process from corn stalk by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(8), 6554–6561. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.121>
- Sreela-Or, C., Imai, T., Plangklang, P., & Reungsang, A. (2011). Optimization of key factors affecting hydrogen production from food waste by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14120–14133. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.136>
- Stanojević-Nikolić, S., Dimić, G., Mojović, L., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., & Kocić-Tanackov, S. (2016). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(5). <https://doi.org/10.1111/jfpp.12679>
- Tan, Z., Luo, J., Liu, F., Zhang, Q., & Jia, S. (2015). Effects of pH, temperature, storage time, and protective agents on Nisin antibacterial stability. In M. Zhang, TC., Nakajima (Eds.), *Advances in Applied Biotechnology*. Lecture Notes in Electrical Engineering (Vol. 333, pp. 305–312). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46318-5_33
- Teusink, B., & Molenaar, D. (2017). Systems biology of lactic acid bacteria: for food and thought. *Current Opinion in Systems Biology*, 6, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.07.005>
- Toledo-Cervantes, A., Méndez-Acosta, H. O., Arreola-Vargas, J., Gabriel-Barajas, J. E., Aguilar-Mota, M. N., & Snell-Castro, R. (2022). New insights into microbial interactions and putative competitive mechanisms during the hydrogen production from tequila vinasses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(19–20), 6861–6876. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12143-2>
- Valdez-Vazquez, I., Morales, A. L., & Escalante, A. E. (2017). History of adaptation determines short-term shifts in performance and community structure of hydrogen-producing microbial communities degrading wheat straw. *Microbial*

Biotechnology, 10(6), 1569–1580. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12678>

- Valdez-Vazquez, I., Pérez-Rangel, M., Tapia, A., Buitrón, G., Molina, C., Hernández, G., & Amaya-delgado, L. (2015). Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. *Fuel*, 159, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.052>
- Valdez-Vazquez, I., Robledo-Rizo, J. G., Muñoz-Páez, K. M., Pérez-Rangel, M., & de la Luz Ruiz-Aguilar, G. M. (2020). Simultaneous hydrogen production and decolorization of denim textile wastewater: kinetics of decolorizing of indigo dye by bacterial and fungal strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 701–709. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00157-4>
- Villanueva-Galindo, E., & Moreno-Andrade, I. (2021). Bioaugmentation on hydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(51), 25985–25994. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.092>
- Villanueva-Galindo, E., Pérez-Rangel, M., & Moreno-Andrade, I. (2024). Evaluation of individual and combined effect of lactic acid-consuming bacteria on mesophilic hydrogen production from lactic acid effluent from food waste treatment Edith. *Bioresource Technology Journal*, 408(131224), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131224>
- Villanueva-Galindo, E., & Moreno-Andrade, I. (2021). Bioaugmentation on hydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(51), 25985–25994. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.092>
- Villanueva-Galindo, E., Vital-Jácome, M., & Moreno-Andrade, I. (2023). Dark fermentation for H₂ production from food waste and novel strategies for its enhancement. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(27), 9957–9970. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.339>
- Wang, J., & Yin, Y. (2017). Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(8), 4804–4823. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2017.01.135>
- Wang, X., & Zhao, Y. cai. (2009). A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(1), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.09.100>
- Wang, Y., Jing, Y., Lu, C., Kongjan, P., Wang, J., Awasthi, M. K., Tahir, N., & Zhang,

- Q. (2021a). A syntrophic co-fermentation model for bio-hydrogen production. *Journal of Cleaner Production*, 317(128288). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128288>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021b). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry degradation of indigestible. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Woraruthai, T., & Supawatkorn, C. (2024). Isolation and characterization of *Enterococcus faecalis* isolate VT-H1: a highly efficient hydrogen-producing bacterium from palm oil mill effluent (POME). *International Journal of Hydrogen Energy*, 49, 295–309. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.08.017>
- Wu, C. W., Whang, L. M., Cheng, H. H., & Chan, K. C. (2012). Fermentative biohydrogen production from lactate and acetate. *Bioresource Technology*, 113, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.130>
- Xu, X., Zhou, Q., & Yu, D. (2022). The future of hydrogen energy: Bio-hydrogen production technology. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(79), 33677–33698. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.07.261>
- Xue, S., Chen, H., Wang, F., Lv, G., Tan, L., & Liu, G. (2024). The effect of substrate acidification on the biohydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 49, 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.07.183>
- Yang, G., & Wang, J. (2018). Enhancement of biohydrogen production from grass by ferrous ion and variation of microbial community. *Fuel*, 233, 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.06.067>
- Yang, G., Yin, Y., & Wang, J. (2019). Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(26), 13147–13156. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2019.03.216>
- Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J. A., & Benemann, J. R. (2007). Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(18), 4761–4771. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.038>
- Yin, Y., & Wang, J. (2016). Characterization and hydrogen production performance of a novel strain *Enterococcus faecium* INET2 isolated from gamma irradiated

sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(48), 22793–22801.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.10.059>

Zhao, S., Lau, R., Zhong, Y., & Chen, M. (2024). Lactate cross-feeding between *Bifidobacterium* species and *Megasphaera indica* contributes to butyrate formation in the human colonic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(1), 1–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/aem.01019-23>

Capítulo IV. Producción de biohidrógeno a partir de mucílago de café enriquecido en ácido láctico: Desempeño de la fermentación oscura semicontinua

4.1. Introducción

La expansión de la producción cafetalera ha incrementado la generación de subproductos de bajo valor económico, cuya acumulación representa un desafío ambiental significativo para los países productores (Acevedo et al., 2021; Trujillo-González et al., 2024; Tsigkou et al., 2025). Como se abordó en el Capítulo 2, se estima que más del 90% de la biomasa del fruto de café no se aprovecha en la fabricación del producto final, generando 40,68 millones de toneladas anuales de residuos con alta carga orgánica a nivel global. Cuando estos residuos no son gestionados de forma adecuada, pueden convertirse en fuentes importantes de contaminación en suelos y cuerpos de agua (Duarte et al., 2021; Pongsiriyakul et al., 2024). En este contexto, la transición hacia modelos de economía circular ha impulsado el desarrollo de alternativas biotecnológicas para su valorización, entre las cuales destaca FO para la producción de biohidrógeno (Moreno-Cárdenas et al., 2019; Setter et al., 2020; Duarte et al., 2021; Tsigkou et al., 2025).

Los subproductos del procesamiento postcosecha del café, como cáscara, pulpa, mucílago y aguas residuales, contienen fracciones ricas en carbohidratos y compuestos fácilmente fermentables, lo que las convierte en sustratos potenciales para la producción de bioH₂ (Villa Montoya et al., 2019). Diversos estudios reportan rendimientos variables según los subproductos utilizados. Para la pulpa de café se

han reportado rendimientos de 49,2 mL H₂/g DQO (Miñón-Fuentes & Aguilar-Juárez, 2019), mientras que para aguas residuales fluctúan entre 1,29 y 2,57 mol H₂/mol hexosa (Jung et al., 2010, 2012). En la codigestión de cáscara, pulpa y aguas residuales se alcanzó 3,04 L H₂/L-d (Villa Montoya et al., 2020), y 1,8 L H₂/L-d al utilizar aguas residuales de café, residuos de verduras y jugo de caña (Quiñones Navia et al., 2025). En cuanto al mucílago de café, se ha mostrado rendimientos entre 77,6 y 5511 mL H₂/ g DQO al emplearse como cosustrato, evidenciando su potencial para la producción de bioH₂ (Hernández et al., 2014; Moreno-Cárdenas & Zapata Zapata, 2019; Rangel et al., 2021). Sin embargo, su aprovechamiento como sustrato único sigue siendo limitado.

Los residuos del procesamiento del café también albergan poblaciones de BAL, debido a su alto contenido de carbohidratos, particularmente de azúcares reductores y pectinas fácilmente biodegradables. Como se detalló en el Capítulo 3, estas bacterias transforman los carbohidratos principalmente en ácido láctico (Evangelista et al., 2015; de Oliveira Junqueira et al., 2019; Zhang et al., 2019; de Melo Pereira et al., 2020). De modo que, la presencia simultánea de BAL y ácido láctico en la FO han mostrado efectos contrastes. Por un lado, las BAL y la acumulación de ácido láctico disminuyen la eficiencia hidrogenogénica por competencia por el sustrato, acidificación excesiva y secreción de bacteriocinas (Correa-Villa et al., 2024b); por otro lado, el ácido láctico también puede actuar como precursor para la producción de bioH₂, lo que representa una alternativa biotecnológica viable para evitar su acumulación y controlar el crecimiento de BAL,

especialmente cuando los pretratamientos no logran suprimir completamente su crecimiento (Correa-Villa et al., 2024b; Villanueva-Galindo et al., 2025).

Este papel positivo del ácido láctico ha impulsado el desarrollo de estrategias operativas orientadas a su aprovechamiento como fuente de carbono, en lugar de considerarlo únicamente un metabolito (García-Depraect et al., 2021a; Correa-Villa et al., 2024a). Bajo esta perspectiva se ha desarrollado la FO impulsada por lactato (FO-LA), donde el ácido láctico se convierte en el sustrato principal para la producción de bioH₂. Esta ruta ha demostrado ser efectiva para diversos residuos orgánicos como desechos de alimentos, melaza de caña de azúcar, suero de queso, hidrolizados de bagazo de agave, vinaza de tequila, evidenciando su potencial para mejorar el aprovechamiento de residuos orgánicos (García-Depraect et al., 2021a; Villanueva-Galindo et al., 2023; Correa-Villa et al., 2024b).

Además, se han propuesto configuraciones en dos etapas de FO-LA en los que desacoplan la fermentación láctica de la fase hidrogenogénica. En la primera etapa, los carbohidratos se convierten en ácido láctico; en la segunda etapa el residuo enriquecido en ácido láctico, se emplea como sustrato para la producción de bioH₂, desacoplando así la fase hidrogenogénica de la utilización directa de carbohidratos, evitando la competencia entre BAL y bacterias productoras de H₂ (BPH; Villanueva-Galindo et al., 2025). Esta configuración ha mostrado un mejor desempeño en la producción de bioH₂ en sistemas de FO-LA de una sola etapa utilizando vinaza de tequila, alcanzando rendimientos y tasas de producción de H₂ de hasta 128,0 mL H₂/g VS y 12,3 L H₂/L-d, respectivamente, valores superiores obtenidos en una sola

etapa (García-Depraect & León-Becerril, 2018; García-Depraect et al., 2020). Se obtuvieron resultados similares en sistemas que emplean desechos alimentarios, donde la configuración de dos etapas mostró una mayor estabilidad e incremento en la producción de bioH_2 respecto a la configuración de una sola etapa, alcanzando una mayor estabilidad del proceso (Regueira-Marcos et al., 2025). Investigaciones adicionales en biorreactores continuos confirman que el desacoplamiento de las fases láctica e hidrogenogénica favorece un metabolismo más eficiente al reducir la competencia bajo condiciones controladas de pH y TRH (García-Depraect et al., 2021b; Regueira-Marcos et al., 2024).

A pesar de estos avances en la FO-LA, el comportamiento de la fase hidrogenogénica bajo operación semicontinua ha sido estudiado muy poco (Regueira-Marcos et al., 2025). Este modo de operación puede ofrecer un equilibrio entre la estabilidad de los sistemas continuos y la flexibilidad y baja complejidad de los discontinuos, favoreciendo la adaptación de la comunidad microbiana y el control de la acumulación de metabolitos (Srivastava & Gupta, 2011; de Almeida Silva et al., 2020; G. Kim & Cho, 2025). Sin embargo, la efectividad de esta operación depende del tipo de sustrato y las estrategias de alimentación implementadas. Asimismo, la participación directa del ácido láctico en sistemas de FO que emplean residuos de café ha sido evaluada de manera limitada.

Por tanto, el primer objetivo específico de esta investigación es evaluar el efecto del tiempo de retención hidráulica y de la concentración de ácido láctico derivado del mucílago de café fermentado naturalmente sobre la producción de bioH_2 mediante

FO-LA en un biorreactor semicontinuo. Los resultados generarán evidencia experimental necesaria para comprender la fase hidrogenogénica durante la FO-LA bajo operación semicontinua, contribuyendo al desarrollo de sistemas sostenibles para la producción bioH₂ de a través de residuos agroindustriales.

4.2. Metodología

El proceso experimental desarrollado en este proyecto de investigación se presenta de forma esquemática en la Figura 4-1, la cual ilustra las principales etapas del trabajo: desde la recolección y acondicionamiento del residuo orgánico, hasta la operación del biorreactor en modo semicontinuo y el análisis de datos experimentales. Para su ejecución, el procedimiento se estructuró en las siguientes fases: (i) preparación del sustrato enriquecido en ácido láctico a partir de mucílago de café fermentado naturalmente, (ii) operación del sistema de fermentación oscura bajo condiciones controladas, y (iii) evaluación de las variables de desempeño del proceso.

Todas las actividades experimentales se realizaron en el Laboratorio de Energías Alternativas y Laboratorio de Procesos Agrícolas, adscritos al Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín. Estos espacios cuentan con las condiciones adecuadas para la preparación de sustratos, operación de biorreactores anaerobios y análisis fisicoquímicos requeridos para la presente investigación.

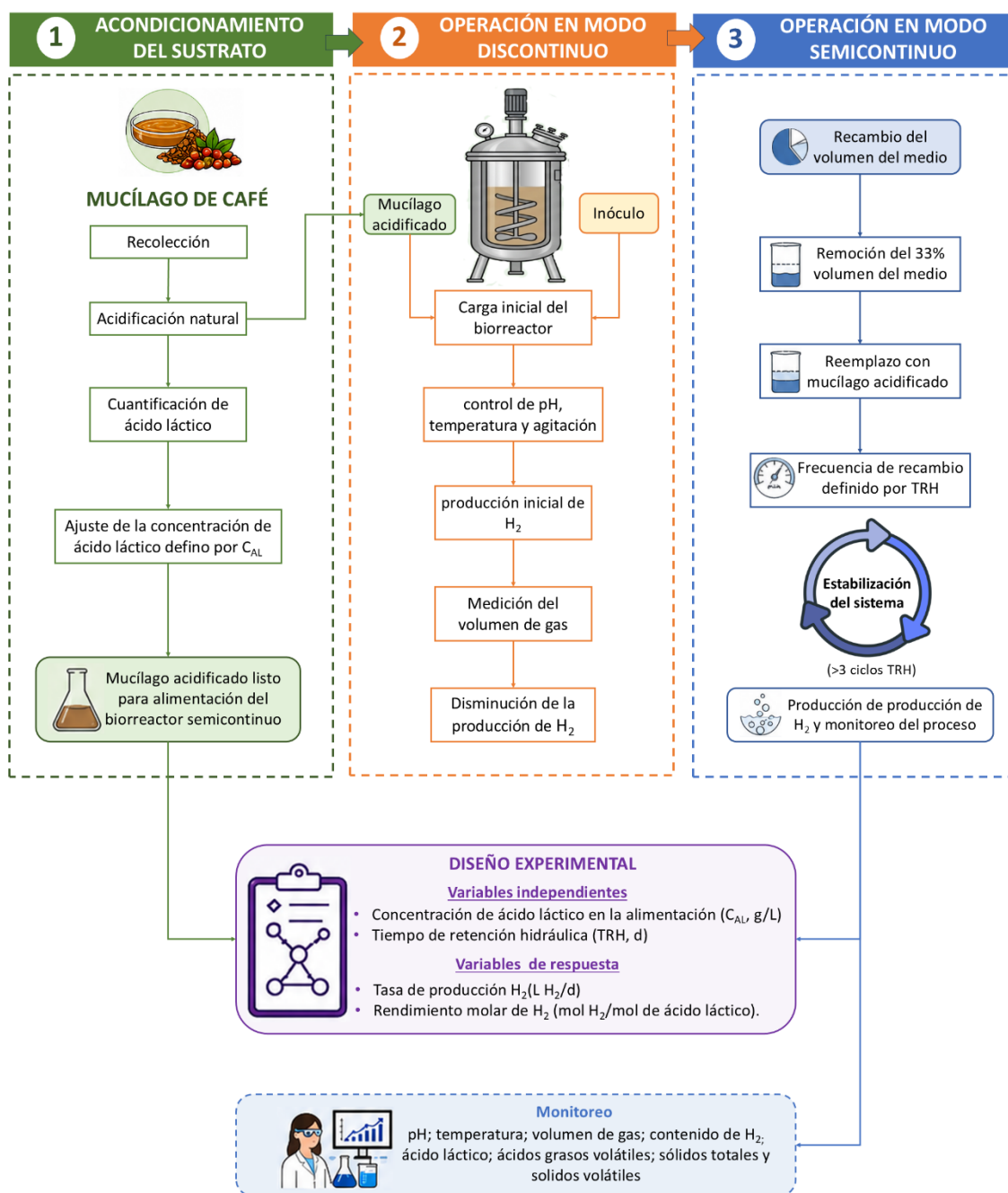


Figura 4-1. Esquema general del procedimiento experimental desarrollado para evaluar la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura semicontinua utilizando mucílago de café enriquecido en ácido láctico.

4.2.1. Diseño experimental

Los ensayos experimentales se diseñaron siguiendo un diseño de composición central (DCC) con dos variables independientes: el tiempo de retención hidráulica (TRH, días) y la concentración de ácido láctico en la alimentación del biorreactor (C_{AL} , g/L), con el objetivo de evaluar su efecto sobre la producción de bioH_2 mediante FO en un sistema operado en modo semicontinuo. En la Tabla 4-1 se presentan los niveles de los factores evaluados, los cuales fueron definidos a partir de rangos reportados en la literatura científica para fermentaciones anaerobias alimentadas con mucilago de café, vinaza de tequila y la fracción orgánica de residuos municipales (Gómez et al., 2006; Kim et al., 2012; Zahedi et al., 2013; Moreno, 2016; García-Depraect et al., 2020).

Tabla 4-1. Factores y niveles establecidos en el diseño de composición central.

Factor	Nivel 1 (-1)	Central (0)	Nivel 2 (+1)	Axiales ($\pm\alpha=1,41421$)
C_{AL} (g/L)	10	20	30	5-35
TRH (días)	1	2	3	0,5-3,5

En particular, el rango de C_{AL} se seleccionó para abarcar valores reportados en sistemas discontinuos y continuos en los que la producción de hidrógeno se mantiene, considerando además la escasa evidencia disponible en operación semicontinua. Kim et al. (2012) reportaron que concentraciones iniciales de ácido láctico de 5 y 8 g/L no afectaron negativamente la producción de hidrógeno en ensayos discontinuos con glucosa, mientras que García-Depraect et al. (2020) obtuvieron un buen desempeño en un biorreactor continuo con 12,4 g/L. Asimismo,

Moreno (2016) reportó buenos rendimientos en un intervalo más alto, entre 20 y 35 g/L, en ensayos discontinuos. Con base en estos antecedentes, se definió un rango experimental de C_{AL} entre 5 y 35 g/L, con el fin de evaluar la respuesta del sistema desde condiciones de menor disponibilidad de lactato hasta concentraciones más elevadas reportadas como favorables en la literatura.

Por su parte, TRH se estableció considerando valores asociados a buen desempeño hidrogenogénico en biorreactores semicontinuos. Gómez et al. (2006) reportaron resultados favorables con TRH entre 3 y 5 días, mientras que Zahedi et al. (2013) evaluaron un rango más amplio (0,5–10 días), observando un desempeño significativo en el intervalo de 0,5–3 días. En función de estos antecedentes, el rango experimental de TRH se definió entre 0,5 y 3,5 días, con el propósito de evaluar tiempos de retención contrastantes y analizar su efecto sobre la productividad de hidrógeno, la permanencia del sustrato en el reactor y el desempeño global del proceso.

Esta configuración permitió explorar el efecto individual y combinado de ambos factores sobre las variables de respuesta consideradas: tasa de producción ($L\ H_2/d$) y rendimiento molar de H_2 ($mol\ H_2/mol$ de ácido láctico). El diseño experimental generó un total de 13 corridas experimentales, distribuidas en 8 puntos factoriales (no centrales) y 5 puntos centrales (réplicas), definidos por el software Design Expert 11.0 (Stat-Ease® Inc., Minneapolis, MN, USA), utilizado tanto para la generación del DCC como para el análisis estadístico posterior.

4.2.2. Recolección y acondicionamiento del sustrato

El mucílago de café arábica (*Coffea arabica*) fresco, subproducto generado durante el procesamiento postcosecha en la etapa de la separación mecánica del grano (Figura 4-2), fue recolectado en tres fincas cafeteras ubicadas en el suroeste de Antioquia (Colombia) y trasladado al Laboratorio de Energías Alternativas de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. La recolección se realizó en diferentes momentos, de acuerdo con la disponibilidad de materia prima en cada finca, con el propósito de completar el volumen requerido para la alimentación del biorreactor semicontinuo en cada condición experimental. Por tanto, el mucílago recolectado en las distintas fincas no fue mezclado en una proporción fija, sino utilizado según su disponibilidad.



Figura 4-2. Recolección del mucílago de café fresco durante el proceso de beneficio húmedo en finca cafetera del suroeste antioqueño.

Posteriormente, el residuo fue sometido a un proceso de fermentación espontánea en tanques de polietileno de alta densidad, cerrados herméticamente, durante un

periodo superior a 24 horas, a temperatura ambiente (16–28 °C), sin agitación ni control de pH, con el fin de lograr la acidificación natural del sustrato como resultado de la actividad metabólica de BAL nativas, responsables de la conversión de carbohidratos fácilmente biodegradables en ácido láctico como metabolito predominante (Moreno, 2016; Zhang et al., 2019; Correa-Villa et al., 2024a). Este procedimiento se realizó mediante dos a tres fermentaciones en discontinuo con el fin de obtener aproximadamente 72 L de mucílago acidificado requeridos para la alimentación del biorreactor para cada ensayo.

Una vez finalizada la acidificación, se midieron el pH y la concentración de ácido láctico. Posteriormente, la concentración de ácido láctico del mucílago acidificado se ajustó a los niveles de C_{AL} definidos en el diseño experimental (Tabla 4-1), mediante dilución con agua potable o adición de ácido láctico al 88 %, con el fin de emplearlo como sustrato base en los ensayos de FO semicontinua. Tras su cuantificación, el sustrato acidificado fue almacenado a 4 °C hasta su uso, con el fin de limitar cambios adicionales antes del ajuste final de la C_{AL} . En consecuencia, la etapa de acondicionamiento del mucílago estuvo orientada a obtener un sustrato enriquecido en ácido láctico para su posterior evaluación en la etapa hidrogenogénica, por lo que el seguimiento operativo se centró en el pH y en la concentración de ácido láctico, más que en una caracterización fisicoquímica exhaustiva del mucílago fresco y del mucílago acidificado.

4.2.3. Inóculo

El inóculo productor de H_2 se obtuvo mediante la auto-fermentación oscura de residuos de frutas y verduras no aptas para el consumo humano en un biorreactor operado en modo discontinuo, según la metodología descrita por Moreno (2016). Los residuos fueron recolectados en la Estación Ambiental de la Central Mayorista de Antioquía, Colombia, tal como se muestra en la Figura 4-3a, con su composición inicial conforme a Moreno Cárenas et al. (2013), incluyendo lechuga (2,03%), raíz de cebolla (0,74%), naranja (23,7%), mango (14,1%), papaya (29,7%) y guayaba (29,8%) (Figura 4-3b). La mezcla se homogeneizó con agua en una proporción de 1:1,4 (m/v), completando un volumen de trabajo de 16 L. El acondicionamiento y procesamiento de estos residuos se realizó previo a su carga en el biorreactor, como se ilustra en la Figura 4-3b y 4-3c.

El proceso de auto-fermentación consistió en dos fases. En la primera, se realizó una acidificación natural de la mezcla de residuos por acción de comunidades microbianas nativas, sin adición de cultivos iniciadores, de forma similar a la aplicada al sustrato descrito en la sección 4.2.2. Durante el acondicionamiento inicial, la mezcla presentó un pH aproximado de 5,0 y, tras la acidificación natural, alcanzó un pH cercano a 3,35. Posteriormente, se inició la fase hidrogenogénica mediante la activación de la temperatura, la agitación y el ajuste del pH con cal agrícola (CaO) y carbonato de sodio (Na_2CO_3). Durante esta etapa, el biorreactor se operó a $32,0 \pm 0,7$ °C y pH $6,7 \pm 0,2$, condiciones bajo las cuales se generó biogás con presencia de H_2 de forma sostenida durante tres días consecutivos



Figura 4-3. Etapas preliminares para la obtención del inóculo productor de hidrógeno mediante auto-fermentación oscura.

4.2.4. Operación del biorreactor en modo semicontinuo

Se utilizaron dos biorreactores de acero inoxidable con capacidad de 20 L, equipados con control automático de temperatura y agitación mecánica. La agitación se aplicó de forma intermitente a 100 rpm durante 5 min/h mediante un impulsor helicoidal de cinta. Cada biorreactor fue cargado inicialmente con una mezcla compuesta por 8,3% v/v de inóculo y 91,7% v/v de mucílago de café acidificado, hasta completar un volumen de trabajo de 12 L. Ambos sistemas fueron operados en modo discontinuo durante un periodo inicial de 2 a 3 días para favorecer la adaptación del inóculo y el agotamiento parcial del sustrato.

Una vez observada la disminución del volumen del gas producido, se inició la operación en modo semicontinuo, de acuerdo con los niveles de TRH y C_{AL} establecidos en el diseño experimental (Tabla 4-1). La temperatura se mantuvo a

31,0 ± 1,0 °C y el pH en 6,76 ± 0,14, mediante la adición Na₂CO₃ y cal agrícola (CaO). Antes de cada alimentación, el pH del sustrato fue igualmente ajustado al mismo valor para garantizar condiciones homogéneas de operación.

La estrategia operacional consistió en retirar el 33% del volumen total del fermentado (4 L) con una frecuencia definida por el TRH y reemplazarlo con un volumen equivalente de mucílago acidificado, ajustado según la C_{AL} correspondiente a cada tratamiento. Las frecuencias de recambio aplicadas para cada condición de TRH se presentan en la Tabla 4-2.

Tabla 4-2. Frecuencias de recambio aplicadas durante la operación semicontinua definidos por el tiempo retención hidráulica (TRH).

Condiciones de operación	TRH (días)				
	0,5	1,0	2,0	3,0	3,5
Frecuencia de recambio (h)	4	8	16	24	28
Ciclos TRH	6	6	6	6	6
Tiempo de operación (d)	3	6	12	18	21

Cada ciclo de TRH comprendió tres recambios consecutivos. Todos los ensayos fueron evaluados durante seis ciclos de TRH, permitiendo cubrir la fase transitoria y lograr la estabilización del sistema para iniciar el análisis bajo las condiciones operativas establecidas. Durante todo el tiempo de operación se registró el volumen total de gas producido. Adicionalmente, al sexto ciclo de TRH de cada tratamiento, se recolectaron muestras del gas en bolsas TEDLAR® y se tomaron muestras líquidas para analizar ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico y sólidos volátiles (SV). Las siguientes variables se seleccionaron como indicadores

principales del desempeño del proceso hidrogenogénico: tasa de producción de H_2 (HPR; L H_2 /d); el rendimiento molar de H_2 por mol de ácido láctico (AL) consumido (HMY; mol H_2 /mol AL); el rendimiento de H_2 con relación a sólidos volátiles adicionados (HSY; mL H_2 /g SV); el contenido de H_2 en el gas (%v/v); el índice de estabilidad de producción de H_2 (IE); el perfil de ácidos grasos (AGV; g/L); y la eficiencia de remoción de SV.

4.2.5. Métodos analíticos

La composición del gas fue analizada mediante un cromatógrafo de gases (MicroGC Agilent 3000, USA) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos canales con gases de arrastre Ar y He. Las columnas e inyectores operaron a una temperatura constante de 60 °C, mientras el detector a 300 °C, con una presión de operación de 30 psi. En el canal A, con Ar como gas de arrastre, se cuantificaron H_2 , CH_4 y CO ; en el canal B, con He, se determinó CO_2 . El volumen diario de gas generado se midió con un gasómetro Metrex G2.5, con una precisión de 0,040 m³ h⁻¹.

El pH del sistema fue registrado utilizando un potenciómetro SI Analytics Lab 855. Las concentraciones de ST y SV se determinaron conforme a los métodos 2540B y 2540E, respectivamente, descritos en Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 22^a edición). La concentración de ácido láctico en el mucílago acidificado se determinó mediante el método colorimétrico descrito por Borshchevskaya et al. (2016), empleando un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo

Scientific) y una curva de calibración entre 1 y 8 g/L. En las muestras líquidas del biorreactor, el ácido láctico y AGV —específicamente, ácido acético, ácido butírico y propiónico — se cuantificaron mediante un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC; LC-20AT Prominence, Shimadzu) equipado con detectores RID-20A y UV-PDA. Se empleó una columna Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm; 9 µm), fase móvil de H₂SO₄ de 0,005 M (0,6 mL min⁻¹), temperatura de la columna de 55 °C y un volumen de inyección de 20 µL. La identificación de los compuestos se realizó mediante comparación con estándares analíticos, considerando sus tiempos de retención bajo las condiciones cromatográficas descritas. La cuantificación se efectuó a partir de curvas de calibración específicas para cada ácido orgánico. Cromatogramas representativos de los compuestos analizados se presentan en Anexo A.

4.2.6. Análisis de datos

4.2.6.1. Cálculo de indicadores de desempeño del proceso

Las ecuaciones empleadas para calcular los principales indicadores del desempeño hidrogenogénico se presentan en la Tabla 4-3. Estos indicadores permitieron evaluar la cantidad, eficiencia y estabilidad de la producción de bioH₂ durante la operación del sistema en modo semicontinuo.

Las muestras de gas generadas en cada ensayo fueron analizadas a una temperatura de 20 °C y una presión atmosférica local de 0,84 atm en el Laboratorio del Grupo de Investigación Termodinámica Aplicada y Energías Alternativas,

Universidad Nacional de Colombia-sede Medellín. En consecuencia, los volúmenes de gas fueron corregidos a condiciones estándar (0 °C y 1 atm) para asegurar la comparabilidad de los resultados entre tratamientos y con datos reportados en la literatura.

Tabla 4-3. Indicadores de desempeño y ecuaciones utilizadas para el análisis de la producción de biohidrógeno en fermentación oscura semicontinua.

Indicador	Símbolo	Unidades	Ecuación
Volumen acumulado de H ₂	V _{H₂}	L H ₂	$V_{H_2} = \%H_2 \times V_{gas}^{STD}$
Tasa de producción de H ₂	HPR	L H ₂ /d	$HPR = \frac{V_{H_2}}{TRH}$
Rendimiento molar de H ₂	HMY	mol H ₂ /mol AL	$HMY = \frac{n_{H_2}}{n_{AL_{Cons}}}$
Rendimiento volumétrico de H ₂ por sólidos volátiles adicionados	HSY	mL H ₂ /g SV	$HSY = \frac{V_{H_2} \times 1000}{SV_{adicionados}}$
Índice estabilidad	IE	adimensional	$IE = \frac{\overline{HPR}}{\sigma_{HPR}}$
Eficiencia de remoción de sólidos volátiles	SV _{rem}	%	$SV_{rem} = \left(\frac{SV_{inicial} - SV_{final}}{SV_{inicial}} \right) \times 100$

$\%H_2$: porcentaje de hidrógeno en el gas generado; V_{gas}^{STD} : volumen total de gas normalizado (0°C, 1 atm); TRH: tiempo de retención hidráulica; $SV_{adicionados}$: sólidos volátiles adicionados en los ciclos de TRH estables; $\overline{HPR}$: HPR promedio durante los ciclos de TRH estables; σ_{HPR} : desviación estándar de la HPR; $SV_{inicial}$ y SV_{final} : concentración de sólidos volátiles al antes y después del ciclo de TRH, respectivamente.

4.2.6.2. Análisis estadístico

La relación entre TRH y C_{AL}, y las variables de respuesta seleccionadas (HPR; HMY), fue evaluada mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR).

Para ello, se aplicó un modelo de regresión cuadrática de segundo orden, que permite representar tanto efectos lineales como no lineales e interactivos de los factores experimentales sobre las variables de interés. El modelo general adoptado se presenta en la Ecuación 4-1:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (4-1)$$

Donde, Y es la variable de respuesta (HPR; HMY); X_1 y X_2 corresponde a los factores TRH y C_{AL} , respectivamente; β_0 es una constante o término independiente; β_1 y β_2 son los coeficientes del término lineal; β_{11} y β_{22} son los coeficientes del término cuadrático; y β_{12} es el coeficiente del término interactivo.

La significancia estadística de los modelos y de cada uno de los coeficientes se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA), empleando un nivel de significancia del 95 % ($p < 0,05$). Posteriormente, se construyeron superficies de respuesta y diagramas de contorno basados en la Ecuación 4-1, con el fin de visualizar el efecto simultáneo de TRH y C_{AL} sobre cada variable de respuesta. La validación predictiva de los modelos se realizó a través de tres ensayos experimentales adicionales, dos incluidos y uno distinto al diseño experimental operados en las combinaciones de TRH (0,5; 1,0 y 1,5 días) y C_{AL} en la alimentación (10–20 g/L). Para cada ensayo de validación se determinaron HPR y HMY, que posteriormente se compararon con los valores predichos por los modelos ajustados.

4.2.7. Modelamiento con lógica difusa

Se construyó un modelo de inferencia basado en lógica difusa con el objetivo de representar el comportamiento no lineal del sistema, el cual no fue completamente capturado por los modelos de regresión proporcionados por la MSR. Para ello, se definieron dos variables de entrada (TRH, C_{AL}) y una variable de salida correspondiente a la tasa de producción de hidrógeno (HPR; LH_2/d).

Los datos experimentales de entrada y salida fueron transformados en conjuntos difusos mediante funciones de pertenencia trapezoidales. El sistema de inferencia adoptado correspondió a un modelo de tipo Mamdani de primer orden (tipo 1), utilizando reglas condicionales de la forma IF-THEN para establecer la relación entre las variables:

- El operador AND (mínimo) fue utilizado como método de implicación para evaluar las reglas de inferencia.
- El operador OR (máximo) se empleó como método de agregación para combinar las salidas de las reglas activadas.
- La desdifusificación se realizó mediante el método del centroide, transformando los valores difusos de salida al dominio numérico original.

La implementación del modelo se llevó a cabo en la herramienta Fuzzy Logic Designer del software MATLAB R2025a®. Para evaluar la calidad del ajuste del modelo, se utilizó el error cuadrático medio (RMSE) entre los valores estimados por el sistema difuso y los datos experimentales, calculado mediante la Ecuación 4.2:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_{i,exp} - y_{i,pred})^2} \quad (4-2)$$

Donde, $y_{i,exp}$ es el valor experimental; $y_{i,pred}$ es el valor estimado por el modelo difuso; y n es el número total de observaciones.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Acidificación natural del mucílago de café

El mucílago de café fresco, removido mecánicamente del grano proveniente de la planta de café arábica (*C. arabica*), presenta una composición química característica que lo convierte en un sustrato altamente fermentable. En base húmeda, contiene en promedio 8,55 % de carbohidratos, 0,93 % de proteína, 0,12 % de lípidos, 0,17 % de ácido láctico, 0,12 % de alcoholes y 0,43 % de cenizas (Puerta-Quintero & Rios-Arias, 2011). Esta composición refleja su elevado contenido de compuestos orgánicos fácilmente biodegradables, susceptibles de ser transformados por comunidades microbianas anaerobias.

