



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
Posgrado en CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

**PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE  
BIOMASA RESIDUAL DEL PROCESO DE BIOETANOL  
EMPLEANDO HARINA DE SEMILLAS DE *Brosimum  
alicastrum***

Tesis que presenta

**ING. RICARDO DANIEL JUSTO RODRÍGUEZ**

En opción al título de  
**GRADO MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA  
RENOVABLE**

Mérida, Yucatán, México

2024

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE*



**DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que, a razón de lo anterior, y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_

*Ricardo Daniel*

Nombre: Ricardo Daniel Justo Rodríguez

Merida, Yucatan, Mexico, a 07 de marzo de 2024

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN ENERGIA RENOVABLE*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Ricardo Daniel Justo Rodríguez** titulado “**Producción de biohidrógeno a partir de biomasa residual del proceso de bioetanol empleando harina de semillas de *Brosimum alicastrum***”, fue realizado en la Unidad de Energía Renovable, en la línea de investigación de Bioenergía, en los laboratorios ERU 19 y 20 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Raúl Tapia Tussell** y la Codirección de la **Dra. Liliana Alzate Gaviria**, pertenecientes al Programa de Posgrado en Ciencias en Energía Renovable de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 07 de marzo de 2024

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada no. 800395 para la realización de la presente investigación.

Al CICY y a la Unidad de Energía Renovable por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en los laboratorios ERU 19 y 20.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell, por su dirección, apoyo, guía, consejos, revisiones, seguimiento y paciencia que me otorgo durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Liliana Alzate Gaviria por sus consejos, revisiones y seguimiento en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda por sus observaciones y comentarios en el seguimiento de tesis.

A la Dra. Galdy Hernández Zárate por el apoyo en la revisión y corrección de la tesis, así como comentarios y observaciones para el mejoramiento de este trabajo.

Dr. Mauricio Alberto Escalante Soberanis por sus observaciones y comentarios en la revisión de tesis,

A la Dra. Elda Isaura España Gamboa por su apoyo técnico en el análisis elemental de muestras y enseñanza y capacitación en el uso de métodos de cromatografía de gases, guía y asesoramiento de resultados, consejos y observaciones en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Edgar Olguin Maciel por todas las asesorías, consejos y ayuda con comentarios y observaciones en la realización de este trabajo.

A la I.Q.I Tanit Toledano Thompson por su apoyo técnico en el uso de campanas de extracción, autoclave y buenas prácticas de laboratorio.

Al M.C Jorge Domínguez Maldonado por sus consejos y asesoría técnica en este trabajo.

Al M.C Martín Baas López por su disponibilidad y apoyo en la realización del análisis elemental de las muestras.

A la Lic. Julia González Montilla por el apoyo administrativo correspondiente, así como de la ayuda en cuanto al transporte.

A David y Johana por su apoyo y contribución en el desarrollo de pruebas para la mejora de este trabajo.

A mis compañeros y amigos Andrés, Edwin, Roberto, Aurora, Michelle, Mariana, Eréndira y Marianna por su compañía y apoyo dentro y fuera del laboratorio, por haber hecho agradable esta etapa con momentos divertidos con café y pan.

A mi familia por la paciencia, confianza, motivación y apoyo para la realización de mis metas. Un logro compartido el cual no habría sido posible sin sus consejos y presencia.

## **DEDICATORIA**

**A Dios**

**A mi madre Susana**

**A mis abuelos**

**A mis hermanos**

**A mis tíos**

**Por estar siempre presentes, por su cariño, los amo.**

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES .....	3
1.1 Hidrógeno .....	3
1.2 Hidrógeno como combustible .....	3
1.3 Hidrógeno en el mercado .....	4
1.4 Procesos para la producción de hidrógeno .....	4
1.4.1 Reformado de metano con vapor .....	5
1.4.2 Oxidación parcial.....	5
1.4.3 Reformado autotérmico .....	6
1.4.4 Procesos biológicos para la producción de hidrógeno .....	6
1.4.5 Biofotólisis .....	7
1.4.6 Fotofermentación .....	7
1.4.7 Fermentación oscura para la producción de biohidrógeno.....	7
1.5 Sustratos en la producción de biohidrógeno en la fermentación oscura.....	10
1.6 Pretratamiento de sustratos para la producción de biohidrógeno .....	10
1.7 Reactores en la fermentación oscura.....	11
1.8 Factores de operación de la fermentación oscura .....	11
1.8.1 Inóculo y vía metabólica .....	12
1.8.2 Temperatura .....	13
1.8.3 pH .....	13
1.9 Potencial bioquímico de hidrógeno .....	13
1.10 <i>Brosimum alicastrum</i> Sw (Árbol de ramón).....	14
1.10.1 Clasificación y distribución.....	14

1.10.2 Composición y aprovechamiento de la semilla de ramón .....	14
JUSTIFICACIÓN .....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
2.1. Estrategia experimental .....	20
2.2. Materia prima .....	21
2.2.1. Preparación de harina de ramón .....	21
2.2.2. Obtención de sustrato a partir de bioproceso consolidado (RBPC) .....	22
2.2.3. Caracterización de la materia prima .....	22
2.3. Preparación del inóculo.....	24
2.3.1. Caracterización del inóculo.....	24
2.4. Evaluación del potencial bioquímico de hidrógeno .....	24
2.5. Ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno (PBH).....	25
2.6. Medición de producción de hidrógeno .....	28
2.7. Caracterización digestato.....	29
CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
3.1. Perfil elemental y fisicoquímico de harina de HR y RBPC.....	31
3.2. Producción de hidrógeno en pruebas de PBH y PBHCAG (Evaluación inicial).....	32
3.3. Evaluación de diferentes parámetros (S/I, concentración de sustrato y CAG).....	35
3.4. Rendimiento y producción de hidrógeno en pruebas utilizando mejores parámetros (efecto de la concentración de sustrato y relación S/I).....	37
3.5. Perfil elemental y fisicoquímico de pruebas de RBPC y sacarosa .....	39
3.6. Producción de hidrógeno en pruebas de RCBP y sacarosa .....	42
3.7. Efecto del BPC y fermentación oscura en el contenido de azúcares reductores .....	44
3.8. Producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) de CS y PFR y ruta metabólica.....	45

3.9. Recuperación de energía del BPC y fermentación oscura con RBPC .....	46
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Pasos de la biodegradación y vías metabólicas implicadas en la descomposición fermentativa de la biomasa residual (adaptado de Ghimire 2015). .....	8
Figura 2.1 Estrategia experimental para la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura utilizando el residuo del bioproceso consolidado a partir de harina de semilla de ramón con <i>T. hirsuta</i> Bm-2.....	20
Figura 2.2 Etapas de preparación de harina de semilla de ramón.....	21
Figura 2.3 Etapas de proceso de obtención de RBPC.....	22
Figura 2.4 Pruebas de potencial bioquímico de hidrógeno en frascos serológicos de 250 mL. ...	27
Figura 2.5 Pruebas de fermentación oscura y medición de biogás (hidrógeno) mediante desplazamiento de volumen. ....	28
Figura 3.1 Contenido de hidrógeno de PBH and PBHCAG.....	33
Figura 3.2 Producción de hidrógeno (mL) de PBH y PBHCAG. ....	33
Figura 3.3 Producción acumulada de hidrógeno (mL) de PBH, PBHCAG y control.....	34
Figura 3.4 Producción acumulada de hidrógeno (mL) de diferentes relaciones S/I. ....	36
Figura 3.5 Producción acumulada de hidrógeno (mL) de diferentes concentraciones de RBPC (g STV/L),.....	36
Figura 3.6 Producción acumulada de hidrógeno (mL) de diferentes concentraciones de CAG con RBPC.....	37
Figura 3.7 Producción acumulada de hidrógeno (mL) de CS y PFR.....	42
Figura 3.8 Contenido de hidrógeno (%) de CS y PFR. ....	43
Figura 3.9 Contenido de azúcares reductores en diferentes etapas del bioproceso consolidado y fermentación oscura.....	45
Figura 3.10 Contenido de ácidos grasos volátiles en inicio y final de CS y PFR. ....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Comparación de procesos de producción de hidrógeno (adaptado de Nikolaidis, 2017 [45]). .....	9
Tabla 1.2 Pretratamientos aplicados a diferentes sustratos para la producción de hidrógeno. ..	11
Tabla 1.3 Composición de la semilla de ramón ( <i>Brosimum alicastrum</i> ). .....	16
Tabla 3.1 Perfil elemental y fisicoquímico de HR, RBPC e inóculos. ....	31
Tabla 3.2 Rendimiento de hidrógeno, pH y remoción de SV de pruebas de PBH y PBH2 con solo residuo de bioproceso consolidado. ....	37
Tabla 3.3 Caracterización fisicoquímica y elemental de condiciones iniciales y finales en CS y PFR. ....	41
Tabla 3.4 Perfil elemental inicial y final de pruebas de CS y PFR. ....	41
Tabla 3.5 Rendimiento de producción de hidrógeno en modo batch y condiciones mesófilas utilizando diferentes sustratos. ....	44
Tabla 3.6 Recuperación energética de harina de <i>B. alicastrum</i> mediante el bioproceso consolidado y fermentación oscura con base en poder calórico superior. ....	47

## RESUMEN

Hoy en día la búsqueda de satisfacer la necesidad de energía ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías alternas competitivas para la producción de biocombustibles como bioetanol, bioturbosina y biohidrógeno. Como resultado de diferentes trabajos, el concepto de biorefinería es cada vez más usado. El cual tiene como objetivo el procesamiento de la biomasa para la obtención de productos de valor agregado con un plan de cero residuos. En este trabajo se estudió el potencial de producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura a partir de biomasa residual del bioproceso consolidado (RBPC) para la producción de bioetanol a partir de semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*) con *Trametes hirsuta* Bm-2. Se evaluó el efecto de la adición de carbón activado granular (PBHCAG) en ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno (PBH) con RBPC, el efecto de la concentración de sustrato (PBH2) y del volumen de trabajo (PFR), teniendo como control positivo sacarosa (CS). Se obtuvo un rendimiento de producción de biohidrógeno de 125.68 mL H<sub>2</sub>/g-RBPC en pruebas sin CAG (PBH) y de 90.89 mL H<sub>2</sub>/g-RBPC con CAG (PBHCAG), se determinó que el CAG no tuvo un efecto positivo. Las pruebas de PBH con un incremento en la concentración del 50% (PBH2) permitió la mejora del rendimiento de biohidrógeno en un 22.76% (131.61 mL H<sub>2</sub>/g-RBPC). Se demostró que el uso de RBPC como sustrato en la fermentación oscura utilizando una concentración de 7.5 g/L de SV-RBPC permitió mantener un pH por encima de 5.0 (valor mínimo requerido) sin control continuo de pH, esto debido a la presencia de fosfatos en el RBPC, actuando como buffer. El mayor rendimiento de producción de hidrógeno con RBPC se obtuvo en pruebas con un volumen de trabajo de 2.8 L siendo de 1.75 mol H<sub>2</sub>/mol-glucosa, esto represento el 92% del rendimiento molar obtenido utilizando sacarosa, en mismas condiciones (1.89 mol H<sub>2</sub>/mol-glucosa).