Durante la fermentación espontánea, realizada sin agitación ni control de pH y temperatura, el pH del mucílago disminuyó de $4,97 \pm 0,25$ a aproximadamente $3,35 \pm 0,21$. Este descenso se atribuye a la rápida degradación de carbohidratos por parte del microbioma endógeno, compuesto principalmente por BAL como *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Streptococcus faecalis*, que conducen la acidificación del medio mediante la producción de ácidos orgánicos (Puerta Quintero, 2012; de Oliveira Junqueira et al., 2019; de Melo Pereira et al., 2020). Como antecedente complementario, en un ensayo preliminar de FO semicontinua operado a un TRH de 2 días (Correa-Villa et al., 2024a), se evaluó el perfil de fermentación natural del mucílago de café bajo condiciones no controladas. Este análisis permitió establecer una línea base del comportamiento fermentativo del sustrato previo a su utilización

en la FO-LA. La evolución de los principales ácidos orgánicos detectados en el mucílago acidificado utilizado para alimentar el biorreactor se muestra en la Figura 4-4. No obstante, este perfil no representa una caracterización rutinaria de todos los lotes de mucílago empleados en el diseño experimental.

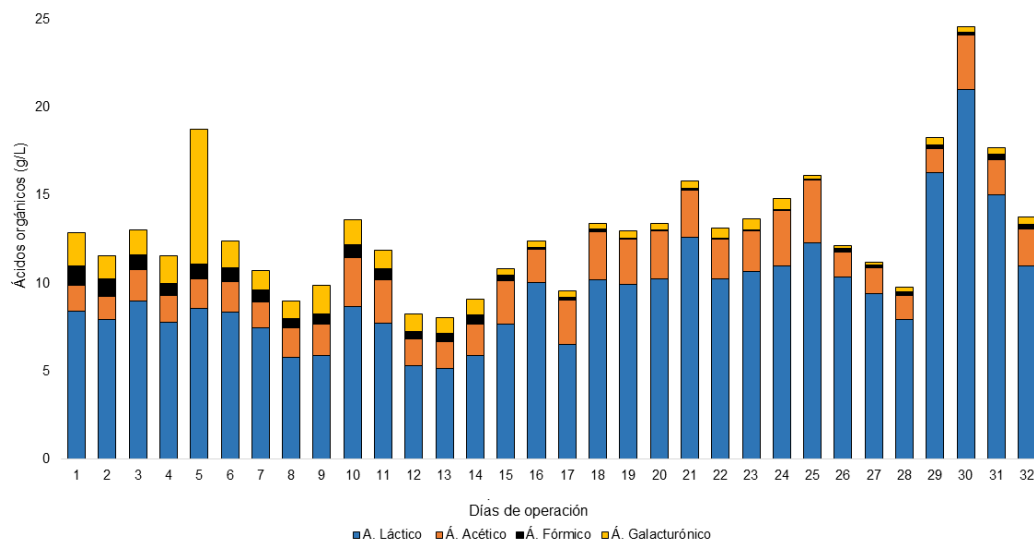


Figura 4-4. Perfil de ácidos orgánicos en el mucílago de café acidificado utilizado como sustrato durante un ensayo preliminar de fermentación oscura semicontinua operado bajo condiciones de TRH de 2 días (Correa-Villa et al., 2024a).

A lo largo de todo el periodo de operación, el ácido láctico fue el principal metabolito detectado, alcanzando concentraciones superiores a 5 g/L de forma sostenida, con picos que superaron los 15 g/L. En proporciones menores se identificaron ácido acético, fórmico y galacturónico, los cuales también contribuyen a la acidificación del medio, aunque en menor magnitud. Esta variabilidad está asociada a factores como el estado de madurez del fruto del café, las condiciones ambientales y la composición del microbioma nativo (Puerta Quintero, 2012).

Asimismo, se evidenció la presencia de etanol como producto adicional de la fermentación espontánea, aunque no fue posible su cuantificación. Su formación se atribuye principalmente a la acción de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia nakasei*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. parasilopsis* y *C. pintolopesii*, cuya actividad es mayor en las primeras horas de fermentación (Puerta Quintero, 2012; de Oliveira Junqueira et al., 2019). Sin embargo, a medida que el proceso avanza y el pH desciende por debajo de 4,0, la actividad de muchas de estas levaduras puede verse inhibida. Cabe señalar que algunas BAL heterofermentativas también pueden producir etanol, aunque el ácido láctico suele ser su principal metabolito (Puerta Quintero, 2012; de Oliveira Junqueira et al., 2019; de Melo Pereira et al., 2020).

Este perfil de ácidos orgánicos confirma el predominio de una fermentación láctica, condición favorable para el desarrollo de procesos posteriores de la FO, ya que permite establecer un entorno acidificado y enriquecido en lactato, precursor metabólico clave en la producción de biohidrógeno. No obstante, en algunos casos las concentraciones de ácido láctico obtenidas en el mucílago no alcanzaron los valores requeridos por el diseño experimental (C_{AL}), por lo que fue necesario ajustarlas mediante la adición de ácido láctico al 88 %. Finalmente, la acidificación natural del mucílago de café no solo permitió generar un sustrato enriquecido en ácido láctico, sino que también actuó como un pretratamiento simple y de bajo costo para limitar la presencia de microorganismos no relevantes para el proceso de FO. En particular, la disminución rápida del pH puede inhibir el crecimiento de parte del

microbiota presente, mientras que algunas BAL suelen mantenerse debido a su mayor tolerancia a la acidez del medio (Xue et al.,2024).

4.3.2. Producción de biohidrógeno mediante FO-LA en modo semicontinuo

Los resultados experimentales obtenidos de los 13 ensayos definidos por el DCC, en función de los indicadores del desempeño asociados a cada combinación del TRH y C_{AL} confirman la idoneidad del mucílago de café acidificado enriquecido con ácido láctico como sustrato para la producción de bioH₂ mediante FO-LA, operada en modo semicontinuo. Los valores de HPR oscilaron entre 0,10 y 36,60 L H₂/d y HMY varió entre 0,008 y 0,828 mol H₂· mol⁻¹ AL, mientras que el contenido de H₂ en el gas generado se mantuvo entre 2,19 y 39,53 %v/v (Tabla 4-4).

Tabla 4-4. Indicadores desempeño de la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura impulsada por lactato en modo semicontinuo bajo diferentes condiciones de tiempo de retención hidráulica y concentración de ácido láctico en la alimentación.

Ensayo	TRH (d)	C _{AL} (g/L)	Contenido H ₂ (%v/v)	HPR (LH ₂ /d)	HMY (mol H ₂ /mol AL)	HSY (mL _N H ₂ /gVS)	SV _{rem} (%)	IE
1	0,5	20	39,53 ± 1,83	36,60 ± 0,87	0,373 ± 0,056	47,46 ± 6,14	6,71	0,87
2	1,0	10	31,69 ± 2,08	24,05 ± 0,74	0,828 ± 0,177	121,5 ± 24,3	5,69	0,74
3	1,0	30	7,46 ± 1,09	2,34 ± 0,45	0,127 ± 0,228	3,02 ± 0,47	13,45	0,45
4	2,0	5	2,19 ± 0,73	0,10 ± 0,63	0,008 ± 0,006	1,79 ± 0,67	24,13	0,63
5	2,0	20	25,05 ± 1,71	6,18 ± 0,94	0,218 ± 0,016	24,74 ± 2,12	20,09	0,94
6	2,0	20	27,56 ± 1,64	6,66 ± 0,87	0,220 ± 0,037	27,52 ± 3,46	10,30	0,87
7	2,0	20	34,87 ± 1,38	9,16 ± 0,91	0,343 ± 0,025	59,13 ± 5,55	6,16	0,91
8	2,0	20	27,72 ± 6,61	7,21 ± 0,73	0,274 ± 0,084	41,15 ± 11,2	20,51	0,73
9	2,0	20	23,60 ± 0,44	6,70 ± 0,95	0,241 ± 0,035	28,04 ± 1,49	18,6	0,95
10	2,0	35	21,49 ± 2,01	7,26 ± 0,91	0,290 ± 0,064	39,45 ± 1,91	12,74	0,91
11	3,0	10	18,77 ± 0,89	1,89 ± 0,82	0,111 ± 0,011	47,90 ± 4,62	13,37	0,82
12	3,0	30	25,88 ± 0,12	3,84 ± 0,79	0,200 ± 0,043	34,13 ± 6,63	6,90	0,79
13	3,5	20	26,24 ± 0,49	4,06 ± 0,80	0,159 ± 0,049	64,04 ± 12,9	4,45	0,80

TRH: Tiempo de retención hidráulica; C_{AL}: Concentración de ácido láctico en la alimentación; HPR: Tasa de producción H₂; HMY: rendimiento molar de H₂ por mol de ácido láctico consumido; HSY: rendimiento volumétrico de H₂ por sólidos volátiles adicionados; SV_{rem}: Eficiencia de remoción de sólidos volátiles; IE: Índice de estabilidad de producción de H₂.

Aunque en esta investigación no se abordó en profundidad la etapa previa de fermentación láctica, la acidificación natural del mucílago de café permitió disponer de un medio con alta concentración de ácido láctico y con bajos niveles de carbohidratos residuales (0.10-0.83 g/L glucosa; 0.15-0.87 g/L fructosa). Esta condición redujo la competencia entre BAL y BPH, favoreciendo la conversión del lactato en H_2 (Fuentes-Santiago et al., 2023; Correa-Villa et al., 2024a). Este comportamiento concuerda con estudios que han propuesto aprovechar la fermentación natural de los residuos agroindustriales y desacoplar la fase hidrogenogénica de la utilización directa de carbohidratos, señalando esta estrategia como vía clave para mejorar la eficiencia del proceso de FO a partir de dichos sustratos (Noblecourt et al., 2018; García-Depraect et al., 2020; Fuentes-Santiago et al., 2023; Villanueva-Galindo et al., 2023; Ordoñez-Frías et al., 2024; Regueira-Marcos et al., 2024; Pérez-Rangel et al., 2025).

Durante el proceso, se observó una producción simultánea de ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico, además de una concentración final de ácido láctico bastante variable. En la mayoría de los ensayos, el ácido butírico fue el AGV dominante, coherente con rutas hidrogenogénicas asociadas a la conversión del lactato en butirato e H_2 , indicando que esta fue la ruta metabólica preferencial usada por el consorcio (García-Depraect et al., 2021b; Correa-Villa et al., 2024b; Romo-Hernández & Vital-Jácome, 2025). Este perfil metabólico ha sido similares a otros estudios de producción de bio H_2 a partir de ácido láctico derivado de residuos

agrícolas (García-Depraect et al., 2020; Martínez-Mendoza et al., 2022; Fuentes-Santiago et al., 2023; Pérez-Rangel et al., 2025; Regueira-Marcos et al., 2025; Villanueva-Galindo et al., 2025). La evolución de estos ácidos orgánicos se presenta en la Figura 4-5.

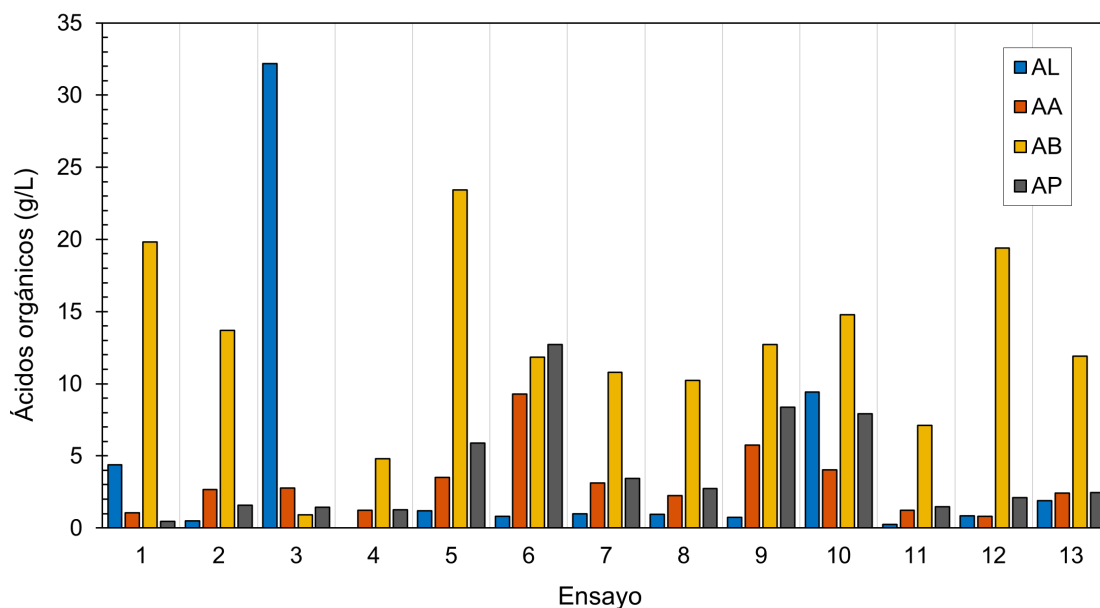


Figura 4-5. Perfil de ácidos grasos volátiles y concentración final de ácido láctico en función de los ensayos experimentales (AL: ácido láctico; AA: ácido acético; AB: ácido butírico; AP: ácido propiónico).

No obstante, en el ensayo 3 se observó un comportamiento atípico, caracterizado por una elevada concentración residual de ácido láctico y una baja producción de bioH_2 . Este resultado se asoció a un valor reducido del índice de estabilidad ($\text{IE} = 0,45$), lo cual sugiere una inhibición parcial del metabolismo hidrogenogénico debido a la acumulación de ácido láctico (Correa-Villa et al., 2024b). En este caso, la elevada acumulación de lactato estuvo asociada a una baja conversión de ácido láctico (1,93 %) bajo condiciones de $\text{TRH} = 1$ día y $\text{C}_{\text{AL}} = 30$ g/L, lo que explica el reducido desempeño del sistema.

En contraste, el ensayo 2, operado con el mismo TRH (1 día) pero con una C_{AL} igual de 10 g/L, presentó una conversión de ácido láctico de 84,2 % y una baja acumulación residual de este metabolito. Esta diferencia sugiere que, a TRH cortos, una mayor carga de ácido láctico en la alimentación puede superar la capacidad de conversión del consorcio microbiano y favorecer la acumulación del sustrato. En este sentido, la literatura reporta que TRH demasiado cortos combinados con sobrecargas orgánicas pueden inducir el colapso del proceso de FO, limitando la conversión del sustrato y afectando negativamente la producción de $bioH_2$ (Martínez-Mendoza et al., 2023).

Por su parte, el ensayo 4 también presentó un IE inferior al de los demás ensayos. Sin embargo, en este caso el ácido láctico no fue detectado al final del ciclo de TRH, lo que indica una elevada conversión del sustrato (100%). Aun así, el sistema mostró un comportamiento inestable, lo que sugiere que valores bajos de C_{AL} en la alimentación también pueden comprometer el desempeño del proceso, ya sea por disponibilidad insuficiente de sustrato o por fluctuaciones metabólicas asociadas a una menor presencia de lactato como precursor (Fuess et al., 2018; Noblecourt et al., 2018).

Se ha reportado que valores de IE entre 0,8 y 1,0 representan condiciones cercanas al estado estacionario (García-Depraect et al., 2020; Pérez-Rangel et al., 2021). En concordancia con este criterio, los ensayos que alcanzaron un comportamiento estable fueron los ensayos 1, 5, 6, 7, 10, 11 y 13, evidenciando que determinadas

combinaciones de TRH y C_{AL} permiten garantizar condiciones de estabilidad durante la FO-LA. Ensayos como el 2 y 12, aunque con de IE cercanos a dicho rango, no alcanzaron la estabilidad debido a que, durante su operación, el pH descendió a 6,4 y 6,3, respectivamente, valores inferiores al pH operativo en el cual las comunidades BPH consumidoras de ácido láctico mantuvieron un funcionamiento estable ($6,76 \pm 0,14$). Este descenso del pH probablemente afectó la actividad hidrogenogénica al desplazar el metabolismo hacia rutas menos favorables para la producción de H₂ (Martínez-Mendoza et al., 2022). Sin embargo, al operar en condiciones cercanas a la neutralidad, no se observó actividad metanogénica en los ensayos, lo cual sugiere que las combinaciones de TRH y C_{AL} aplicadas generaron condiciones bioquímicas que limitaron el crecimiento de las arqueas metanogénicas en el biorreactor (Khan et al., 2016; Wainaina et al., 2019).

El pH ha sido ampliamente identificado como un parámetro clave en la eficacia de la FO-LA, ya que no solo controla la composición de la comunidad microbiana, sino también las vías metabólicas, la actividad enzimática, el crecimiento de la biomasa y la degradación del sustrato. La FO-LA ha sido reportada como más activa en rangos de pH entre 5,5 y 7, siendo los valores cercanos a la neutralidad aquellos que generalmente proporcionan las mejores tasas y rendimientos de H₂ (Noblecourt et al., 2018; García-Depraect, et al. 2021; Regueira-Marcos et al., 2023; Villanueva-Galindo et al., 2025). En este estudio se lograron rendimientos entre 1,8 y 121,5 mL H₂/g SV, los cuales están acordes al rango reportado en la literatura entre 4,7 y 141,4 mL H₂/g SV a pH de 5,8, 6,0 y 6,5 en condiciones mesofílicas (35 y 37°C) (Villanueva-Galindo et al., 2025).

En cuanto a la eficiencia de remoción de SV, los valores obtenidos para las distintas combinaciones de TRH y CAL oscilaron y fueron de 4,45 y 20,51%. Estos resultados concuerdan con estudios previos sobre la fase hidrogenogénica en sistemas de FO-LA operados en dos etapas, donde se reportaron valores entre 4 y 19,1 % (García-Depraet et al., 2023a; Regueira-Marcos et al., 2024, 2025). En particular, Regueira-Marcos et al. (2025) evidenció que la remoción de SV a partir de residuos de comida fue ligeramente menor en configuraciones de una etapa en comparación con un sistema de dos etapas, destacando que la fermentación láctica jugó un papel determinante en la degradación del sustrato, equilibrando la baja remoción observada en la segunda etapa hidrogenogénica.

Esta tendencia podría explicarse por dos factores. Primero, al desacoplar la producción de bioH₂ de la conversión de carbohidratos, la mayor degradación del sustrato ocurre en la fase láctica, donde los carbohidratos son transformados principalmente en ácido láctico y se sostiene el crecimiento microbiano. Por tanto, en la etapa hidrogenogénica ocurre una remoción limitada, dado que el metabolismo se encuentra más orientado a la conversión del lactato que a la degradación adicional del material orgánico particulado. Segundo, la baja eficiencia de remoción también podría atribuirse a la limitada capacidad del sistema para mantener procesos de degradación sostenidos a TRH cortos, lo que coincide con las observaciones de Regueira-Marcos et al. (2025).

No obstante, diversos autores han señalado que la remoción de SV y carbohidratos no constituye un indicador fiable en el desempeño de los sistemas de FO-LA, debido a la ausencia de cambios significativos en estos parámetros durante la operación (Martínez-Mendoza et al., 2022; García-Depraect et al., 2023a; Regueira-Marcos et al., 2024). Esto sugiere que la eficiencia de remoción de SV y carbohidratos no refleja adecuadamente la actividad hidrogenogénica y, por tanto, no debe emplearse como variable primaria para evaluar o comparar el desempeño del proceso.

La Tabla 4-5 presenta estudios orientados a la producción de biohidrógeno por FO-LA a partir de diferentes residuos orgánicos, considerando distintas condiciones de operación, como pH, temperatura y modo de operación. En términos generales, los valores máximos de producción de hidrógeno reportados (Ensayo 1y 2) muestran que el mucílago de café presenta un desempeño comparable al descrito en la literatura para otros residuos agroindustriales. En particular, al contrastar los resultados obtenidos en este estudio con los reportados en sistemas discontinuos mezclas de mucílago de café con residuos de frutas y verduras, y de aguas residuales del procesamiento de café y (Moreno, 2016; García-Depraect & León-Becerril, 2023), se observa que la operación en modo semicontinuo permitió aumentar la productividad del proceso. En conjunto, estos antecedentes sugieren que la implementación de sistemas continuos y semicontinuos en FO-LA puede favorecer una mayor productividad cuando se emplean residuos agroindustriales como sustrato.

Tabla 4-5. Comparación del desempeño de residuos agroindustriales evaluados en sistemas de fermentación oscura impulsada por lactato.

Sustrato	Condiciones de operación	Inóculo	VHPR (L H ₂ /L-d)	Referencia
Mucílago de café y residuos de fruta y verdura	Discontinuo; pH 6,5; 30 °C; V _T =20 L; 33 g/L AL	Comunidad microbiana nativa	1,2	Moreno (2016)
Vinaza de Tequila	Continuo; pH 5,8; 35 °C; V _T = 2 L; TRH 6 h; 12,4 g/L AL influente	Cultivo mixto PTA-124566	12,3	García-Depraect et al. (2020)
Suero de queso ácido	Discontinuo; pH 5,8; 35°C; V _T = 2 L; 15 g/L AL	Cultivo mixto PTA-124566	1,9	Aranda-Jaramillo et al. (2023)
Aguas residuales procesamiento de café	Discontinuo; pH 5,5; 35 °C; V _T = 3 L; 5 g/L AL	Fermentado anaerobio de residuos de alimentos	0,58	García-Depraect & León-Becerril (2023)
Residuos de comida de cafetería	Discontinuo; pH 7,0; 37 °C; V _T = 0,6 L; 15 g/L AL	Comunidad microbiana nativa	2,9	Villanueva-Galindo et al. (2025)
Suero de queso	Continuo; pH 5,8; 35 °C; V _T =1 L; TRH 18 h 17,4 g/L AL influente	Cultivo mixto PTA-124566	7 8	Aranda-Jaramillo et al. (2025)
Suero de queso ácido	Continuo; pH 5; 35 °C; V _T =2,2 L; TRH 4,5 h	Lodo anaerobia granular	2,42	Ordoñez-Frías et al. (2024)
Residuos de cocina	Semicontinuo; pH 6,5, 37°C; V _T = 0,9 L; TRH 6 h 14,5 g/L AL influente	Fermentado anaerobio de residuos de alimentos	4,4	Regueira-Marcos et al. (2025)
Mucílago de café	Semicontinuo pH 6,7; 31°C; V _T =12 L; TRH 12 h; 20 g/L AL influente	Fermentado anaerobio de residuos de frutas y verduras	3,05	Este estudio
Mucílago de café	Semicontinuo pH 6,7; 31°C; V _T =12 L; TRH 24 h; 20 g/L AL influente	Fermentado anaerobio de residuos de frutas y verduras	2,0	Este estudio

V_T= Volumen de trabajo; VHPR: Tasa volumétrica de producción de hidrógeno; TRH: Tiempo de retención hidráulica;
AL: Ácido láctico

No obstante, la comparación con otros residuos orgánicos también pone de manifiesto que uno de los principales desafíos para la producción de biohidrógeno

mediante FO se relaciona con la composición heterogénea y variable de estos sustratos, ya que esta variabilidad puede generar fluctuaciones en el rendimiento, afectar la estabilidad del proceso y dificultar la estandarización de las condiciones operativas (Ghimire et al., 2015; Gbiete et al., 2024). En la práctica, los residuos orgánicos pueden constituir una excelente fuente de nutrientes; sin embargo, también puede ocurrir una limitación de componentes clave, debido a su composición variable puede restringir la disponibilidad de macro y micronutrientes requeridos para un adecuado funcionamiento del metabolismo microbiano (García-Depraect et al., 2021a).

Se ha reportado que la disponibilidad de oligoelementos como magnesio, hierro, zinc y sodio es relevante para la producción de biohidrógeno. En particular, la disponibilidad de hierro adquiere especial importancia debido a su participación en enzimas clave como la hidrogenasa (Bastidas-Oyanedel et al., 2019; García-Depraect et al., 2021a). Evidencia de esto es lo reportado por Ren et al. (2022), quienes demostraron que la adición de ion ferroso (Fe^{2+}) en una concentración de 200 mg/L incrementó la producción de hidrógeno en un 62,1% a partir de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, favoreciendo las rutas hidrogenogénicas. Bajo esta premisa, el alto desempeño observado por García-Depraect et al. (2020) en el efluente de fermentación láctica de vinaza de tequila —comparado con otros sustratos en la Tabla 4-5— podría atribuirse a la suplementación con sulfato ferroso y cloruro de amonio, este último empleado para evitar la limitación de nitrógeno. En contraste, Rodríguez-Reyes et al. (2021) obtuvieron valores máximos de 1,9 $\text{LH}_2/\text{L-d}$ utilizando vinaza de tequila sin suplementación nutricional, los cuales fueron

inferiores a los alcanzados con tequila de vinaza suplementada con nutrientes. Estos resultados sugieren que el balance nutricional del medio es un factor determinante para contribuir el desempeño óptimo del sistema.

Adicionalmente, García-Depraect y León-Becerril (2023) reportaron que la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales del procesamiento de café fue menor que la observada con otros residuos orgánicos, lo cual atribuyeron a su bajo contenido de carbohidratos, principal fuente de carbono para la fermentación dual de ácido láctico. De acuerdo con estos autores, el contenido de carbohidratos en este residuo fue aproximadamente 20, 15 y 8,5 veces menor que el reportado para residuos alimentarios, suero de queso y vinaza de tequila, respectivamente. Asimismo, Ordoñez-Frías et al. (2024) reportaron que los valores máximos de producción de hidrógeno en suero de leche ácido previamente prefermentado se alcanzaron mediante la adición de ácido acético al sustrato, favoreciendo la conversión posterior del ácido láctico. En conjunto, estos antecedentes sugieren que una disponibilidad suficiente de carbohidratos en el sustrato resulta necesaria para sostener la formación de ácido láctico y ácido acético como intermediarios metabólicos asociados a la producción de H_2 (García-Depraect et al., 2021a).

Bajo esta perspectiva, el mucílago de café presenta un alto contenido de carbohidratos fermentables, particularmente glucosa y galactosa (Pérez-Sariñana et al., 2015; Rangel et al., 2021), lo que sugiere una mayor aptitud para sostener la producción de ácido láctico y su posterior conversión a hidrógeno. Asimismo, su composición incluye macro y micronutrientes relevantes para el metabolismo

microbiano, tales como fósforo, potasio, magnesio, calcio, hierro y zinc (Pérez-Sariñana et al., 2015). No obstante, la presencia de estos componentes no implica necesariamente que la composición nutricional del sustrato sea óptima, ya que una baja concentración de proteínas podría reflejar una disponibilidad limitada de nitrógeno (Pérez-Sariñana et al., 2015; Rangel et al., 2020), que podría traducirse en una relación C/N muy alta y afectar la eficiencia del proceso de FO-LA. Se ha señalado que una relación C/N adecuada es necesaria para alcanzar una alta eficiencia en la producción de biohidrógeno, mientras que valores excesivamente altos o bajos pueden afectar negativamente el crecimiento microbiano, alterar las rutas metabólicas y, en última instancia, reducir la producción de hidrógeno (García-Depraect et al., 2023b).

Por otro lado, la composición fisicoquímica del mucílago de café puede variar entre lotes, entre fincas cafeteras y según el grado de madurez del fruto, la época de cosecha y las condiciones de procesamiento, entre otros factores. Por ejemplo, los frutos maduros contienen mayores concentraciones de carbohidratos, mientras que los frutos verdes presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos, los cuales pueden inhibir el crecimiento microbiano. Asimismo, la cantidad de agua utilizada durante el proceso de separación del grano de café del fruto puede modificar la concentración de azúcares disponibles en el mucílago. Además, dado que este residuo puede portar una microbiota nativa variable, cambios en la composición de dicha comunidad microbiana podrían modificar los patrones de fermentación láctica y la posterior conversión de ácido láctico a hidrógeno, aún bajo condiciones operativas similares (Haile & Kang, 2019). En consecuencia, la variabilidad

intrínseca del mucílago de café podría condicionar tanto la eficiencia como la reproducibilidad del proceso fermentativo, por lo que resulta importante aplicar estrategias de caracterización y control del sustrato antes y después de la fermentación láctica.

Estudios previos han confirmado que tanto las características fisicoquímicas como la composición microbiana del sustrato son factores determinantes en la producción de biohidrógeno por fermentación oscura. Asimismo, el tipo de inóculo y su pretratamiento influyen directamente en el desempeño de los sistemas de FO-LA, ya que pueden favorecer el equilibrio funcional entre la conversión inicial de carbohidratos a ácido láctico y su posterior transformación a hidrógeno (García-Depraect & León-Becerril, 2023; García-Depraect et al., 2023b).

En este estudio, la acidificación del mucílago de café se realizó en tanques de polipropileno de alta densidad, bajo condiciones discontinuas, estáticas y herméticamente cerradas, sin control de pH ni temperatura, sin adición de cultivos iniciadores y sin suplementación externa de nutrientes. Además, no se emplearon cultivos mixtos ni pretratamientos del inóculo orientados al enriquecimiento de bacterias especializadas, como se ha reportado en otros estudios de FO-LA. La estrategia experimental utilizada buscó aproximarse a un escenario operativo más industrial, potencialmente más rentable, evitando etapas con alta demanda energética, uso de reactivos químicos o requerimientos operacionales complejos.

Sin embargo, debe reconocerse que no se realizó una caracterización fisicoquímica detallada del sustrato antes y después de la acidificación natural. Esto se debe a que el enfoque principal del trabajo estuvo centrado en la etapa hidrogenogénica de la FO-LA, más que en la etapa primaria de fermentación láctica espontánea del mucílago. En consecuencia, futuros estudios deberían profundizar en la caracterización, el control y el mejoramiento de esta etapa inicial, con el fin de reducir la variabilidad del sustrato, favorecer una producción más consistente de ácido láctico y mejorar la reproducibilidad global del proceso.

A pesar de esta limitación, los resultados obtenidos evidencian que el mucílago de café acidificado aportó condiciones nutricionales favorables para sostener la actividad hidrogenogénica de la comunidad microbiana. Esto permitió alcanzar tasas volumétricas máximas de producción de hidrógeno entre 2,0 y 3,05 L H₂/L-d, aun bajo un esquema de acondicionamiento simple y considerando la variabilidad composicional inherente del sustrato (Tabla 4-5).

Finalmente, la comparación directa entre sistemas hidrogenogénicos debe interpretarse con cautela, dado que la FO depende de múltiples factores, incluyendo el tipo de sustrato, la composición del inóculo, el modo de operación, el pretratamiento aplicado y las condiciones ambientales. En este contexto, el análisis realizado permite evaluar el desempeño relativo del mucílago de café frente a otros residuos orgánicos, más que establecer una comparación absoluta entre procesos.

4.3.3. Análisis estadístico de los factores operativos mediante metodología de superficie de respuesta

A partir de los resultados obtenidos, se identificó que el comportamiento del sistema hidrogenogénico semicontinuo fue fuertemente acondicionado por la combinación de TRH y C_{AL} . El análisis estadístico mediante MSR permitió evaluar la influencia individual y conjunta de ambos factores sobre el desempeño del proceso a partir de los indicadores HPR y HMY, como variables de respuestas (Tabla 4-5).

Tabla 4-6. Coeficientes de regresión y ANOVA de los modelos ajustados para la tasa de producción y rendimiento molar de hidrógeno.

Fuente	Valor real		Valor p	
	Coeficientes		Variable	
	HPR	HMY	HPR	HMY
Modelo	-	-	0,0134	0,0346
Intercepto	60,85074	1,35901	-	-
TRH	- 40,65893	- 0,50872	0,0035	0,0482
C_{AL}	- 0,395055	- 0, 04404	0,5932	0,3856
TRH $\times$ C_{AL}	0,591348	0,01975	0,0516	0,0235
TRH ²	5,16523	-	0,0311	-
C_{AL}^2	- 0,022342	-	0,2826	-
Falta de ajuste	-	-	0,0014	0,0135
R ²	0,8274	0,5993	-	-
R ² _{ajustado}	0,7040	0,4657	-	-

HPR: Tasa de producción de hidrógeno;
HMY: Rendimiento molar de H₂ por mol de ácido láctico consumido

Además, para el modelo de HPR se detectó un efecto cuadrático significativo del TRH ($p=0,0311$), lo que confirma la existencia de una relación no lineal. La interacción TRH $\times$ C_{AL} , si bien no fue estadísticamente significativa para HPR ($p=0,0516$), presentó un valor cercano al umbral de significancia, indicando una posible influencia moderada. Por razones de consistencia estructural, todos los términos no significativos fueron conservados, excepto los cuadráticos del modelo para HMY.

A pesar de que los modelos explican adecuadamente las tendencias generales del sistema ($R^2 = 0,8274$ y $0,5993$ para HPR y HMY, respectivamente), la prueba de falta de ajuste fue significativa en ambos modelos ($p > 0,05$), lo que sugiere que no logran representar completamente la variabilidad observada, especialmente en los bordes del espacio experimental. Esta limitación se confirmó mediante la validación experimental (Tabla 4-6), donde se observaron errores relativos más altos en condiciones extremas como $TRH=0,5$ & $C_{AL}=20$ y $TRH=1,0$ & $C_{AL}=10$, las cuales fueron previamente identificadas como puntos influyentes a través del análisis de la distancia de Cook y DFFITS (Anexo B).

Tabla 4-7. Validación del modelo para la producción y rendimiento molar de biohidrógeno.

Ensayo		HPR (L H ₂ /d)			HMY (mol H ₂ /mol AL)		
TRH (d)	C _{AL} (g/L)	Real	Predicho	Error (%)	Real	Predicho	Error (%)
0,5	20	39,72	31,24	21,34	0,521	0,421	19,18
1	10	23,82	25,28	6,138	0,918	0,607	33,85
1,5	20	10,92	12,43	7,572	0,335	0,308	8,07

HPR: Tasa de producción de hidrógeno; HMY: Rendimiento molar de H₂ por mol de ácido láctico consumido

Este comportamiento fue consistente con los patrones observados, validando su inclusión como escenario operativo normal. En contraste, en condiciones intermedias ($TRH=1,5$ & $C_{AL}=20$), los errores fueron menores y el comportamiento fue más coherente con las predicciones del modelo. En este contexto, y considerando la complejidad inherente de los sistemas biológicos y la variabilidad asociada al uso de residuos agroindustriales, el modelo desarrollado constituye una herramienta útil para explorar el efecto combinado de los factores operativos sobre la producción de bioH₂ y sirve de base para orientar futuras estrategias de mejora

del proceso. Sin embargo, su aplicación con fines predictivos debe abordarse con precaución y restringirse a la interpretación de tendencias dentro del dominio experimental validado.

Una vez definido el alcance de los modelos ajustados, se procedió a la representación gráfica de las superficies de respuesta para las variables HPR y HMY (Figuras 4-6 y 4-7, respectivamente). Las representaciones tridimensionales, junto con sus respectivos gráficos de contorno, facilitaron la identificación de tendencias, zonas operativas críticas y posibles efectos combinados de los factores TRH y C_{AL} sobre el desempeño del sistema.

4.3.4. Análisis del efecto combinado del tiempo de retención hidráulica y la concentración de ácido láctico en la producción de biohidrógeno

La superficie correspondiente a HPR (Figuras 4-6a y 4-6b) evidenció una morfología parabólica atribuida a la combinación de efectos lineales negativos y términos cuadráticos, reflejando una relación no lineal e inversa entre los factores evaluados y la HPR. En particular, se observó una disminución progresiva de HPR con el incremento del TRH, en concordancia con lo reportado en otros sistemas de FO-LA operados en modo continuo y semicontinuo utilizando residuos de comida y vinaza de tequila enriquecidas con ácido láctico (García-Depraect et al., 2020; Regueira-Marcos et al., 2024, 2025).