## ABSTRACT

Nowadays, the search to satisfy the need for energy has led to the development of new competitive alternative technologies for the production of biofuels such as bioethanol, bioturbosine and biohydrogen. As a result of different works, the concept of biorefinery is increasingly used. Which aims to process biomass to obtain value-added products with a zero waste plan. In this work, potential for biohydrogen production through dark fermentation from residual biomass from the consolidated bioprocess (RBPC) was studied for the production of bioethanol from ramón seed (*Brosimum alicastrum*) with *Trametes hirsuta* Bm-2. The effect of the addition of granular activated carbon (PBHCAG) was evaluated in biochemical potential of hydrogen (BHP) assays with RBPC, the effect of substrate concentration (PBH2) and working volume (PFR), having as a positive control sucrose (CS). A biohydrogen production yield of 125.68 mL H<sub>2</sub>/g-RBPC was obtained in tests without CAG (PBH) and 90.89 mL H<sub>2</sub>/g-RBPC with CAG (PBHCAG), it was determined that the CAG did not have a positive effect. PBH testing with an increase in concentration of 50% (PBH2) allowed the improvement of biohydrogen yield by 22.76% (131.61 mL H<sub>2</sub>/g-RBPC). It was demonstrated that the use of RBPC as a substrate in dark fermentation using a concentration of 7.5 g/L of SV-RBPC allowed maintaining a pH above 5.0 (minimum required value) without continuous pH control, this due to the presence of phosphates in the RBPC, acting as a buffer. The highest hydrogen production yield with RBPC was obtained in tests with a working volume of 2.8 L, being 1.75 mol H<sub>2</sub>/mol-glucose, this represented 92% of the molar yield obtained using sucrose, under the same conditions (1.89 mol H<sub>2</sub> /mol-glucose).

## INTRODUCCIÓN

Con el aumento de la población mundial, la industrialización y la urbanización, la demanda de energía se ha incrementado a un ritmo acelerado. Actualmente, alrededor del 85% del consumo total de energía en todo el mundo se obtiene de recursos no renovables, como son el carbón, gas natural y petróleo [1].

Sin embargo, la dependencia global de estas fuentes de energía convencionales de combustible se encuentra en un nivel crucial hoy en día. En este sentido, la búsqueda de fuentes alternativas de energía renovable limpia está ampliamente desarrollada [2]. Entre las diversas energías renovables exploradas para sustituir a los combustibles fósiles, el hidrógeno ha recibido gran atención, debido a que es más compatible ambientalmente, es de alto contenido energético y ofrece considerables ventajas económicas y sociales [3]. El hidrógeno se considera un combustible limpio, ya que su combustión solo genera agua, por lo tanto, su uso se ha convertido en una solución factible para afrontar los efectos actuales de los Gases de Efecto Invernadero (GEI), responsables del calentamiento global [4]

Actualmente, la producción directa de hidrógeno en la industria proviene del reformado a vapor de hidrocarburos. Una de las principales razones para su producción de manera industrial se debe a que el hidrógeno no siempre está disponible como sustancia química en la naturaleza, esto en su fórmula molecular  $H_2$  y a menudo se encuentra en forma de compuestos llamados hidruros, donde el átomo de hidrógeno ha adquirido carga parcial negativa o carácter aniónico, denotado ( $H^-$ ) [5–7]. Hoy en día, los combustibles fósiles son el principal material para la producción de hidrógeno. Del total de materia prima utilizada para obtener hidrógeno, el gas natural representa aproximadamente el 49%, los hidrocarburos líquidos el 29%, el carbón 18%; el 4% restante proviene del electrólisis de agua (3.9%) y otras fuentes en donde se incluye la utilización de biomasa (0.1%) [8,9].

Cabe resaltar que la energía producida por el hidrógeno molecular es 2.75 veces mayor que los combustibles provenientes de los hidrocarburos. Además, al ser producido por fuentes renovables como la biomasa tiene potencial para satisfacer la demanda mundial de energía, lo que lo convierte en una alternativa adecuada para solventar la crisis energética actual [10].

De acuerdo con IHS Markit<sup>®</sup>, (*Information Handing Services*), se espera que la demanda global de hidrógeno se incremente durante los próximos cinco años, principalmente como resultado del requerimiento de operaciones de refinería de petróleo, la producción de amoníaco y metanol [11], otras aplicaciones incluyen su uso en la hidrogenación de grasas, pilas de combustible y en vehículos alimentados con hidrógeno [12].

Una alternativa a los procesos que utilizan fuentes fósiles, es la producción biológica de hidrógeno mediante el uso de diferentes sustratos, como son los residuos provenientes de las aguas residuales domésticas e industriales y residuos agroindustriales que contienen principalmente biopolímeros celulósicos y de almidón [13]. El aprovechamiento de la biomasa a partir de residuos o de cultivos energéticos ha sido ampliamente aplicada para la producción de biocombustibles, un ejemplo de ello es el estudio del aprovechamiento de semilla del árbol de ramón como materia prima para la producción de etanol [14], por su alto contenido de carbohidratos (72.25 %) y del cual 61% es almidón [15]. Se ha logrado la obtención de este combustible mediante un bioproceso consolidado con *Trametes hirsuta* Bm-2 [16]. Al final de este proceso, el producto final es un combustible con valor energético (etanol) y la biomasa residual del proceso, la cual, puede ser aprovechada en la alimentación animal o reutilizada como materia prima en el proceso de producción de hidrógeno. Bajo el concepto de biorefinería, el aprovechamiento total de una materia prima a partir de biomasa es un proceso esencial.

El propósito de este trabajo es obtener resultados de producción de biohidrógeno mediante el proceso de fermentación oscura utilizando como sustrato la biomasa residual del proceso de obtención de bioetanol a partir de harina de semillas de *Brosimum alicastrum*.

# CAPÍTULO 1

## ANTECEDENTES

### 1.1 Hidrógeno

El hidrógeno ( $H_2$ ) es el elemento químico más abundante y ligero que existe, su átomo consiste en un electrón y un protón, su peso atómico es de 1.008 unidades de masa atómica [17] se caracteriza por ser un gas incoloro, inodoro e inflamable [18] que se encuentra en nuestro planeta principalmente en el agua y compuestos orgánicos [19].

Es muy importante mencionar que el hidrógeno no es tóxico y es mucho más ligero que el aire, se disipa rápidamente cuando se libera, lo que permite una dispersión relativamente rápida del combustible, y en caso de una fuga lo hace relativamente más seguro que otros combustibles. El Departamento de Energía de los Estados Unidos mostró en su sitio web el historial de seguridad del hidrógeno, mostrando que el hidrógeno puede ser tan seguro como los combustibles en uso generalizado hoy en día. Cabe recordar que el uso seguro de cualquier combustible se centra en prevenir situaciones en las que los tres factores de combustión (ignición, oxidante y combustible) están presentes [17].

### 1.2 Hidrógeno como combustible

El hidrógeno suministra una mayor cantidad de energía por unidad de masa que los combustibles usados actualmente. Su aporte calorífico más alto es de 141.6 MJ/kg y el menor aporte calorífico es de 119.9 MJ/kg. A modo de seguridad es necesario considerar sus características físico-químicas; el hidrógeno a 101.3 kPa, su temperatura de autoignición es de 585 °C, la temperatura de llama de 2045 °C y la velocidad de llama oscila entre 265 cm/s y 325 cm/s [20]. Con la disminución de la presión, la energía mínima de chispa de hidrógeno en el aire es de 0.017 mJ a 101.3 kPa, en comparación con los gases más densos, su energía mínima de ignición es considerablemente menor que la del metano (0.29 mJ) o la gasolina (0.24 mJ). Las fuentes de ignición potenciales de acuerdo con el Estándar de Seguridad de la NASA (Administración Nacional de Aeronáutica y el Espacio) para Sistemas de Hidrógeno, podrían ser principalmente: cortocircuitos eléctricos, llamas, electricidad estática, chispas por trabajos de soldadura o fricción, y caída de rayos [21]. Lo anterior son fuentes que pueden ser controladas o previstas en los protocolos de seguridad para disminuir o erradicar los efectos, que llevarían a un posible incidente o accidente.

### **1.3 Hidrógeno en el mercado**

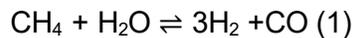
El hidrógeno es un combustible empleado como insumo en plantas de producción de amoníaco y etanol, así como en otras industrias centrales de la red eléctrica, el transporte, la agricultura y el almacenamiento de energía. Se espera que el hidrógeno pueda satisfacer alrededor del 18% de la demanda final de energía para 2050 [22]. En consecuencia, estas numerosas opciones y aplicaciones de producción, hará que el hidrógeno pueda valorarse en condiciones de flexibilidad y el acoplamiento sectorial a los sistemas energéticos [23]. La demanda mundial total de hidrógeno ha aumentado rápidamente desde 255.3 mil millones de metros cúbicos en 2013 a 324.8 mil millones de metros cúbicos en 2020, lo que significa un aumento del 27.2%. Para satisfacer la demanda de hidrógeno, como fuente de energía secundaria, este puede extraerse de sustancias, como los hidrocarburos y el agua, mediante un proceso de conversión de energía, como la termoquímica y la electrólisis del agua [24]. Con ello satisfacer los requerimientos para su uso final como materia prima y combustible en transporte terrestre, marítimo o ferroviario, para lo cual se han desarrollado las hidrogeneras, estaciones de servicio que generan mediante energías renovables hidrógeno el cual se almacena y dispensa para su uso en movilidad y las hidrolineras, estaciones de recarga para dispensar hidrógeno [25]. En 2023 la compañía Iberdrola obtuvo el certificado de Hidrógeno Renovable de AENOR en su planta de Puertollano y la hidrogenera de Barcelona. “El sello AENOR ‘Verificación de hidrógeno renovable’ abarca el proceso de generación, almacenamiento y comercialización de hidrógeno, así como el sistema de gestión de la organización. Este reconocimiento acredita que Iberdrola cumple con la regulación europea establecida, utilizando la tecnología de electrólisis del agua y que la electricidad utilizada para la misma proviene exclusivamente de energías renovables” [26].

### **1.4 Procesos para la producción de hidrógeno**

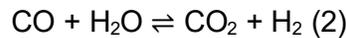
Actualmente las principales tecnologías utilizadas para producir hidrógeno son el reformado de metano a vapor, oxidación parcial de petróleo, gasificación de carbón y electrólisis de agua. El método más económico es el reformado de los combustibles fósiles, el cual provee el 99% del hidrógeno total. Sin embargo, esto no genera un beneficio climático real, ya que se emite CO<sub>2</sub> en el proceso. Alternativas como la electrólisis del agua para producir hidrógeno verde a partir del uso de energías renovables, como la energía eólica terrestre, marina y la energía solar, has sido desarrolladas con el objetivo de reducir las emisiones de GEI (Gases de Efecto Invernadero) a la atmosfera [27].

### 1.4.1 Reformado de metano con vapor

El reformado al vapor de metano (SMR, por sus siglas en inglés) a partir de gas natural o gas de síntesis es ahora económicamente el proceso económicamente más importante de la producción industrial de hidrógeno y también implica la eliminación de hidrógeno de los hidrocarburos [28]. A alta temperatura (700–1100 °C), el vapor de agua y el metano reaccionan para formar hidrógeno y monóxido de carbono (Ecuación 1):



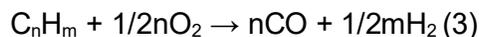
El CO producido puede reaccionar con el vapor para producir H<sub>2</sub> adicional a través de la reacción de cambio agua-gas (Ecuación 2):



### 1.4.2 Oxidación parcial

El método de oxidación parcial (POX, por sus siglas en inglés) consiste básicamente en la conversión de vapor de oxígeno e hidrocarburos en hidrógeno y óxidos de carbono. El proceso catalítico que ocurre a aproximadamente 950 °C, opera con materia prima que va desde metano hasta nafta, mientras que el proceso no catalítico que ocurre entre 1150 - 1315 °C puede operar con hidrocarburos que incluyen metano, petróleo pesado y carbón [29].

Después de la eliminación del azufre, el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) puro se utiliza para oxidar parcialmente la materia prima de hidrocarburos, posteriormente, el gas de síntesis producido recibe el mismo tratamiento que el gas producto del proceso de reformado con vapor. Cabe señalar que se requiere de gran capital para solventar los costos de la planta de oxígeno y de los pasos de desulfuración [30]. En el proceso catalítico, el calor es proporcionado por la combustión controlada y a partir del metano la eficiencia térmica es del 60 – 75% [31]. Los procesos de reformado catalítico y no catalítico se presentan en la Ecuación 3 y 4:



### 1.4.3 Reformado autotérmico

El reformado autotérmico (ATR, por sus siglas en inglés) es la combinación de SMR y POX, donde la oxidación parcial se utiliza para producir reformado de calor y vapor para aumentar la producción de hidrógeno [32]. Por lo tanto, da como resultado un proceso térmicamente neutro. Este proceso funciona correctamente cuando la relación de oxígeno y combustible se controla dentro de un período de tiempo para evitar la formación de coque y también para controlar la temperatura de reacción y la composición del gas [33]. Para el reactor ATR, la temperatura de salida del reactor está en el intervalo de 950 ° C a 1100 °C con una presión de gas que alcanza hasta 100 bares. En ATR, la reacción de reformado y oxidación ocurre simultáneamente como se muestra en la Ecuación 5:



### 1.4.4 Procesos biológicos para la producción de hidrógeno

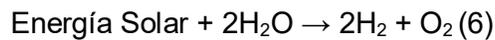
El hidrógeno también se puede producir a partir de procesos biológicos (biohidrógeno) que consumen menos energía y son más respetuosos con el medio ambiente en términos de reducción global de CO<sub>2</sub>. Estas tecnologías de producción de biohidrógeno renovable tienen el potencial de ser competitivas económicamente, ya que pueden utilizar biomasa residual de bajo costo como materia prima [34], por ejemplo, residuos orgánicos municipales, agrícolas, industriales y aguas residuales. El biohidrógeno es producido por microorganismos autótrofos o heterótrofos [34,35]. En las conversiones autótrofas (también conocidas como biofotólisis directa o indirecta), la energía solar se convierte directamente en hidrógeno a través de reacciones fotosintéticas mediadas por microorganismos fotosintéticos, es decir, microalgas (eucariotas) y bacterias fotosintéticas (procariotas), como las cianobacterias. En condiciones heterótrofas, los sustratos orgánicos se transforman en compuestos orgánicos más simples con la producción simultánea de hidrógeno molecular [35,36].

Además, existen dos tipos de conversiones heterótrofas, la fotofermentación llevada a cabo por bacterias fotosintéticas y la fermentación oscura (FO) llevada a cabo por bacterias anaeróbicas que convierten los carbohidratos en biohidrógeno mediante su metabolismo [3].

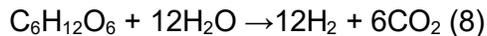
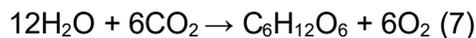
### 1.4.5 Biofotólisis

La biofotólisis es una producción de biohidrógeno impulsada por fotones, y es un método que utilizan las cianobacterias (cianofitas o algas verde-azules) que operan sobre la base de un principio similar al de la fotosíntesis en las plantas. Este proceso se puede clasificar como biofotólisis directa y biofotólisis indirecta [37].

La biofotólisis directa es otro tipo de proceso biológico en el que la energía solar se convierte en energía química mediante sistemas fotosintéticos de microalgas, para producir hidrógeno molecular (Ecuación 6) [38].



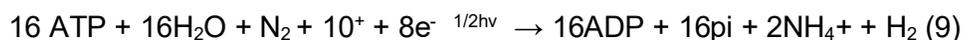
Por el contrario, la fijación de  $\text{CO}_2$  y la acumulación de carbohidratos que ocurrieron en primer lugar durante la fotosíntesis para la biofotólisis indirecta, es seguida de la fermentación de las reservas de carbono que conduce a la producción de hidrógeno, esto se expresa en la Ecuaciones 7 y 8:



A través de este proceso, las cianobacterias y las microalgas pueden producir hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) a partir del glucógeno guardado, y este método ha resuelto el problema de sensibilidad de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) al separar la generación de  $\text{H}_2$  y  $\text{O}_2$  en dos pasos distintos a través de la fijación de  $\text{CO}_2$  [39].

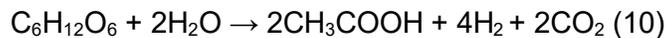
### 1.4.6 Fotofermentación

Los procesos de fermentación que emplean la luz como fuente de energía para la fotosíntesis se conocen como fotofermentación. En comparación con otras rutas, la fotofermentación tiene la ventaja de que la luz puede reemplazar a los azúcares como fuente de energía, lo que reduce la competencia por el uso de la tierra con los cultivos alimentarios. La Ecuación 9 muestra la producción química de hidrógeno a través de la fotofermentación [40]:

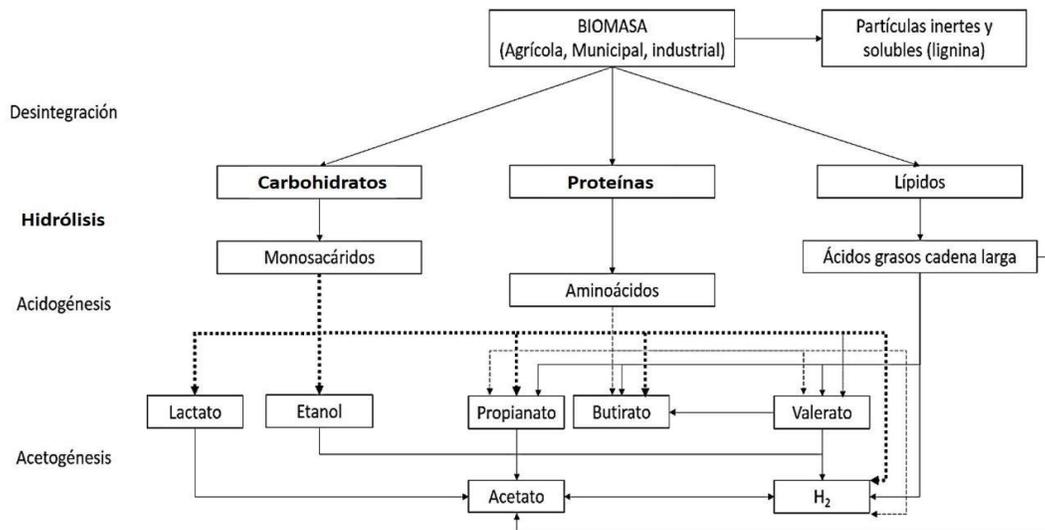


### 1.4.7 Fermentación oscura para la producción de biohidrógeno

La conversión de recursos biológicos en energía por parte de microorganismos catalizadores asistidos por enzimas como las nitrogenasas e hidrogenasas se conoce como fermentación [41]. La fermentación oscura (DF por sus siglas en inglés) en la producción de biohidrógeno tiene un enfoque de menor demanda energética. Este proceso es una técnica tradicional, pero sigue siendo una tecnología favorable con la que se puede reducir la generación de lodos y realizar la recuperación inocua de la energía o nutrientes, incluido el hidrógeno y ácidos grasos de cadena corta que se han logrado producir [42]. Durante la fermentación oscura el hidrógeno molecular ( $H_2$ ), el dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y los ácidos grasos volátiles se producen por microorganismos que degradan los carbohidratos presentes en residuos provenientes de sectores como la industria alimentaria, papelera, agrícola y residuos municipales [43]. Con la glucosa como sustrato modelo, los ácidos acético y butírico constituyen más del 80 % del total de productos finales y en teoría, los rendimientos de  $H_2$  son de 4 mol y 2 mol por cada mol de glucosa en fermentación de tipo acética (Ecuación 10) y butírica (Ecuación 11), respectivamente [44].