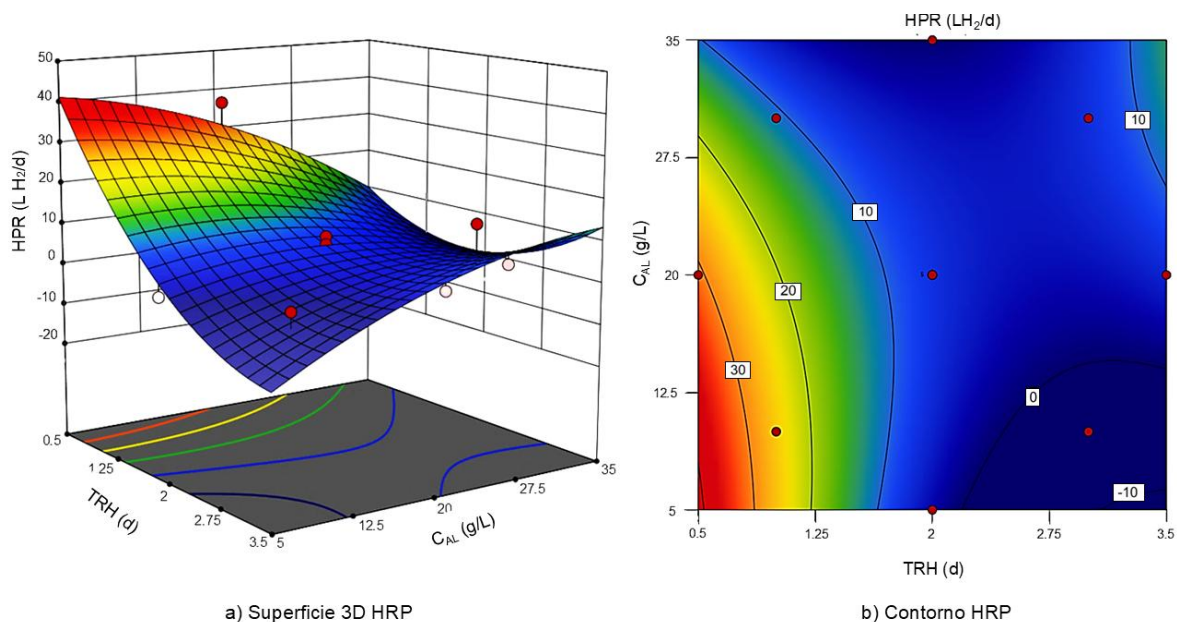


Figura 4-6. Superficies y contorno de respuesta para la tasa de producción de hidrógeno (HPR) en función del tiempo de retención hidráulica y la concentración de ácido láctico en la alimentación (C_{AL}), obtenidas mediante la metodología de superficie de respuesta.

A valores de TRH superiores a 2 días, la producción de H₂ decayó notablemente, incluso a niveles elevados de C_{AL} (>20 g/L). Aunque el efecto individual de C_{AL} no fue estadísticamente significativo, su incremento en el rango de 10 a 20 g/L bajo condiciones de TRH menores promovió aumentos discretos en HPR. Este comportamiento, respaldado por la morfología cóncava descendente de la superficie, sugiere una interacción funcional entre ambos factores que no debe ser ignorada, lo cual concuerda con el ANOVA.

Cabe destacar que, si bien los valores de TRH evaluados en este estudio difieren de los reportados en otras investigaciones, existe coincidencia relevante en el rango de concentración de ácido láctico empleado. García-Depraect et al. (2020) utilizaron

12,4 g/L de ácido láctico provenientes de vinaza de tequila fermentada como sustrato en un biorreactor continuo, observando que la producción de bioH₂ mejoró progresivamente a medida que TRH disminuía. De manera análoga, Regueira-Marcos et al. (2024, 2025) emplearon residuos alimentarios enriquecidos con 11,4 g/L y 15 g/L de AL, respectivamente, reportando mejoras sustanciales en la producción de bioH₂ bajo regímenes de TRH cortos, tanto en sistemas continuos como semicontinuos. En conjunto, estos resultados indican que regímenes con TRH bajos y niveles levemente bajos a intermedios de C_{AL} favorecen un metabolismo hidrogenogénico más activo y eficiente, al permitir una mayor disponibilidad del sustrato y facilitar la selección y estabilización de BPH durante la operación semicontinua (Cruz-López et al., 2024; Pérez-Rangel et al., 2025).

El argumento anterior se refuerza con la interpretación de la superficie correspondiente a HMY (Figuras 4-7a y 4-7b), la cual representa la fracción del ácido láctico efectivamente convertida en H₂. A diferencia de HPR, esta variable mostró una respuesta más sensible a la interacción entre TRH y C_{AL}, como se evidenció en el análisis estadístico. El gradiente de respuesta se orientó diagonalmente, lo que indica una interacción sinérgica entre ambos factores. Se identificó una zona de mayor rendimiento bajo condiciones de TRH menores (0,5–1 día) y concentraciones moderadamente bajas a intermedias de C_{AL} (10–20 g/L).

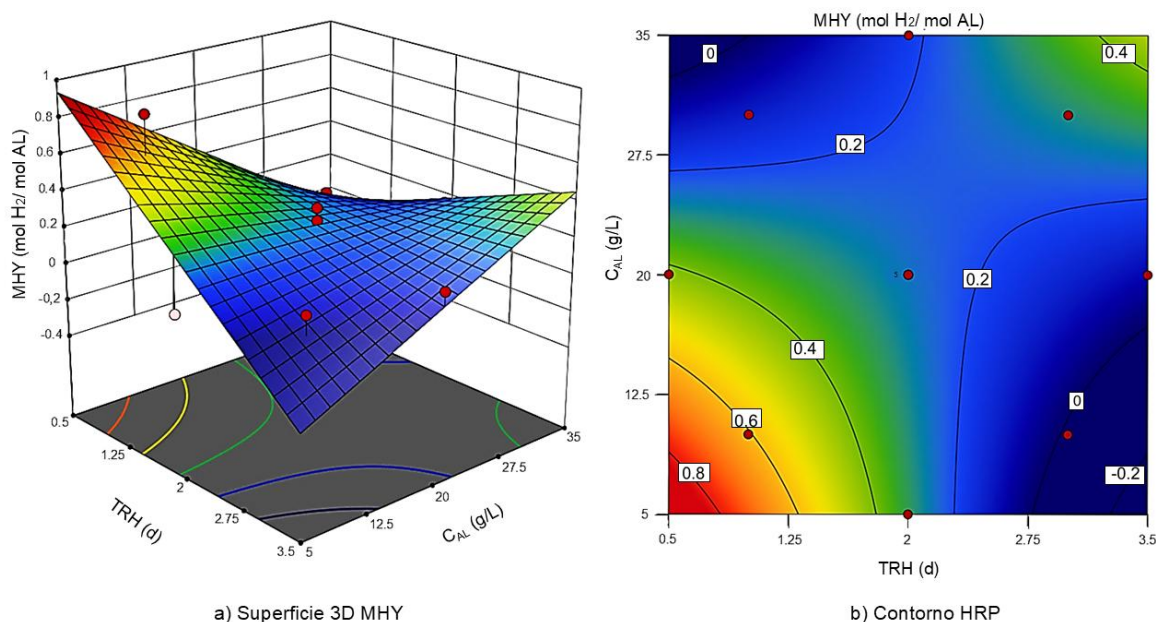


Figura 4-7. Superficies y contorno de respuesta para el rendimiento molar de hidrógeno (MHY) en función del tiempo de retención hidráulica (TRH) y la concentración de ácido láctico en la alimentación (C_{AL}), obtenidas mediante la metodología de superficie de respuesta

Este comportamiento sugiere que, en dicho rango operacional, la disponibilidad de ácido láctico y su permanencia dentro del biorreactor fue adecuada, permitiendo una conversión eficiente hacia H₂ a través de rutas hidrogenogénicas predominantes, particularmente la vía butírica (Ecuación 3-1 y 3-2), en lugar de rutas consumidoras de H₂ como la ruta propionogénica (Ecuación 3-4; Regueira-Marcos et al., 2024; Correa-Villa et al., 2024b). Asimismo, la dominancia del ácido butírico y la baja concentración de ácido propiónico, junto con la mínima acumulación de ácido láctico residual observadas en estos ensayos (Figura 4-5) respaldan la prevalencia de BPH consumidoras de ácido láctico bajo dichas condiciones. Estudios previos han señalado que la mayor producción de bioH₂ en cultivos discontinuos se encuentra en el rango de concentraciones de ácido láctico de 5 a 25 g/L

(Baghchehsaraee et al., 2009; Kim et al., 2012; Noblecourt et al., 2018; Fuentes-Santiago et al., 2023; Villanueva-Galindo et al., 2024; Pérez-Rangel et al., 2025). La eficiencia en el aprovechamiento del ácido láctico como fuente de carbono depende tanto del tipo de consorcio microbiano como de la disponibilidad de carbohidratos residuales (Fuentes-Santiago et al., 2023; Pérez-Rangel et al., 2025).

Noblecourt et al. (2018) reportaron un HMY global de 0,40 mol H_2 /mol ácido láctico en biorreactores discontinuos alimentados con 25 g/L de ácido láctico provenientes de residuos alimentarios pre-fermentados, los cuales fueron completamente consumidos en 33 horas. Resultados similares fueron obtenidos por Wu et al., (2012), quienes lograron un HMY de 0,42 mol H_2 /mol ácido láctico utilizando un medio sintético con 30 g/L de ácido láctico en condiciones de operación continua a un TRH de 18 horas. En comparación, los valores de HMY alcanzados en este estudio oscilaron entre 0,37 y 0,90 mol H_2 /mol AL bajo condiciones de TRH menores y niveles moderadamente bajos a intermedios de C_{AL} , superando incluso algunos de los valores previamente reportados. Sin embargo, combinaciones con TRH prolongados (≥ 2 días) y altas concentraciones de C_{AL} (>20 g/L) generaron rendimientos considerablemente más bajos.

Este descenso puede atribuirse a varios fenómenos que podrían estar interrelacionados con la dinámica metabólica del sistema. En primer lugar, el aumento de la concentración de ácido propiónico, a pesar de la dominancia del ácido butírico bajo estas condiciones (Figura 4-4) sugieren que una fracción del ácido láctico y del H_2 generado pudo haberse desviado hacia rutas propionogénicas. En segundo lugar, la dinámica del ácido acético en el sistema debe interpretarse

cautelosamente. Por un lado, el ácido acético puede formarse como un coproducto en reacciones hidrogenogénicas (Ecuación 3-2), pero su baja acumulación podría indicar su utilización como co-sustrato para la conversión del ácido láctico hacia H₂ y ácido butírico (Ecuaciones 3-1; García-Depraect et al., 2021a; Correa-Villa et al., 2024a). Se ha estimado que hasta el 75 % del volumen total de H₂ en la fermentación oscura puede derivarse de rutas que involucran ácido láctico y acético como precursores (Blanco et al., 2019; Aranda-Jaramillo et al., 2023). Por otro lado, la acumulación de ácido acético también podría asociarse a rutas consumidoras de H₂, como las homoacetogénicas (Ecuación 4-3), lo cual comprometería aún más el rendimiento (Saady, 2013; Castelló et al., 2020).



No obstante, el aprovechamiento del ácido láctico siguió distintos patrones dependiendo de la combinación entre TRH y C_{AL}. En la región operativa favorable (TRH ≤ 1 día; C_{AL} = 10–20 g/L), las frecuencias de recambio de 4 y 8 h (Tabla 4-2) permitieron un consumo más efectivo del sustrato, reflejado en una baja acumulación de ácido láctico residual y en un mejor desempeño hidrogenogénico durante la fermentación oscura semicontinua del mucílago de café acidificado. En contraste, en el ensayo 3 (TRH = 1 día; C_{AL} = 30 g/L), la alta concentración residual de ácido láctico sugiere que la frecuencia de recambio de 8 h fue insuficiente para un consumo efectivo del sustrato alimentado al sistema, lo que favoreció su acumulación y una baja producción de H₂ a lo largo de la operación. Por otra parte, en los ensayos 4 y 11–13, que operaron a TRH prolongados y niveles de C_{AL} entre

5 y 30 g/L, se observó baja acumulación de ácido láctico junto con bajos valores de HMY, lo que indica que, aunque el sustrato fue consumido, su conversión a H_2 fue limitada, probablemente debido al agotamiento temprano del ácido láctico antes del siguiente evento de alimentación, programado a frecuencias de recambio iguales o superiores a 16 h (Tabla 1). Por su parte, los ensayos 5–9, correspondientes al punto central ($TRH = 2$ días; $C_{AL} = 20$ g/L), presentaron valores intermedios de HMY, baja acumulación de ácido láctico y bajos valores de HPR, lo que sugiere que la disponibilidad de este sustrato en el sistema pudo no haber sido suficiente para sostener una conversión más efectiva hacia H_2 , posiblemente debido a la competencia con otros procesos metabólicos alternativos. Según esta interpretación, el leve incremento de HMY observado en las superficies de respuesta (Figuras 4-7a y 4-7d)) bajo condiciones de TRH superiores a 2 días y $C_{AL} \geq 30$ g/L podría sugerir que una mayor disponibilidad de ácido láctico en el sistema favorecería una conversión más efectiva hacia H_2 , a pesar de la coexistencia de otros procesos metabólicos.

4.3.5. Aplicación de lógica difusa para el modelado de la producción de biohidrógeno en FO-LA semicontinua

Los modelos de regresión obtenidos mediante MSR presentaron limitaciones para capturar completamente la naturaleza no lineal y compleja del sistema hidrogenogénico impulsado por ácido láctico operado en modo semicontinuo. Esta limitación motivó la aplicación de lógica difusa (LD) como una herramienta matemática poderosa para analizar sistemas con alta complejidad, permitiendo

gestionar la incertidumbre y la ambigüedad inherentes a los procesos biotecnológicos (Zenani et al., 2025).

Los datos experimentales del volumen total de gas sin normalizar (Anexo A) se utilizaron para definir los dominios y construir los conjuntos difusos de entrada (TRH; C_{AL}) y de salida (HRP). Las variables TRH y C_{AL} fueron representadas mediante seis conjuntos: *muy bajo*, *medio bajo*, *bajo*, *medio*, *medio alto* y *alto*, distribuidos en los dominios 0-4,5 días y 0-40 g/L, respectivamente. Para la salida HRP, se establecieron siete conjuntos: *muy bajo*, *medio bajo*, *bajo*, *medio*, *medio alto*, *alto*, *muy alto*, en el dominio 0-55 L_{H2}/d. Las funciones de pertenencias asociadas fueron de tipo trapezoidal y su distribución se presenta en el Anexo C. A partir de estos conjuntos se construyeron 36 reglas basadas en los resultados experimentales, cubriendo las combinaciones relevantes entre TRH y C_{AL} para estimar la HRP. Tras la inferencia Mamdani y la conversión de las salidas difusas al dominio original de la variable empleando el método centroide, se obtuvo la superficie de respuesta del modelo (Figura 4-8).

La superficie de respuesta obtenida mostró un comportamiento coherente con los patrones observados experimentalmente. Se identificó que la variable C_{AL} no ejerce un efecto dominante por sí sola sobre HRP, sino que su influencia se encuentra condicionada por el TRH, el cual concuerda con el resultado del ANOVA del modelo de regresión. Además, se observan máximos de producción en rangos de TRH menores (0,2–1,0 días) combinados con concentraciones moderadas a intermedias de C_{AL} (10–22 g/d), coincidiendo con los resultados

experimentales y de validación obtenidos en condiciones $TRH = 0,5$ días & $C_{AL} = 20 \text{ g L}^{-1}$ y $TRH = 1,0$ días & $C_{AL} = 10 \text{ g L}^{-1}$.

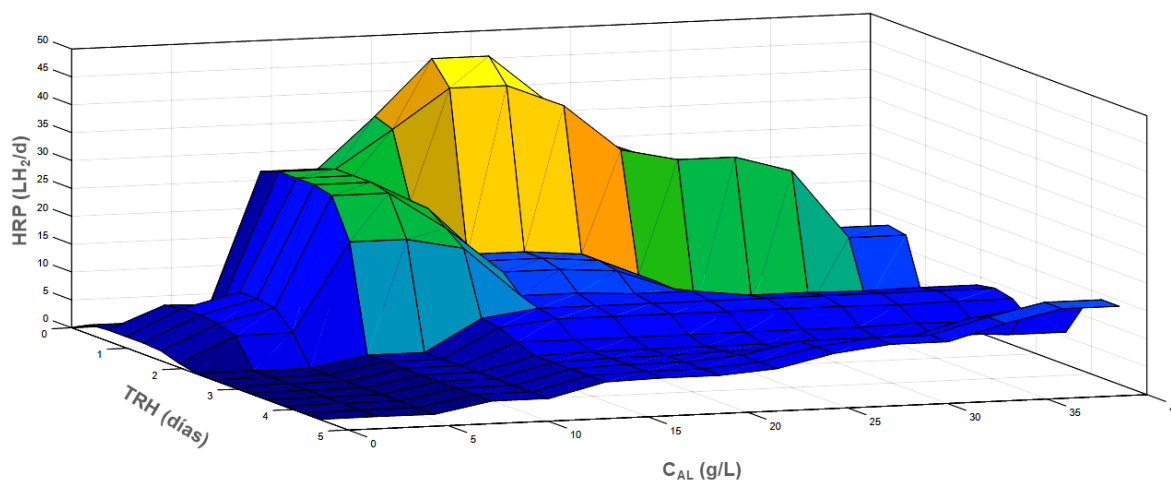


Figura 4-8. Superficie de respuesta generada por el modelo de lógica difusa para la tasa de producción de hidrógeno (HRP) en función de la interacción entre el tiempo de retención hidráulica (TRH) y la concentración de ácido láctico en la alimentación (C_{AL}).

En contraste, cuando TRH fue superior a 2,0 días, el efecto de la concentración de ácido láctico fue poco relevante, y la HPR decayó incluso a niveles elevados de sustrato. Esta tendencia sugiere que el recambio frecuente del medio — favorecido por un TRH menor— contribuye a minimizar la acumulación de metabolitos inhibidores y promueve un entorno favorable para la actividad de BPH, lo cual está en concordancia con lo reportado por García-Depraect et al. (2020) y Regueira-Marcos et al. (2024, 2025), quienes observaron altas tasas de producción en sistemas continuos y semicontinuos operados con TRH entre 0,17 y 1 días utilizando sustratos ricos en ácido láctico como vinaza de tequila y residuos de comida.

Finalmente, la comparación entre los valores experimentales de la HRP y las estimaciones del modelo LD (Figura 4-9a) mostró un elevado grado de concordancia. El modelo fue capaz de reproducir con precisión tanto los valores máximos como mínimos de producción observados, alcanzando un RMSE de 1,124, considerablemente inferior al RMSE del modelo de regresión (5,314).

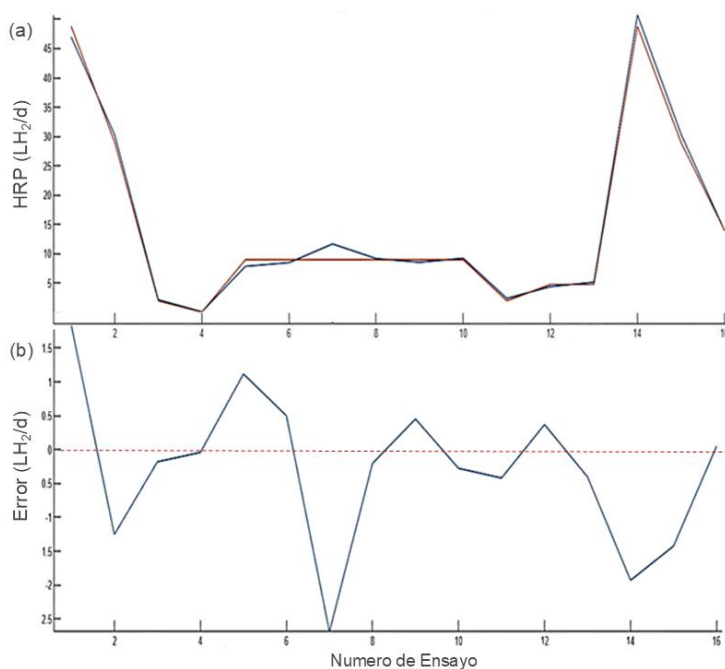


Figura 4-9. Validación del modelo de lógica difusa: (a) comparación entre los valores experimentales (línea azul) y valores estimados por el modelo para la tasa de producción de H_2 (HRP; línea naranja); (b) Distribución de los errores residuales (RMSE=1,124).

El análisis de residuales reveló una distribución centrada alrededor del cero (Figura 4-9b), lo que indica la ausencia de sesgo. Además, el error se mantiene en valores cercanos a $\pm 1,25 \text{ L H}_2/\text{d}$, con discrepancias puntuales mayores bajo condiciones de HPR extrema, asociadas a los ensayos con condiciones $\text{TRH}=0,5$ & $\text{CAL}=20$. Lo anterior demuestra que, en el dominio evaluado, el modelo de LD captura con

precisión la tendencia global y las variaciones locales de HRP, destacándose como una herramienta robusta para el modelado del proceso dentro del dominio experimental evaluado.

4.3.6. Consideraciones finales y proyección para futuras investigaciones

El análisis desarrollado permitió identificar tendencias clave en el desempeño hidrogenogénico de sistemas FO-LA operados en modo semicontinuo, utilizando mucílago de café acidificado como sustrato. A pesar de las limitaciones estadísticas observadas en los modelos de regresión empleados y de la variabilidad inherente a los sistemas biológicos, fue posible establecer relaciones funcionales robustas entre los factores operativos evaluados y los principales indicadores de desempeño del proceso.

Se confirmó que el TRH fue el parámetro más influyente sobre las variables HRP y HMY, seguido por la C_{AL} , cuyo efecto se manifestó principalmente a través de su interacción con el TRH. Esta combinación condicionó el aprovechamiento del sustrato al afectar tanto su disponibilidad como su conversión efectiva en H_2 . En particular, las combinaciones con TRH menores (≤ 1 día) y C_{AL} moderadamente bajas a intermedias (10–20 g/L) promovieron condiciones metabólicas favorables: alta conversión del ácido láctico, predominancia de las rutas hidrogenogénicas de tipo butíricas, baja acumulación de metabolitos inhibidores y mayor actividad de BPH consumidoras de ácido láctico.

Estos resultados concuerdan con investigaciones previas sobre FO-LA con residuos fermentados ricos en ácido láctico, en las cuales los mejores desempeños se lograron bajo condiciones de TRH entre 4 y 24 horas (García-Depraect et al., 2020; Ordoñez-Frías et al., 2024; Regueira-Marcos et al., 2024; 2025).

A partir de estos hallazgos, se identifican tres estrategias prioritarias para investigaciones futuras:

- (i) *Explorar regímenes con TRH menores a un día*, en combinación con concentraciones de C_{AL} entre 10 y 20 g/L, para optimizar la conversión del sustrato y disminuir la acumulación de metabolitos inhibitorios.
- (ii) *Evaluar el efecto de diferentes porcentajes de recambio* durante la operación semicontinua, con el fin de mejorar la disponibilidad del sustrato sin comprometer la estabilidad del consorcio microbiano.
- (iii) *Investigar el comportamiento del sistema bajo condiciones de altos niveles de C_{AL} y TRH prolongados*, lo cual permitiría estudiar la respuesta adaptativa del consorcio microbiano frente a la dinámica del sustrato a mayores TRH.

Estas estrategias permitirán no solo fortalecer el diseño de condiciones operativas más robustas y adaptativas, sino también potenciar la flexibilidad del sistema semicontinuo, alineándolo con la estacionalidad y variabilidad de los residuos agroindustriales. En conjunto, los resultados obtenidos no solo explican el comportamiento observado, sino que además ofrecen una base sólida para el

diseño de procesos integrales y sostenibles orientados una producción eficiente de bioH_2 a partir de residuos reales.

4.4. Conclusiones

Este estudio contribuye significativamente a la comprensión del comportamiento hidrogenogénico de sistemas semicontinuos de fermentación oscura impulsada por ácido láctico, utilizando mucílago de café acidificado como sustrato modelo. A través de una integración metodológica que incluyó un análisis estadístico por superficie de respuesta y una modelación mediante lógica difusa, se logró una caracterización exhaustiva del sistema.

Desde una perspectiva operacional, se evidenció que el tiempo de retención hidráulica (TRH) ejerce una influencia determinante sobre la tasa de producción y el rendimiento molar de hidrógeno, siendo potenciado por su interacción con la concentración de ácido láctico en la alimentación (C_{AL}). En particular, la combinación de TRH menores (≤ 1 día) con C_{AL} en el rango de 10 a 20 g/L favoreció tener condiciones bioquímicas adecuadas para maximizar la conversión del ácido láctico en hidrógeno, mediante rutas metabólicas predominantemente de tipo butíricas y con baja acumulación de metabolitos inhibidores.

Los modelos estadísticos ajustados permitieron identificar tendencias generales en el comportamiento del sistema, aunque con limitaciones en la capacidad predictiva debido a la complejidad no lineal del proceso. En este contexto, la implementación del modelo basado en lógica difusa mostró una mayor precisión en la estimación de

la tasa de producción de H₂ dentro del dominio experimental, evidenciando su utilidad como herramienta complementaria para el análisis de sistemas biológicos complejos.

Finalmente, los hallazgos de este trabajo aportan evidencia sólida sobre el potencial del mucílago de café como sustrato viable para la producción de biohidrógeno, reafirmando su pertinencia dentro de esquemas de valorización integral de residuos agroindustriales en contextos de biorrefinería. Asimismo, se delimitaron condiciones críticas para optimizar el proceso, abriendo nuevas oportunidades para el desarrollo de estrategias sostenibles de producción de biohidrógeno a partir de residuos reales, bajo esquemas operativos flexibles y adaptados a la variabilidad de los sustratos.

4.5. Bibliografía

- Acevedo, M.-A., Peñaloza-Quintero, I., & Morales-Fonseca, D. (2021). Aprovechamiento de los polisacáridos de la pulpa de café residual para la obtención de bioetanol como estrategia hacia la bioeconomía. *Gestión y Ambiente*, 24(Supl3), 100–113. <https://doi.org/10.15446/ga.v24nsupl3.99983>
- Aranda-Jaramillo, B., León-Becerril, E., Aguilar-Juárez, O., Castro-Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2023). Feasibility Study of Biohydrogen Production from Acid Cheese Whey via Lactate-Driven Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(644), 1–12. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070644>
- Aranda-Jaramillo, B., García-Depraect, O., Aguilar-Juárez, O., Archundia-Amador, M., & León-Becerril, E. (2025). Continuous hydrogen production from cheese whey in a single-stage lactate-driven dark fermentation reactor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 177, 106307. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2025.106307>
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), & Water Environment Federation (WEF). (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (22nd ed.). APHA.

- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., & Margaritis, A. (2009). Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(6), 2573–2579. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.010>
- Bastidas-Oyanedel, J. R., Bonk, F., Thomsen, M. H., & Schmidt, J. E. (2019). The Future Perspectives of Dark Fermentation: Moving from Only Biohydrogen to Biochemicals. In J. R. Bastidas-Oyanedel & J. E. Schmidt (Eds.), *Biorefinery* (pp. 375–413). Springer Nature. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_15
- Blanco, V. M. C., Oliveira, G. H. D., & Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. *Renewable Energy*, 139, 1310–1319. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>
- Borshchevskaya, L. N., Gordeeva, T. L., Kalinina, A. N., & Sineokii, S. P. (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(8), 755–758. <https://doi.org/10.1134/S1061934816080037>
- Castelló, E., Nunes Ferraz-Junior, A. D., Andreani, C., Anzola-Rojas, M. del P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Gomes, S. D., Maintinguer, S. I., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Schiappacasse-Dasati, M., Tapia-Venegas, E., Valdez-Vázquez, I., Vesga-Baron, A., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 119). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>
- Correa-Villa, C., Moreno-Cárdenas, E., & de Bruijn, J. (2024a). Estudio preliminar sobre la producción de biohidrógeno a partir del mucílago de café en un biorreactor semicontinuo: efecto del ácido láctico. In U. T. Nacional (Ed.), *5to. Congreso de Energías Sustentables. Bahía Blanca, Argentina* (pp. 565–571). <https://doi.org/10.33414/ajea.1770.2024>
- Correa-Villa, C., Moreno-Cárdenas, E., & de Bruijn, J. (2024b). Presence of lactic acid bacteria in hydrogen production by dark fermentation: competition or synergy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(380), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04167-9>
- Cruz-López, A., Cruz-Méndez, A., Suárez-Vázquez, S. I., Reyna-Gómez, L. M., Pecina-Chacón, D. E., & de León Gómez, H. (2024). Effect of Hydraulic Retention Time on Continuous Biohydrogen Production by the Codigestion of Brewery Wastewater and Cheese Whey. *BioEnergy Research*, 17, 1155–1166.

<https://doi.org/10.1007/s12155-022-10399-0>

- de Almeida Silva, M. C., Monteggia, L. O., Alves Barroso Júnior, J. C., Granada, C. E., & Giongo, A. (2020). Evaluation of semi-continuous operation to hydrogen and volatile fatty acids production using raw glycerol as substrate. *Renewable Energy*, 153, 701–710. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.152>
- de Melo Pereira, G. V, da Silva Vale, A., de Carvalho Neto, D. P., Muynarsk, E. S., Thomaz Soccol, V., & Soccol, C. R. (2020). Lactic acid bacteria : what coffee industry should know? *Current Opinion In Food Science*, 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.004>
- de Oliveira Junqueira, A. C., Pereira, G. V. D. M., Medina, J. D. C., Alvear, M. C. R., Rosero, R., Neto, D. P. D. C., & Enríquez, H. G. (2019). First description of bacterial and fungal communities in Colombian coffee beans fermentation analysed using Illumina-based amplicon sequencing. *Scientific Reports*, 9(8794), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45002-8>
- Duarte, A., Uribe, J. C., Sarache, W., & Calderón, A. (2021). Economic, environmental, and social assessment of bioethanol production using multiple coffee crop residues. *Energy*, 216. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.119170>
- Evangelista, S. R., da Cruz, M. G., Ferreira, C., Marques, A. C., & Freitas, R. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>
- Fuentes-Santiago, V., Valdez-Vazquez, I., Vital-Jácome, M., Zavala-Méndez, M., Razo-Flores, E., & Carrillo-Reyes, J. (2023). Carbohydrates/acid ratios drives microbial communities and metabolic pathways during biohydrogen production from fermented agro-industrial wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(3). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110302>
- Fuess, L. T., Ferraz, A. D. N., Machado, C. B., & Zaiat, M. (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. *Bioresource Technology*, 247, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>
- García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., Muñoz, R., Rene, E. R., León-Becerril, E., Valdez-Vazquez, I., Kumar, G., Reyes-Alvarado, L. C., Martínez-Mendoza, L. J., Carrillo-Reyes, J., & Buitrón, G. (2021a). A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark

- fermentative processes. *Bioresource Technology*, 324, 124595. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124595>
- García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2018). Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway: Operational performance, kinetic analysis and microbial ecology. *Fuel*, 234, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.06.126>
- García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2023). Use of a Highly Specialized Biocatalyst to Produce Lactate or Biohydrogen and Butyrate from Agro-Industrial Resources in a Dual-Phase Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(787), 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090787>
- García-Depraect, O., Mena-Navarro, V., Muñoz, R., Rene, E. R., & León-Becerril, E. (2023b). Effect of nitrogen and iron supplementation on the process performance and microbial community structure of a hydrogen-producing reactor continuously fed with tequila vinasse. *Fuel*, 334(2). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.126736>
- García-Depraect, O., Mirzazada, I., Martínez-Mendoza, L. J., Regueira-Marcos, L., & Muñoz, R. (2023a). Biotic and abiotic insights into the storage of food waste and its effect on biohydrogen and methane production potential. *Journal of Water Process Engineering*, 53(103840), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103840>
- García-Depraect, O., Muñoz, R., Rodríguez, E., Rene, E. R., & León-Becerril, E. (2021b). Microbial ecology of a lactate-driven dark fermentation process producing hydrogen under carbohydrate-limiting conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46, 11284–11296. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.08.209>
- García-Depraect, O., Muñoz, R., van Lier, J. B., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., & León-Becerril, E. (2020). Three-stage process for tequila vinasse valorization through sequential lactate, biohydrogen and methane production. *Bioresource Technology*, 307, 123160. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123160>
- Gbiete, D., Narra, S., Kongnine, D. M., Narra, M.-M., & Nelles, M. (2024). Insights into biohydrogen production through dark fermentation of food waste: Substrate properties, inocula, and pretreatment strategies. *Energies*, 17(24), 6350. <https://doi.org/10.3390/en17246350>
- Gómez, X., Morán, A., Cuetos, M. J., & Sánchez, M. E. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process. *Journal of Power Sources*, 157(2), 727–732.

<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2006.01.006>

Haile, M., & Hee Kang, W. (2019). The Harvest and Post-Harvest Management

Practices' Impact on Coffee Quality. In *Coffee - Production and Research*.

IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89224>

Hernández, M. A., Rodríguez Susa, M., & Andres, Y. (2014). Use of coffee mucilage as a new substrate for hydrogen production in anaerobic co-digestion with swine manure. *Bioresource Technology*, 168, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.101>

Jung, K., Kim, D., Lee, M., & Shin, H. (2012). Two-stage UASB reactor converting coffee drink manufacturing wastewater to hydrogen and methane. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(9), 7473–7481. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.150>

Jung, K. W., Kim, D. H., & Shin, H. S. (2010). Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13370–13378. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2009.11.120>

Khan, M. A., Ngo, H. H., Guo, W. S., Liu, Y., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Deng, L. J., Wang, J., & Wu, Y. (2016). parameters for production of volatile fatty acid , biohydrogen and methane from anaerobic digestion. *Bioresource Technology Optimization of Process*, 219, 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.073>

Kim, G., & Cho, K. (2025). Comparative analysis of H₂ production and microbial communities during dark fermentation of food waste under varying temperature and cultivation modes. *Bioresource Technology Reports*, 31(102279), 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2025.102279> Received

Kim, T., Lee, Y., Chang, K., & Hwang, S. (2012). Effects of initial lactic acid concentration , HRTs , and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresource Technology*, 103(1), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.093>

Martínez-Mendoza, L. J., García-Depraect, O., & Muñoz, R. (2023). Unlocking the high-rate continuous performance of fermentative hydrogen bioproduction from fruit and vegetable residues by modulating hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 373, 128716. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128716>

- Martínez-Mendoza, L. J., Lebrero, R., Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2022). Influence of key operational parameters on biohydrogen production from fruit and vegetable waste via lactate-driven dark fermentation. *Bioresource Technology*, 364(August). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128070>
- Miñón-Fuentes, R., & Aguilar-Juárez, O. (2019). Hydrogen production from coffee pulp by dark fermentation. *Water Science & Technology*, 80(9), 1692–1701. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.416>
- Moreno-Cárdenas, E. L., Zapata-Zapata, A. D., & Kim, D. (2019). Hydrogen production from coffee mucilage in dark fermentation with organic wastes. *Energies*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/en12010071>
- Moreno Cárdenas, E. L., Cano Quintero, D. Y., & Cortés Marín, E. A. (2013). Generation of Biohydrogen by Anaerobic Fermentation of Organics Wastes in Colombia. In Z. Fang (Ed.), *Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques* (pp. 377–400). InTech. <https://doi.org/10.5772/53351>
- Moreno, E. (2016). *Estudio del proceso de generación de biohidrógeno mediante fermentación anaerobia de residuos orgánicos agrícolas*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Noblecourt, A., Christophe, G., Larroche, C., & Fontanille, P. (2018). Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. *Bioresource Technology*, 247, 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.199>
- Ordoñez-Frías, E. j, Muñoz-Páes, K. M., & Buitrón, G. (2024). Biohydrogen production from fermented acidic cheese whey using lactate: Reactor performance and microbial ecology analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.06.307>
- Pérez-Rangel, M., Villanueva-galindo, E., & Moreno-Andrade. (2025). Hydrogen production from lactic acid-rich effluent of food waste fermentation : Influence of pH , type and inoculum concentration , and physical pretreatment of the substrate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(116033). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.116033>
- Pérez-Sariñana, B. Y., De León-Rodríguez, A., Saldaña-Trinidad, S., & Pathiyamattom Joseph, S. (2015). Optimization of bioethanol production from coffee mucilage. *BioResources*, 10(3), 4326–4338.
- Pongsiriyakul, K., Wongsurakul, P., Kiatkittipong, W., Premashtira, A., Kuldilok, K., Najdanovic-Visak, V., Adhikari, S., Cognet, P., Kida, T., & Assabumrungrat, S.

- (2024). Upcycling Coffee Waste: Key Industrial Activities for Advancing Circular Economy and Overcoming Commercialization Challenges. *Environmental Research*, 12(2851), 1–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.57647/j.ijrowa.2024.1303.33>
- Puerta-Quintero, G. I., & Rios-Arias, S. (2011). Composición Química del Mucílago de Café, según el Tiempo de Fermentación y Refrigeración. *Cenicafé*, 62(2), 23–40.
- Puerta Quintero, G. I. (2012). Factores, Procesos Y Controles En La Fermentación Del Café. *Avances Técnicos Cenicafé*, 1(422), 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.38141/10779/0422>
- Quiñones Navia, I. A., Martínez Castro, V. M., & Moreno Cárdenas, E. L. (2025). Hydrogen production by dark fermentation from by-products of coffee wet processing and other organic wastes. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 78(3), 11255–11266. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v78n3.116340>
- Rangel, C. J., Hernández, M. A., Mosquera, J. D., Castro, Y., Cabeza, I. O., & Acevedo, P. A. (2021). Hydrogen production by dark fermentation process from pig manure , cocoa mucilage, and coffee mucilage. *Biomass Conversión and Biorefinery*, 11, 241–250. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00618-z>
- Regueira-Marcos, L., García-depraect, O., & Mu, R. (2024). Continuous two-stage lactate-driven dark fermentation process for enhanced biohydrogen production from food waste. *Journal of Water Process Engineering*, 67(106116), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106116>
- Regueira-Marcos, L., García-Depraect, O., & Muñoz, R. (2023). Elucidating the role of pH and total solids content in the co-production of biohydrogen and carboxylic acids from food waste via lactate-driven dark fermentation. *Fuel*, 338(127238), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127238>
- Regueira-Marcos, L., Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2025). Biogenic hydrogen production from household food waste via lactate-driven dark fermentation: A comparative study of single-stage and two-stage configurations. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117672>
- Ren, Y., Si, B., Liu, Z., Jiang, W., & Zhang, Y. (2022). Promoting dark fermentation for biohydrogen production: Potential roles of iron-based additives. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(3), 1499–1515. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.10.137>

- Rodríguez-Reyes, J. J., García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., & León-Becerril, E. (2021). Dark fermentation process response to the use of undiluted tequila vinasse without nutrient supplementation. *Sustainability*, 13(21), 11904. <https://doi.org/10.3390/su132111904>
- Romo-Hernández, A., & Vital-Jácome, M. A. (2025). Modeling microbial interactions in lactate-driven dark fermentation systems using metabolic models. *International Journal of Hydrogen Energy*, 158(150516), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2025.150516>
- Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Setter, C., Borges, F. A., Cardoso, C. R., Mendes, R. F., & Oliveira, T. J. P. (2020). Energy quality of pellets produced from coffee residue: Characterization of the products obtained via slow pyrolysis. *Industrial Crops and Products*, 154(June), 112731. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112731>
- Srivastava, A. K., & Gupta, S. (2011). Fed-Batch Fermentation - Design Strategies. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Vol. 2). Elsevier <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00112-4>
- Trujillo-González, J. M., Jiménez-Ballesta, R., Silva-Parra, A., Torres-Mora, M. A., & García Navarro, F. J. (2024). A comprehensive review of composting from coffee waste: Revalorisation of coffee residue in Colombia. *International Journal of Recycling Organic Waste in Agriculture*, 13(3), 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.57647/j.ijrowa.2024.1303.33>
- Tsigkou, K., Demissie, B. A., Hashim, S., Ghofrani-Isfahani, P., Thomas, R., Mapinga, K. F., Kassahun, S. K., & Angelidaki, I. (2025). Coffee processing waste: Unlocking opportunities for sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 210(115263), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2024.115263>
- Villa Montoya, A. C., Cristina da Silva Mazareli, R., Delforno, T. P., Centurion, V. B., Sakamoto, I. K., Maia de Oliveira, V., Silva, E. L., & Amâncio Varesche, M. B. (2019). Hydrogen, alcohols and volatile fatty acids from the co-digestion of coffee waste (coffee pulp, husk, and processing wastewater) by applying autochthonous microorganisms. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(39), 21434–21450. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.115>
- Villa Montoya, A. C., da Silva Mazareli, R. C., Delforno, T. P., Centurion, V. B., de

- Oliveira, V. M., Silva, E. L., & Varesche, M. B. A. (2020). Optimization of key factors affecting hydrogen production from coffee waste using factorial design and metagenomic analysis of the microbial community. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(7), 4205–4222. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.062>
- Villanueva-Galindo, E., Pérez-Rangel, M., & Moreno-Andrade, I. (2024). Evaluation of individual and combined effect of lactic acid-consuming bacteria on mesophilic hydrogen production from lactic acid effluent from food waste treatment. *Bioresource Technology Journal*, 408(131224), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131224>
- Villanueva-Galindo, E., Pérez-Rangel, M., & Moreno-Andrade, I. (2025). Biohydrogen production from lactic acid: Use of food waste as substrate and evaluation of pretreated sludge and native microbial community as inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 108, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.12.202>
- Villanueva-Galindo, E., Vital-Jácome, M., & Moreno-Andrade, I. (2023). Dark fermentation for H₂ production from food waste and novel strategies for its enhancement. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(27), 9957–9970. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.339>
- Wainaina, S., Lukitawesa, Kumar Awasthi, M., & Taherzadeh, M. J. (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. In *Bioengineered* (Vol. 10, Issue 1, pp. 437–458). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>
- Wu, C. W., Whang, L. M., Cheng, H. H., & Chan, K. C. (2012). Fermentative biohydrogen production from lactate and acetate. *Bioresource Technology*, 113, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.130>
- Xue, S., Chen, H., Wang, F., Lv, G., Tan, L., & Liu, G. (2024). The effect of substrate acidification on the biohydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 49, 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.07.183>
- Zahedi, S., Sales, D., Romero, L. I., & Solera, R. (2013). Hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste in anaerobic thermophilic acidogenesis: Influence of organic loading rate and microbial content of the solid waste. *Bioresource Technology*, 129, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.003>

- Zenani, S., Obileke, K. C., Ndiweni, O., & Mukumba, P. (2025). A Review of the Application of Fuzzy Logic in Bioenergy Technology. *Processes*, 13(7), 1–32. <https://doi.org/10.3390/pr13072251>
- Zhang, S. J., Bruyn, F. De, Pothakos, V., Torres, J., Falconi, C., Moccand, C., Weckx, S., & Vuyst, L. De. (2019). Following Coffee Production from Cherries to Cup : Microbiological and Metabolomic Analysis of Wet Processing of Coffea arabica. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(6), 1–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.02635-18>

Capítulo V. Microbiología del proceso de fermentación oscura semicontinua para la producción de biohidrógeno: Aislamiento e identificación

5.1. Introducción

La FO, mediada por consorcios microbianos, es un proceso biológico sustentado en una serie de reacciones bioquímicas interdependientes, que se expresa a través de la actividad y asociación sintrófica entre diferentes grupos de bacterias (Wainaina et al., 2019). En este sentido, la producción de bioH₂ por FO depende en gran medida de la estructura y la dinámica de la comunidad microbiana, ya que esta determina la prevalencia de rutas metabólicas hidrogenogénicas. No obstante, el rendimiento del proceso puede verse comprometido cuando coexisten microorganismos que compiten con BPH por el sustrato, que desvían el flujo de carbono hacia otros metabolitos alternativos distintos de los ácidos acético y butírico, o consumen el H₂ generado como parte de su balance energético y crecimiento. En consecuencia, las disminuciones en la producción de H₂ pueden atribuirse a cambios en la comunidad microbiana y el desplazamiento de la abundancia de BPH por otros grupos microbianos que interfieren con el rendimiento global de proceso (Etchebehere et al., 2016; Detman et al., 2021; Villanueva-Galindo et al., 2025).

Como se discutió en capítulos anteriores, las BAL suelen presentar ventajas competitivas frente a las BPH debido a su versatilidad metabólica y capacidad de proliferación en residuos agroindustriales ricos en carbohidratos, lo que incrementa su abundancia relativa en el consorcio microbiano y puede afectar negativamente el desempeño de la producción de bioH₂ (Correa-Villa et al., 2024; Villanueva-

Galindo et al., 2025). Aun así, este efecto puede contrarrestarse cuando el ácido láctico actúa como precursor para la producción de bioH_2 mediante FO impulsada por lactato (FO-LA). Bajo este enfoque, la FO-LA constituye una alternativa biotecnológica para valorizar sustratos fermentados y, simultáneamente, controlar la acumulación de ácido láctico, al favorecer un acoplamiento sintrófico donde el lactato producido por BAL puede ser consumido por BPH consumidoras de lactato, promoviendo rutas hidrogenogénicas (p. ej., asociadas a la formación de butirato) en condiciones de operación que promuevan dicho acoplamiento (García-Depraect, Castro-Muñoz, et al., 2021; Correa-Villa et al., 2024). En consecuencia, la implementación de configuraciones en dos etapas —fermentación láctica seguida de la etapa hidrogenogénica— podría contribuir a mitigar la sobreproliferación de BAL frecuentemente observada en sistemas de una sola etapa, y mejorar la producción de bioH_2 a partir de sustratos ricos en ácido láctico (Villanueva-Galindo et al., 2025), como el mucílago de café acidificado.

Para dilucidar la base microbiológica de este proceso, la identificación de los microorganismos implicados en la conversión del ácido láctico resulta esencial para interpretar el desempeño hidrogenogénico en operación semicontinua y plantear una hipótesis sobre los mecanismos subyacentes asociados a la estabilidad del proceso, la selección microbiana y las rutas metabólicas predominantes. La caracterización de comunidades microbianas puede abordarse mediante métodos fenotípicos (bioquímicos) y genotípicos (moleculares). Si bien las técnicas moleculares presentan la ventaja de no depender de la fracción cultivable, su aplicación puede verse limitada por la disponibilidad de infraestructura, costos o

acceso a servicios especializados (Suárez-Contreras & Yañez-Meneces, 2020). Por ello, el aislamiento del cultivo puro y la identificación bioquímica continúa siendo enfoques válidos para reconocer microorganismos cultivables predominantes, inferir su potencial metabólico y establecer relaciones preliminares entre la identidad bacteriana y el desempeño del proceso, particularmente cuando se comparan condiciones de operación contrastantes.

Tras evaluar en el Capítulo 4 el comportamiento de la FO-LA semicontinua alimentada con mucílago de café acidificado como sustrato enriquecido en ácido láctico bajo diferentes combinaciones de TRH y C_{AL} , los resultados sugirieron la participación de consorcios consumidores de lactato con respuestas diferentes según el régimen operativo. En consecuencia, en este capítulo se aisló e identificó bioquímicamente la población bacteriana presente en (i) efluentes asociados a alta y baja producción de H_2 y (ii) el inóculo iniciador, con el fin de comparar la composición bacteriana cultivable y aportar evidencia complementaria para explicar el desempeño hidrogenogénico observado. De este modo, el capítulo aborda el cumplimiento del segundo objetivo específico de la tesis: identificar bioquímicamente la población microbiana involucrada en el proceso de FO semicontinua al utilizar como sustrato el ácido láctico proveniente del mucílago de café acidificado naturalmente.

5.2. Metodología

5.2.1. Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de efluente al finalizar los ensayos con las tasas más altas y bajas de producción de hidrógeno (HPR) en FO semicontinua, correspondientes a $TRH = 0,5$ días & $C_{AL} = 20$ g/L y $TRH = 2$ días & $C_{AL} = 5$ g/L, respectivamente (véase Capítulo 4). Estas condiciones se seleccionaron para el aislamiento e identificación bacteriana asociada a la producción de $bioH_2$ a partir de mucílago de café acidificado (Tabla 5-1). Adicionalmente, se tomó una muestra del inóculo iniciador proveniente de la auto-fermentación oscura de residuos de frutas y verduras, antes de su utilización en los ensayos. Las muestras se almacenaron en frascos estériles y se conservaron a 4 °C por un periodo no mayor a cinco días, o a -20 °C hasta su inoculación en medios de cultivo. Todos los procedimientos microbiológicos, desde la preparación de los medios de cultivo hasta el aislamiento, se realizaron en el Laboratorio de Procesos Agrícolas de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Tabla 5-1. Muestras seleccionadas y codificación utilizada para el aislamiento e identificación bacteriana.

Muestra	Codificación	Descripción
Efluente ($TRH = 0,5$ días; $C_{AL} = 20$ g/L)	H	Efluente asociado a alta HPR
Efluente ($TRH = 2$ días; $C_{AL} = 5$ g/L)	L	Efluente asociado a baja HPR
Inóculo iniciador (auto-fermentación oscura de frutas y verduras)	C	Control: inóculo empleado en los ensayos de FO en modo semicontinuo

TRH: tiempo de retención hidráulica; C_{AL} : Concentración de ácido láctico en la alimentación; HPR: Tasa de producción de H_2 ; FO: fermentación oscura H: High; L: Low; C: Control.

5.2.2. Preparación de medios de cultivo

Para la propagación y el aislamiento de microorganismos se emplearon medios de cultivo de caldo y agar tripticasa de soya (TSB y TSA, respectivamente), y agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Todos los medios fueron suplementados con ácido láctico a una concentración de 2,5 g/L, con el propósito de favorecer el desarrollo de bacterias con la capacidad de metabolizar este compuesto, potencialmente asociadas a la producción de H₂. Los medios se prepararon de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. El pH inicial se ajustó a 6,5 con una solución de NaOH de 1 M; y posteriormente, los medios fueron esterilizados en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.2.3. Inoculación de las muestras

Se inocularon 10 mL de cada muestra recolectada en 90 mL de caldo de TSB suplementado con ácido láctico, con el fin de reactivar la comunidad microbiana y favorecer la selección de bacterias capaces de metabolizar el lactato. Los frascos se sellaron herméticamente y fueron incubados a 31°C durante una semana.

5.2.4. Dilución seriada y siembra en medios de cultivos

Tras la incubación, se redujo progresivamente la carga microbiana mediante dilución seriada con agua peptonada estéril, para la siembra inicial en medios de cultivos sólidos (Figura 5-1). En primer lugar, se preparó una dilución primaria 10⁻¹, inoculando 1 mL de la muestra en 9 mL de agua peptonada. A partir de esta, se

realizaron diluciones sucesivas transfiriendo 1 mL de la dilución anterior a 9 mL de agua peptonada, hasta obtener la dilución 10^{-9} . Para la siembra por extensión, se depositaron 0,1 mL de las diluciones 10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9} en el centro de las placas con medio de TSA y MRS suplementado con ácido láctico y se distribuyeron sobre la superficie con un asa estéril de Drigalski. Posteriormente, las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis a 31°C durante 72 horas o hasta la aparición de colonias.

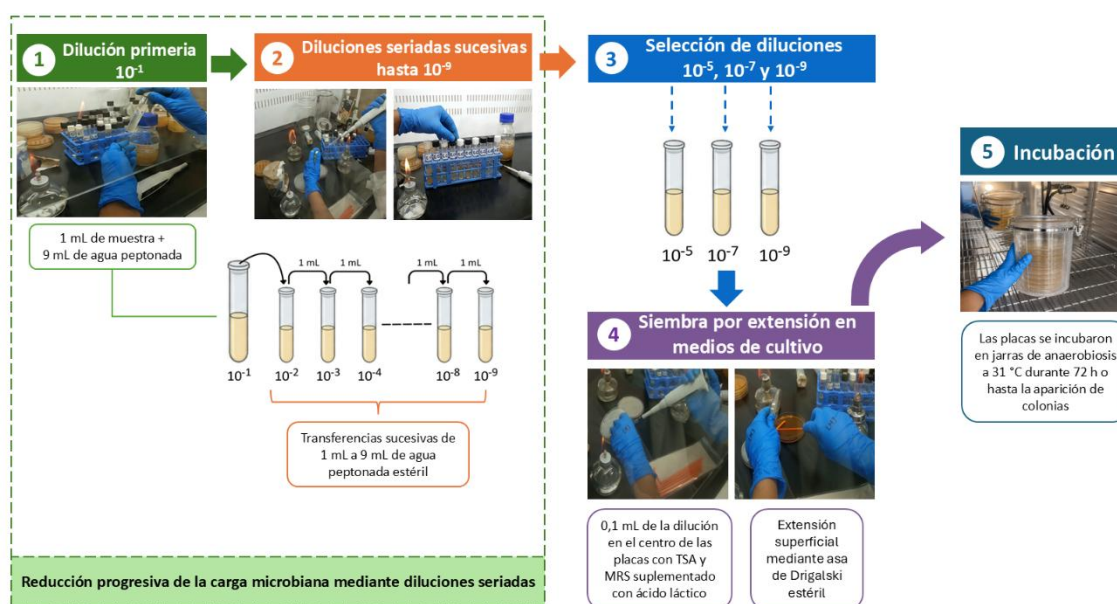


Figura 5-1. Esquema del procedimiento de dilución seriada y siembra por extensión en placas con TSA y MRS suplementados con ácido láctico, bajo condiciones asépticas.

5.2.5. Aislamiento de colonias microbianas

Se seleccionaron las colonias individuales con morfología distintiva (Figura 5-2) y se repicaron mediante siembra por estría (agotamiento) en nuevas placas con medios de TSA y MRS enriquecido con ácido láctico. Las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis a 31°C durante 72 horas con el objetivo de obtener cultivos axénicos para su posterior caracterización e identificación.

5.2.6. Identificación bioquímica de aislados bacterianos

Los aislados bacterianos seleccionados y purificados se documentaron inicialmente mediante el registro de su morfología colonial en medios de TSA y MRS suplementados con ácido láctico (Figura 5-2), considerando características macroscópicas como tamaño, forma, borde, elevación, textura y pigmentación, los cuales se resumen en la Tabla 5-2. Posteriormente, los cultivos puros fueron sometidos a caracterización microscópica mediante tinción de Gram (Smith & Hussey, 2005). Los aislados fueron enviados al Laboratorio de Control de Calidad de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia (LACMA), Medellín, Colombia, donde se realizó una identificación fenotípica mediante pruebas bioquímicas convencionales y observación de características fenotípicas. El análisis incluyó pruebas como oxidasa, catalasa, fermentación de glucosa, movilidad, producción de indol, utilización de sustratos como manitol, así como evaluación en medios diferenciales y cromogénicos. Con base en estos resultados, se estableció un perfil bioquímico para cada aislado, el cual fue comparado con esquemas de referencia microbiológica para su interpretación (MacFaddin, 2000).

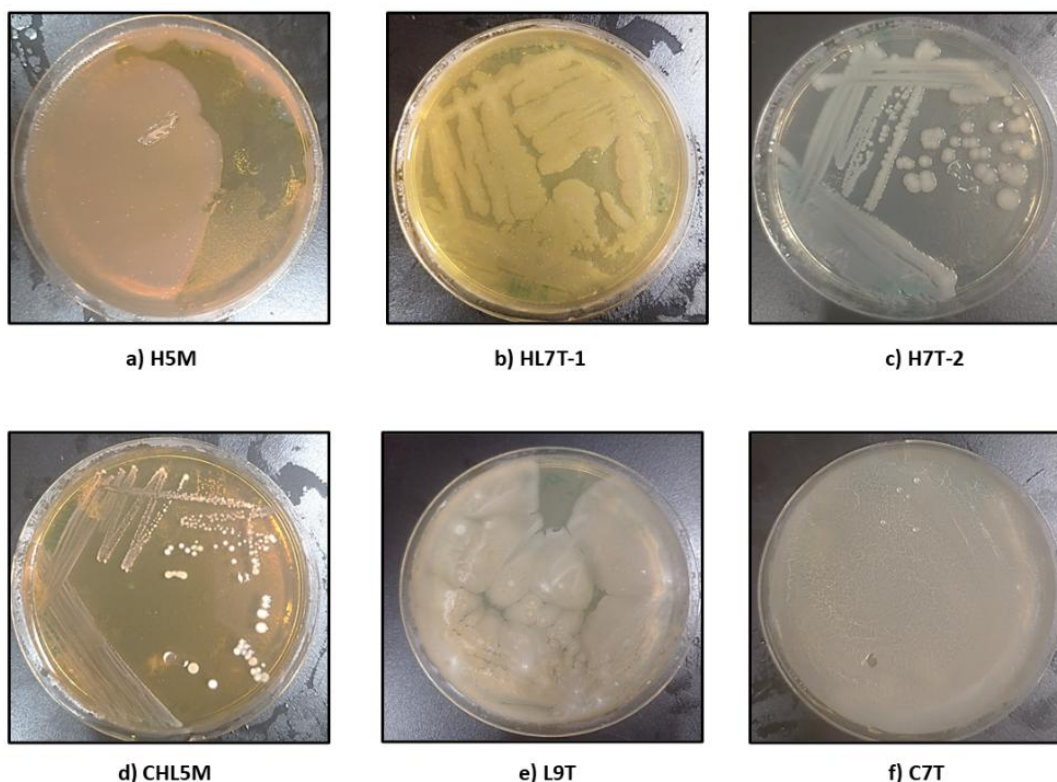


Figura 5-2. Morfología colonial de aislados bacterianos representativos obtenidos en medios TSA y MRS suplementados con ácido láctico durante el proceso de fermentación oscura semicontinua. (a) H5M, aislado en medio MRS a partir de la dilución seriada 10^{-5} del efluente asociado a alta HPR; (b) HL7T-1, aislado en medio TSA a partir de la dilución seriada 10^{-7} de efluentes asociados a alta y baja HPR; (c) H7T-2, aislado en medio TSA a partir de la dilución seriada 10^{-7} del efluente asociado a alta HPR; (d) CHL5M, aislado en medio MRS a partir de la dilución seriada 10^{-5} del inóculo iniciador y efluentes asociados a alta y baja HPR; (e) L9T, aislado en medio TSA a partir de la dilución seriada 10^{-9} del efluente asociado a baja HPR; y (f) C7T, aislado en medio TSA a partir de la dilución seriada 10^{-7} del inóculo iniciador. H: efluente asociado a alta HPR; L: efluente asociado a baja HPR; C: inóculo iniciador; T: medio TSA (agar tripticasa de soya); M: medio MRS (agar Man, Rogosa y Sharpe); HPR: tasa de producción de hidrógeno.

Tabla 5-2. Origen, condiciones de aislamiento y criterios de selección morfológica de los aislados bacterianos

Código del aislado	Origen	Dilución seriada	Medio de aislamiento	Criterio de selección (Morfología colonial)
H5M	H	10^{-5}	MRS	Grande; blanca; translúcida; forma irregular; borde ondulado; plana; superficie lisa.
HL7T-1	H y L	$10^{-7}(\text{H})$ $/10^{-5}(\text{L})$	TSA	Mediana; beige; opaca; forma irregular; borde ondulado; plana.
H7T-2	H	10^{-7}	TSA	Mediana; blanca cremosa; forma irregular; borde entero; plana; superficie lisa.
CHL5M	C, H y L	10^{-5}	MRS	Pequeñas; blanca; brillante; circular; borde regular; elevadas (convexas); colonias individuales
L5T-2	L	10^{-5}	TSA	Puntiforme; blanquecina; plana; superficie lisa.
L7T	L	10^{-7}	TSA	Mediana; blanca; forma irregular; borde ondulado; textura lisa.
L9T	L	10^{-9}	TSA	Grande; blanca; opaca; forma irregular; borde ondulado; plana.
C5M	C	10^{-5}	MRS	Pequeña; translúcida; circular; plana; superficie lisa; colonias individuales.
C5T	C	10^{-5}	TSA	Grande; blanca; opaca; elevación leve; superficie mate; aspecto nuboso.
C7T	C	10^{-7}	TSA	Mediana; blanca; borde irregular; plana; textura rugosa.

TSA: agar tripticasa de soya; MRS: agar De Man, Rogosa y Sharpe. H, L y C indican el origen (efluente asociado a alta HPR, efluente asociado a baja HPR e inóculo iniciador, respectivamente); CHL indica un aislado observado en C, H y L; HL7T-1 indica un aislado observado en ambos efluentes (H y L); los sufijos numéricos (p. ej., -2) distinguen aislados obtenidos bajo igual origen, dilución y medio.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Aislamiento e identificación bioquímica de aislado bacterianos

En las tres muestras recolectadas (H, L y C) se observó crecimiento microbiano en los medios TSA y MRS suplementados con ácido láctico (Figura 5-2; Tabla 5-2), lo cual permitió seleccionar diez aislados bacterianos a partir de morfologías coloniales macroscópicas distintivas. La distribución de los aislados evidenció patrones compartidos y diferentes entre condiciones. En el efluente asociado a alta HPR (TRH = 0,5 días; C_{AL} = 20 g/L) se obtuvieron cuatro aislados (H5M, HL7T-1, H7T-2 y CHL5M). En el efluente asociado a baja HPR (TRH = 2 días; C_{AL} = 5 g/L) se

recuperaron cinco aislados, de los cuales dos correspondieron a aislados compartidos con la condición de alta HPR (HL7T-1 y CHL5M) y tres fueron exclusivos de esta condición (L5T-2, L7T y L9T). Por su parte, el inóculo iniciador (C) presentó cuatro aislados (C5M, C5T, C7T y CHL5M), siendo CHL5M el único aislado detectado simultáneamente en las tres muestras.

En la Tabla 5-3 se presentan los resultados de la identificación bioquímica de los diez aislados. El detalle de los perfiles bioquímicos empleados para la asignación de los géneros y/o especies compatibles se presentan en el Anexo D. A nivel microscópico, todos los aislados presentaron morfología bacilar. La tinción de Gram permitió diferenciar bacilos Gram negativos, correspondientes a H7T-2 y C5M, de los demás aislados, que mostraron reacción Gram positiva (Figura 5-3; Tabla 5-3).

Tabla 5-3. Resultado de la tinción de Gram e identificación bioquímica de los aislados bacterianos.

Código	Morfología	Tinción de Gram	Identificación	Origen
H5M	Bacilos	Positivo	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	H
HL7T-1	Bacilos	Positivo	<i>Bacillus badius</i>	H y L
H7T-2	Bacilos	Negativo	<i>Enterobacter</i> sp.	H
CHL5M	Bacilos	Positivo	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	C, H y L
L5T-2	Bacilos	Positivo	<i>Bacillus pumilus</i>	L
L7T	Bacilos	Positivo	<i>Bacillus cereus</i> sensu lato	L
L9T	Bacilos	Positivo	<i>Lysinibacillus</i> spp.	L
C5M	Bacilos	Negativo	<i>Klebsiella</i> spp.	C
C5T	Bacilos	Positivo	<i>Bacillus megaterium</i>	C
C7T	Bacilos	Positivo	<i>Rummeliibacillus stabekesii</i>	C

H: efluente asociado a alta HPR; L: efluente asociado a baja HPR; C: inóculo iniciador (control). "H y L" indica aislamiento observado en ambas condiciones; "C, H y L" indica aislamiento observado en las tres muestras; HPR: tasa de producción de H₂

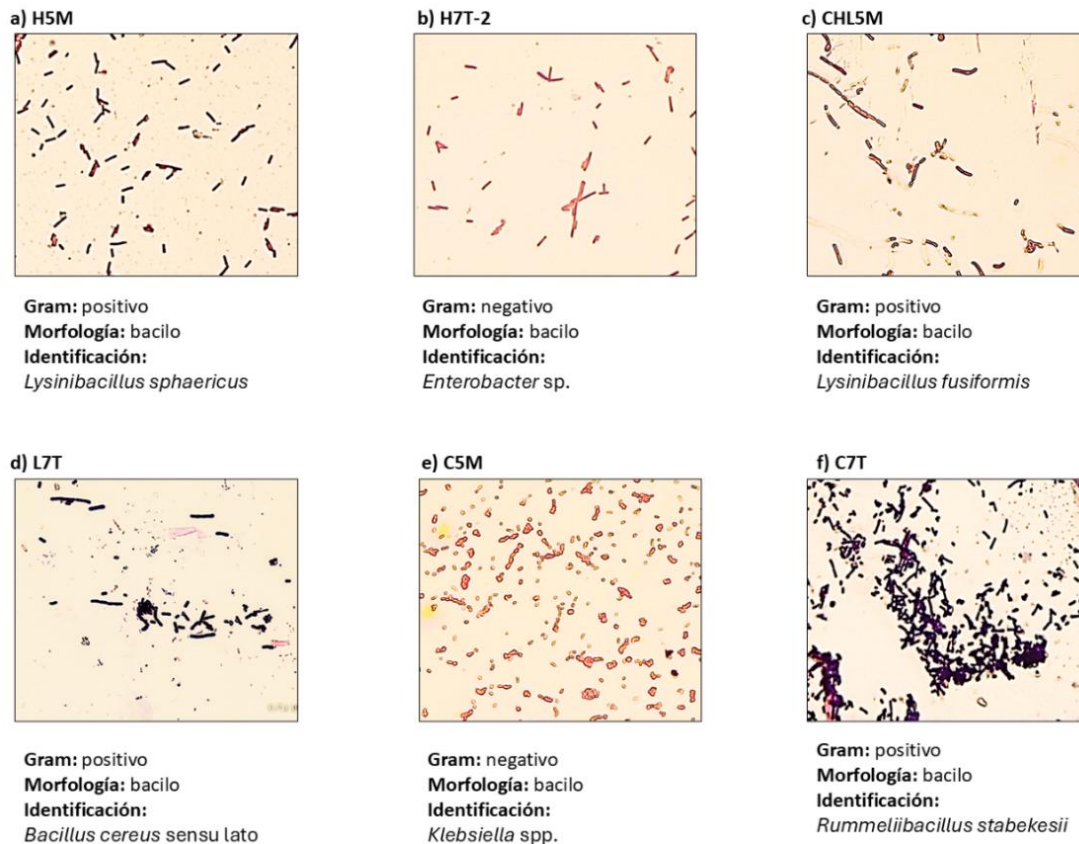


Figura 5-3. Caracterización microscópica de aislados bacterianos representativos mediante tinción de Gram durante el proceso de fermentación oscura semicontinua. (a) H5M, aislado en medio MRS a partir de la dilución seriada 10^{-5} del efluente asociado a alta HPR; (b) H7T-2, aislado en medio TSA a partir de la dilución seriada 10^{-7} de efluentes asociados a alta HPR; (c) CHL5M, aislado en medio MRS a partir de la dilución seriada 10^{-5} del inóculo iniciador y efluentes asociados a alta y baja HPR; (d) L7T, aislado en medio TSA a partir de la dilución seriada 10^{-7} del efluente asociado a baja HPR; y (e) C5M, aislado en medio MRS a partir de la dilución seriada 10^{-5} del inóculo iniciador. (f) C7T, aislado en medio TSA a partir de la dilución seriada 10^{-7} del inóculo iniciador. H: efluente asociado a alta HPR; L: efluente asociado a baja HPR; C: inóculo iniciador; T: medio TSA (agar tripticasa de soya); M: medio MRS (agar Man, Rogosa y Sharpe); HPR: tasa de producción de hidrógeno.

En conjunto, estos resultados confirman la presencia de una fracción cultivable diversa y parcialmente compartida entre condiciones operativas contrastantes, y sugieren la persistencia de un consorcio bacteriano con potencial capacidad de metabolizar el ácido láctico a lo largo del proceso de FO en modo semicontinuo. Esto respalda el análisis comparativo de la composición cultivable en relación con el desempeño hidrogenogénico observado en el Capítulo 4.

5.3.2. Interpretación de la microbiología del proceso de FO-LA semicontinua

Con base a los resultados de la identificación bioquímica (Tabla 5-3), los géneros asignados a partir de perfiles bioquímicos consistentes con — *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Rummeliibacillus* —han sido reportados con frecuencia en consorcios microbianos asociados a procesos de FO orientados a la producción de bioH₂ (Valdez-Vazquez et al., 2020; Mugnai et al., 2021; Aranda-Jaramillo et al., 2023; García-Depraect & León-Becerril, 2023; Rodríguez-Reyes et al., 2025; Silva-martínez et al., 2025), por lo que su presencia resulta compatible con el contexto microbiano del sistema evaluado. Adicionalmente, la presencia de géneros compartidos entre condiciones y la aparición de aislados exclusivos sugieren que el régimen operativo (TRH y C_{AL}) moduló la composición de la fracción cultivable, evidenciando un efecto de presión de selección en la comunidad microbiana del proceso.

En particular, la recuperación de un aislado consistente con *Bacillus badius* (HL7T-1) tanto en el efluente de alta como de baja HPR, y de aislados consistentes con el

género *Lysinibacillus* (H5M, CHL5M; L9T) en las muestras analizadas, sugiere la persistencia de poblaciones capaces de mantenerse en el sistema bajo condiciones contrastantes. En términos interpretativos, este patrón apoya la existencia de un componente relativamente estable de la comunidad, potencialmente tolerante al ambiente del biorreactor y el esquema de recambio, sin que ello implique atribuirles, por sí mismo, un rol directo en la producción de H_2 .

Por otro lado, las condiciones impuestas en el biorreactor pudieron favorecer cambios en la composición de la comunidad microbiana, según lo reflejado por los aislados recuperados, aun cuando un componente pudiera permanecer relativamente estable. Este comportamiento es consistente con las diferencias en el desempeño hidrogenogénico observadas en el Capítulo 4, donde el TRH presentó un efecto significativo. Lo anterior se evidencia en la detección de aislados exclusivos del inóculo iniciador (C; p. ej., *Klebsiella* spp., *Bacillus megaterium* y *Rummeliibacillus stabelisensis*), los cuales no se recuperaron en los efluentes. En contraste, un aislado consistente con *Enterobacter* sp. (H7T-2) se detectó específicamente en la condición asociada a alta HPR (H; TRH = 0,5 d; C_{AL} = 20 g/L), mientras que aislados consistentes con *Bacillus pumilus* (L5T-2) y *Bacillus cereus* sensu lato (L7T) se identificaron en la condición asociada a baja HPR (L; TRH = 2 d; C_{AL} = 5 g/L).

De manera similar, estudios previos han reportado que los cambios en la dinámica de la comunidad microbiana en sistemas de FO-LA pueden asociarse a modificaciones del TRH. En particular, se ha descrito que TRH menores favorecen

a poblaciones asociadas a mayor producción de H₂. En cambio, TRH prolongados se han relacionado con menores rendimientos, atribuibles a la dominancia de poblaciones funcionalmente no vinculadas con la producción de H₂ (García-Depraect, Muñoz, et al., 2021). Considerando lo anterior, el asilado consistente con *Enterobacter* sp. recuperado en este estudio bajo la condición asociada a alta HPR, también ha sido reportado en consorcios microbianos de FO-LA vinculados a mayores niveles de producción de H₂ (García-Depraect & León-Becerril, 2023).

En la literatura se ha reportado que bacterias anaerobias facultativas como *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. podrían favorecer indirectamente el establecimiento de condiciones adecuadas para BPH estrictamente anaerobias, como *Clostridium* spp., al contribuir al consumo de oxígeno residual y al mantenimiento de la anaerobiosis, condiciones requeridas para una producción eficiente de H₂ (Hung et al., 2011; Cabrol et al., 2017; Rodríguez-Reyes et al., 2021). En concordancia, se ha señalado que escenarios con menor producción de H₂ se han asociado con la ausencia o baja detección de *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. en consorcios de FO-LA (Rodríguez-Reyes et al., 2021). Si bien se ha atribuido frecuentemente al género *Clostridium* un papel central en la producción de H₂ en FO, también varios estudios reconocen que especies de *Enterobacter* pueden presentar rendimientos relevantes de producción de H₂ bajo condiciones específicas (Rittmann & Herwig, 2012; Cabrol et al., 2017; Rodríguez-Reyes et al., 2021).