La ruta metabólica del proceso de fermentación oscura se puede observar en la Figura 1.1 [3].



**Figura 1.1** Pasos de la biodegradación y vías metabólicas implicadas en la descomposición fermentativa de la biomasa residual (adaptado de Ghimire 2015).

Las bacterias fermentativas oscuras no requieren energía externa, únicamente emplean la energía administrada en el sistema para el funcionamiento del reactor. Debido al bajo consumo

de energía y la operación con una amplia variedad de sustratos (residuos agrícolas, forestales, e industriales), la fermentación oscura es económicamente factible y tiene una gran importancia en la generación de H<sub>2</sub> y la reducción de residuos. Además, el efluente procedente de la fermentación oscura contiene compuestos como lo son los ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido butírico, ácido láctico) y etanol los cuales pueden recuperarse y utilizarse como producto final de valor agregado o bien utilizarse como materia prima para otro proceso [40]. En la Tabla 1.1 se mencionan las eficiencias de los procesos para la producción de hidrógeno y algunas de las ventajas y desventajas principales en su utilización [45].

**Tabla 1.1** Comparación de procesos de producción de hidrógeno (adaptado de Nikolaidis, 2017 [45]).

Proceso	Eficiencia (%)	Ventajas	Desventajas
<b>Reformado de vapor</b>	74-85	Tecnología desarrollada e infraestructura existente	CO <sub>2</sub> como producto y dependiente de combustibles fósiles
<b>Oxidación parcial</b>	60-75		
<b>Reformado autotérmico</b>	60-75		
<b>Biofotólisis</b>	10	Consumo de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> como producto	Requiere luz solar bajos rendimiento de H <sub>2</sub> debido a características de la materia prima, sensibilidad al O <sub>2</sub>
<b>Fermentación oscura</b>	60-80	Producción de H <sub>2</sub> sin luz, aprovechamiento de residuos orgánicos	Requiere grandes volúmenes, conversión baja de materia prima
<b>Fotofermentación</b>	0.1	Aprovechamiento de residuos orgánicos y aguas residuales.	Requiere luz solar, requiere grandes volúmenes de reactor, sensibilidad al O <sub>2</sub>
<b>Electrólisis</b>	40-60	O <sub>2</sub> como único producto, no genera emisiones si se usan energías renovables, infraestructura existente.	Problemas por corrosión en sistema, elementos tóxicos, grandes costos.

Entre los procesos existentes, siguen prevaleciendo aquellos que usan combustibles fósiles, los cuales presentan los mayores rendimientos en cuanto a eficiencia. Estos procesos pueden

implementar captura de carbono y control de emisiones como primera parte en cuanto a la transición de un mejor desarrollo de la economía del hidrógeno [46]. Por otra parte, entre los procesos biológicos, la fermentación oscura destaca en cuanto a rendimiento de producción de hidrógeno.

### **1.5 Sustratos en la producción de biohidrógeno en la fermentación oscura**

Principalmente el costo, la logística y el suministro de materia prima, son limitantes que afectan la economía de uso de biomasa para técnicas de producción de hidrógeno de manera biológica [47]. La biomasa que es adecuada para la producción de biohidrógeno, se divide de forma general, en dos categorías, los cultivos bioenergéticos y desechos agrícolas. En función de su origen, se pueden clasificar además como biomasa orientada a plantas o animales. En extensión, se aprovechan cultivos microbianos mixtos o puros para la bioconversión de biomasa vegetal en hidrógeno, y los modos operativos en lote que son empleados han sido sustituidos recientemente por experimentos continuos de producción de hidrógeno [48].

El sustrato es un factor crucial que influye significativamente en la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura [49]. Las bacterias fermentativas oscuras anaeróbicas son capaces de producir hidrógeno a partir de diversas fuentes de carbono, como azúcares simples (por ejemplo, glucosa, sacarosa y lactosa), desechos que contienen almidón y celulosa, procedentes de residuos de la industria alimentaria, aguas residuales [50], biomásas lignocelulósicas y la fracción orgánica de desechos sólidos municipales [51].

### **1.6 Pretratamiento de sustratos para la producción de biohidrógeno**

La concentración de sustrato es un parámetro importante en la fermentación para producir biohidrógeno, una mayor concentración de sustrato puede ocasionar inhibición en la producción de hidrógeno [52]. Por otra parte, algunos compuestos complejos requieren un tratamiento previo para que puedan ser metabolizados por las bacterias fermentadoras de hidrógeno [53].

Para mejorar la producción de hidrógeno, se han desarrollado una serie de pretratamiento físicos y químicos, como lo son la aplicación de calor, oxidación química, tratamientos alcalinos, adición de materiales especiales para la mejora de la solubilización de lodos (o sustratos) y/o selección de inóculos [54,55]. Por ejemplo, la hidrólisis de almidón presente en diversos residuos se implementa para obtener monómeros de glucosa y maltosa los cuales son fácilmente accesibles por los microorganismos. El pretratamiento del almidón es comparativamente más simple que el

de otros carbohidratos complejos, como la celulosa y hemicelulosa, ya que puede hidrolizarse en subunidades más pequeñas mediante métodos físicos, químicos y biológicos (enzimáticos) o una combinación de estos métodos [56]. En la tabla 1.2 se muestran los pretratamientos utilizados en diferentes sustratos y rendimientos obtenidos.

**Tabla 1.2** Pretratamientos aplicados a diferentes sustratos para la producción de hidrógeno.

Sustrato	Pretratamiento	Tipo	Rendimiento	Referencia
<b>Macroalga marina (<i>Ulva reticulata</i>)</b>	Microondas-peróxido-ácido	Físico	92 mL H <sub>2</sub> /g-COD	[56]
<b>Pulpa de remolacha</b>	Alcalino	Químico	115.6 mL H <sub>2</sub> /g-COD	[57]
<b>Residuos de comida</b>	Térmico	Químico	148 mL H <sub>2</sub> /g-SV	[58]
<b>Residuos de comida</b>	Ultrasonificación	Físico	149 mL H <sub>2</sub> /g-SV	[59]
<b>Paja de trigo</b>	Enzimático	Biológico	19.63 mL H <sub>2</sub> /g-SV	[60]
<b>Paja de maíz</b>	Molienda	Físico	41.6 H <sub>2</sub> /g-ST	[61]

### 1.7 Reactores en la fermentación oscura

La eficiencia de conversión del sustrato y el potencial de producción de biohidrógeno del biocatalizador microbiano durante la fermentación oscura dependen principalmente de las características del reactor, los parámetros del proceso y las condiciones operativas. El diseño y configuraciones específicas de entradas, salidas, control de pH, agitación, calentamiento y control de temperatura tienen un efecto directo en el rendimiento de los biorreactores. Estos deben tener la capacidad de funcionar con un menor tiempo de retención hidráulica y, además, debe tener la capacidad de limitar el lavado de biomasa[53].

Algunos reactores utilizados en la fermentación oscura emplean la retención de biomasa en gránulos, por ejemplo, los reactores de lodos anaeróbicos de flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés), los reactores de lecho de lodo granular expandido (EGSB por sus siglas en inglés) o los soportes inertes como los reactores de lecho fijo (FBR por sus siglas en inglés), por otro lado están los reactores biológicos secuenciales por lotes (SBR por sus siglas en inglés) y reactores de tanque agitado continuo (CSTR por sus siglas en inglés) [62].

### 1.8 Factores de operación de la fermentación oscura

Los parámetros que influyen en gran medida la producción de hidrógeno son: el tipo y concentración de sustrato, edad del inóculo, uso de cultivos puros o mixtos de bacterias, vía metabólica, pH, temperatura [63], modo de operación (batch o lote continuo) en el reactor, proceso fermentativo (fotofermentación o fermentación oscura), diseño y características del biorreactor [64].

### 1.8.1 Inóculo y vía metabólica

La fermentación oscura se puede llevar a cabo utilizando cultivos puros o mixtos. Los consorcios mixtos como el lodo y el estiércol de vaca contienen diferentes tipos de microorganismos que pueden actuar sobre una amplia gama de sustratos, pero la presencia de consumidores de H<sub>2</sub> como las bacterias metanogénicas reduce el rendimiento de producción de hidrógeno [65]. Chang *et al.*, realizaron un estudio para evaluar el efecto de los pretratamientos ácido (HCl), básico (NaOH) y de choque térmico (95°C) sobre el inóculo, resultando en un mayor rendimiento de 1.51 mol H<sub>2</sub>/mol-glucosa mediante tratamiento ácido y utilizando 10 g/L de glucosa como sustrato [66]; mientras que Wang *et al.*, obtuvo un rendimiento de 2.10 H<sub>2</sub>/mol-glucosa empleando choque térmico (80°C) con una concentración de 20 g/L de glucosa [67]. La aplicación de temperatura en los inóculos mixtos es el método más utilizado debido a su practicidad y resultados [68].

La aplicación de múltiples microorganismos con diferentes funciones es una forma eficiente de convertir carbohidratos complejos de sustrato en H<sub>2</sub>, tal como los que degradan y aprovechan el almidón para producir hidrógeno. Ma H *et al.*, utilizaron un cultivo mixto de *Bacillus cereus* ATCC 14579 y *Brevundimonas naejangsanensis* BIO-TAS2-2 para la producción de hidrógeno a partir de almidón. En éste estudio se observó un aumento del rendimiento de hidrógeno de 52% a 62%, en comparación al de una sola cepa, respectivamente [69]. Sin embargo, *Clostridium* sp. y *Enterobacter* sp., son las principales especies que se utilizan comúnmente en la producción de biohidrógeno. Existen dos rutas metabólicas separadas: la vía formiato-piruvato liasa (FPL) la cual se lleva a cabo por el metabolismo anaeróbico facultativo, como por ejemplo *Escherichia coli*; y la vía piruvato: ferredoxina-oxidoreductasa (PFOR), a través de *Clostridium*.

La glucosa en ambas vías se transforma en piruvato a través de la glucólisis, en cuyo proceso el NAD<sup>+</sup> se reduce a NADH y se produce la conversión de ADP en ATP. El intermediario clave es el piruvato, la degradación del piruvato por anaerobios facultativos resulta en formiato mientras que el acetil-CoA es transformado por acción de FPL. Por otro lado, microorganismos anaerobios estrictos producen acetil-CoA, CO<sub>2</sub> y ferredoxina reducida usando PFOR. La producción de

hidrógeno a partir del formiato por el metabolismo anaeróbico facultativo es debido a la Ni-Fe hidrogenasa, alternativamente, la ferredoxina producida promueve la producción de hidrógeno por Fe-Fe hidrogenasa [12].

### **1.8.2 Temperatura**

La fermentación oscura puede llevarse a cabo en condiciones mesófilas (20 °C – 40 °C), termófilas (40 – 65 °C) o hipertermófilas (> 80 °C) [70]. A pesar de que la producción de hidrógeno es mayor en condiciones termófilas (principalmente utilizadas con inóculos provenientes de lodos y estiércol de vaca), las condiciones mesófilas son las más utilizadas, debido a su menor consumo de energía [71,72].

### **1.8.3 pH**

El pH influye directamente en las vías metabólicas llevadas a cabo por los microorganismos, teniendo un impacto en el rendimiento del hidrógeno. Durante la glucólisis, los organismos anaerobios facultativos son capaces de generar hidrógeno por conversión de la glucosa en piruvato. Los metabolitos generados en medio de la descomposición del piruvato, a su vez, influyen en el rendimiento de hidrógeno [73]. Un valor óptimo de pH es de 5.5 en la fermentación oscura, el cual ha sido reportado previamente [74]. Sin embargo, el ajuste de pH inicial durante la fermentación oscura varía según el tipo de sustrato [75], un pH neutro se recomienda para residuos ganaderos, para residuos de cultivo un valor de 6.5 a 7.0 y para residuos de comida se ha reportado un pH de 5 a 6 [76]. Sin embargo, si el pH desciende por debajo de 5.0 la producción de hidrógeno disminuye debido a la formación de metabolitos ácidos y por consiguiente la inhibición de la actividad enzimática [13].

## **1.9 Potencial bioquímico de hidrógeno**

El potencial bioquímico del hidrógeno (PBH) es un procedimiento a escala laboratorio en el cual se evalúa el potencial de un sustrato para la producción de hidrógeno, por ejemplo, biomasa de microalgas, residuos de cultivos agrícolas, plantas acuáticas. Los estudios de esta técnica se centran en analizar el efecto de la composición del sustrato, en cuanto al contenido de carbohidratos o sólidos, la relación con el inóculo y los rendimientos de producción de hidrógeno; Carrillo *et al.*, reportaron los resultados de un protocolo estandarizado para la evaluación del potencial del biohidrógeno [77]. Debido a que estos procedimientos son más simples, cortos y a

pequeña escala en comparación con los experimentos de reactores continuos más complejos a mayor escala que encarecen los costos, éstas pruebas por lotes son sin duda ampliamente recomendados [78].

## **1.10 *Brosimum alicastrum* Sw (Árbol de ramón)**

### **1.10.1 Clasificación y distribución**

El árbol de ramón (*Brosimum alicastrum*), toma su nombre científico del griego *brosimos*, que significa comestible. En México y Guatemala se le conoce como “ramón”. Este nombre, que proviene del verbo ramonear, hace referencia a que el ganado vacuno y otros animales domésticos consumen sus semillas, plántulas y hojas [79]. Es originario de los bosques húmedos de América tropical y se distribuye en las zonas tropicales de América, desde México hasta el norte de Brasil, incluyendo las Islas del Caribe [79,80]. En México se encuentra en los estados del Golfo de México y el mar Caribe, desde Tamaulipas hasta Quintana Roo; en la costa del Pacífico desde el sur de Sinaloa hasta Chiapas, y en el centro del país se localiza en los estados de San Luis Potosí, Durango, Estado de México, Morelos y Puebla [81–83].

### **1.10.2 Composición y aprovechamiento de la semilla de ramón**

Diversos estudios indican que alrededor del 75% del peso seco de la semilla de ramón está compuesto por carbohidratos, además, el almidón constituye un 61%, por lo que es el principal componente de la semilla (Tabla 1.3). Por otra parte, esta semilla fue el alimento más importante de los mayas durante el periodo clásico (250-900 d.C), y en los últimos años se ha descubierto que tiene un gran contenido de fibra, calcio, potasio, ácido fólico y vitaminas A, B y C, además de ser una fuente importante de aminoácidos [80].

Se han realizado diversos trabajos enfocados en el estudio del aprovechamiento de la harina de la semilla de ramón.

Barquera en 2014 [15] demostró que la harina de la semilla de ramón tiene potencial para ser empleada como materia prima en la producción de bioetanol, por su alto contenido de carbohidratos (72.25 %) y almidón.

Olgún-Maciel en 2015 [84] para el proceso de producción de bioetanol utilizó diferentes pre-tratamientos térmicos, logrando alcanzar concentraciones de azúcares reductores directos (ARD) de 67 a 97 g/L, equivalente a 50% de producción máxima teórica de azúcares reductores,

logrando un aumento de 33% en comparación con el de harina no tratada y demostrando que los granos de almidón se encuentran embebidos en una matriz proteica que limita su accesibilidad para ser hidrolizados por las enzimas amilolíticas.

Posteriormente, en 2017, Olgúin-Maciel *et al.*, [85] realizaron un estudio con el objetivo de producir etanol a partir de harina de ramón aplicando un tratamiento térmico de 90 °C durante 30 min y añadiendo una cepa de levadura nativa (*Candida tropicalis* PL-1) para el proceso de fermentación. Se observó además que la cepa de levadura nativa fue superior a la cepa comercial, fermentando el 98,8% del azúcar reductor a las 48 h y generando un 31% más de etanol que la levadura comercial. En el estudio se señala que una tonelada de harina puede producir 213 L de etanol, lo que sugiere que la harina de ramón es un excelente candidato para la producción de etanol. Es importante resaltar que este fue el primer informe sobre la producción de bioetanol utilizando el almidón de la harina de semilla de ramón y una cepa de levadura nativa aislada de esta materia prima.

En 2019, en un estudio realizado por Jiménez [86], evaluó el efecto del ultrasonido en la actividad enzimática en el proceso de sacarificación de harina de semilla de *Brosimum alicastrum*. Se obtuvieron resultados favorables con el pretratamiento ultrasónico a 45°C durante 60 min, a una potencia de 100 W y una concentración de 0.075U/g de  $\alpha$ -amilasa, obteniendo una concentración de azúcares fermentables de 123.72 g/L, lo que representó un 92% de almidón hidrolizado.

En 2020, Olguin-Maciel *et al.*, [14] realizaron un estudio donde se evaluó el uso de la cepa nativa *Trametes hirsuta* Bm-2 en la producción de bioetanol en un bioproceso consolidado (BPC). La harina de la semilla cruda obtenida del árbol de ramón tuvo 61% de almidón, realizando ensayos a partir de los cuales se encontró que la cepa *T. hirsuta* Bm-2 produjo la enzima amilasa con una actividad de 193.85 U/mL con una alta tolerancia al estrés por etanol y fue capaz de producir directamente etanol a partir de harina cruda a una concentración de 13 g/L, con un rendimiento de producción de 123.4 mL/kg de harina. Finalmente, este estudio demostró el potencial de *T. hirsuta* Bm-2 en la producción de etanol a base de almidón en un bioproceso consolidado que podría implementarse en la industria de los biocombustibles.

En 2021, Garza-Garza [87] realizó un estudio cuyo objetivo fue el desarrollo de una sacarificación y co-fermentación simultánea utilizando las cepas de *T. hirsuta* Bm-2 y *T. hirsuta* RT-1, para hidrolizar el almidón presente en la harina de semillas de ramón; seguido de la adición de levaduras nativas aislada del fruto de *B. alicastrum*, *Candida tropicalis* PL-1 y *Hanseniaspora guilliermondii* TL-3 para fermentar azúcares reductores. Los resultados en el estudio mostraron una mayor eficiencia con el uso de *T. hirsuta* RT-1; un aumento en la concentración de azúcares

reductores con una agitación del hidrolizado con el hongo a 150 rpm a  $32 \pm 2$  °C y la producción de 18.93 g/L de etanol utilizando *Candida tropicalis* PL-1.

Los procesos de generación de etanol a partir de harina de ramón como el BPC generan residuos, los cuales contienen aun materia orgánica, rica en almidón sin hidrolizar; que puede ser utilizado en otros procesos para la obtención de productos con valor energético agregado como es el hidrógeno.

**Tabla 1.3** Composición de la semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*).

Componente						Referencia
Carbohidratos*	Proteína cruda*	Fibra*	Lípidos*	Energía**	Humedad*	
76.1	6.2	11.4	1.6	363	6.5	FAO [88]
77.27	10.87	5.99	-	-	-	Lozano <i>et al.</i> [89]
-	12.8	4.6	-	361	-	Peters y Pardo-Tejeda. [90]
72.25	12.21	4.96	1.1	347.86	5.88	Barquera [15]

\* g en 100 g de semilla en base seca.