Sin embargo, no se recuperaron aislados consistentes con *Klebsiella* spp. en el efluente asociado a alta HPR y, en general, su detección se restringió al inóculo

inicial, lo cual sugiere que la composición de la comunidad microbiana pudo modificarse a lo largo de la operación, favoreciendo la detección de *Enterobacter* sp. bajo el régimen asociado a mayor productividad. Este comportamiento es consistente con lo reportado para la auto-fermentación oscura de residuos de frutas y verduras, donde el género *Enterobacter* fue mínimo, y para residuos de suero de queso, donde incluso estuvo ausente en la comunidad microbiana (García-Depraect & León-Becerril, 2023). Adicionalmente, se ha informado que géneros frecuentemente asociados a un buen desempeño en la producción de bioH₂, como *Klebsiella* y *Clostridium*, estuvieron presentes inicialmente en el inóculo, pero no fueron detectados durante la operación de FO-LA en configuraciones de una y dos etapas alimentadas con residuos de comida. Se ha sugerido que esta pérdida en la abundancia podría relacionarse con una capacidad limitada para absorber lactato del medio, y/o con una menor competitividad por el sustrato bajo condiciones operacionales específicas (Regueira-Marcos et al., 2025).

De manera similar, se ha reportado la baja dominancia de especies de *Clostridium* en FO a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos en codigestión con lodos anaerobios de tratamiento de aguas residuales, atribuyéndose en gran parte la producción de bioH₂ a la elevada abundancia relativa del género *Bacillus* en la comunidad microbiana, dicho enriquecimiento fue asociado al pretratamiento de centrifugado y aireación que se realizó al inóculo (Silva-martínez et al., 2025). Por tanto, la identificación de aislados consistentes con especies de *Bacillus* en el inóculo iniciador (C) y condiciones de baja y alta HPR (H y L) sugiere que este

género formó parte del consorcio bajo condiciones operativas contrastes, y respalda su consideración dentro de los microorganismos asociados al proceso de FO-LA.

Considerando estos resultados, es plausible que la producción de bioH₂ en los ensayos de FO-LA en modo semicontinuo haya estado asociada a un consorcio en el que las bacterias aerobias y anaerobias facultativas tuvieron una participación relevante, dentro de las cuales se identificaron taxones consistentes con *Bacillus* spp., *Lysinibacillus* spp. y *Enterobacter* sp. Esto podría explicarse, por una parte, porque no se utilizó un inóculo con una población dominante de *Clostridium*, condición frecuentemente reportada en lodos anaerobios (Silva-martínez et al., 2025), y por otra parte, porque la anaerobiosis del sistema pudo depender del consumo de O₂ residual por parte de bacterias aerobias y anaerobias facultativas, lo cual podría no haber sido suficiente para una posible dominancia de *Clostridium* en el biorreactor. En apoyo a esta interpretación, se ha propuesto que la presencia de *Rummeliibacillus* spp. y *Bacillus* spp. puede considerarse un indicador de presencia de oxígeno en sistemas de FO (Cabrol et al., 2017; Rodríguez-Reyes et al., 2025). Por otra parte, también se ha reportado que estos géneros, junto con *Lysinibacillus* spp., pueden participar en consorcios consumidores de lactato, contribuyendo con funciones metabólicas/enzimáticas relevantes en rutas asociadas a la conversión de lactato y formación de H₂ (Mugnai et al., 2021).

Con respecto al aislamiento de BAL, el medio MRS es ampliamente reconocido como un medio selectivo estándar para su recuperación desde matrices alimentarias y muestras fermentativas, incluyendo a sistemas orientados a la

producción de bioH₂. Su composición favorece principalmente el crecimiento de *Lactobacillus*, aunque también permite el desarrollo de *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*, al proveer fuentes óptimas de carbono, nitrógeno, vitaminas y sales (Fuentes et al., 2018). En particular, el género *Lactobacillus* es el grupo más representativos de las BAL y su presencia —e incluso dominancia— en sistemas de FO se ha asociado con cambios relevantes en el proceso (Correa-Villa et al., 2024; Regueira-Marcos et al., 2025).

En este sentido, Fuentes et al. (2018) reportaron que el género *Lactobacillus* fue el dominante en biorreactores de FO convencional operados en modo continuo (TRH de 24 horas, pH 5,5 y 30°C) en las condiciones de menor producción de H₂, representando una abundancia relativa del 89,1% detectado por identificación molecular del gen 16 S ARN_r. Adicionalmente, dichos autores aislaron la mayoría de sus cepas en medios como MRS y TSA, lo que sugiere una cobertura elevada de la comunidad microbiana mediante métodos de cultivo.

En contraste, en el presente estudio no se recuperaron aislados consistentes a *Lactobacillus* en las condiciones de cultivo aplicadas. Este resultado podría ser consistente con una menor presencia en el biorreactor hidrogenogénico operado en modo semicontinuo y alimentado con sustrato enriquecido con ácido láctico (mucílago de café acidificado). Desde una perspectiva operativa, se ha sugerido que la reducción de TRH entre 1 y 0,5 días puede disminuir la ocurrencia de poblaciones no productoras de H₂ en sistemas de FO-LA alimentados con vinaza de tequila prefermentada rico en ácido láctico (García-Depraect et al., 2021).

Asimismo, se ha atribuido que el desacoplamiento entre fermentación láctica e hidrogenogénica contribuye a reducir la prevalencia de *Lactobacillus* en procesos de producción de H_2 a partir de residuos de comida (Regueira-Marcos et al., 2025). En resumen, estos antecedentes son coherentes con la posibilidad de que la operación semicontinua a TRH menores, utilizando un sustrato rico en ácido láctico, contribuya a limitar la sobreproliferación de BAL y favorecer un entorno más orientado a la producción de $bioH_2$.

A modo de comparación, en este estudio se alcanzó en promedio un volumen acumulado de H_2 de 19,1 L en el biorreactor semicontinuo operado a TRH = 0,5 días, sin recuperación de BAL mediante los métodos cultivables aplicados. Por el contrario, Moreno-Cárdenas et al. (2019) reportaron que durante tres días se alcanzó un volumen acumulado máximo de 25,9 L en operación batch (30 °C; pH = 7,0) utilizando mucílago de café en codigestión con residuos de frutas y verduras, e identificaron dentro de los aislados bacterianos géneros de BAL como *Streptococcus* y *Leuconostoc*, evidenciando su presencia en la comunidad asociada al proceso. Estas diferencias resaltan que la configuración operacional, la composición del sustrato y el régimen de TRH pueden influir de manera importante en la composición microbiana recuperable y, potencialmente, en el desempeño hidrogenogénico del sistema. De esta manera, en la Figura 5-4 se presenta un esquema conceptual integrador que facilita la interpretación de los resultados obtenidos sobre la relación entre las condiciones de operación, la comunidad microbiana y el desempeño del sistema semicontinuo de FO-LA.

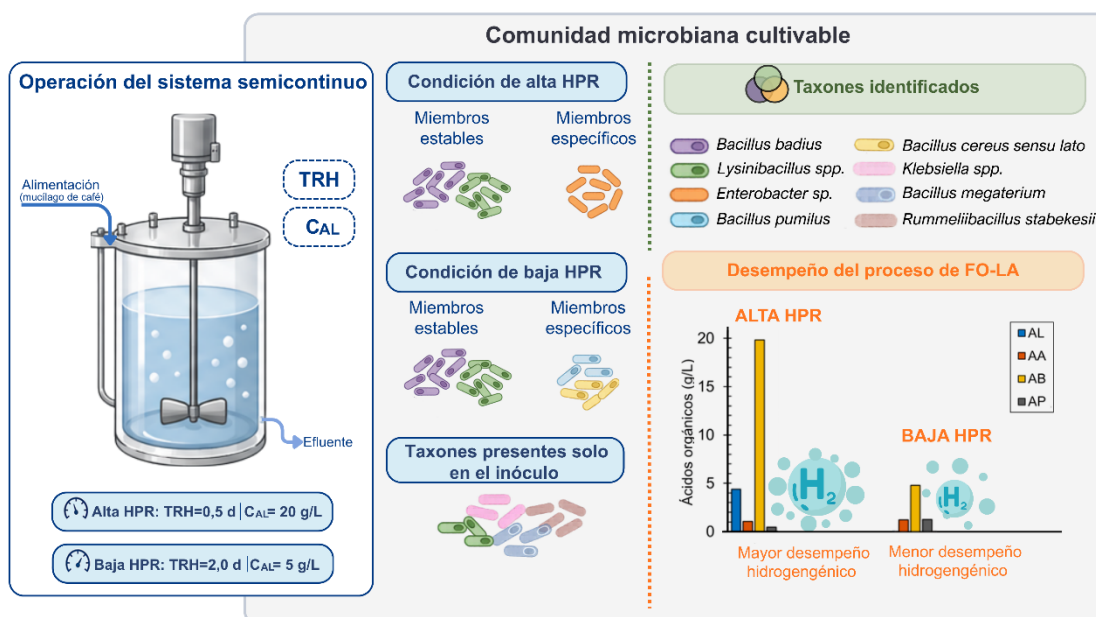


Figura 5-4. Esquema conceptual de la relación entre las condiciones de operación, la comunidad microbiana y el desempeño del sistema semicontinuo de fermentación oscura impulsada por lactato. TRH: Tiempo de retención hidráulica; C_{AL}: Concentración de ácido láctico en la alimentación; HPR: Tasa de producción de hidrógeno; FO-LA: fermentación oscura impulsada por lactato; AL: Ácido láctico; AA: Ácido acético; AB: Ácido butírico; AP: Ácido propiónico.

5.3.3. Interpretación bioquímica de la conversión de ácido láctico asociadas a la producción de hidrógeno

Dado que el ácido láctico constituyó el principal producto de la acidificación natural del mucílago de café, probablemente asociado a la actividad de BAL, y actuó como sustrato en la etapa de FO semicontinua, la interpretación bioquímica del proceso requiere considerar las rutas metabólicas asociadas a su conversión. Esta interpretación es coherente con los resultados microbiológicos obtenidos, en los cuales se recuperaron aislados consistentes con los géneros *Lysinibacillus*, *Bacillus*

y *Rummeliibacillus*, reportados en consorcios productores de hidrógeno y asociados con la utilización metabólica de lactato (Schleifer, 2009; Chen et al., 2021; Mugnai et al., 2021; Silva-martínez et al., 2025). En particular, bajo la condición asociada a alta HPR se recuperaron aislados consistentes con *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus sphaericus* y *Bacillus badius*, especies previamente reportadas con capacidad de metabolizar lactato (Schleifer, 2009). En este contexto, en la Figura 5-5 se presentan las principales rutas vinculadas con la formación de H₂, ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico en consorcios microbianos con potencial capacidad de consumir lactato.

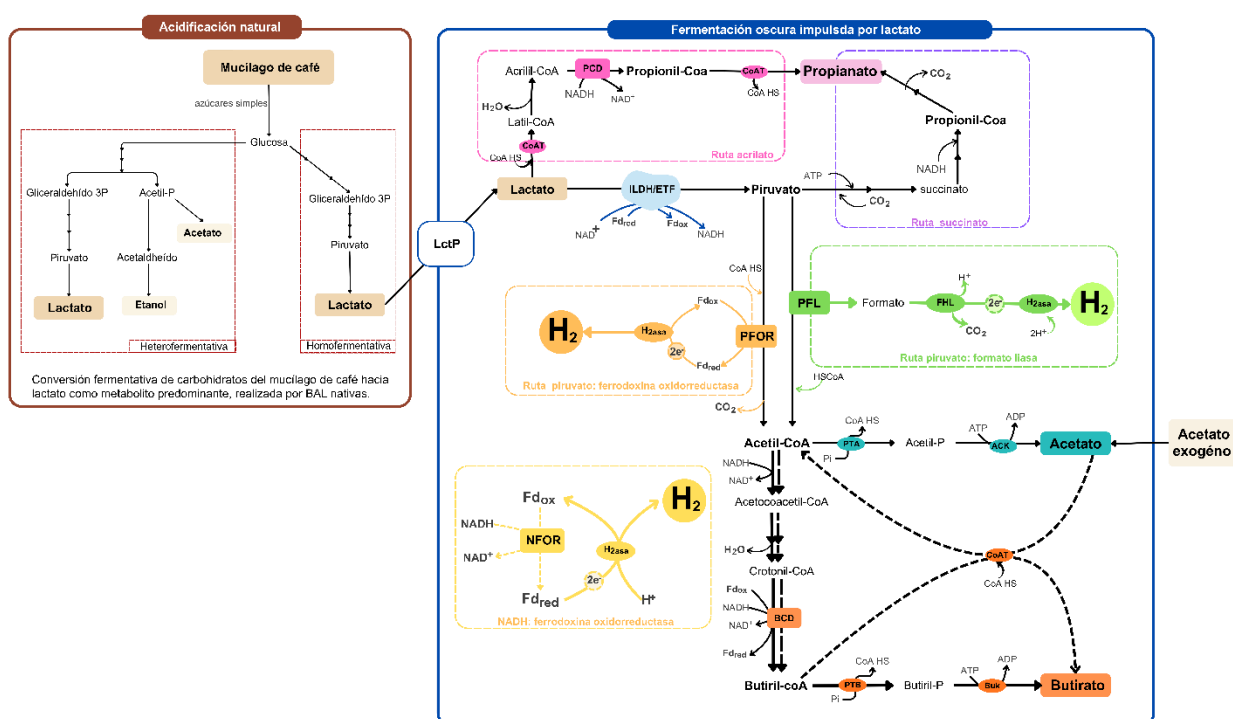


Figura 5-5. Esquema conceptual y metabólico de la fermentación oscura impulsada por lactato a partir de mucílago de café acidificado. LctP: lactato permeasa; iLDH: lactato deshidrogenasa independiente de NAD⁺; Etf: flavoproteínas de transferencia de electrones; PFOR: piruvato:ferredoxina oxidorreductasa; PFL: piruvato:formato liasa; FHL: formato hidrógeno liasa; Fdox: ferredoxina oxidada; Fdred: ferredoxina reducida; H₂asa: Hidrogenasa; NFOR: NADH:ferredoxina oxidorreductasa; PTA: fosfato acetiltransferasa; ACK: acetato

quinasa; PTB: fosfotransbutirilasa; Buk: butirato quinasa; PCD: propionil-CoA deshidrogenasa; CoAT: CoA-transferasa. Adaptado de Cabrol et al. (2017), Gonzalez-Garcia et al. (2017), Louis et al. (2022); Munier et al. (2023) y García-Depraect & León-Becerril (2023).

Desde una perspectiva bioquímica, el consorcio microbiano puede utilizar el lactato —forma dissociada del ácido láctico— como fuente de carbono y energía en condiciones desfavorables como la baja disponibilidad de carbohidratos (Fuess et al., 2018; Mugnai et al., 2021). El lactato puede ser asimilado por bacterias consumidoras de lactato, entre ellas algunas BPH, mediante transportadores específicos, como las lactato permeasas. Una vez en el interior de la célula, el lactato es oxidado a piruvato por acción de lactato deshidrogenasas independientes de NAD^+ (iLDH), asociadas a flavoproteínas de transferencia de electrones (Etf), consideradas enzimas clave en la utilización microbiana del lactato (Jiang et al., 2014).

Esta reacción puede ser termodinámicamente desfavorable debido a que el potencial redox del par lactato/piruvato es considerablemente mayor que el par NAD^+/NADH , lo que dificulta la transferencia directa de electrones. Por ello, la participación del complejo iLDH/Etf es crucial; mediante un mecanismo de bifurcación de electrones basado en flavinas, se acopla la oxidación del lactato con la reducción simultánea de ferredoxina (Fd) y NAD^+ , superando la barrera energética del proceso (Detman et al., 2019; Louis et al., 2022).

Posteriormente, el piruvato puede convertirse en acetil-CoA mediante dos rutas metabólicas principales: i) la vía catalizada por la enzima piruvato:formato liasa (PFL) y ii) la vía mediada por piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR). En la ruta PFL, el piruvato se escinde en acetil-CoA y formato, el cual puede transformarse posteriormente en H_2 y CO_2 mediante el complejo formato hidrógenoliasa (FHL), constituido por formato deshidrogenasa H e hidrogenasa. En la vía PFOR, el piruvato es oxidado a acetil-CoA con la reducción simultánea de ferredoxina, cuya reoxidación catalizada por hidrogenasa conduce a la liberación de H_2 (Cabrol et al., 2017; Dzulkarnain et al., 2022). Además, el H_2 también proviene de la reoxidación de NADH, mediante la acción de la enzima NADH:ferredoxina oxidorreductasa (NFOR), que transfiere electrones desde NADH hacia ferredoxina, permitiendo su posterior conversión a H_2 por la hidrogenasa (Cabrol et al., 2017; Dzulkarnain et al., 2022; Saady, 2013).

A partir del acetil-CoA, el flujo metabólico puede dirigirse hacia distintas rutas fermentativas. La formación de acetato ocurre mediante la conversión de acetil-CoA a acetil fosfato y posteriormente a acetato, generando ATP por fosforilación a nivel de sustrato. Por su parte, la formación de butirato implica la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para producir butiril-CoA, el cual posteriormente es convertido en butirato. Ambas rutas se consideran metabólicamente favorables para la producción de H_2 debido a la generación y reoxidación de equivalentes reductores asociados al metabolismo fermentativo (Cabrol et al., 2017; Mugnai et al., 2021).

Adicionalmente, diversos estudios han reportado que el consumo simultáneo de lactato y acetato puede favorecer rutas metabólicas orientadas a la formación de H₂ y butirato en consorcios microbianos (Blanco et al., 2019; Mugnai et al., 2021). En particular, Mugnai et al. (2021) observaron, durante la fermentación oscura de residuos de almazara, una alta abundancia relativa de genes asociados con la producción y el consumo de acetato, como acetato quinasa y fosfato acetiltransferasa. Estos autores sugirieron que la disminución de acetato durante el proceso podría estar relacionada con su utilización como co-sustrato en la conversión de lactato hacia H₂. Asimismo, reportaron genes asociados con la formación de butirato, como butirato quinasa y acetato CoA-transferasa, vinculados con filotipos como *Bacillus*, *Clostridium* y *Lysinibacillus*.

En este sentido, la predominancia de ácido butírico observada en el presente estudio podría estar asociada con una ruta de conversión lactato-acetato orientada hacia la formación de butirato e H₂. El acetato disponible pudo provenir tanto del sustrato como de la conversión fermentativa del lactato a piruvato y acetil-CoA. Posteriormente, este acetato podría haber participado como co-sustrato en la formación adicional de butirato, contribuyendo al balance de carbono y a la conservación de energía durante el metabolismo butirogénico (Detman et al., 2019; Munier et al., 2023).

En contraste, parte del flujo metabólico derivado del lactato también puede dirigirse hacia la formación de propionato, principalmente mediante la ruta del acrilato, en la cual el lactato es convertido a lactil-CoA, posteriormente a acrilil-CoA y finalmente

a propionil-CoA y propionato (Prabhu et al., 2012; Gonzalez-Garcia et al., 2017). Sin embargo, la formación de propionato generalmente se considera menos favorable para la producción de H_2 debido a que compite por equivalentes reductores que podrían destinarse a la generación de hidrógeno. Prabhu et al. (2012) observaron que el incremento en la formación de propionato estuvo acompañado por una disminución simultánea en la producción de butirato e hidrógeno. De manera similar, Cabrol et al. (2017) describieron las rutas propionigénicas como procesos competidores dentro de los consorcios hidrogenogénicos, debido a que desvían electrones y carbono hacia productos más reducidos. Considerando lo anterior, la baja proporción de ácido propiónico observada en el presente estudio, en comparación con el predominio de ácido butírico, podría sugerir que el flujo metabólico del lactato estuvo orientado preferencialmente hacia rutas butirogénicas asociadas con una mayor producción de H_2 .

5.4. Alcances y limitaciones del enfoque de identificación

El presente capítulo abordó la caracterización de microorganismos asociados al proceso de FO-LA en modo semicontinuo mediante aislamiento en medios suplementados con ácido láctico, descripción de morfología colonial, tinción de Gram e identificación fenotípica basada en pruebas bioquímicas convencionales. La identificación incluyó pruebas como oxidasa, catalasa, fermentación de glucosa, movilidad, producción de indol, utilización de sustratos como manitol, así como evaluación en medios diferenciales y cromogénicos. Con base en estos resultados,

se estableció un perfil bioquímico para cada aislado, el cual fue comparado con esquemas de referencia microbiológica para su interpretación.

Este enfoque se aplicó como una herramienta presuntiva para una comprensión inicial de la comunidad microbiana cultivable vinculada al proceso y de sus posibles capacidades metabólicas, las cuales fueron interpretadas y contextualizadas con apoyo de la literatura. En este sentido, los resultados representan una aproximación centrada en los aislados recuperados bajo las condiciones de cultivo empleadas, permitiendo comparar patrones entre el inóculo inicial y los efluentes asociados a condiciones contrastantes de desempeño, alta y baja HPR.

No obstante, las identificaciones reportadas deben interpretarse como microorganismos consistentes con los géneros y/o especies indicados, de acuerdo con el perfil bioquímico observado, y no como confirmaciones taxonómicas definitivas a nivel de especie. En este sentido, la resolución taxonómica del enfoque empleado es limitada, dado que las identificaciones se basaron en pruebas bioquímicas convencionales y no en métodos confirmatorios automatizados o moleculares. Por tanto, no se dispone de un porcentaje de identidad, nivel de confianza o grado de certeza cuantitativo asociado a cada aislado.

Adicionalmente, este enfoque presenta limitaciones inherentes a los métodos cultivables y fenotípicos. En primer lugar, la recuperación de aislados depende del medio, del pre-enriquecimiento, de la atmósfera de incubación y de la capacidad de crecimiento de los microorganismos bajo dichas condiciones. Por ello, la no

recuperación de determinados taxones, por ejemplo, BPH anaerobias estrictas como *Clostridium* spp. o BAL como *Lactobacillus* spp., no debe interpretarse como ausencia o no participación en el biorreactor, sino como una posible limitación del método de aislamiento empleado.

En segundo lugar, debe considerarse que los microorganismos provenientes de matrices fermentativas complejas, especialmente cuando derivan de cultivos mixtos, pueden presentar perfiles bioquímicos atípicos o parcialmente contradictorios durante su identificación, debido a su alta diversidad genética, plasticidad fenotípica dependiente del ambiente y dificultad para obtener cultivos completamente puros. Por ello, los aislados puros deberán evaluarse posteriormente en ensayos controlados para explorar sinergias en cocultivos, determinar su potencial de producción de H₂ a partir de sustratos enriquecidos en ácido láctico y establecer su pertinencia para futuras aplicaciones, como el desarrollo de inóculos especializados o estrategias de bioaumentación en sistemas de FO-LA.

Aunque los perfiles bioquímicos reportados fueron considerados suficientes dentro del alcance del análisis efectuado, no permiten estimar abundancias relativas ni describir la estructura completa de la comunidad microbiana. Además, la estrategia de muestreo se restringió a tres matrices: inóculo, efluente de alta HPR y efluente de baja HPR, recolectadas al final de los ensayos, lo que limita la resolución temporal para describir procesos de sucesión microbiana a lo largo de los ciclos de TRH. Por tanto, las inferencias ecológicas planteadas en la discusión deben

interpretarse como hipótesis consistentes con la evidencia recuperada y con antecedentes de literatura, más que como demostraciones directas de causalidad. En consecuencia, futuros trabajos podrían complementar estos hallazgos mediante técnicas moleculares independientes del cultivo, como secuenciación del gen 16S ARNr, metagenómica o qPCR dirigida, junto con estrategias de aislamiento bajo condiciones de anaerobiosis más estricta, para caracterizar con mayor precisión la estructura comunitaria, su dinámica y su relación funcional con los metabolitos y el desempeño hidrogenogénico.

5.5. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo aportan evidencia microbiológica complementaria para interpretar el comportamiento del sistema de fermentación oscura impulsada por lactato (FO-LA) operado en modo semicontinuo y descrito en el Capítulo 4. Mediante el aislamiento en medios suplementados con ácido láctico, la tinción de Gram y la identificación fenotípica en pruebas bioquímicas convencionales, se recuperaron e identificaron diez aislados bacterianos con perfiles bioquímicos consistentes a los géneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Rummeliibacillus*. Dado que estos taxones han sido reportados con frecuencia en consorcios microbianos asociados a sistemas de fermentación oscura orientados a la producción de biohidrógeno, su recuperación resulta coherente con el contexto microbiano del sistema evaluado.

La comparación entre el inóculo inicial y los efluentes recolectados bajo condiciones contrastantes de desempeño (alta y baja HPR) evidenció, de forma consistente, la coexistencia de taxones compartidos y la aparición de taxones exclusivos por condición. Este patrón respalda dos ideas centrales: i) la posible existencia de un componente de la comunidad capaz de mantenerse durante la operación semicontinua, tolerando el ambiente del biorreactor y el esquema de recambio; y ii) la ocurrencia de cambios asociados a presión de selección y/o reorganización de la estructura microbiana inducidos por el régimen operativo (TRH y C_{AL}), en concordancia con el efecto significativo del TRH sobre el desempeño hidrogenogénico descrito en el Capítulo 4. Luego, estos resultados son compatibles con la presencia de un consorcio capaz de metabolizar ácido láctico en FO-LA, cuyo desempeño se favorece bajo TRH menores y concentraciones intermedias de ácido láctico en la alimentación (C_{AL}).

Finalmente, dado que el enfoque empleado es fundamentalmente fenotípico y dependiente del cultivo, se reconoce la necesidad de complementar estos hallazgos mediante técnicas moleculares independientes del cultivo (p. ej., secuenciación del gen 16S ARN_r; qPCR dirigida o metagenómica) para caracterizar con mayor precisión la estructura comunitaria, su dinámica temporal y su relación funcional con metabolitos y desempeño. De manera adicional, se propone evaluar experimentalmente el potencial de los aislados recuperados en ensayos controlados con sustratos enriquecidos en ácido láctico, con el fin de validar capacidades metabólicas, explorar sinergias en cocultivos y valorar su aplicabilidad futura como inóculos especializados o en estrategias de bioaumentación para sistemas FO-LA.

5.6. Bibliografía

- Aranda-Jaramillo, B., León-Becerril, E., Aguilar-Juárez, O., Castro-Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2023). Feasibility Study of Biohydrogen Production from Acid Cheese Whey via Lactate-Driven Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(644), 1–12. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070644>
- Blanco, V. M. C., Oliveira, G. H. D., & Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. *Renewable Energy*, 139, 1310–1319. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>
- Correa-Villa, C., Moreno-Cárdenas, E., & de Bruijn, J. (2024). Presence of lactic acid bacteria in hydrogen production by dark fermentation: competition or synergy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(380), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04167-9>
- Chen, J., Li, X., Gan, L., Jiang, G., Zhang, R., Xu, Z., & Tian, Y. (2021). Mechanism of Cr(VI) reduction by *Lysinibacillus* sp. HST-98, a newly isolated Cr(VI)-reducing strain. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 66121–66132. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15424-x>
- Detman, A., Mielecki, D., Chojnacka, A., Salamon, A., Błaszczyk, M. K., & Sikora, A. (2019). Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: *Clostridium butyricum* and microbial communities from dark fermentation bioreactors. *Microbial Cell Factories*, 18, 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1085-1>
- Detman, A., Laubitz, D., Chojnacka, A., Wiktorowska-Sowa, E., Piotrowski, J., Salamon, A., Kaźmierczak, W., Błaszczyk, M. K., Barberan, A., Chen, Y., Łupikasz, E., Yang, F., & Sikora, A. (2021). Dynamics and complexity of dark fermentation microbial communities producing hydrogen from sugar beet molasses in continuously operating packed bed reactors. *Frontiers in Microbiology*, 11(612344), 19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612344>
- Dzulkarnain, E. L. M., Audu, J. O., Wan Dagang, W. R. Z., & Abdul-Wahab, M. F. (2022). Microbiomes of biohydrogen production from dark fermentation of industrial wastes: Current trends, advanced tools and future outlook.

Bioresources and Bioprocessing, 9, 16. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00504-8>

Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., Cabrol, L., Carminato, V. M., Carrillo-Reyes, J., Cisneros-Pérez, C., Fuentes, L., Moreno-Andrade, I., Razo-Flores, E., Filippi, G. R., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., & Zaiat, M. (2016). Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 3371–3384. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7325-y>

Fuentes, L., Braga, L., Castelló, E., & Etchebehere, C. (2018). Work scheme to isolate the different micro-organisms found in hydrogen-producing reactors: a study of effectiveness by pyrosequencing analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 125(1), 96–110. <https://doi.org/10.1111/jam.13763>

Fuess, L. T., Ferraz Júnior, A. D. N., Machado, C. B., & Zaiat, M. (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. *Bioresource Technology*, 247, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>

García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2023). Use of a Highly Specialized Biocatalyst to Produce Lactate or Biohydrogen and Butyrate from Agro-Industrial Resources in a Dual-Phase Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(787), 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090787>

García-Depraect, O., Muñoz, R., Rodríguez, E., Rene, E. R., & León-Becerril, E. (2021). Microbial ecology of a lactate-driven dark fermentation process producing hydrogen under carbohydrate-limiting conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46, 11284–11296. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.08.209>

Gonzalez-Garcia, R. A., McCubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L. K., & Marcellin, E. (2017). Microbial propionic acid production. *Fermentation*, 3(2), 21. <https://doi.org/10.3390/fermentation3020021>

Hung, C. H., Chang, Y. T., & Chang, Y. J. (2011). Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. *Bioresource Technology*, 102(18), 8437–8444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.084>

Jiang, T., Gao, C., Ma, C., & Xu, P. (2014). Microbial lactate utilization: enzymes, pathogenesis, and regulation. *Trends in Microbiology*, 22(10), 589–599.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.008>

- Louis, P., Duncan, S. H., Sheridan, P. O., Walker, A. W., & Flint, H. J. (2022). Microbial lactate utilisation and the stability of the gut microbiome. *Gut Microbiome*, 3, e3, 1–16. <https://doi.org/10.1017/gmb.2022.3>
- MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Moreno-Cárdenas, E. L., Zapata-Zapata, A. D., & Kim, D. (2019). Hydrogen production from coffee mucilage in dark fermentation with organic waste. *Energies*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/en12010071>
- Mugnai, G., Borruso, L., Mimmo, T., Cesco, S., Luongo, V., Frunzo, L., Fabbricino, M., Pirozzi, F., Cappitelli, F., & Villa, F. (2021). Dynamics of bacterial communities and substrate conversion during olive-mill waste dark fermentation: Prediction of the metabolic routes for hydrogen production. *Bioresource Technology*, 319(124157), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124157>
- Munier, E., Licandro, H., Beuvier, E., & Cachon, R. (2023). Bioinformatics and metabolic flux analysis highlight a new mechanism involved in lactate oxidation in *Clostridium tyrobutyricum*. *International Microbiology*, 26, 501–511. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00316-y>
- Prabhu, R., Altman, E., & Eiteman, M. A. (2012). Lactate and acrylate metabolism by *Megasphaera elsdenii* under batch and steady-state conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8564–8570. <https://doi.org/10.1128/AEM.02443-12>
- Regueira-Marcos, L., Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2025). Biogenic hydrogen production from household food waste via lactate-driven dark fermentation: A comparative study of single-stage and two-stage configurations. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117672>
- Rittmann, S., & Herwig, C. (2012). A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production. *Microbial Cell Factories*, 11(115), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-115>
- Rodríguez-Reyes, J. J., García-Depraect, O., Cantera, S., Mena-navarro, V., & León-Becerril, E. (2025). Assessment of the recovery of hydrogen production activity in dark fermentation reactors after a long period of shutdown. *International Journal of Hydrogen Energy*, 144, 1134–1146.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2025.04.025>

- Rodríguez-Reyes, J. J., García-Depraet, O., Castro-Muñoz, R., & León-Becerril, E. (2021). Dark Fermentation Process Response to the Use of Undiluted Tequila Vinasse without Nutrient Supplementation. *Sustainability*, 13(11034), 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/su131911034>
- Schleifer, K.-H. (2009). Phylum XIII. *Firmicutes* Gibbons and Murray 1978, 5 (*Firmacutes* [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). En P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer, & W. B. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. 3). Springer.
- Silva-martínez, R. D., Aguilar-juárez, O., Díaz-jiménez, L., Valdez-Guzman, B. E., Aranda-Jaramillo, B., & Carlos-Hernández, S. (2025). Biological pydrogen Production through dark fermentation with high-solids content : An alternative to enhance organic residues degradation in co-digestion with sewage sludge. *Fermentation*, 11(398), 1–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/fermentation11070398>
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). Gram Stain Protocols. *American Society for Microbiology*, 1(14), 113–144.
- Suárez-Contreras, L. Y., & Yañez-Meneces, L. F. (2020). 16 s rRNA as an applied tool in molecular characterization of genera and species of bacteria. *Respuestas*, 25(1), 127–137.
- Valdez-Vazquez, I., Robledo-Rizo, J. G., Muñoz-Páez, K. M., Pérez-Rangel, M., & de la Luz Ruiz-Aguilar, G. M. (2020). Simultaneous hydrogen production and decolorization of denim textile wastewater: kinetics of decolorizing of indigo dye by bacterial and fungal strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 701–709. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00157-4>
- Villanueva-Galindo, E., Pérez-Rangel, M., & Moreno-Andrade, I. (2025). Biohydrogen production from lactic acid: Use of food waste as substrate and evaluation of pretreated sludge and native microbial community as inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 108(2023), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.12.202>
- Wainaina, S., Lukitawesa, Kumar Awasthi, M., & Taherzadeh, M. J. (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. In *Bioengineered* (Vol. 10, Issue 1, pp. 437–458). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>

Capítulo VI. Análisis cinético del consumo de ácido láctico y la producción de H₂ durante la fermentación oscura semicontinua con mucílago de café acidificado

6.1. Introducción

La evaluación científica de la producción fermentativa de bioH₂ requiere enfoques que permitan describir cuantitativamente la dinámica del proceso y, al mismo tiempo, facilitar comparaciones entre sistemas que difieren en sustrato, inóculo y modo de operación. En este contexto, la modelación cinética constituye una herramienta útil para el análisis, diseño y operación de procesos de producción bioH₂, ya que permite relacionar variables observables con parámetros operacionales interpretables y discutir el comportamiento fermentativo desde una base cuantitativa (García-Depraect & León-Becerril, 2018; Guo & Wang, 2024). Adicionalmente, los modelos cinéticos no solo permiten describir el proceso, sino también optimizarlo, reducir costos y apoyar su escalamiento industrial (Boshagh et al., 2022).

En la FO se han empleado diversos modelos cinéticos para describir la producción de H₂, el consumo de sustrato, el crecimiento microbiano y la formación de metabolitos. Estos modelos pueden clasificarse en estructurados y no estructurados. Los modelos estructurados, como el modelo de digestión anaerobia No 1 (ADM1), permiten representar de manera simultánea la degradación de sustrato, la producción de bioH₂ y la formación de subproductos; sin embargo, su aplicación suele verse limitada por su complejidad matemática y la necesidad de

contar con un número elevado de parámetros (Boshagh et al., 2022). A pesar de ello, adaptaciones del ADM1 han sido utilizadas con éxito para describir procesos fermentativos complejos; por ejemplo, Blanco et al. (2019) emplearon un modelo basado en ADM1 para analizar la conversión de ácido láctico y ácido acético en la producción de bioH_2 a partir de suero de queso, logrando una representación satisfactoria de las principales rutas metabólicas.

En contraste, los modelos no estructurados, como Monod, Andrews, Logístico, Cone, primer orden y Gompertz modificado, ofrecen aproximaciones más simples al tratar el sistema microbiano como una “caja negra”, por lo que resultan útiles cuando no se dispone de información detallada sobre la biomasa, rutas metabólicas o la composición funcional del consorcio (Boshagh et al., 2022). Dentro de estos modelos, el Gompertz modificado ha sido ampliamente utilizado para describir perfiles sigmoidales de producción acumulada de H_2 , debido a que permite estimar parámetros con interpretación operativa directa, como el potencial máximo de producción, la tasa máxima y el tiempo de retardo. Guo y Wang (2024) señalan que estos parámetros son relevantes para comprender la eficiencia, la dinámica y el potencial del sistema fermentativo.

La comparación entre Gompertz y ADM1 ha sido evaluada previamente en sistemas de fermentación oscura. Gadhamshetty et al. (2010) reportaron que el modelo de Gompertz presentó un excelente ajuste a los datos experimentales de producción de hidrógeno en ocho configuraciones de reactores, con coeficientes de determinación cercanos a 0,98; sin embargo, señalaron que sus parámetros son

específicos para cada condición experimental y que, en su forma empírica, el modelo no permite predecir de manera general el consumo de sustrato ni la formación de ácidos grasos volátiles bajo diferentes condiciones operacionales. En contraste, el modelo basado en ADM1 mostró una calidad de ajuste ligeramente menor para la producción de H_2 ($R^2 > 0,91$), pero permitió representar simultáneamente el consumo de sustrato, la producción acumulada de hidrógeno y la formación de AGV, evidenciando su mayor alcance mecanístico y predictivo. No obstante, esta mayor capacidad descriptiva requiere una adecuada determinación y calibración de los parámetros del modelo, especialmente cuando se busca aplicarlo a sistemas complejos con cultivos mixtos.

Aun considerando las limitaciones, Boshagh et al. (2022) indican que la estructura matemática del modelo de Gompertz modificado es lo suficientemente flexible para ser aplicada con éxito al consumo de sustrato, al crecimiento microbiano y a la formación de metabolitos solubles. Un ejemplo destacado es el trabajo de García-Depraect y León-Becerril (2018), quienes emplearon este modelo de forma integrada para describir el consumo de ácido láctico y la formación de ácido butírico durante la FO de vinaza de tequila.

Es así como, para fines prácticos y en correspondencia con el alcance experimental del estudio, se seleccionó el modelo de Gompertz modificado para analizar la producción de $bioH_2$ por FO a partir de mucílago de café acidificado. Esta elección se fundamentó en la ausencia de información detallada sobre la biomasa, posibles efectos inhibitorios, rutas metabólicas específicas y fracciones fermentables del

sustrato, aspectos que dificultan la aplicación de modelos estructurados en sistemas complejos basados en consorcios microbianos y residuos orgánicos, sin sobredimensionar la capacidad predictiva del modelo.

En consecuencia, este capítulo adopta un enfoque integrado centrado en la cinética de consumo de sustrato y formación de productos en un biorreactor semicontinuo, operado bajo $TRH = 1$ día y $C_{AL} = 10$ g/L. A partir de la estimación de los parámetros del modelo de Gompertz modificado, la discusión de la generación de H_2 y los perfiles de metabolitos, se busca generar evidencia cuantitativa para interpretar el desempeño del sistema bajo dicha condición operacional, dando cumplimiento al tercer objetivo específico planteado en esta tesis doctoral.

6.2. Metodología

6.2.1. Recolección de muestras

El estudio de la cinética de la FO de mucílago de café acidificado se realizó bajo las condiciones operacionales de tiempo de retención hidráulica (TRH) de 1 día y concentración de ácido láctico en la alimentación (C_{AL}) de 10 g/L, correspondientes a la operación del biorreactor en modo semicontinuo descrita en detalle en el Capítulo 4. En síntesis, el biorreactor operó a $31,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ y pH en $6,76 \pm 0,142$ con un volumen de trabajo de 12 L, aplicando la remoción intermitente de 4 L del producto fermentado y la alimentación de un volumen equivalente de mucílago de café acidificado, ajustado a una C_{AL} igual de 10 g/L, con una frecuencia de recambio de 8 horas; de este modo, tres recambios consecutivos conformaron un ciclo

completo de TRH. Una vez superada la fase transitoria, en el tercer recambio del quinto ciclo del TRH se registró la evolución temporal de la concentración de algunos metabolitos del proceso fermentativo con el fin de construir la cinética. La producción de gas se midió cada hora y se recolectaron muestras en bolsas TEDLAR® para su análisis. Adicionalmente, se tomaron muestras líquidas al inicio del tercer recambio ($t=0$) y posterior cada hora para cuantificar ácido láctico y algunos AGV, específicamente ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico.

6.2.2. Métodos analíticos

La caracterización de las muestras líquidas se efectuó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar ácidos orgánicos y carbohidratos solubles. Entre los compuestos evaluados se incluyeron ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico, ácido láctico, glucosa, fructosa, xilosa, galactosa, arabinosa y ácido galacturónico. Se empleó un equipo LC-20AT Prominence (Shimadzu), con detectores RID-20A y UV-PDA, y una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, CA, EE.UU.; $300 \times 7,8$ mm; $9 \mu\text{m}$). Como fase móvil se utilizó H_2SO_4 5 mM a un caudal de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, con temperatura de columna de 55°C y volumen de inyección de $20 \mu\text{L}$. El volumen de gas generado se midió con un gasómetro Metrex G2.5 (precisión $\pm 0,040 \text{ m}^3/\text{L}$), mientras que la composición se determinó mediante un cromatógrafo de gases (MicroGC Agilent 3000, USA), equipado con detector de conductividad térmica (TCD) y dos canales con gases de arrastre Ar y He. Columnas e inyectores operaron a 60°C y el detector a 300°C , con presión de operación de 30 psi. En el canal A (Ar) se cuantificaron H_2 , CH_4 y CO , y en el canal

B (He) se determinó CO₂. El volumen de H₂ reportado se expresó en condiciones normalizadas (1 atm; 0°C).

6.2.3. Análisis de datos y desarrollo de los modelos cinéticos

6.2.3.1. Delimitación y formulación del balance de masa

La operación del biorreactor en modo semicontinuo se compone de eventos intermitentes de recambio (remoción/alimentación), seguidos por una etapa posterior sin ingreso ni salida de materia. Para el desarrollo del análisis cinético, el sistema se delimitó exclusivamente a la etapa post-recambio en la cual el reactor operó sin flujos, asimilándose a un régimen discontinuo (batch) bajo el supuesto de mezcla completa y volumen constante ($V_L=12$ L) sin considerar una posible limitación de transferencia de masa en el sistema. En consecuencia, los cambios temporales de concentración observados para cada componente se atribuyen a la conversión bioquímica neta durante el intervalo analizado. Bajo estas condiciones, el balance de masa macroscópico para cada componente se expresa como:

$$\frac{dC_j}{dt} = r_j \quad (6-1)$$

Donde, C_j corresponde a la concentración del componente j dentro del biorreactor (g/L); r_j =velocidad de reacción de generación o consumo del componente (g/L·h). Por convención, $r_j < 0$ representa consumo (sustratos) y $r_j > 0$ representa formación (productos). La ecuación 6-1 excluye los términos de entrada, salida y

dilución, por lo que representa el marco de referencia para el cálculo de tasas y el ajuste de modelos empíricos de consumo de sustrato y formación de productos.

6.2.3.2. Variables analizadas y procesamiento de los datos

Se utilizaron perfiles temporales de ácido láctico y de metabolitos solubles en la fase líquida: ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, expresados en g/L, junto con la producción de hidrógeno (como volumen normalizado). Los datos se organizaron en series temporales con un origen temporal común ($t = 0$), definido como el instante inmediatamente posterior a la remoción/alimentación y la homogenización del biorreactor. Previo al ajuste de los modelos, se verificó la consistencia dimensional y de las unidades entre mediciones y se evaluaron las tendencias temporales (monotonía y/o cambios de pendiente) para sustentar la selección de los modelos empíricos. La Tabla 6-1 resume las expresiones empleadas para el cálculo de volumen de H_2 , el cálculo de la conversión del ácido láctico y rendimientos aparentes en el intervalo de análisis $[t_i, t_f]$.

Tabla 6-1. Ecuaciones empleadas para el procesamiento de datos e indicadores cinéticos.

Variable/Indicador	Símbolo	Unidades	Ecuación
Volumen H_2 acumulado	H	L H_2	$H(t) = \sum_{k=1}^n H_2(t_k)$
Conversión de ácido láctico	X_{AL}	%	$X_{AL} = \frac{AL(t_i) - AL(t_f)}{AL(t_i)} \times 100$
Moles de ácido láctico consumido	$n_{AL,cons}$	mol AL	$n_{AL} = \frac{(AL(t_i) - AL(t_f)) V_L}{MW_{AL}}$
Moles netos de producto soluble (P_i)	$n_{P_i,net}$	mol P_i	$n_{P_i,net} = \frac{(P_i(t_f) - P_i(t_i)) V_L}{MW_{P_i}}$
Moles de H_2 producidos	n_{H_2}	mol H_2	$n_{H_2} = \frac{n_{H_2}}{22,414}$

Rendimiento aparente de H ₂ respecto al ácido consumido	$Y_{H_2/AL}$	mol H ₂ /mol AL	$Y_{H_2/AL} = \frac{n_{H_2}}{n_{AL_{Cons}}}$
Rendimiento aparente de P _i respecto al ácido láctico consumido	$Y_{P_i/AL}$	mol P _i /mol AL	$Y_{P_i/AL} = \frac{n_{H_2}}{n_{AL_{Cons}}}$

$H_2(t_k)$: volumen producido en el intervalo tiempo k; $AL(t)$: concentración de ácido láctico (g/L); MW_{AL} : peso molecular de ácido láctico (g/mol); $P_i(t)$: Concentración de producto soluble (g/L), donde $P_i \in \{AC, AB, AP\}$; AC: Ácido acético, AB: Ácido butírico; AP: Ácido propiónico; MW_{P_i} : peso molecular de producto (g/mol); V_L : Volumen de trabajo del biorreactor (12 L); t_i, t_f : inicio/fin del intervalo de tiempo analizado; 22,414 L/mol es el volumen molar ocupado por un gas ideal en condiciones normales de temperatura y presión (0°C; 1 atm).

6.2.3.3 Modelo empírico para la descripción del consumo de sustrato y la formación de productos

Se empleó el modelo de Gompertz modificado para el análisis cinético de la producción acumulada de H₂ y, adicionalmente, para describir el consumo neto del sustrato y la formación neta de los metabolitos predominantes durante la etapa post-recambio. Su aplicación resulta adecuada en sistemas con cultivos mixtos y sustratos complejos, especialmente cuando no se dispone de información detallada sobre la biomasa, las rutas metabólicas o los posibles efectos inhibitorios, condiciones que limitan la aplicación robusta de modelos estructurados como ADM1 (Boshagh et al., 2022). Por tanto, el análisis se orientó hacia una representación empírica de las tendencias experimentales mediante parámetros operacionales con interpretación cinética directa —potencial, tasa máxima y tiempo de retardo—, en concordancia con aplicaciones previas en FO (Mu et al., 2007; García-depraect & León-becerril, 2018).

La evolución temporal de la variable acumulada $Z(t)$ se representó mediante la siguiente ecuación:

$$Z(t) = Z_{max} \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{max,Z} \times e}{Z_{max}} (\lambda_Z - t) + 1 \right] \right\} \quad (6-2)$$

donde Z_{max} corresponde al valor asintótico (potencial), R_{max} a la tasa máxima producción o consumo neto y λ_Z al tiempo de retardo (fase latencia). El tiempo asociado a la tasa máxima se estimó como:

$$t_{R_{max}} = \lambda_Z + \frac{Z_{max}}{R_{max,Z}e} \quad (6-3)$$

Con el fin de asegurar la compatibilidad con el carácter acumulativo del modelo, se definió $Z(t)$ según la variable evaluada (Tabla 6-1). En particular, se utilizaron variables acumuladas definidas respecto al tiempo (t): $H(t)$ para la producción de hidrógeno, $\Delta AL(t)$ para el consumo neto de lactato, y $\Delta P_i(t)$ para la formación neta de metabolitos solubles.

Tabla 6-2. Definición de $Z(t)$ y parámetros cinéticos del modelo de Gompertz.

Variable acumulada ajustada	Definición $Z(t)$	Parámetros cinéticos		
		Z_{max}	$R_{max,Z}$	λ_Z
Producción de H_2	$H(t)$	H_{max}	R_{max,H_2}	λ_{H_2}
Consumo de ácido láctico	$\Delta AL(t) = AL_0 - AL(t)$	ΔAL_{max}	$R_{max,AL}$	λ_{AL}
Formación de productos solubles	$\Delta P_i(t) = P_i(t) - P(i, 0)$	$\Delta P_{max,i}$	R_{max,P_i}	λ_{P_i}

H_{max} : Potencial de producción de H_2 (mL); R_{max,H_2} : Tasa máxima de producción de H_2 (mL/h); $\Delta AL(t)$ y $\Delta P_i(t)$ se expresan en g/L; ΔAL_{max} y $\Delta P_{max,i}$: Cambio acumulado máximo (g/L); $R_{max,AL}$: Tasa máxima de consumo de ácido láctico (g/L·h); R_{max,P_i} : Tasa máxima de formación de metabolitos solubles (g/L·h); P_i : corresponde a los metabolitos solubles evaluados (AC: ácido acético; AB: ácido butírico; AP: Ácido propiónico; g/L); ΔAL_{max} : Tasa máxima de formación de metabolitos solubles (g/h), $\lambda_{H_2}, \lambda_{AL}, \lambda_{P_i}$: Fase latencia (horas).

Los parámetros cinéticos del modelo $\{Z_{max}, R_{max,Z}, \lambda_Z\}$ se estimaron mediante regresión no lineal minimizando la suma de cuadrados de los errores entre los valores medidos y estimados (Ecuación 6-4). Los valores medidos fueron ajustados

con la función *lsqcurvefit* en MATLAB 2025a (MathWorks, USA). La calidad de ajuste se evaluó mediante el coeficiente de correlación y el error cuadrático medio (Ecuación 6-5 y Ecuación 6-6, respectivamente).

$$SSE = \sum_k^n [Z_{exp}(t_k) - Z_{est}(t_k)]^2 \quad (6-4)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_k^n (Z_{exp} - Z_{est})^2}{\sum_k^n (Z_{exp} - \overline{Z_{exp}})^2} \quad (6-5)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (Z_{exp} - Z_{est})^2} \quad (6-6)$$

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Producción de hidrógeno y perfil de ácidos orgánicos durante la operación del biorreactor modo semicontinuo

La evolución temporal de la concentración de metabolitos presentes durante la FO con mucílago de café acidificado se evaluó en la etapa post-recambio del biorreactor operado en modo semicontinuo (quinto ciclo; TRH=1 día y $C_{AL}=10$ g/L), en un intervalo de 8 h sin ingreso ni salida de materia, asimilable a un régimen discontinuo. La Figura 6-1 presenta la producción acumulada de H_2 y los perfiles de ácido láctico y AGV en función del tiempo.

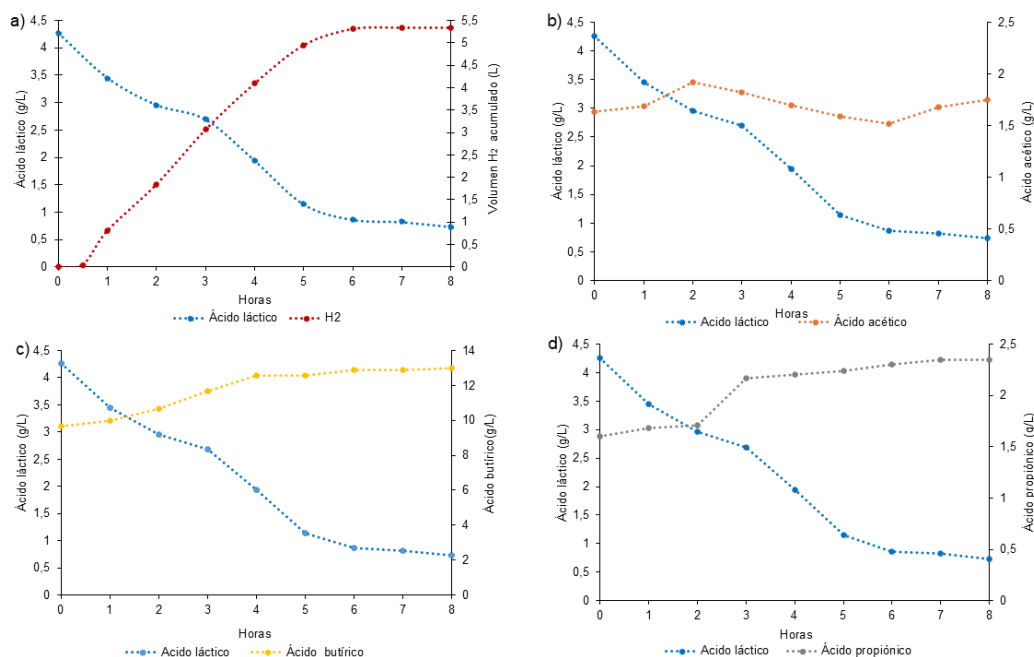


Figura 6-1. Producción de hidrógeno y perfil de concentración de ácidos orgánicos en función del tiempo de fermentación. (a) Ácido láctico e H₂; (b) Ácidos láctico y acético; (c) Ácidos láctico y butírico; (d) Ácidos láctico y propiónico.

Durante la fermentación, se observó un periodo inicial corto con producción nula o despreciable de H₂, seguido por una fase de incremento pronunciado del H₂ acumulado, concomitante con la disminución de AL durante las primeras seis horas (Figura 6-2a). El consumo global del ácido láctico alcanzó una conversión de 82,3% al final del intervalo analizado. En paralelo, se registró un incremento en las concentraciones de ácidos butírico y propiónico (Figura 6-1c, 6-1d), con formación predominante del ácido butírico, lo que sugiere una mayor participación de las rutas butirogénicas asociadas temporalmente a la fase de mayor producción de H₂.

En contraste con los ácidos butírico y propiónico, el ácido acético exhibió incrementos y disminuciones en distintos tramos temporales (Figura 6-1b),

compatible con formación y consumo concurrentes. En consecuencia, su interpretación requiere considerar rutas metabólicas acopladas y/o secuenciales más que un esquema único de formación neto. Este comportamiento es relevante dado que, en fermentaciones basadas en lactato, se ha reportado que el ácido láctico puede canalizarse hacia ácido acético y/o butírico con la producción de H_2 , mientras que rutas hacia ácido propiónico pueden operar como vía competitiva, potencialmente asociada a consumo de H_2 (Mugnai et al., 2021; Luo et al., 2024). Adicionalmente, debe señalarse que el mucílago acidificado utilizado durante el ensayo cinético correspondió a un sustrato enriquecido en ácido láctico y bajo en carbohidratos fermentables; de hecho, la fracción de carbohidratos analizada por HPLC —glucosa, fructosa, xilosa, galactosa, arabinosa y ácido galacturónico— no fue detectada en el sustrato alimentado al biorreactor. Por tanto, bajo las condiciones evaluadas, estos carbohidratos como tal no se consideran una fuente relevante para la producción de H_2 observada.

6.3.2. Análisis de la cinética del consumo de sustrato y formación de producto

Los perfiles experimentales de la producción acumulada de H_2 y de los ácidos orgánicos —a excepción del ácido acético— evidenciaron una dinámica compatible con un comportamiento sigmoideal (Figura 6-1). En consecuencia, dichos perfiles se describieron mediante el modelo de Gompertz modificado, en concordancia con metodologías previamente reportadas para procesos de FO (Mu et al., 2007; García-depraect & León-becerril, 2018; Guo & Wang, 2024). En particular, Mu et al. (2007) extendieron el uso del modelo de Gompertz modificado para representar de

forma unificada la cinética de consumo del sustrato, producción de H_2 y formación de productos solubles, proporcionando un marco consistente para la interpretación de los parámetros operacionales tales como potencial (Z_{max}), tasa máxima ($R_{max,z}$) y tiempo de retardo (λ_z). Sobre esta base, García-depraect & León-becerril (2018) reportaron que la producción de H_2 se asoció al consumo de ácido láctico y ácido acético, y que la modelación con Gompertz modificado resultó consistente para describir la cinética del proceso ($R^2>0,98$).

En este estudio, el ajuste de los perfiles experimentales de la producción acumulada de H_2 , consumo de ácido láctico y la formación del ácido butírico y propiónico mediante el modelo de Gompertz fue eficaz para describir la cinética del consumo de sustrato y la formación de productos, observándose altos coeficientes de determinación ($R^2>0,97$) y bajos errores de ajustes ($RMSE<0,17$). La Figura 6-2 presenta los ajustes del modelo a las variables acumuladas seleccionadas, mientras que la Tabla 6-3 resume los parámetros estimados ($Z_{max}, R_{max,z}, \lambda, t_{R_{max}}$). En contraste, el ácido acético no se ajustó con este modelo debido a su comportamiento no monótono observado experimentalmente (Figura 6-1b), lo cual impide representar su trayectoria completa como una variable acumulada compatible a una única curva sigmoide.

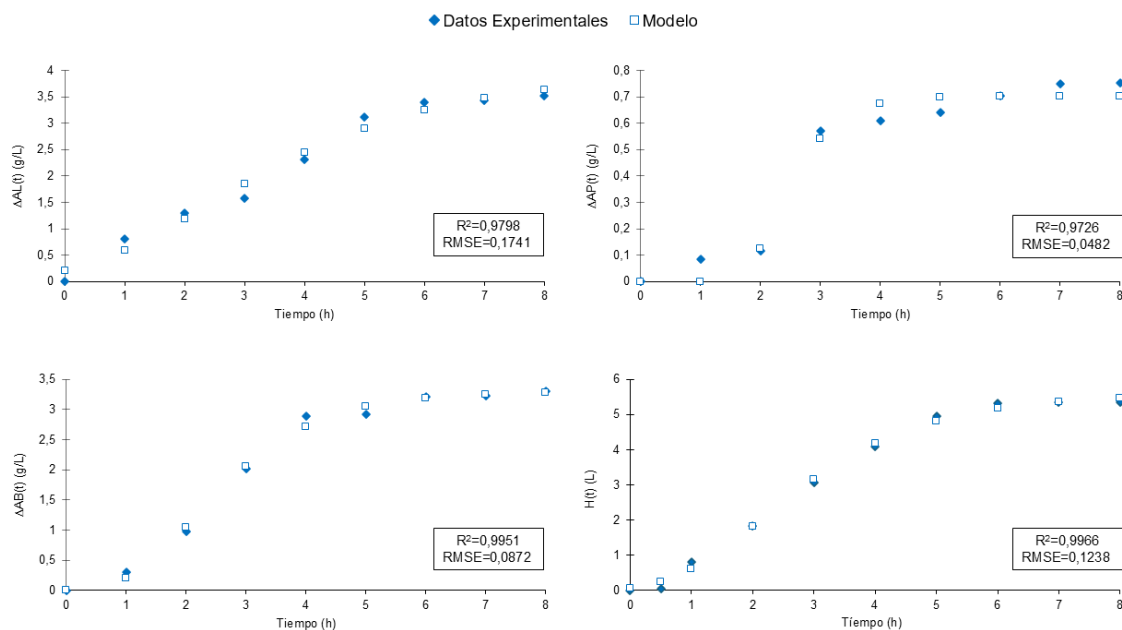


Figura 6-2. Análisis cinético del consumo de sustrato y la formación de producto mediante el modelo de Gompertz modificado. (a) Consumo de ácido láctico, $\Delta AL(t)$; (b) Formación de ácido propiónico; $\Delta AP(t)$; (c) Formación neta de ácido butírico, $\Delta AB(t)$; y d) Producción acumulada de hidrógeno, $H(t)$. Los rombos azules (◆) representan los datos experimentales y los cuadrados abiertos (□) los valores estimados por el modelo.

Tabla 6-3. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz para el consumo de sustrato y formación de productos.

Variable ajustada	Z_{max}	$R_{max,z}$	λ (h)	$t_{R_{max}}$ (h)
Producción de H_2	$H_{max} = 5,56$ L	$R_{max,H_2} = 1,39$ L/h	$\lambda_{H_2} = 0,69$	2,16
Consumo de ácido láctico	$\Delta AL_{max} = 3,93$ g/L	$R_{max,AL} = 0,66$ g/L·h	$\lambda_{AL} = 0,21$	2,38
Formación de ácido butírico	$\Delta AB_{max} = 3,30$ g/L	$R_{max,AB} = 1,07$ g/L·h	$\lambda_{AB} = 1,02$	2,15
Formación de ácido propiónico	$\Delta AP_{max} = 0,70$ g/L	$R_{max,AP} = 0,48$ g/L·h	$\lambda_{AP} = 1,76$	2,28

H_{max} : Potencial de producción de H_2 ; R_{max,H_2} : Tasa máxima de producción de H_2 ; ΔAL_{max} : consumo máximo del ácido láctico; ΔAB_{max} y ΔAP_{max} : Formación máxima de ácido butírico y propiónico respectivamente; $R_{max,AL}$: Tasa máxima de consumo de ácido láctico; $R_{max,AB}$ y $R_{max,AP}$: Tasa máxima formación de ácido butírico y propiónico; $\lambda_{H_2}, \lambda_{AL}, \lambda_{P_i}$: Fase latencia o tiempo de retardo; $t_{R_{max}}$: tiempo asociado a la tasa máxima.

Como era previsible, la concentración del ácido láctico disminuyó conforme avanzó su consumo en el periodo de fermentación (Figura 6-2a). El ajuste cinético sugiere

que el sistema alcanzó la tasa máxima de consumo ($R_{max,AL}$) de 0,66 g/L·h alrededor de 2,38 horas. Posteriormente, se aprecia una desaceleración en el consumo de ácido láctico, atribuible a la disminución de su disponibilidad, hasta alcanzar un consumo neto (ΔAL_{max}) de 3,93 g/L al final del intervalo evaluado (Tabla 6-3).

Un rasgo relevante del conjunto de parámetros es que los tiempos asociados a las tasas máximas (t_{Rmax}) para el consumo de ácido láctico, producción de H_2 y formación de ácido butírico se sitúan en un rango de 2 y 2,4 h, lo cual sugiere un acoplamiento temporal entre el consumo acelerado y la mayor actividad hidrogenogénica (Figura 6-2). En contraste, el mayor valor de λ_{AP} (1,76 h) indica que la formación neta de ácido propiónico se intensifica con un retardo relativo frente al establecimiento de la producción de H_2 . De manera consistente, el consumo de ácido láctico presentó un retardo mínimo λ_{AL} de 0,21 h lo que coincide con la disminución temprana del ácido láctico en el perfil experimental antes de apreciar la generación de H_2 (Tabla 6-3).

En términos comparativos, el valor $R_{max,AL}$ estimado es similar al reportado para la fermentación de la vinaza de tequila bajo un esquema de FO-LA a 35°C y pH 6,5 ($R_{max,AL} = 0,6 \pm 0,08$ g/L·h), lo cual respalda la plausibilidad de las estimaciones cinéticas obtenidas, aunque la comparación debe interpretarse con cautela por diferencias de sustrato e inóculo (García-depraect & León-becerril, 2018). De forma análoga, la comparación del potencial de producción indica que el H_{max} reportado

para vinaza de tequila fue mayor ($\approx 9,1$ L) que el observado en este estudio (Tabla 6-3), lo que es consistente con la diferencia en disponibilidad inicial de lactato (12 g/L en vinaza versus $\approx 4,2$ g/L en este sistema), sugiriendo por una parte que la carga efectiva de ácido láctico podría en parte constituir un condicionante relevante del potencial alcanzable (García-Depraect & León-Becerril, 2018). Esta interpretación de $H_{\max}$ es coherente con la evidencia en residuos de comida, donde se ha informado un aumento de H_2 al incrementar la concentración de ácido láctico disponible (Villanueva-Galindo et al., 2025). Sin embargo, por otra parte, el menor valor de $H_{\max}$ también puede estar asociado a la disponibilidad de co-sustratos como el ácido acético y/o al desvío del flujo de carbono/electrones hacia la formación de productos alternativos y de biomasa celular (Ordoñez-Frías et al., 2024).

Otro resultado distintivo del sistema es la fase de latencia corta asociada a la producción de H_2 (λ_{H_2} ; Tabla 6-3), congruente al inicio temprano del incremento de la producción acumula de H_2 observado experimentalmente (Figura 6-1a). Según Villanueva-Galindo et al., (2025), los valores de λ_{H_2} tiende a incrementarse a medida que aumenta la concentración de ácido láctico, independiente del tipo inóculo, lo cual se ha atribuido a requerimientos de adaptación y asimilación del ácido láctico durante el inicio de la fermentación. En dicho estudio, λ_{H_2} varió entre 17 y 29 h para lodos anaerobios pretrados térmicamente y entre 18 a 24 horas para inóculo nativo de residuos de comida (37°C y pH 7,0; Villanueva-Galindo et al., 2025).

En contraste, en la presente investigación, la λ_{H_2} estimada fue menor de una hora (Tabla 6-3), a una concentración inicial de ácido láctico cercana de 4,2 g/L y con un inóculo derivado de residuos de frutas y verduras combinado con la microbiota asociada al mucílago de café acidificado incorporado con la alimentación (31°C y pH 6,7). Esta reducción de λ_{H_2} sugiere un estado de adaptación previo de la comunidad microbiana, favorecido por el esquema recambio intermitente característico de la operación semicontinua, el cual tiende a mantener una fracción de biomasa activa capaz de asimilar el lactato y otros nutrientes, acortando el tiempo requerido para alcanzar una actividad hidrogenogénica apreciable.

En apoyo a esta suposición, Kim & Cho (2025) reportaron que, al comparar los modos de cultivos en la producción de H_2 de residuos de comida en condiciones mesofílicas, la operación semicontinua presentó λ_{H_2} igual a 2 h, considerablemente menor que el valor en modo discontinuo (20,4 h). Los autores atribuyeron este comportamiento a la remoción parcial repetitiva del medio y su reemplazo con sustrato fresco, lo cual favoreció la resiliencia y la estabilización de la comunidad microbiana y el mantenimiento de poblaciones productoras de H_2 capaces de adaptarse y recuperarse frente a perturbaciones externas, sosteniendo el desempeño del proceso.

Con respecto a la formación de metabolitos solubles, los parámetros cinéticos estimados respaldan la lectura funcional del proceso FO-LA durante el intervalo evaluado. La formación neta predominante de ácido butírico, junto con la presencia

de ácido propiónico en menor magnitud ($H_{max,AB} > H_{max,AP}$), es coherente con una competencia entre rutas metabólicas durante la fase hidrogenogénica, donde la reacción de conversión de ácido láctico en ácido acético/butírico o ácido láctico/acetico en ácido butírico se asocia a la producción de H_2 , mientras que rutas hacia propionogénicas pueden operar como vía competidora y potencialmente asociada al consumo de H_2 (Mugnai et al., 2021), tal como se ha discutido en los capítulos anteriores. En contraste, el ácido acético no fue modelado mediante Gompertz debido a su comportamiento no monótono, consistente con su naturaleza dinámica reportado en sistemas de FO-LA, donde puede participar como metabolito intermedio sujeto a la formación y consumo simultáneos, y no necesariamente como producto neto acumulativo, por lo que refuerza la necesidad de interpretarlo bajo un esquema de rutas acopladas y/o secuenciales.

Igualmente, este análisis cinético resulta relevante para su interpretación conjunta con el desempeño del biorreactor bajo diferentes regímenes de TRH y C_{AL} , especialmente en las condiciones que presentaron los mejores resultados (TRH = 0,5 días & C_{AL} = 20 g/L y TRH = 1 día & C_{AL} = 10 g/L; Capítulo 4). De acuerdo con el valor de $t_{R_{max,H_2}}$ estimado en la cinética post-recambio para TRH = 1 día y C_{AL} = 10 g/L, la máxima actividad hidrogenogénica se alcanzó a 2,16 h (Tabla 6-3). A partir de este máximo, la producción de H_2 tiende a disminuir y, en algunos casos, puede incluso cesar hacia el final del intervalo evaluado, en concordancia con lo descrito para sistemas de FO conforme progresa la fermentación, la disponibilidad del sustrato cambia (Blanco et al., 2019).

Lo anterior sugiere que, la duración del intervalo entre recambios establecidos en la operación semicontinua determinará qué fracción del periodo de mayor actividad se aprovecha antes de introducir sustrato, y por tanto, podría influir en la eficiencia global del proceso. Por ejemplo, cuando el TRH es 0,5 días, el intervalo entre recambios equivale a 4 h, por lo que es razonable sugerir que el sistema opera durante una porción más amplia del intervalo en proximidad al máximo hidrogenogénico, reduciendo el riesgo de entrar tempranamente en una fase de baja actividad por limitación de sustrato. No obstante, en estas condiciones el consumo neto de ácido láctico durante el post-recambio fue cercano al 57%, inferior al observado para TRH = 1 día y $C_{AL} = 10$ g/L (véase Sección 6.3.1), lo que sugiere que la disponibilidad de ácido láctico y su grado de conversión dependen del acoplamiento específico de TRH y C_{AL} . En conjunto, estos resultados refuerzan la necesidad de definir C_{AL} en función del TRH, con el fin de favorecer una conversión eficiente del ácido láctico a H_2 y, simultáneamente, prevenir el agotamiento del sustrato durante el intervalo entre recambios, manteniendo la estabilidad del desempeño hidrogenogénico.

Finalmente, la Tabla 6-4 permite situar los parámetros cinéticos estimados en este trabajo dentro del rango reportado en algunos sistemas de FO-LA con diferentes sustratos e inóculos, evitando interpretaciones absolutas y enfatizando el carácter referencial de comparación. De esta forma, los resultados confirman que el modelo de Gompertz modificado ofrece una descripción adecuada de la cinética observada para las variables acumulativas seleccionadas (Figura 6-2; Tabla 6-3) y proporciona

una base cuantitativa coherente para discutir el desempeño del sistema FO-LA bajo una operación semicontinua.

Tabla 6-4. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz modificado reportados para la producción de H₂ en sistemas de FO-LA.

Sustrato	Inóculo	Modo operación	pH	T* (°C)	λ_{H_2} (h)	H_{max} (mLH ₂ /L)	R_{max,H_2} (mLH ₂ /L·h)	Referencias
Vinaza de tequila (12 g/L AL)	Cultivo mixto sintético (PTA-124566)	Discontinuo	6,5	35	31,8	4559,0	159,0	a
Suero de queso ácido (14 g/L AL)	Cultivo mixto sintético (PTA-124566)	Discontinuo	5,8	35	4,2	3313,1	77,9	b
Suero de queso fermentado naturalmente (12 g/L AL)	Lodo anaerobio granular	Discontinuo	5,0	37	16,6	74,5	117,6	c
Residuos de comida (5 g/L AL)	Microbiota nativo	Discontinuo	7,0	37	18,2	45,5	9,4	d
Residuos de comida (20g/L AL)	Microbiota nativo	Discontinuo	7,0	37	40,6	416,0	50,7	d
Residuos de comida	Mix de consorcios de sedimento agua dulce y de humedales	Semicontinuo (recambio intermitente)	N.C	37	2,0	408,0	58,0	e
Mucílago de café acidificado (4,2 g/L AL)	Microbiota nativo de residuos de frutas y verdura	Semicontinuo (recambio intermitente)	6,7	31	0,69	463,5	116,2	Este estudio

*Temperatura; AL: Ácido láctico; H_{max} y R_{max,H_2} Expresados como volumen de H₂ por litro de reactor (mLH₂/L y mLH₂/L·h), respectivamente; N.C: no controlado; Referencias: a. García-depraect & León-becerril (2018); b. Aranda-Jaramillo et al. (2023); c. Ordoñez-Frías et al. (2024); d. Villanueva-Galindo et al. (2025), e. Kim & Cho (2025). FO convencional.