\*\*Kcal en 100 g de semilla en base seca.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el hidrógeno es un combustible con una alta demanda en diferentes procesos industriales, con una proyección para su uso como combustible en medios de transporte y generación de energía eléctrica. Es considerado un combustible limpio, ya que su uso no genera gases contaminantes como el monóxido de carbono (CO) y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), por tal motivo se ha incrementado el interés en su producción y nuevas aplicaciones, sin embargo, la mayor producción de este combustible es a partir de los combustibles fósiles.

A fin de encontrar un proceso alternativo de obtención de hidrógeno, se han desarrollado nuevas tecnologías a partir del uso de energías y materias primas renovables, reduciendo el impacto ambiental y costos por insumos, además de que los rendimientos sean competitivos en el mercado, como lo es la fermentación oscura, mediante la cual es posible obtener hidrógeno con la utilización de sustratos orgánicos variados (aguas residuales, desechos de alimentos y residuos agrícolas). Para desarrollar una metodología de producción de biohidrógeno a partir de biomasa, es necesario la optimización del proceso de fermentación oscura, la cual no requiere un consumo de una alta demanda de energía.

Por lo anterior, se propone el uso de la biomasa residual generada al final del proceso de producción de etanol con harina de ramón mediante el bioproceso consolidado (BPC) utilizando la cepa del hongo *T. hirsuta* Bm-2, en un proceso de fermentación oscura para la producción de hidrógeno.

Se ha demostrado en diferentes investigaciones el potencial de la semilla de ramón como materia prima en la producción de etanol, debido a su alto contenido de carbohidratos, asimismo, proviene de un cultivo que no es base en la alimentación humana y es un árbol perenne. De igual forma, la biomasa residual proveniente del BPC contiene almidón, azúcares reductores y carbohidratos disponibles, que bien, pueden ser utilizados como sustrato para microorganismos fermentativos en la producción de hidrógeno.

Bajo un concepto de biorefinería, la adición de un nuevo proceso como lo es la producción de hidrógeno, es un avance para el aprovechamiento total de la semilla de ramón, aprovechando el residuo de cada etapa obteniendo un producto de valor agregado.

## HIPÓTESIS

Mediante un proceso de fermentación oscura se puede obtener biohidrógeno utilizando como sustrato la biomasa residual del bioproceso consolidado de bioetanol a partir de harina de *Brosimum alicastrum* con *Trametes hirsuta* Bm-2.

## OBJETIVO GENERAL

- Producir biohidrógeno utilizando biomasa residual del bioproceso consolidado de bioetanol (RBPC) a partir de harina de *Brosimum alicastrum* y *Trametes hirsuta* Bm-2.

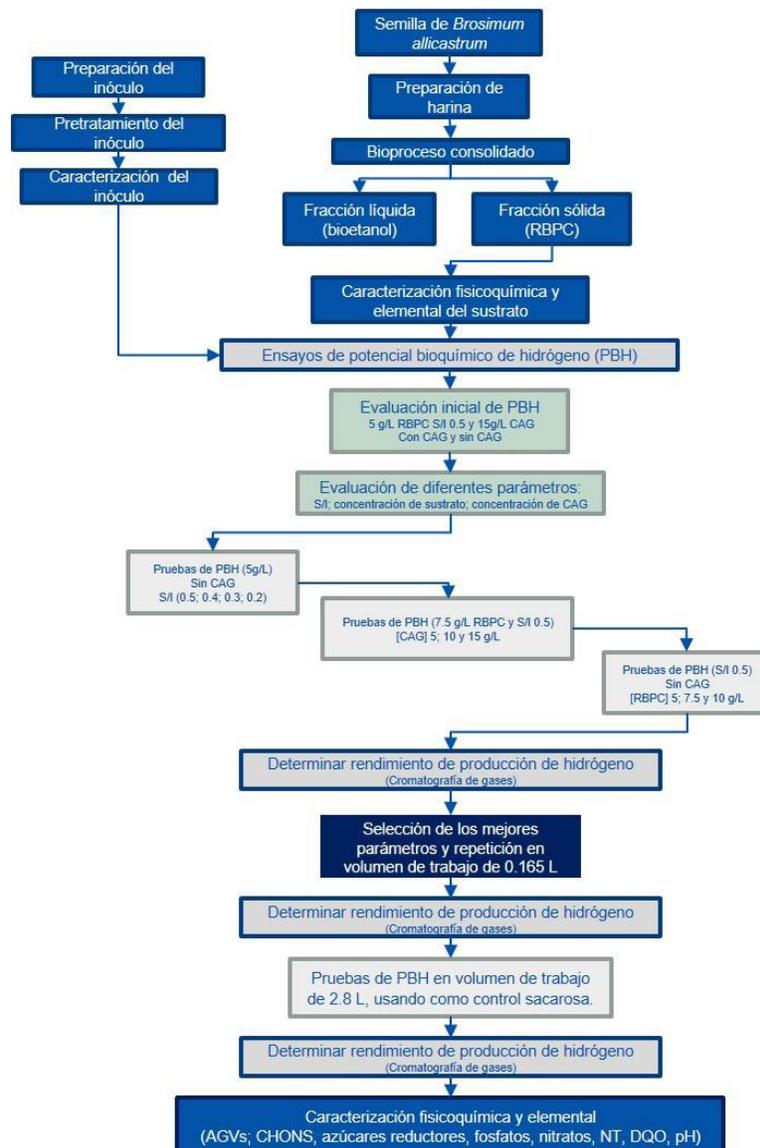
## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímicamente la biomasa residual del bioproceso consolidado de bioetanol (BPC) a partir de semilla de *Brosimum alicastrum* con *Trametes hirsuta* Bm-2.
- Determinar la contribución del carbón activado en el potencial bioquímico de hidrógeno (PBH) a partir de biomasa residual del bioproceso consolidado
- Caracterizar fisicoquímicamente las condiciones de operación (pH, temperatura) en el proceso de producción de hidrógeno, para su optimización.
- Determinar el rendimiento de producción de hidrógeno en escala laboratorio de dos diferentes volúmenes de trabajo (0.165 mL y 2.8 L).

## CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental para determinar el rendimiento de producción de hidrógeno mediante fermentación oscura utilizando biomasa residual del bioproceso consolidado (RBPC) a partir de harina de semilla de ramón con *T. hirsuta* Bm-2 e inóculo mixto se esquematiza en la Figura 2.1.



**Figura 2.1** Estrategia experimental para la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura utilizando el residuo del bioproceso consolidado a partir de harina de semilla de ramón con *T. hirsuta* Bm-2

## 2.2. Materia prima

La materia prima utilizada como sustrato en las pruebas de fermentación oscura para la producción de biohidrógeno fue la biomasa residual del bioproceso consolidado (RBPC) con *T. hirsuta* Bm-2 para la obtención de bioetanol, a partir de harina obtenida de semillas de *Brosimum alicastrum* (árbol de ramón) [14]. El procedimiento para la obtención del RBPC se describe a continuación:

### 2.2.1. Preparación de harina de ramón

Para la preparación de harina se utilizaron semillas recolectadas en el mes de abril de 2022. Posterior a ello, se realizó un lavado con agua corriente, se limpiaron para eliminar el pericarpio e impurezas y se secaron en un horno de convección (Binder, modelo 115UL) a 70°C por 72 h. Pasado el tiempo, se retiró manualmente la testa de la semilla, seguidamente se trituró en una prensa hidráulica (Carver, modelo #3912), después se realizó su molienda en una licuadora industrial (Warning Laboratory, NSF, CB15) a 20,800 rpm. Finalmente, se tamizó la harina obtenida en malla #50 (U.S.A STD TEST SIEVE) para obtener harina con tamaño de partícula menor a 300 µm. Las etapas de preparación de harina de ramón se ilustran en la Figura 2.2.



**Figura 2.2** Etapas de preparación de harina de semilla de ramón.

### 2.2.2. Obtención de sustrato a partir de bioproceso consolidado (RBPC)

Los ensayos de BPC se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Olgúin-Maciel *et al.* [16]. Para ello, se prepararon matraces Erlenmeyer con 14% p/v de harina natural de ramón (HR) con agua destilada en un volumen de 100 mL, posteriormente, se esterilizó el medio durante 20 min a 121°C para que en esterilidad se sembrara un disco de 1 cm de diámetro del micelio de *T. hirsuta* Bm-2. Una vez realizada la siembra, se incubó a 35°C durante 12 y 20 días. Al término, se retiró el sobrenadante mediante centrifugación (CRM GLOBE, Centrificient IV) a 3500 RPM por 20 min. El precipitado en lo siguiente denominado como “RBPC” se preservó a -18°C para su utilización en pruebas de potencial bioquímico de hidrógeno posteriores. Las etapas de obtención del sustrato (RBPC) se ilustran en la Figura 2.3.



Figura 2.3 Etapas de proceso de obtención de RBPC.

### 2.2.3. Caracterización de la materia prima

Se realizaron los siguientes análisis para caracterizar la HR y RBPC (sustrato):

**Análisis elemental (C, H, N y S):** La determinación del análisis elemental de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre se realizó en el equipo Thermo Scientific Elemental Analyzer Flash 2000. Se realizaron mediciones con el detector en Modo CHNS, a partir de 3 a 4 mg de HR y de RBPC en contenedores de estaño (ThermoScientific) y 10 mg de óxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) como catalizador (ThermoScientific). [14].

**Humedad:** Se determinó la humedad de la HR y RBPC mediante la norma NREL/TP-510-42621 [91]. Para lo cual se colocaron crisoles en un horno de convección (Binder, 115-UL) a 105 °C, hasta peso constante. La HR y RBPC se homogenizaron individualmente y se colocaron en los crisoles a 105 °C durante al menos 4 horas en un horno (Binder 115-UL) hasta peso constante. Cada muestra se analizó por triplicado. Para determinar el porcentaje de humedad se empleó la siguiente fórmula:

$$\%humedad = 100 - \left( \frac{\text{peso de crisol con muestra seca} - \text{peso de crisol}}{\text{peso de muestra}} \right) \times 100$$

**Determinación de sólidos totales (ST) y volátiles (STV):** Para determinar sólidos totales y sólidos volátiles se siguió la metodología de las normas NREL/TP-510-42621 [91] y NREL/TP-510-42622 [92] y NREL/TP-510-42622 [94] y se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$ST \text{ mg/mL} = \left( \frac{\text{peso de crisol con muestra seca} - \text{peso de crisol seco}}{\text{mL de muestra}} \right)$$

Para determinar los sólidos volátiles los crisoles con muestra seca ingresaron a una mufla (Vulcan, modelo 3-550) a 550 °C durante 180 minutos, transcurrido el tiempo, la muestra se mantuvo a 105°C, posteriormente se realizó la medición de peso hasta que este fuera constante. Para el cálculo de sólidos totales volátiles se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$STV \text{ mg/L} = \left( \frac{\text{peso de crisol con ceniza} - \text{peso de crisol seco}}{\text{mL de muestra}} \right)$$

**Concentración de azúcares reductores:** Los azúcares reductores se cuantificaron mediante el método de Miller [93] con ligeras modificaciones [14]. Las muestras fueron previamente centrifugadas a 3500 rpm, se utilizó 1 mL de muestra del sobrenadante [69] (con diluciones 1:2 y 1:5) se añadió 1.5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), la mezcla se llevó a ebullición a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente se disminuyó la temperatura en un baño de agua fría,

inmediatamente se agregó 7.5 mL de agua destilada. La absorbancia fue leída a 550 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf BioSpectrometer® basic) y la concentración se determinó en base a una curva estándar de glucosa.

### 2.3. Preparación del inóculo

Se preparó un inóculo compuesto de 30 g/L de suelo profundo, 300 g/L de excreta de vacuno, 150 g/L de excreta de cerdo, 1.5 g/L de carbonato de sodio y un litro de agua [94]. Se integraron los materiales, se realizó la mezcla y filtrado manual del inóculo. Posteriormente, se sometió a un pretratamiento térmico [95,96] (100°C durante 20-25 min), con la finalidad de inhibir las bacterias consumidoras de hidrógeno.

#### 2.3.1. Caracterización del inóculo

Se determinó el contenido de humedad, sólidos totales, sólidos volátiles, análisis elemental (C, H, N y S), por triplicado de muestras de inóculo, tal como se enuncia en el apartado 2.1.3.

**Medición de pH:** Se realizó la medición de pH del inóculo con un multímetro portátil (HACH, modelo HQ40d).

### 2.4. Evaluación del potencial bioquímico de hidrógeno

Para la determinación del potencial bioquímico de hidrógeno (**PBH**) se utilizó la biomasa residual del bioproceso consolidado (**RBPC**) como sustrato e inóculo pretratado con edad de 24 a 72 h, en diferentes escalas y concentraciones:

Clave	Condición
C	Control
PBH	5 g-SV/L de RBPC
PBHCAG	5 g-SV/L de RBPC y carbón activado
PBH2	7.5 g-SV/L de RBPC
CS	Control con sacarosa en 2.8L
PFR	7.5 g-SV/L de RBPC en 2.8L

## 2.5. Ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno (PBH)

A continuación, se describen las condiciones que se emplearon en cada ensayo:

**Evaluación inicial de PBH y PBHCAG:** Los ensayos se realizaron en frascos serológicos de 250 mL empleando 5 g/L de sólidos totales volátiles de **RBPC** con 12 días de incubación, el volumen útil fue de 165 mL, manteniendo una relación de 0.5 g STV de sustrato / g STV del inóculo [78]. Para **PBHCAG** se añadió carbón activado granulado en una concentración de 15 g/L. Se utilizó agua destilada para completar el volumen útil. Los frascos se sellaron y se desplazó el aire mediante flujo de nitrógeno para crear un ambiente anaerobio. Posteriormente se incubó cada ensayo por triplicado a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y 150 RPM (Corning® LSE™) [77]. El pH se ajustó a  $5.5 \pm 0.1$  con HCl 3M. Los ensayos se mantuvieron en condiciones de incubación durante 72 h, en los cuales se tomaron muestras del gas producido cada 3, 4, 6 y 8 h, para su análisis en el cromatógrafo de gases Perkin Elmer®.

**Control:** Los ensayos del control con inóculo se realizaron en frascos serológicos de 250 mL, se añadió el volumen de inóculo empleado en **PBH** y **PBHCAG** se añadió agua destilada hasta completar un volumen útil de 165 mL. Los frascos se sellaron y se desplazó el aire mediante flujo de nitrógeno para crear un ambiente anaerobio.

Posteriormente se incubó cada ensayo por triplicado a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y 150 RPM (Corning® LSE™) [77]. El pH se ajustó a  $5.5 \pm 0.1$  con HCl 3M. Los frascos se sellaron y se desplazó el aire mediante flujo de nitrógeno para crear un ambiente anaerobio. Los ensayos se mantuvieron en condiciones de incubación durante 72 h, en los cuales se tomaron muestras del gas producido cada 3, 4, 6 y 8 h, para su análisis por cromatografía de gases.

### **Pruebas de variación de sustrato/inóculo (S/I):**

Los ensayos se realizaron en frascos serológicos de 250 mL empleando 5 g/L de sólidos totales volátiles de **RBPC**, el volumen útil fue de 165 mL, variando la relación de S/I con valores de 0.5; 0.4; 0.3 y 0.2 (g STV de sustrato / g STV del inóculo). Se añadió agua destilada hasta completar un volumen útil. Los frascos se sellaron y se desplazó el aire mediante flujo de nitrógeno para crear un ambiente anaerobio.

Posterior se incubó cada ensayo por duplicado a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sin agitación. El pH se ajustó a  $5.5 \pm 0.1$  con HCl 3M. Los ensayos se mantuvieron en condiciones de incubación durante 40 h, en los cuales se tomaron muestras del gas producido, para su análisis por cromatografía de gases. El volumen promedio acumulado de los diferentes ensayos fue registrado.

**Pruebas de variación de concentración de sustrato:** Los ensayos se realizaron en frascos serológicos de 250 mL, con la relación de S/I de 0.5, variando la concentración de sustrato (5; 7.5; y 10 g/L de sólidos totales volátiles de RBPC), el volumen útil fue de 165 mL. Se añadió agua destilada hasta completar un volumen útil. Los frascos se sellaron y se desplazó el aire mediante flujo de nitrógeno para crear un ambiente anaerobio.

Posterior se incubó cada ensayo por duplicado a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sin agitación. El pH se ajustó a  $5.5 \pm 0.1$  con HCl 3M. Los ensayos se mantuvieron en condiciones de incubación hasta 44 h, en los cuales se tomaron muestras del gas producido, para su análisis por cromatografía de gases. El volumen promedio acumulado de los diferentes ensayos fue registrado.

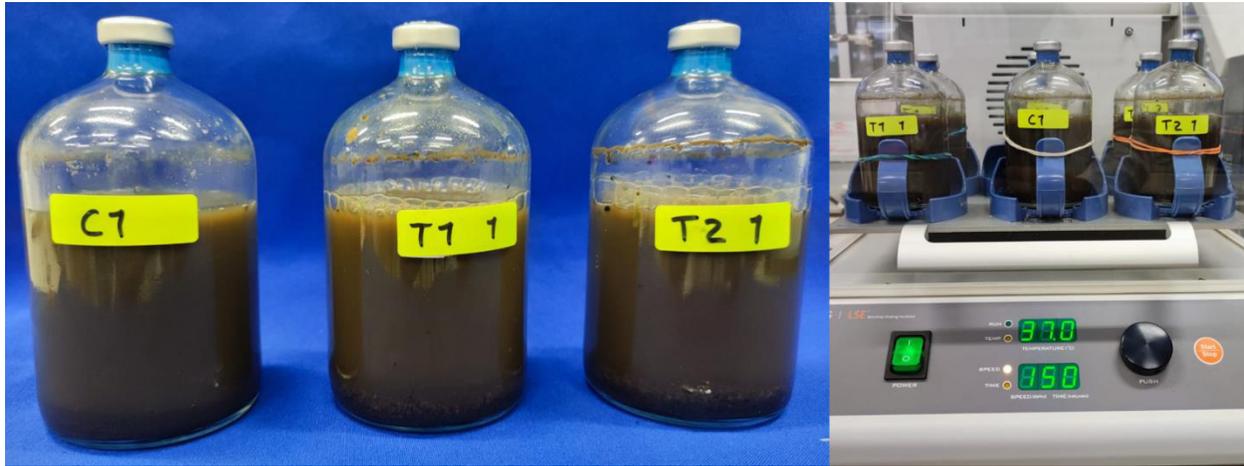
**Pruebas de variación de concentración de CAG:** Los ensayos se realizaron en frascos serológicos de 250 mL, con la relación de S/I de 0.5, utilizando 7.5 g/L de sólidos totales volátiles de RBPC, variando la concentración de CAG (5; 10 y 15 g/L de CAG), el volumen útil fue de 165 mL. Se añadió agua destilada hasta completar un volumen útil. Los frascos se sellaron y se desplazó el aire mediante flujo de nitrógeno para crear un ambiente anaerobio.

Posterior se incubó cada ensayo por duplicado a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sin agitación. El pH se ajustó a  $5.5 \pm 0.1$  con HCl 3M. Los ensayos se mantuvieron en condiciones de incubación hasta 44 h, en los cuales se tomaron muestras del gas producido, para su análisis por cromatografía de gases. El volumen promedio acumulado de los diferentes ensayos fue registrado. Se realizó un control sin CAG bajo las mismas condiciones.

**PBH2 (mejores parámetros seleccionados):** Los ensayos se realizaron en frascos serológicos de 250 mL empleando 7.5 g/L de sólidos totales volátiles de **RBPC** con 21 días de incubación, el volumen útil fue de 165 mL, manteniendo una relación de 0.5 g STV de sustrato / g STV del inóculo. Se añadió agua destilada hasta completar un volumen útil. Los frascos se sellaron y se desplazó el aire mediante flujo de nitrógeno para crear un ambiente anaerobio.

Posterior se incubó cada ensayo por triplicado a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sin agitación. El pH se ajustó a  $5.5 \pm 0.1$  con HCl 3M. Los ensayos se mantuvieron en condiciones de incubación durante 36 h, en los cuales se tomaron muestras del gas producido cada 2 y 3 h, para su análisis por cromatografía de gases. El volumen promedio acumulado de los diferentes ensayos fue registrado.