Al considerar este comparativo, los valores obtenidos de λ_{H_2} , H_{max} y R_{max,H_2} , junto con el comportamiento cinético observado, sugieren que el esquema de recambio característico de la operación semicontinua fue funcional para sostener un desempeño hidrogenogénico favorable bajo la condición TRH de 1 día. En este estudio, la aplicación del 33% de recambio permitió completar el TRH mediante tres

recambios diarios, con intervalos post-recambio de 8 h en los que el reactor operó como una etapa discontinua.

En comparación, Kim et al. (2025) aplicaron un recambio del 25% para completar un TRH de 16 h mediante cuatro recambios, con intervalos post-recambio de 4 h; bajo dichas condiciones, reportaron una λ_{H_2} mayor y valores de H_{max} y R_{max,H_2} inferiores a los obtenidos en este estudio. En contraste, García-Depraect y León-Becerril (2018) alcanzaron valores mayores de H_{max} y R_{max,H_2} sin aplicar un esquema de recambio intermitente; sin embargo, reportaron una λ_{H_2} mayor y la diferencia en la tasa máxima fue moderada, siendo aproximadamente 1,3 veces superior a la estimada en este estudio. Además, dicho H_{max} fue alcanzado durante una operación discontinua de mayor duración de aproximadamente 4 días, y con una concentración inicial de ácido láctico de 12 g/L, mientras que en este estudio la respuesta cinética fue evaluada durante un intervalo post-recambio de 8 h y con una concentración inicial de ácido láctico cercana a 4,2 g/L.

Estas diferencias deben interpretarse con cautela, debido a que los sistemas comparados difieren en sustrato, inóculo, condiciones operacionales y composición del medio. Aun así, la comparación sugiere que el esquema de recambio puede contribuir a mantener una respuesta hidrogenogénica temprana, posiblemente asociada con la retención de una fracción de biomasa activa dentro del biorreactor. Por tanto, como se propuso en el Capítulo IV, el efecto específico de la fracción de

recambio sobre la estabilidad y eficiencia del proceso deberá ser abordado en futuros estudios.

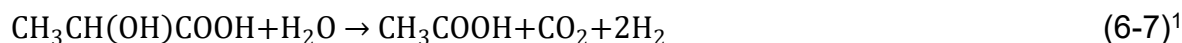
6.3.3. Utilización del ácido láctico y mecanismos de producción de hidrógeno

En sistemas de FO-LA, la utilización del ácido láctico por consorcios microbianos constituye una propiedad fisiológica y ecológicamente relevante, ya que permite la obtención de energía en condiciones de baja disponibilidad de carbohidratos (Fuess et al., 2018). Para mantener un suministro continuo de energía, la conversión de ácido láctico puede dar lugar a una distribución del flujo metabólica hacia productos con distinto grado de reducción, favoreciendo la regeneración de cofactores redox en sus formas oxidadas (p.ej., NAD^+ y ferredoxina oxidada, Fd_{ox}). Esta dinámica se refleja en la coexistencia de múltiples rutas metabólicas. En este sentido, la literatura sobre FO-LA describe que el ácido láctico puede transformarse en ácido acético y/o butírico con la producción de H_2 , mientras que la formación de ácido propiónico se reconoce como una vía alternativa asociada a una disminución del H_2 neto por desvío de equivalentes reductores (Mugnai et al., 2021; Luo et al., 2024), lo cual es coherente con lo observado en este estudio con la presencia simultánea de ácido acético, butírico y propiónico en el período de post-recambio.

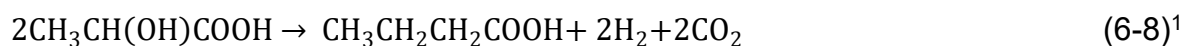
Adicionalmente, el comportamiento no monótono del ácido acético registrado experimentalmente sugiere una formación y consumo concurrente y que su papel debe interpretarse como el de un intermediario dinámico dentro de rutas acopladas y/o secuenciales más que como un producto final acumulativo, en concordancia con el análisis desarrollado en las subsecciones previas. Desde esta perspectiva, y con

el objetivo de vincular los rendimientos aparentes del post-recambio (Tabla 6-5) con mecanismos plausibles, a continuación, se presentan reacciones globales de referencia que sintetizan tres direcciones metabólicas (Correa-Villa et al., 2024):

(i) Ruta acetogénica con producción de H₂:



(ii) Ruta butirogénica asociada a producción de H₂:



(iii) Ruta propiogénica como vía que contribuye a reducir el H₂ neto:

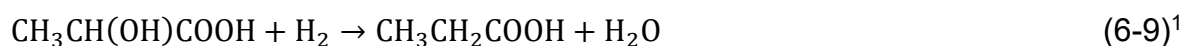


Tabla 6-5. Rendimientos aparentes netos respecto al ácido láctico consumido durante el post-recambio.

Rendimiento aparente	Símbolo	Valor	Unidad
Hidrógeno	$Y_{\text{H}_2/\text{AL}}$	0,51	$\text{mol H}_2/\text{mol AL}_{\text{cons}}$
Ácido acético	$Y_{\text{AC}/\text{AL}}$	0,24	$\text{mol AC}/\text{mol AL}_{\text{cons}}$
Ácido propiónico	$Y_{\text{AP}/\text{AL}}$	0,26	$\text{mol AP}/\text{mol AL}_{\text{cons}}$
Ácido butírico	$Y_{\text{AB}/\text{AL}}$	0,97	$\text{mol AB}/\text{mol AL}_{\text{cons}}$

AL_{cons}: ácido láctico consumido; AC: ácido acético; AP: ácido propiónico;
AB: ácido butírico

Al contrastar estas direcciones metabólicas con los rendimientos aparentes (Tabla 6-5), se obtiene evidencia cuantitativa de que el ácido láctico consumido no puede considerarse como única base para explicar simultáneamente la formación de AGV y el H₂ medido. En primer lugar, la reacción (ii) implica un máximo teórico entre 0,5 mol ácido butírico por mol ácido láctico, por lo que el rendimiento aparente observado para el ácido butírico excede este límite (Tabla 6-5) y descarta que la formación neta del ácido butírico provenga exclusivamente del ácido láctico

consumido. Esta discrepancia es consistente con dos rasgos del sistema: (a) la naturaleza compleja del sustrato (mucílago acidificado), donde pueden coexistir fracciones fermentables adicionales al ácido láctico que contribuyan a la formación de AGV; y (b) el rol del ácido acético como intermediario dinámico con formación y consumo concurrentes, de modo que los cambios netos no capturan flujos internos y pueden magnificar rendimientos aparentes al usar el ácido láctico como denominador.

En este contexto, la presencia de ácido acético resulta relevante en la conversión de ácido láctico durante la FO-LA en la medida que participa como co-sustrato dentro de rutas que favorecen la formación de ácido butírico y la liberación de H_2 (Martínez-Fraile et al., 2024). Según Wu et al. (2012), la mejora de la producción de H_2 se vio limitada bajo escenarios de baja disponibilidad de ácido acético, consistente con una oxidación incompleta de ácido láctico. Asimismo, Romo-Hernández & Vital-Jácome (2025) destacaron que la formación de ácido butírico puede impulsar una fracción importante de la generación de energía (ATP) cuando el ácido acético participa como intermediario en el direccionamiento del flujo hacia este metabolito. De este modo, estudios previos han informado que un mol de ácido láctico y 0,37-0,50 mol de ácido acético da como resultado un rendimiento de H_2 entre 0,50-0,53 mol y de ácido butírico entre 0,63-0,75 mol a través de esta vía de producción de H_2 (Martínez-Fraile et al., 2024). No obstante, al comparar dichos rangos con los valores del presente estudio (Tabla 6-5), los rendimientos sugieren que, además de ácido láctico y acético, pudo existir contribución de carbono/electrones desde compuestos presentes en el mucílago no cuantificados

en el balance de productos (p. ej., alcoholes). En concordancia, se ha reportado que compuestos como etanol pueden transformarse a ácido acético en sistemas FO-LA, contribuyendo a la dinámica no monótona de este metabolito (Aranda-Jaramillo et al., 2023).

En segundo lugar, puede realizarse el siguiente chequeo si se utiliza el esquema mínimo Ecuaciones 6-7 a 6-9 para estimar un H_2 “calculable” a partir de los rendimientos aparentes de ácido acético y butírico, descontando el consumo asociado a ácido propiónico:

$$Y_{H_2,calc} \approx 2Y_{AC/AL} + 2Y_{AB/AL} - Y_{AP/AL} \quad (6-10)$$

Al sustituir los valores de la Tabla 6-5 a la Ecuación 6-10, se obtiene $Y_{H_2,calc}$ resulta mayor que el $Y_{H_2/AL}$ observado. Este resultado refuerza que el H_2 medido corresponde a un balance neto afectado por rutas paralelas no cuantificadas (p. ej., consumo de compuestos distintos del ácido láctico y/o formación de compuestos reducidos no monitorizados), por consumo de equivalentes reductores en la síntesis de biomasa y por dinámicas internas donde del ácido acético participa como pool interconvertible más que como producto final. En consecuencia, la Tabla 6-5 no debe leerse como un balance cerrado, sino como evidencia de la distribución de rutas que en parte estuvieron presentes durante el post-recambio: predominio butirogénico aparente, coexistencia de una dirección propionogénica y ácido acético con comportamiento compatible con rutas acopladas y secuenciales.

En síntesis, los resultados respaldan que el ácido láctico actuó como sustrato funcional clave durante el post-recambio; sin embargo, la magnitud de los rendimientos aparentes, especialmente hacia ácido butírico, indica que la formación de AGV no puede explicarse únicamente a partir del ácido láctico neto consumido, en concordancia con la complejidad del mucílago acidificado y la probable contribución de fracciones fermentables adicionales diferente a los carbohidratos. Asimismo, el contraste con las reacciones globales de referencia sugiere que el sistema podría haber presentado un potencial de producción de H_2 superior al observado; la diferencia entre el H_2 “calculable” y el H_2 medido implica que una fracción importante del poder reductor se canalizó hacia sumideros no cuantificados y/o rutas reductoras concurrentes, además de flujos internos asociados al ácido acético como intermediario dinámico. En consecuencia, el “no cierre” se interpreta como evidencia de distribución de rutas y de límites del conjunto de variables monitorizadas, más que como una inconsistencia del enfoque.

6.4. Conclusiones

El análisis cinético mostró que el modelo de Gompertz modificado describe de manera consistente las variables acumulativas de producción de H_2 , consumo de ácido láctico y formación neta de ácidos butírico y propiónico, permitiendo estimar parámetros operacionales comparables (potenciales, tasas máximas, retardos y tiempos característicos) y discutir el desempeño del sistema sobre una base cuantitativa. La principal excepción fue el ácido acético, cuya dinámica no monótona impidió su representación mediante una sigmoide única; este patrón es consistente

con la formación y consumo concurrentes y respalda su interpretación como un intermediario dinámico dentro de rutas acopladas y/o secuenciales, más que como un producto final acumulativo.

Bajo la operación semicontinua evaluada ($TRH = 1$ día; $C_{AL} = 10$ g/L), el mucílago de café acidificado permitió sostener una respuesta hidrogenogénica temprana, acoplada temporalmente al consumo acelerado de ácido láctico. La sincronía observada entre los tiempos asociados a las tasas máximas de consumo de sustrato, formación de metabolitos y generación de gas indica que, posterior a la alimentación, el consorcio mantiene una condición fisiológica activa que favorece una transición rápida hacia la fase productora de H_2 .

Desde la perspectiva metabólica, la formación predominante de ácido butírico se asoció a la fase de mayor producción de H_2 , mientras que la presencia de ácido propiónico es consistente con una dirección alternativa del metabolismo capaz de disminuir el H_2 neto por desvío del poder reductor. En concordancia, los rendimientos aparentes netos respecto al ácido láctico consumido evidenciaron que, si bien el ácido láctico fue un sustrato funcional clave, la formación de AGV y el H_2 medido no pueden explicarse exclusivamente a partir del ácido láctico neto consumido. Además, la discrepancia entre el H_2 “calculable” mediante reacciones globales de referencia y el H_2 observado sugiere la participación de sumideros no cuantificados y/o rutas reductoras concurrentes, además de flujos internos asociados al rol intermediario del ácido acético.

En términos prácticos, los resultados aportan criterios para interpretar el desempeño del sistema en función del intervalo de mayor actividad hidrogenogénica y, por extensión, para orientar la definición conjunta de TRH y C_{AL} . La principal limitación radica en que los balances se basan en rendimientos aparentes netos y en un conjunto acotado de metabolitos monitorizados; por ello, el “no cierre” debe entenderse como una señal de complejidad del sustrato y del proceso, más que como una inconsistencia del enfoque.

6.5. Bibliografía

- Aranda-Jaramillo, B., León-Becerril, E., Aguilar-Juárez, O., Castro-Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2023). Feasibility Study of Biohydrogen Production from Acid Cheese Whey via Lactate-Driven Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(644), 1–12. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070644>
- Blanco, V. M. C., Oliveira, G. H. D., & Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. *Renewable Energy*, 139, 1310–1319. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>
- Boshagh, F., Rostami, K., & van Niel, E. W. J. (2022). Application of kinetic models in dark fermentative hydrogen production—A critical review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(52), 21952–21968. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.05.031>
- Correa-Villa, C., Moreno-Cárdenas, E., & de Bruijn, J. (2024). Presence of lactic acid bacteria in hydrogen production by dark fermentation: competition or synergy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(380), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04167-9>
- Fuess, L. T., Ferraz, A. D. N., Machado, C. B., & Zaiat, M. (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. *Bioresource Technology*, 247, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>
- Gadhamshetty, V., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N., & Johnson, D. C. (2010).

Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(2), 479–490. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.007>

García-depraect, O., & León-becerril, E. (2018). Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate- acetate pathway : Operational performance , kinetic analysis and microbial ecology. *Fuel*, 234(June), 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.06.126>

Guo, X., & Wang, J. (2024). The Gompertz model for biohydrogen production kinetics : Origin , application and solving methods. *International Journal of Hydrogen Energy*, 88, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2024.09.200>

Kim, G., & Cho, K. (2025). Comparative analysis of H₂ production and microbial communities during dark fermentation of food waste under varying temperature and cultivation modes. *Bioresource Technology Reports*, 31(102279), 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2025.102279> Received

Luo, L., Lim, R., & Pradhan, N. (2024). Lactic acid-based fermentative hydrogen production from kitchen waste : Mechanisms and taxonomic insights. *Chemical Engineering Journal*, 488(March), 150854. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.150854>

Martínez-Fraile, C., Muñoz, R., Simorte, M. T., Sanz, I., & Garcia-Depraect, O. (2024). Biohydrogen production by lactate-driven dark fermentation of real organic wastes derived from solid waste treatment plants. *Bioresource Technology*, 403(January). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130846>

Mu, Y., Ā, H. Y., & Wang, G. (2007). A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process. *Water Research*, 41, 1152–1160. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.047>

Mugnai, G., Borruso, L., Mimmo, T., Cesco, S., Luongo, V., Frunzo, L., Fabbricino, M., Pirozzi, F., Cappitelli, F., & Villa, F. (2021). Dynamics of bacterial communities and substrate conversion during olive-mill waste dark fermentation: Prediction of the metabolic routes for hydrogen production. *Bioresource Technology*, 319(124157), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124157>

Ordoñez-Frías, E. j, Muñoz-Páes, K. M., & Buitrón, G. (2024). Biohydrogen production from fermented acidic cheese whey using lactate : Reactor performance and microbial ecology analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.06.307>

- Romo-Hernández, A., & Vital-Jácome, M. A. (2025). Modeling microbial interactions in lactate-driven dark fermentation systems using metabolic models. *International Journal of Hydrogen Energy*, 158(150516), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2025.150516>
- Villanueva-Galindo, E., Pérez-Rangel, M., & Moreno-Andrade, I. (2025). Biohydrogen production from lactic acid : Use of food waste as substrate and evaluation of pretreated sludge and native microbial community as inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 108 (August 2023), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.12.202>
- Wu, C. W., Whang, L. M., Cheng, H. H., & Chan, K. C. (2012). Fermentative biohydrogen production from lactate and acetate. *Bioresource Technology*, 113, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.130>

Capítulo VII. Discusión general

La presente investigación evidenció la factibilidad de producir biohidrógeno mediante fermentación oscura impulsada por lactato (FO-LA) en un biorreactor operado en modo semicontinuo, alimentado con un sustrato complejo previamente acidificado naturalmente por fermentación láctica, de manera que el ácido láctico actuó como precursor metabólico para la etapa hidrogenogénica. Este enfoque se plantea como una vía de valorización energética de residuos agroindustriales, al vincular la estabilización operativa del proceso con el uso de matrices reales ricas en ácido láctico.

El interés de este estudio surgió por varias razones, entre ellas:

- El hidrógeno no está disponible de forma libre en la naturaleza, por lo que debe generarse a partir de fuentes específicas. En la actualidad, la mayor parte se produce mediante rutas basadas en combustibles fósiles, lo que limita su aporte real a la descarbonización y a escenarios de “cero emisiones netas”. En consecuencia, resulta estratégico diversificar y complementar tecnologías de producción de hidrógeno de origen renovable, sin depender de una única alternativa, manteniendo su rol como insumo industrial y vector energético (Hydrogen Council, 2021; Sharma et al., 2021; Capítulo 2).

- Entre las rutas biológicas, la fermentación oscura (FO) usando consorcios microbianos destaca por su aplicabilidad a diversos sustratos (p.ej. glucosa, glicerol, celulosa) y su potencial integración en esquemas de valorización de residuos. La FO permite vincular la cogeneración de biohidrógeno y ácidos orgánicos con la gestión ambiental de matrices orgánicas abundantes, operando bajo condiciones relativamente moderadas de temperatura (25-65°C) y pH (5,0-6,5; Akhlaghi & Najafpour-Darzi, 2020; Capítulo 2). No obstante, su desempeño puede verse limitado por la complejidad del sustrato y de la dinámica microbiana, incluyendo la competencia y desvíos metabólicos hacia productos indeseados, afectando la estabilidad y rendimiento (Cabrol et al., 2017; Castelló et al., 2020; Capítulos 2 y 3).
- En residuos ricos en carbohidratos, el ácido láctico y bacterias ácido lácticas (BAL) exhiben una dualidad relevante en sistemas de FO. Por una parte, la dominancia de BAL se asocian a pérdidas de rendimiento por el desvío del flujo de carbono hacia metabolitos no hidrogenogénicos como el ácido láctico y desplazamiento de bacterias productoras de hidrógeno. Por otra parte, bajo condiciones apropiadas, el ácido láctico puede actuar como sustrato para consorcios consumidores de lactato, promoviendo rutas hidrogenogénicas, siendo la base fundamental de los procesos de FO-LA. Por ello, se ha propuesto realizar la FO-LA en dos configuraciones para desacoplar la fase láctica y la hidrogenogénica, para reducir la competencia y controlar la proliferación de BAL (García-Depraect et al., 2021; Villanueva-Galindo et al., 2025; Capítulos 3 y 4).

- Desde una perspectiva de escalamiento, la FO resulta más viable en modos de operación semicontinuo y continuo, dado que permiten controlar la disponibilidad de sustrato y reducir la acumulación de metabolitos potencialmente inhibitorios, contribuyendo a prolongar la producción de hidrógeno (Łukajtis et al., 2018). En particular, el modo semicontinuo opera mediante recambios (remoción/alimentación) intermitentes que generan un efecto de dilución “a pulsos” y mantienen una fracción de biomasa activa para cada alimentación, favoreciendo una productividad más sostenida y mayor flexibilidad operacional (de Almeida Silva et al., 2020; Kim & Cho, 2025; Capítulo 6). No obstante, la evidencia en FO-LA semicontinua con residuos orgánicos sigue siendo limitada y requiere de una caracterización técnica rigurosa (Regueira-Marcos et al., 2025; Capítulo 4).
- En gran medida, el funcionamiento de sistemas semicontinuos se define por la estrategia operacional aplicada, particularmente del tiempo de retención hidráulica (TRH), y del régimen de recambio (fracción y frecuencia de alimentación/extracción) que condiciona la exposición del consorcio a cambios de sustrato y productos, así como de su estabilidad funcional (Swiatkiewicz et al., 2021; Capítulos 4 y 5). En FO-LA, esta lógica se articula con la concentración de ácido láctico en la alimentación (C_{AL}), dado que su magnitud puede incidir simultáneamente en la dinámica de consumo de ácido láctico y en el riesgo de agotamiento o inhibición durante el intervalo entre recambios. Por ello, definir el TRH, el recambio y la C_{AL} de manera coherente resulta determinante para alcanzar una bioconversión eficiente y estable de

ácido láctico a H_2 , condición clave para su eventual integración en esquemas de valorización y biorrefinería (García-Depraect et al., 2021; Capítulo 4).

Bajo este marco conceptual, la presente investigación contrastó las premisas discutidas sobre FO-LA mediante un diseño experimental orientado a comprender el efecto operacional del TRH y de la C_{AL} en un sistema semicontinuo. Al emplear mucílago de café acidificado como sustrato modelo —representativo de matrices residuales ricas en carbohidratos que, tras fermentación espontánea (principalmente láctica), generan efluentes enriquecidos en ácido láctico— se generó evidencia técnica para evaluar cómo la influencia conjunta del TRH y C_{AL} puede afectar simultáneamente el desempeño hidrogenogénico y la respuesta del consorcio microbiano en condiciones de recambios intermitentes.

En coherencia con ello, la respuesta a la hipótesis planteada se operacionalizó a través de tres objetivos específicos (Capítulo 1), concebidos como un enfoque integrador de tres secciones complementarias: (i) desempeño operativo del biorreactor semicontinuo en términos de rendimiento y tasa de producción de hidrógeno (HMY y HPR , respectivamente; Capítulo 4); (ii) caracterización microbiológica presuntiva de la comunidad microbiana del proceso (Capítulo 5); y (iii) análisis cinético de consumo de sustrato y formación de producto (Capítulo 6).

En conjunto, la evidencia converge en que el TRH y la C_{AL} no solo afectan HMY y HPR , sino que también condicionan la selección funcional del consorcio microbiano y la expresión temporal de la actividad hidrogenogénica; proporcionando así una base sólida y coherente para el cumplimiento de los objetivos específicos.

En este sentido, el análisis desarrollado en el Capítulo 4 sobre el desempeño de la FO-LA semicontinua confirmó que el TRH y la C_{AL} condicionan el aprovechamiento del sustrato al afectar tanto su disponibilidad como su conversión efectiva. Además, se observó que el TRH actuó como parámetro determinante para el proceso y a la vez modelador en el efecto de la C_{AL} sobre las variables de respuesta seleccionadas. Este efecto modelador fue especialmente significativo en TRH menores (≤ 1 día), donde la dinámica de recambios intermitentes aplicada evitó la saturación del sistema y permitió mantener los valores de HYM y HPR. Por lo tanto, bajo el esquema de recambios aplicados en el biorreactor, en este estudio se delimitó un dominio operativo en el que TRH menores (0,5-1 días) y C_{AL} moderadas (10-20 g/L) se asociaron con una respuesta hidrogenogénica más eficiente.

Esta interpretación operativa se fortalece al contrastarla con los hallazgos presentados en el Capítulo 6 al describir la dinámica temporal del sistema mediante el ajuste al modelo de Gompertz modificado. En la etapa post-recambio (TRH = 1 día; C_{AL} = 10 g/L), los altos valores de ajustes en variables acumulativas respaldan el uso del modelo para discutir parámetros cinéticos relevantes, destacando que, tras el pulso de alimentación, se manifiesta una fase de latencia corta y una estrecha sincronía temporal entre el máximo consumo de ácido láctico y la máxima actividad hidrogenogénica, alcanzada a las 2,16 h. Este parámetro resulta determinante para la gestión del proceso, dado que la duración entre recambios define qué fracción de este período de alta productividad se capitaliza antes de que el sistema entre en

una fase de baja actividad, ya sea por limitación de sustrato o desvío de equivalentes reductores.

Bajo esta perspectiva, la comparación con un TRH de 0,5 días sugiere que, aunque el intervalo de 4 horas permite operar en mayor proximidad al máximo metabólico, el compromiso observado en la conversión neta de ácido láctico (~57%) subraya que la eficiencia global está supeditada al acoplamiento estratégico entre TRH y CAL. En conjunto, estos resultados refuerzan la necesidad de sincronizar la frecuencia de alimentación con la cinética de bioconversión para asegurar la estabilidad del desempeño y el aprovechamiento integral del ácido láctico como precursor. Desde el perfil metabólico, el patrón registrado es compatible con un escenario en el que la disponibilidad de ácido láctico se mantuvo dentro de un intervalo funcional, favoreciendo las rutas productoras de hidrógeno vinculadas a metabolitos como el ácido butírico y reduciendo el predominio de vías competidoras (p. ej. propionogénicas) que suelen disminuir el rendimiento del proceso (Capítulos 4, 5 y 6).

A este marco operacional se suma la evidencia microbiológica del Capítulo 5, la cual revela una comunidad conformada por componentes tanto persistentes como diferenciales. Estos hallazgos sugieren que el régimen de TRH y CAL actuó como una presión de selección, induciendo una reorganización parcial de la comunidad microbiana bajo condiciones de estrés o eficiencia del sistema. En efecto, al contrastar los efluentes de alta y baja producción (HPR), se observó que este

condicionamiento operativo favoreció la persistencia de un núcleo funcional capaz de ajustarse a las variaciones de C_{AL} y TRH.

Dentro de los aislados recuperados se detectaron géneros clave como *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Rummeliibacillus*. La detección de estos taxones es coherente con los consorcios de FO-LA orientados a la producción de biohidrógeno reportados en la literatura (Valdez-Vazquez et al., 2020; Mugnai et al., 2021; Aranda-Jaramillo et al., 2023; García-Depraect & León-Becerril, 2023; Rodríguez-Reyes et al., 2025; Silva-martínez et al., 2025). Especial interés despierta la coexistencia de taxones como *Bacillus badius* y *Lysinibacillus spp.*, los cuales parecen conformar un componente biológico resiliente capaz de sostener la actividad metabólica frente a la dinámica de recambios intermitentes, permitiendo que el sistema responda con rapidez para alcanzar una actividad hidrogenogénica apreciable, reflejada por las fases de latencias cortas analizadas en Capítulo 6.

De este modo, la evidencia experimental presentada indica que la hipótesis no puede ser rechazada, debido que el TRH y la C_{AL} no solo afectan los indicadores de desempeño, sino que también determinan la fracción microbiana recuperable. Esta capacidad de ajuste del consorcio frente a las presiones de alimentación es lo que garantiza la viabilidad de la FO-LA semicontinua (Swiatkiewicz et al., 2021). No obstante, en consistencia con el rigor metodológico discutido en el Capítulo 5, esta interpretación debe asumirse como una hipótesis plausible basada en una identificación fenotípica. Estos resultados constituyen una base indicativa necesaria que requiere ser contrastada en el futuro con herramientas independientes del

cultivo (p. ej. metagenómica) para describir con mayor certeza la estructura dinámica y las contribuciones funcionales precisas de la comunidad microbiana del sistema.

A pesar de estos hallazgos, es necesario reconocer que la evidencia experimental disponible para FO-LA semicontinua con residuos orgánicos sigue siendo comparativamente limitada (Regueira-Marcos et al., 2025). No obstante, los resultados de esta tesis doctoral son congruentes con investigaciones en sistema continuos, ya que los mejores desempeños se lograron bajo condiciones de TRH relativamente menores (García-Depraect et al., 2020; Ordoñez-Frías et al., 2024; Regueira-Marcos et al., 2024; 2025). En este contexto, la identificación de un TRH mínimo seguro resulta fundamental: si bien valores bajos de TRH favorecen la acumulación de biomasa activa y la exclusión de microorganismos indeseables (p.ej. metanogénicos), un exceso en esta reducción puede limitar el tiempo efectivo para la conversión del sustrato, diluir la biomasa funcional y conducir a fallos por sobrecarga orgánica o lavado. En contrapartida, TRH prolongados tienden a estabilizar el proceso y mejorar la eficiencia de utilización del sustrato, aunque con el riesgo de favorecer rutas metabólicas secundarias que reducen el rendimiento de hidrógeno (García-Depraect et al., 2021; Swiatkiewicz et al., 2021).

De forma complementaria, C_{AL} debe ajustarse en función del TRH. Este estudio evidenció que concentraciones moderadas (10–20 g/L) permitieron un equilibrio entre la disponibilidad de sustrato y bajos efectos inhibitorios. En cambio, C_{AL} elevadas combinadas con TRH cortos pueden provocar acidificación excesiva del

medio, superando la capacidad de adaptación del consorcio, mientras que valores demasiado bajos limitan el potencial bioenergético del sistema (Correa-Villa et al., 2024; Regueira-Marcos et al., 2024). Por ello, el acoplamiento estratégico de TRH y CAL no solo optimiza los indicadores de desempeño, sino que constituye una herramienta crítica para moldear el ecosistema microbiano, su estabilidad funcional y la resiliencia del proceso. En suma, estos elementos permiten generar criterios operacionales que expliquen cómo estabilizar la FO-LA en matrices complejas, perfilando los sistemas semicontínuos como una alternativa biotecnológica plausible.

Finalmente, es imperativo reconocer que la temperatura es un determinante transversal del desempeño de la FO, debido a su influencia directa sobre estructura de la comunidad microbiana, la actividad enzimática, las tasas de crecimiento y la utilización del sustrato (Fuess et al., 2017; Laikova et al., 2024; Kim & Cho, 2025). En esta investigación, los ensayos se desarrollaron bajo condiciones mesofílicas controladas ($31,0 \pm 1,0$ °C), un contexto experimental que cobra especial relevancia al considerar la proyección tecnológica del sistema. En regiones con baja variación térmica, como las zonas tropicales (p. ej., Colombia), existe una ventaja operacional intrínseca: un menor requerimiento energético para mantener la estabilidad del proceso y una menor probabilidad de perturbaciones que afecten la cinética microbiana.

En contraste, la transferencia de esquemas FO-LA hacia latitudes con marcada estacionalidad, como es el caso de Chile, requiere considerar explícitamente el

diseño térmico del sistema. En estas regiones, la viabilidad puede depender de medidas de gestión térmica —tales como el aislamiento del reactor o la integración de calor residual industrial — para amortiguar los choques térmicos que, a nivel biológico, actúan como una presión selectiva capaz de desplazar a las poblaciones hidrogenogénicas por comunidades menos eficientes.

En este sentido, los resultados de esta tesis doctoral deben interpretarse como una demostración del potencial del mucílago de café acidificado como matriz modelo para sostener la bioconversión del ácido láctico a hidrógeno, cuyos principios pueden extrapolarse a otros residuos agrícolas. No obstante, su escalamiento hacia escenarios reales exige incorporar la temperatura y la disponibilidad de biomasa residual como factores críticos de diseño. Por tanto, se definen como líneas prioritarias de proyección tecnológica:

- La evaluación de los rangos de tolerancia térmica del consorcio microbiano.
- El estudio de la interacción entre temperatura, TRH y C_{AL} sobre la estabilidad operativa.
- El análisis del costo energético neto del control térmico en distintos climas y latitudes.
- La incorporación y validación del proceso en épocas diferentes a la estación de invierno o de máxima cosecha, asegurando la disponibilidad de la materia prima como parámetro crítico.

La definición de estos escenarios de operación será la que finalmente determine la viabilidad de la FO-LA semicontinua en aplicaciones a escala piloto e industrial, alineándose con las realidades climáticas y productivas de cada territorio.

Bibliografía

- Akhlaghi, N., & Najafpour-Darzi, G. (2020). A comprehensive review on biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(43), 22492–22512. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.182>
- Aranda-Jaramillo, B., León-Becerril, E., Aguilar-Juárez, O., Castro-Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2023). Feasibility Study of Biohydrogen Production from Acid Cheese Whey via Lactate-Driven Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(644), 1–12. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070644>
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>
- Castelló, E., Nunes Ferraz-Junior, A. D., Andreani, C., Anzola-Rojas, M. del P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Gomes, S. D., Maintinguer, S. I., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Schiappacasse-Dasati, M., Tapia-Venegas, E., Valdez-Vázquez, I., Vesga-Baron, A., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 119). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>
- Correa-Villa, C., Moreno-Cárdenas, E., & de Bruijn, J. (2024). Presence of lactic acid bacteria in hydrogen production by dark fermentation: competition or synergy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(380), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04167-9>
- de Almeida Silva, M. C., Monteggia, L. O., Alves Barroso Júnior, J. C., Granada, C. E., & Giongo, A. (2020). Evaluation of semi-continuous operation to hydrogen and volatile fatty acids production using raw glycerol as substrate. *Renewable Energy*, 153, 701–710. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.152>
- Fuess, L. T., Kiyuna, L. S. M., Ferraz, A. D. N., Persinoti, G. F., Squina, F. M., Garcia, M. L., & Zaiat, M. (2017). Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and

- bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Applied Energy*, 189, 480–491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>
- García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., Muñoz, R., Rene, E. R., León-Becerril, E., Valdez-Vazquez, I., Kumar, G., Reyes-Alvarado, L. C., Martínez-Mendoza, L. J., Carrillo-Reyes, J., & Buitrón, G. (2021). A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark fermentative processes. *Bioresource Technology*, 324, 124595. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124595>
- García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2023). Use of a Highly Specialized Biocatalyst to Produce Lactate or Biohydrogen and Butyrate from Agro-Industrial Resources in a Dual-Phase Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(787), 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090787>
- Hydrogen Council. (2021). *Hydrogen decarbonization pathways Potential supply scenarios*. www.hydrogencouncil.com.
- Kim, G., & Cho, K. (2025). Comparative analysis of H₂ production and microbial communities during dark fermentation of food waste under varying temperature and cultivation modes. *Bioresource Technology Reports*, 31(102279), 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2025.102279> Received
- Laikova, A. A., Zhuravleva, E. A., Kovalev, A. A., Shekhurdina, S. V., Parshina, S. N., & Litt, Y. V. (2024). Biohydrogen Production by Mono- Versus Co- and Mixed Cultures. In J. C. Soccol, C.R., Brar, S.K., Permaul, K., Pakshirajan, K., de Carvalho (Ed.), *Biohydrogen - Advances and Processes. Biofuel and Biorefinery Technologies*, vol 13 (pp. 83–123). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-49818-3_5
- Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91(April 2017), 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- Mugnai, G., Borruso, L., Mimmo, T., Cesco, S., Luongo, V., Frunzo, L., Fabbricino, M., Pirozzi, F., Cappitelli, F., & Villa, F. (2021). Dynamics of bacterial communities and substrate conversion during olive-mill waste dark fermentation: Prediction of the metabolic routes for hydrogen production. *Bioresource Technology*, 319(124157), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124157>
- Regueira-Marcos, L., García-depraect, O., & Mu, R. (2024). Continuous two-stage lactate-driven dark fermentation process for enhanced biohydrogen production

- from food waste. *Journal of Water Process Engineering*, 67(106116), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106116>
- Regueira-Marcos, L., Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2025). Biogenic hydrogen production from household food waste via lactate-driven dark fermentation: A comparative study of single-stage and two-stage configurations. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117672>
- Rodríguez-Reyes, J. J., García-Depraect, O., Cantera, S., Mena-navarro, V., & León-Becerril, E. (2025). Assessment of the recovery of hydrogen production activity in dark fermentation reactors after a long period of shutdown. *International Journal of Hydrogen Energy*, 144, 1134–1146. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2025.04.025>
- Sharma, S., Agarwal, S., & Jain, A. (2021). Significance of hydrogen as economic and environmentally friendly fuel. *Energies*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/en14217389>
- Silva-martínez, R. D., Aguilar-juárez, O., Díaz-jiménez, L., Valdez-Guzman, B. E., Aranda-Jaramillo, B., & Carlos-Hernández, S. (2025). Biological pydrogen Production through dark fermentation with high-solids content : An alternative to enhance organic residues degradation in co-digestion with sewage sludge. *Fermentation*, 11(398), 1–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/fermentation11070398>
- Swiatkiewicz, J., Slezak, R., Krzystek, L., & Ledakowicz, S. (2021). Production of Volatile Fatty Acids in a Semi-Continuous Dark Fermentation of Kitchen Waste : Impact of Organic Loading and Hydraulic Retenction Time. *Energies*, 14(2993), 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/en14112993>
- Valdez-Vazquez, I., Robledo-Rizo, J. G., Muñoz-Páez, K. M., Pérez-Rangel, M., & de la Luz Ruiz-Aguilar, G. M. (2020). Simultaneous hydrogen production and decolorization of denim textile wastewater: kinetics of decolorizing of indigo dye by bacterial and fungal strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 701–709. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00157-4>
- Villanueva-Galindo, E., Pérez-Rangel, M., & Moreno-Andrade, I. (2025). Biohydrogen production from lactic acid : Use of food waste as substrate and evaluation of pretreated sludge and native microbial community as inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 108 (August 2023), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.12.202>

Anexo A. Datos experimentales crudos de fermentación oscura semicontinua

Tabla A-1. Datos experimentales correspondientes de análisis de gases y volúmenes generados en los ciclos de TRH 4, 5 y 6 de cada ensayo para el cálculo de las variables del desempeño del bioproceso.

No	Ensayo	Composición del gas (%v/v)					No normalizado		Normalizado	
	TRH=0,5 C _{AL} =20 g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	V _{gas} (L)	VH ₂ (L)	V _{Ngas} (L)	V _{NH₂} (L)
1	4 ciclo TRH	41,35	50,15	0,000	0,674	11,47	50,40	20,841	39,463	16,319
	5 ciclo TRH	39,52	52,689	0,000	0,336	7,45	67,60	26,72	52,931	20,922
	6 ciclo TRH	37,70	55,23	0,000	0,000	3,42	59,80	22,546	46,823	17,654
	TRH=1 C _{AL} =10 g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	V _{gas} (L)	VH ₂ (L)	V _{Ngas} (L)	V _{NH₂} (L)
2	4 ciclo TRH	33,764	67,792	0,000	0,000	2,6005	117,4	39,64	91,92	31,04
	5 ciclo TRH	31,686	64,137	0,000	0,000	4,1775	87,00	27,57	68,12	21,57
	6 ciclo TRH	29,608	60,482	0,000	0,000	5,7545	84,20	24,93	65,93	19,52
	TRH=1 C _{AL} =30 g.L ⁻¹	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	V _{gas} (L)	VH ₂ (L)	V _{Ngas} (L)	V _{NH₂} (L)
3	4 ciclo TRH	6,37	87,94	0,00	0,00	5,69	28,80	1,83	22,55	1,44
	5 ciclo TRH	7,46	80,91	0,00	0,00	11,63	30,60	2,28	23,96	1,79
	6 ciclo TRH	8,55	73,88	0,00	0,00	17,57	28,40	2,43	22,24	1,90
	TRH=2 C _{AL} =5 g.L ⁻¹	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	V _{gas} (L)	VH ₂ (L)	V _{Ngas} (L)	V _{NH₂} (L)
4	4 ciclo TRH	2,92	55,14	7,11	0,00	34,822	12,20	0,357	9,55	0,279
	5 ciclo TRH	2,19	40,75	8,20	0,00	48,87	10,00	0,219	7,83	0,171
	6 ciclo TRH	1,46	62,92	9,28	0,00	62,919	12,20	0,177	9,55	0,139
	TRH=2 C _{AL} =35 g.L ⁻¹	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	V _{gas} (L)	VH ₂ (L)	V _{Ngas} (L)	V _{NH₂} (L)
10	4 ciclo TRH	19,48	66,82	0,00	0,00	13,69	87,60	17,07	68,59	13,36
	5 ciclo TRH	21,49	70,24	0,00	0,00	8,26	85,40	18,36	66,87	14,37
	6 ciclo TRH	23,51	73,66	0,00	0,00	2,83	86,00	20,21	67,34	15,83
	TRH=3 C _{AL} =10 g.L ⁻¹	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	V _{gas} (L)	VH ₂ (L)	V _{Ngas} (L)	V _{NH₂} (L)
11	4 ciclo TRH	19,67	41,60	3,72	0,00	35,03	30,0	5,90	23,49	4,62
	5 ciclo TRH	18,77	46,83	4,86	0,00	29,54	45,2	8,49	35,39	6,64
	6 ciclo TRH	17,88	52,07	6,00	0,00	24,05	41,4	7,40	32,41	5,80
	TRH=3 C _{AL} =30 g.L ⁻¹	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	V _{gas} (L)	VH ₂ (L)	V _{Ngas} (L)	V _{NH₂} (L)
12	4 ciclo TRH	25,76	72,14	0,00	0,00	2,09	43,6	11,23	34,14	8,79
	5 ciclo TRH	25,88	70,44	0,00	0,00	3,68	63,8	16,51	49,96	12,93
	6 ciclo TRH	26,00	68,74	0,00	0,00	5,26	63,2	16,43	49,49	12,87

+ Corresponde a gases no identificados (principalmente N₂, Vapor de agua u otras trazas); V_{gas}: Volumen de gas generado; VH₂: Volumen de hidrógeno; V_{Ngas}: Volumen de gas normalizado (0°C, 1 amt); V_{NH₂}: Volumen de hidrógeno normalizado (0°C, 1 amt); TRH: tiempo de retención hidráulica; C_{AL}:Concentración de ácido láctico en la alimentación

No	Ensayo	Composición del gas (%v/v)					No Normalizado		Normalizado	
	TRH=2 C _{AL} 20 g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	Vgas (L)	VH ₂ (L)	V _N gas (L)	V _N H ₂ (L)
5	4 ciclo TRH	23,33	66,19	0,00	0,00	10,48	64,60	15,072	50,58	11,80
	5 ciclo TRH	25,05	59,48	0,00	0,00	15,47	61,70	15,453	48,31	12,10
	6 ciclo TRH	26,76	52,78	0,00	0,00	20,46	62,80	16,805	49,17	13,16
	TRH=2 C _{AL} 20 g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	Vgas (L)	VH ₂ (L)	V _N gas (L)	V _N H ₂ (L)
6	4 ciclo TRH	29,19	54,17	0,00	0,00	16,64	62,20	18,159	48,70	14,22
	5 ciclo TRH	27,56	62,35	0,00	0,00	10,10	66,50	18,326	52,07	14,35
	6 ciclo TRH	25,92	70,52	0,00	0,00	3,56	56,10	14,541	43,93	11,39
	TRH=2 C _{AL} 20 g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	Vgas (L)	VH ₂ (L)	V _N gas (L)	V _N H ₂ (L)
7	4 ciclo TRH	36,26	57,67	0,00	0,00	6,08	66,80	24,22	52,30	18,964
	5 ciclo TRH	34,87	57,56	0,00	0,00	7,57	71,80	25,039	56,22	19,606
	6 ciclo TRH	33,49	57,45	0,00	0,00	9,06	62,40	20,897	48,86	16,363
	TRH=2 C _{AL} 20 g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	Vgas (L)	VH ₂ (L)	V _N gas (L)	V _N H ₂ (L)
8	4 ciclo TRH	19,63	74,72	0,00	0,00	5,65	66,80	13,112	52,30	10,27
	5 ciclo TRH	27,72	65,70	0,00	0,00	6,58	68,80	19,073	53,87	14,93
	6 ciclo TRH	35,82	56,67	0,00	0,00	7,51	64,40	23,066	50,43	18,06
	TRH=2 C _{AL} 20 g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	Vgas (L)	VH ₂ (L)	V _N gas (L)	V _N H ₂ (L)
9	4 ciclo TRH	23,16	71,87	0,00	0,00	4,97	76,00	17,605	59,51	13,78
	5 ciclo TRH	23,60	72,74	0,00	0,00	3,66	74,80	17,652	58,57	13,82
	6 ciclo TRH	24,03	73,62	0,00	0,00	2,35	66,80	16,054	52,30	12,57
	TRH=3,5 C _{AL} =20g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	Vgas (L)	VH ₂ (L)	V _N gas (L)	V _N H ₂ (L)
13	4 ciclo TRH	25,756	66,523	0,000	0,000	7,7215	71	18,287	55,593	14,319
	5 ciclo TRH	26,241	69,695	0,000	0,000	4,0645	82,8	21,727	64,832	17,012
	6 ciclo TRH	26,725	72,868	0,000	0,000	0,4075	54	14,431	42,282	11,3
	TRH=1,5 C _{AL} =20g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	Vgas (L)	VH ₂ (L)	V _N gas (L)	V _N H ₂ (L)
14	4 ciclo TRH	17,63	57,70	0,00	0,00	24,67	94,60	16,678	74,07	13,06
	5 ciclo TRH	21,78	54,00	0,00	0,00	24,22	100	21,781	78,30	17,05
	6 ciclo TRH	25,93	50,30	0,00	0,00	23,77	93,80	24,323	73,45	19,05
	TRH=1 C _{AL} =10 g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	Vgas (L)	VH ₂ (L)	V _N gas (L)	V _N H ₂ (L)
15	4 ciclo TRH	29,42	67,90	0,00	0,00	2,67	116,0	34,132	90,83	26,73
	5 ciclo TRH	32,47	64,92	0,00	0,00	2,61	78,20	25,389	61,23	19,88
	6 ciclo TRH	35,51	61,95	0,00	0,00	2,55	89,40	31,745	70,00	24,86
16	TRH=0,5 C _{AL} =20g/L	H ₂	CO ₂	CO	CH ₄	otros gases ⁺	Vgas (L)	VH ₂ (L)	V _N gas (L)	V _N H ₂ (L)

4 ciclo TRH	39,04	54,52	0,00	0,00	6,45	48,40	18,894	37,90	14,79
5 ciclo TRH	40,82	50,70	0,00	0,00	8,48	61,00	24,901	47,76	19,50
6 ciclo TRH	42,61	46,88	0,00	0,00	10,51	75,80	32,296	59,35	25,29

+ Corresponde a gases no identificados (principalmente N₂, Vapor de agua u otras trazas); V_{gas}: Volumen de gas generado; V_{H₂}: Volumen de hidrógeno; V_{Ngas}: Volumen de gas normalizado (0°C, 1 amt); V_{NH₂}: Volumen de hidrógeno normalizado (0°C, 1 amt); TRH: tiempo de retención hidráulica; C_{AL}: Concentración de ácido láctico en la alimentación; Ensayos 14, 15, 16 corresponden a los ensayos de validación.

Tabla A-2. Datos experimentales correspondientes de análisis de sólidos totales y volátiles generados en el ciclo de TRH 6 de cada ensayo para el cálculo de las variables del desempeño del bioproceso.

Ensayo	TRH (d)	C _{AL} (g/L)	Sólidos totales (g/L)		Sólidos volátiles (g/L)	
			Inicial	Final	Inicial	Final
1	0,5	20	49,85	31,32	32,13	29,97
2	1,0	10	24,37	22,04	16,50	15,56
3	1,0	30	86,86	74,50	47,24	40,89
4	2,0	5	13,33	10,09	9,14	6,94
5	2,0	20	66,31	56,66	41,66	33,29
6	2,0	20	62,50	61,59	40,325	36,17
7	2,0	20	44,55	41,92	25,81	24,21
8	2,0	20	44,28	41,22	29,20	23,21
9	2,0	20	59,75	55,55	39,80	32,37
10	2,0	35	61,37	54,05	32,03	27,95
11	3,0	10	18,02	12,27	10,82	9,375
12	3,0	30	41,72	31,20	28,16	26,22
13	3,5	20	29,30	19,35	18,49	17,67
14	1,5	20	38,51	38,03	23,23	21,53
15	1,0	20	25,02	20,45	17,05	14,85
16	0,5	20	37,59	29,08	27,22	22,10

TRH: tiempo de retención hidráulica; C_{AL}: Concentración de ácido láctico en la alimentación; Ensayos 14, 15, 16 corresponden a los ensayos de validación.

Tabla A-3. Tasa de producción de hidrógeno (HPR) calculada a partir del volumen de gas no normalizado, utilizada para el modelado en lógica difusa.

Ensayo	TRH (d)	C _{AL} (g/L)	HRP(LH ₂ /d)
1	0,5	20	46,97
2	1	10	30,25
3	1	30	2,181
4	2	5	0,125
5	2	20	7,888
6	2	20	8,504
7	2	20	11,69
8	2	20	9,208
9	2	20	8,552
10	2	35	9,273
11	3	10	2,421
12	3	30	4,412
13	3,5	20	5,185
14	0,5	20	50,73
15	1	10	30,42
16	1,5	20	13,95

HRP: Tasa de producción de hidrógeno; TRH: tiempo de retención hidráulica; C_{AL}: Concentración de ácido láctico en la alimentación; Ensayos 14, 15, 16 corresponden a los ensayos de validación.

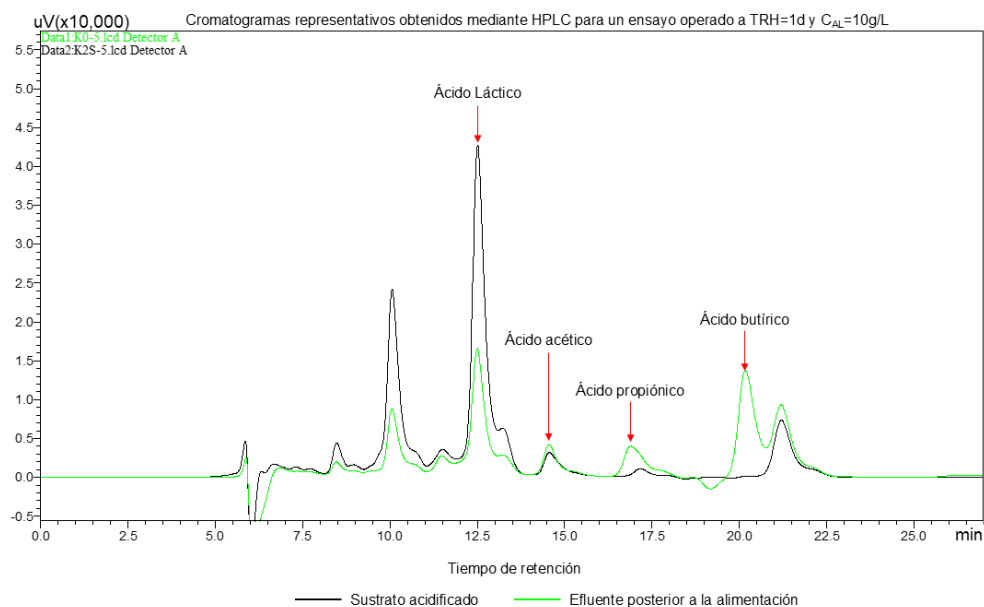


Figura A-1. Cromatogramas representativos obtenidos mediante HPLC para la identificación de ácido láctico y ácidos grasos volátiles en muestras líquidas correspondientes al sustrato acidificado y al efluente posterior a la alimentación del biorreactor semicontinuo operado bajo condiciones FO-LA (TRH = 1 d; C_{AL} = 10 g/L).

External Standard Report

Page 1 of 1

Method Name: D:\EZChrom Elite\Enterprise\Method\CALIBRACIÓN NUEVA 2025.met

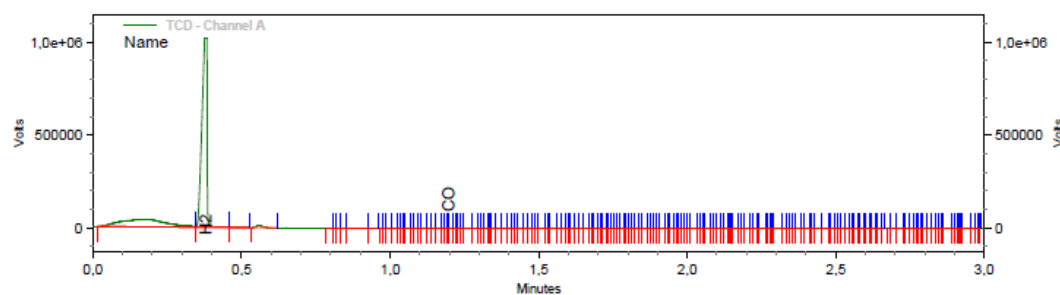
Data:

C:\Users\Laboratorio\Desktop\Resultados_uGC\CindyCorrea_Agricola\07_05_2025\B1G0105_10PM_2.rsl\B1G0105_10PM_2.dat

User: SYSTEM (SYSTEM)

Acquired: 07/05/2025 11:27:41 a.m. (GMT -05:00)

Printed: 07/05/2025 11:37:03 a.m. (GMT -05:00)



TCD - Channel A Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
2	H2	0,380	122441490	43,311
	N2			0,000 BDL
	CH4			0,000 BDL
28	CO	1,197	158	0,000

Totals			122441648	43,311
--------	--	--	-----------	--------

TCD - Channel B Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	CO2	0,238	95872022	56,388
	C2H4			0,000 BDL
	C2H6			0,000 BDL
	C3H8			0,000 BDL

Totals			95872022	56,388
--------	--	--	----------	--------

Figura A-2. Reporte cromatográfico representativo de la composición del biogás generado durante los ensayos de FO-LA en modo semicontinuo.

Anexo B. Verificación de supuestos estadísticos para los modelos de superficie de respuesta

Este anexo presenta los gráficos de diagnóstico obtenidos a partir del software *Design Expert*®, con el fin de verificar el cumplimiento de los supuestos estadísticos requeridos para la validez de los modelos de regresión ajustados para la tasa de producción de hidrógeno (HRP) y el rendimiento molar de hidrógeno (HMY). Este conjunto de análisis garantiza la robustez de los modelos presentados y respalda las conclusiones inferidas a partir del comportamiento hidrogenogénico modelado bajo condiciones semicontínuas.

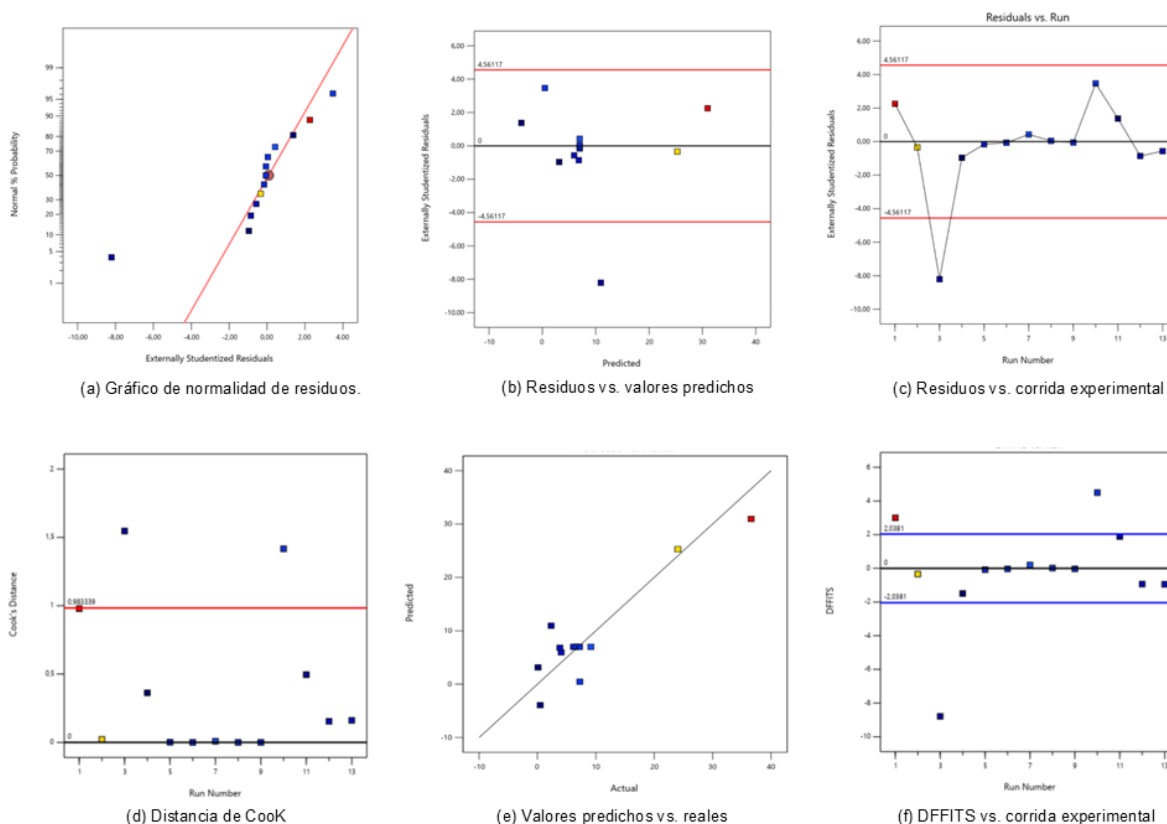


Figura B-1. Gráficos diagnósticos del modelo ajustado para la variable HRP.

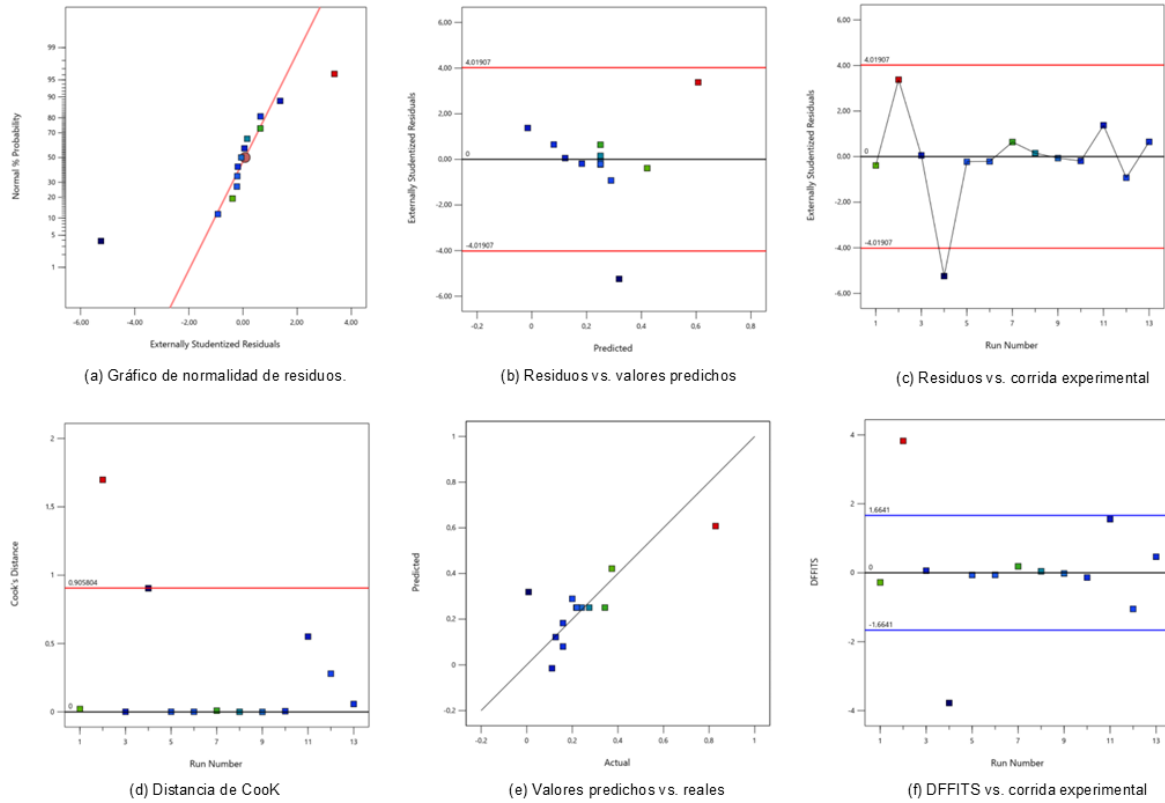


Figura B-2. Gráficos diagnósticos del modelo ajustado para la variable HMY.

Anexo C. Funciones de pertenencia utilizadas en el modelo de lógica difusa para HPR

Este anexo presenta las funciones de pertenencia difusas definidas para las variables utilizadas en el sistema de inferencia Mamdani aplicado al modelado de la tasa de producción de hidrógeno (HPR) en función del tiempo de retención hidráulica (TRH) y la concentración de ácido láctico en la alimentación (C_{AL}). Se utilizaron funciones trapezoidales para representar los conjuntos lingüísticos definidos para cada variable.

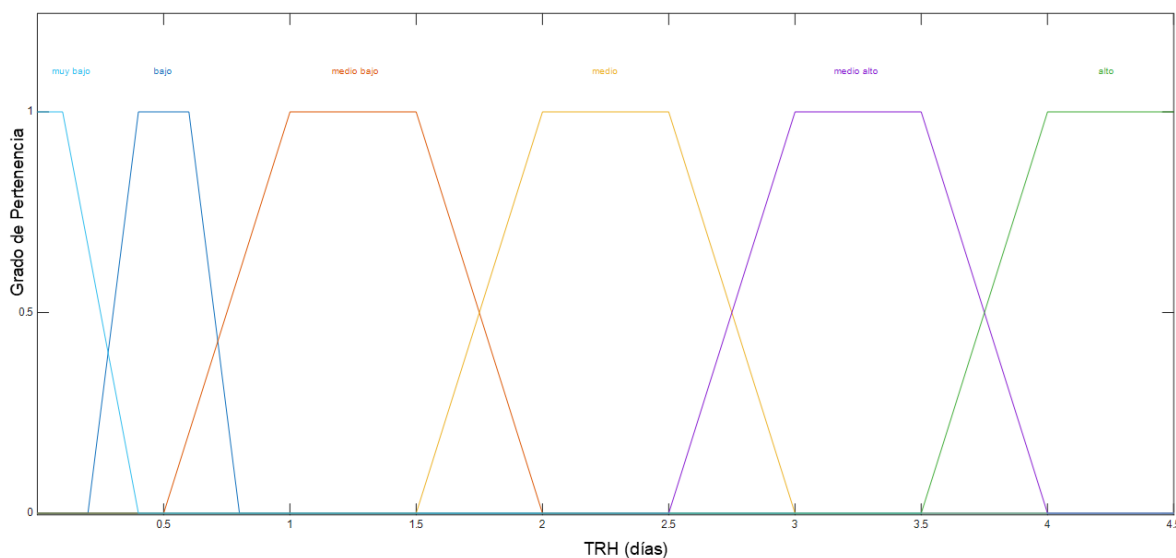


Figura C-1. Funciones de pertenencia para la variable TRH en el rango 0–4,5 días.

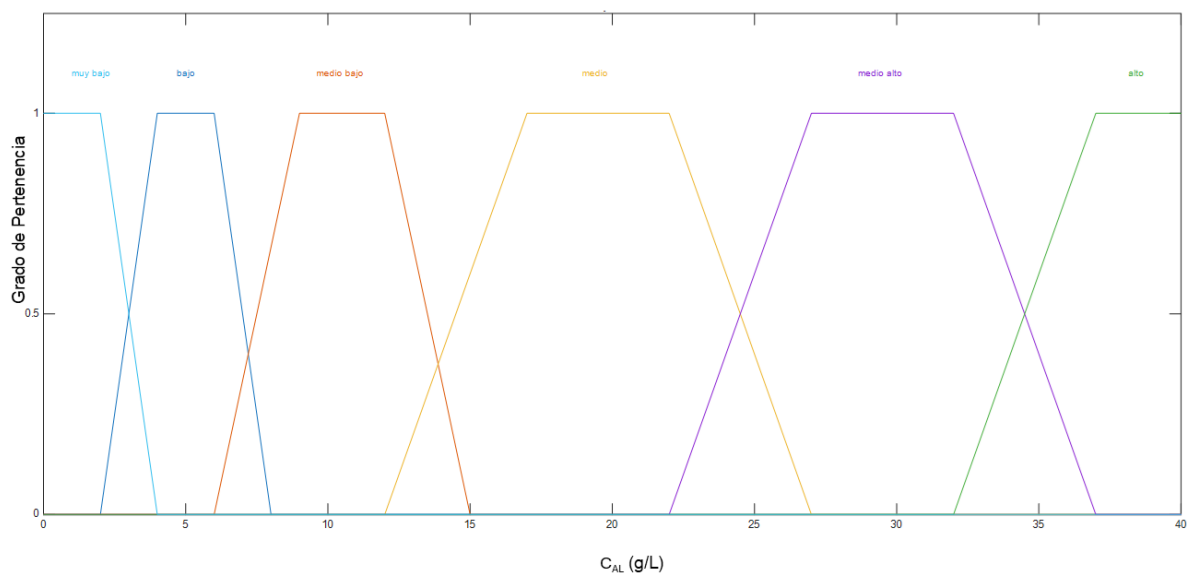


Figura C-2. Funciones de pertenencia para la variable C_{AL} en el rango 0–40 g/L.

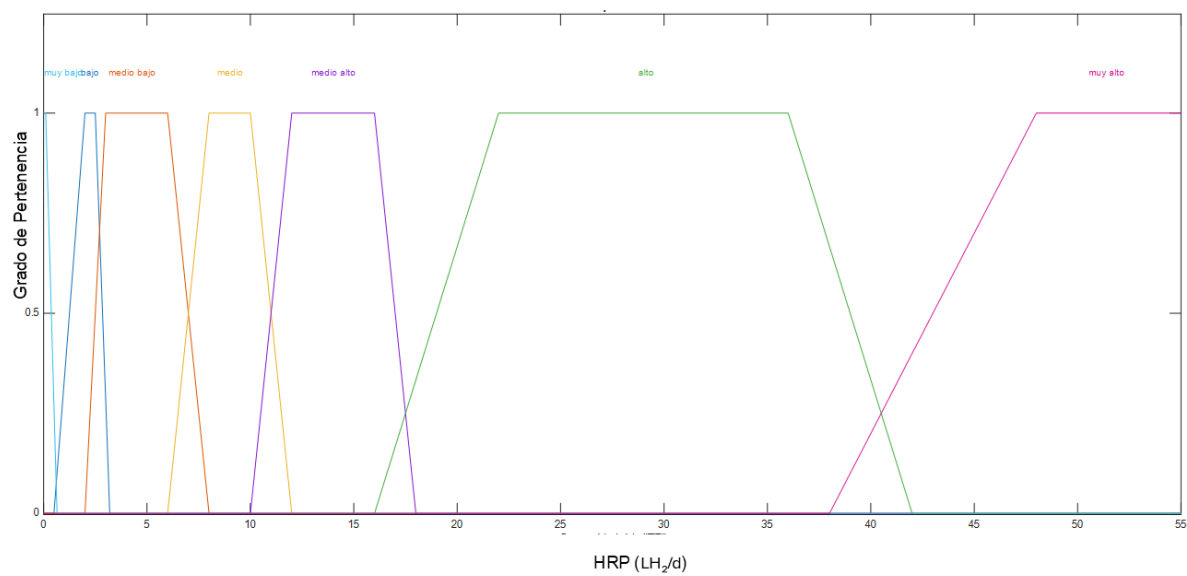


Figura C-3. Funciones de pertenencia para la variable HRP en el rango 0–55 LH_2/d .

Anexo D. Respaldo de identificación bioquímica de aislados bacterianos

Tabla D- 1. Perfiles bioquímicos reportados por LACMA para los aislados bacterianos evaluados.

Código	Microorganismo consistente	Oxidasa	Catalasa	Glucosa	Movilidad	Indol	Manitol	Agar leche	Actividad lecitinasa	Agar HiCrome	Agar Sangre
CHL5M	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	Blanca	No hemolítica
C5M	<i>Klebsiella spp.</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	Colonia Rosada	No hemolítica
C7T	<i>Rummeliibacillus stabekesii</i>	-	+	+	-	-	+	+	-	Naranja, gelosa	No hemolítica
H5M	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	Colonia Rosada	No hemolítica
HL7T-1	<i>Bacillus badius</i>	-	+	-	+	-	-	+	-	humedad Rosada	No hemolítica
H7T-2	<i>Enterobacter sp.</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	Colonia verde, humedad	No hemolítica
L7T	<i>Bacillus cereus sensu lato</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	Colonia blanca	β-hemolítico
L5T-2	<i>Bacillus pumilus</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	Colonias azules	β-hemolítico
L9T	<i>Lysinibacillus spp.</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	Colonia amarilla	β-hemolítico
C5T	<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	+	-	-	+	+	-	Naranja, gelosa	β-hemolítico

Los signos “+” y “-”, indican que las reacciones fueron positivas o negativas respectivamente. Las identificaciones corresponden a microorganismos consistente con los perfiles bioquímicos reportados por LACMA, obtenidos mediante pruebas bioquímicas convencionales y comparación con esquemas de referencia microbiológica.

C: inóculo iniciador (control); H: efluente asociado a alta HPR; L: efluente asociado a baja HPR. “H y L” indica aislamiento observado en ambas condiciones; “C, H y L” indica aislamiento observado en las tres muestras; HPR: tasa de producción de H₂. HPR: tasa de producción de H₂.

		INFORME DE RESULTADOS FISICOQUIMICO/MICROBIOLOGIA LAC-PS-FR-069					
		Versión: 00		Fecha: 22-01-2025		Página 1 de 2	

REFERENCIA:	4725-25
-------------	---------

INFORMACIÓN DEL CLIENTE		
Empresa solicitante: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín	NIT: 899.999.063-3	Contacto: Cindy Yurani Correa Villa
Dirección: Carrera 65 No. 59 A 110	Teléfono/fax: 6044309000	E-mail: cycorroav@unal.edu.co

INFORMACIÓN DE TOMA DE MUESTRAS		
Lugar: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín	Responsable: Cindy Correa	Fecha y hora: 2025/10/09 09:00
Tipo de envase-empaque: Caja de Petri Plástica	Temperatura (°C) toma de muestra: 20.0	

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA					
Fecha y hora de recepción: 2025/10/09 09:35	Fecha de inicio de análisis: 2025/10/09	Fecha final de análisis: 2025/10/20	Fecha de elaboración del informe: 2025/10/31	Fecha pactada de entrega: 2025/10/31	Fecha de entrega: 2025/10/31
Temperatura (°C) recepción: 20.0		Descripción de la muestra Cepa CHLSM			
Fabricante: No aplica					
Lote: No aplica		Fecha de fabricación: fecha no especificada	Fecha de vencimiento: fecha no especificada	Cantidad: 1	

PRODUCTO: Caja de petri inoculada					
-----------------------------------	--	--	--	--	--

ÁREA	PARÁMETRO	RESULTADO	m	M	TÉCNICA/MÉTODO	CUMPLIMIENTO
MICROBIOLOGÍA	Identificación Genero y especie	Aislado consistente con <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	-	-	Identificación bioquímica	-

Realiza

Medellín, 2025/10/31

Mayra A. Fuentes V

MAYRA ALEJANDRA FUENTES VANEGAS
 Coordinador LACMA
 Aprueba

NIT: 890980134-1







Alcaldía de Medellín
 Distrito de
 Ciencia, Tecnología e Innovación

WWW.COLMAYOR.EDU.CO

Figura D-1. Ejemplo representativo del reporte emitido por LACMA para la identificación bioquímica de aislados bacterianos obtenidos durante el proceso de fermentación oscura semicontinua.