Las pruebas de potencial bioquímico en frascos serológicos 250 mL en incubación se ilustran en la Figura 2.4.



**Figura 2.4** Pruebas de potencial bioquímico de hidrógeno en frascos serológicos de 250 mL.

**PFR:** Las pruebas de fermentación oscura se realizaron en un fermentador de vidrio de 4 L de volumen total y 2.8 L de volumen útil (Figura 2.2), la concentración de sustrato de RBPC fue de 7.5 g/L de sólidos totales, manteniendo una relación de 0.5 g STV de sustrato / g STV del inóculo. Se añadió agua corriente hasta completar el volumen útil. Los contenedores se colocaron a baño maría durante 35 h, manteniendo una temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y con agitación continua  $\approx 500$  RPM, sobre una parrilla de calentamiento (THERMOSCIENTIFIC, CIMAREC). El pH se ajustó a  $5.5 \pm 0.1$  con HCl 3M. Se realizaron pruebas por triplicado, se tomaron muestras del gas producido cada 1, 2, 3 y 4 h, para su análisis por cromatografía de gases.

**CS:** Las pruebas de fermentación oscura se realizaron en un contenedor de vidrio de 4 L de volumen total y 2.8 L de volumen útil (Figura 2.2), la concentración de sustrato de RBPC fue de 7.5 g/L de sólidos totales, manteniendo una relación de 0.5 g STV de sustrato / g STV del inóculo. Se añadió agua corriente completar el volumen útil. Los contenedores se colocaron a baño maría durante 35 h, manteniendo una temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y con agitación continua  $\approx 500$  RPM, sobre una parrilla de calentamiento (THERMOSCIENTIFIC, CIMAREC). El pH se ajustó a  $5.5 \pm 0.1$  con HCl 3M. Se realizaron pruebas por triplicado, se tomaron muestras del gas producido cada 1, 2, 3 y 4 h, para su análisis por cromatografía de gases.

## 2.6. Medición de producción de hidrógeno

### Cálculo de volumen de biogás

Para calcular el volumen de biogás producido de los ensayos de **C**, **PBH**, **PBHCAG**, **PBH2**, se utilizó la fórmula de gases ideales en condiciones de temperatura estándar [55] (Ecuación 12).

$$V_{biogas} = V \cdot \frac{P_{ensayo}}{P_{STD}} \cdot \frac{T_{STD}}{T}$$

Formula de gases ideales (12)

$V_{gas}$  = volumen calculado del gas (L).

$P_{ensayo}$  = presión del espacio libre (atm).

$V$  = Volumen del espacio libre (L).

$T$  = Temperatura de operación (°K)

$P_{STD}$  = Presión estándar (1 atm)

$T_{STD}$  = Temperatura estándar (273.15 °K)

El volumen de espacio libre fue de 85 mL, posterior a la toma de muestra de gas se realizó la medición de presión (PSI) con un sensor electrónico (IFN, modelo PN2596), al final de cada muestreo y medición se realizó el desfogue cada frasco. [94].

La medición de volumen de biogás en **CS** y **PFR** se realizó mediante el método de desplazamiento de volumen [69,96], en un sistema conformado por un contenedor de agua cerrado herméticamente y conectado al fermentador, tal como se muestra en la Figura 2.5. La medición del volumen desplazado se realizó después de cada toma de muestra de gas. Se realizó el desfogue del fermentador.



**Figura 2.5** Pruebas de fermentación oscura y medición de biogás (hidrógeno) mediante desplazamiento de volumen.

## Cromatografía de gases

Las muestras de gas se analizaron mediante cromatografía de gases (CLARUS 690 PE AutoSystem GC Perkin Elmer) equipado con una columna Elite-Molesieve (PLOT de 30 m x 0.53 mm) con detector de conductividad térmica, se inyectaron 500 µL de muestra. El gas utilizado fue nitrógeno como gas portador a un flujo de 25 mL/min. Se establecieron las temperaturas de operación del inyector, detector y horno a 150 °C, 200°C y 60°C, respectivamente.

Se realizó una curva estándar con hidrógeno con volumen de 100 a 500 µL bajo las mismas condiciones de análisis de muestras. La curva se utilizó para determinar el porcentaje de contenido de hidrógeno.

## Cálculo de producción de hidrógeno

Para determinar el volumen de hidrógeno producido se obtuvo el producto del biogás y el porcentaje de hidrógeno calculado (Ecuación 13).

$$V_{hidrógeno} = V_{biogás} \cdot \%hidrógeno \quad (13)$$

## 2.7. Caracterización digestato

La caracterización del digestato de los ensayos con fermentación oscura incluyó la determinación del contenido de humedad, sólidos totales, sólidos volátiles, análisis elemental (C, H, N y S), pH, concentración de azúcares reductores tal como se describen en apartado 2.2.3; determinación de Demanda Química de Oxígeno, Nitrógeno Total, Nitrógeno Amoniacal, Fosfatos, Ácidos Grasos Volátiles, descritos a continuación:

**Determinación de Demanda Química de Oxígeno:** Se utilizó una dilución 1:100 de muestras para el análisis con el método 8000 de HACH® por digestión para Demanda Química de Oxígeno de rango alto para 0 a 15 g/L. Se utilizaron 2 mL de muestra en el vial con reactivo, se agitó, posteriormente, los viales se colocaron a digestión a 150°C (HACH®, DRB 200) durante 120 minutos, al finalizar, se dejó enfriar los viales a temperatura ambiente, para el blanco se utilizó agua desionizada. Después se realizó la lectura en un espectrofotómetro (HACH® 3900) a 620 nm con el método seleccionado.

**Determinación de Nitrógeno Total:** Se determinó Nitrógeno Total mediante el método de digestión 10072 de HACH® para alto rango 2 -150 mg/L. Se añadió persulfato a cada vial de reactivo de hidróxido para digestión de NT HR, posteriormente se añadió 0.5 mL de cada muestra con una dilución 1:10, para el blanco se utilizó agua desionizada. Los viales se digestaron durante 30 min a 105 °C, al término, se añadió a cada vial el contenido de reactivo A, se dejó reaccionar por 3 minutos, posteriormente, se añadió el contenido de reactivo B, se dejó reaccionar por 2 minutos, finalmente se añadió 2 mL de muestra digerida a un vial con reactivo C, se agitó lentamente, se dejó reaccionar por 5 minutos. Cada vial siendo el blanco el primero, se leyó en un espectrofotómetro (HACH® 3900) a 410 nm.

**Determinación de Nitrógeno amoniacal:** Se determinó nitrógeno amoniacal mediante el método 10031 de HACH® de salicilato para rango alto de 0 a 50 mg/L, se añadió 0.1 mL de una dilución 1:100 de muestra a un vial con el agente de dilución (AmVer), se preparó un blanco con 0.1 mL de agua desionizada, posteriormente se añadió a los viales una almohadilla de salicilato de amonio, después se añadió el contenido de una almohadilla de cianurato de amonio, se agitó hasta diluir los reactivos. Se dejó en reposo 20 minutos, posteriormente en un espectrofotómetro (HACH® 3900) se realizó la lectura del blanco y viales se realizó lectura de la muestra a 655 nm.

**Determinación de fosfatos:** Se determinó la concentración de fosfatos mediante el método 8048 de HACH® PhosVer3, se añadió 5 mL de una dilución 1:100 a partir de la muestra a un vial con el reactivo para prueba de fósforo, se seleccionó el método en un espectrofotómetro (HACH® 3900) se colocó el vial y se ajustó el ZERO, posteriormente se añadió el contenido de una almohadilla de PhosVer3 al vial, se agitó vigorosamente de 10-15 segundos, se dejó reaccionar por 2 minutos, inmediatamente se realizó lectura de la muestra a 880 nm.

**Determinación de ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases:** Para la determinación de AGVs las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 25 minutos, posteriormente, el sobrenadante se filtró con una membrana de 11 µm y 0.2 µm (modificada de [83]), la muestra filtrada se preservó a -20°C hasta su análisis. El análisis se determinó mediante cromatografía de gases (CLARUS 690 PE AutoSystem GC Perkin Elmer) con detector de ionización de llama y columna EliteWAX (30m x 250 µm). Se utilizó nitrógeno como gas de arrastre a un flujo de 10 mL/min. Se establecieron las temperaturas de operación del inyector, detector y horno a 200 °C, 250°C y 230°C, respectivamente. Se preparó una curva con estándar de ácido propiónico, ácido acético y ácido butírico bajo las mismas condiciones.

## CAPITULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Perfil elemental y fisicoquímico de harina de HR y RBPC

Se determinó el contenido de ST, STV, pH y análisis elemental de HR, RBPC e inóculos utilizados para las pruebas de potencial bioquímico de hidrógeno. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Perfil elemental y fisicoquímico de HR, RBPC e inóculos.

Parámetro	HR	RBPC	Inóculo <sup>a</sup>	Inóculo <sup>b</sup>
<b>ST</b>	987.60 ± 0.62	148.33 ± 4.25	69.89 ± 0.61	77.51 ± 1.37
<b>STV</b>	947.97 ± 0.18	143.83 ± 4.15	43.85 ± 0.45	46.19 ± 0.78
<b>Humedad</b>	1.283 ± 0.001	85.17 ± 0.43	93.01 ± 0.06	92.25 ± 0.14
<b>pH</b>	-	5.36 ± 0.02	8.90 ± 0.07	8.76 ± 0.03
<b>C (%)</b>	45.46 ± 0.29	44.16 ± 0.16	32.70 ± 1.61	31.27 ± 0.50
<b>H (%)</b>	6.24 ± 0.02	6.33 ± 0.03	4.53 ± 0.28	4.10 ± 0.05
<b>O (%)</b>	44.16	44.54	22.38	24.37
<b>N (%)</b>	1.71 ± 0.04	1.88 ± 0.05	2.47 ± 0.19	2.36 ± 0.04
<b>S (%)</b>	0.037 ± 0.003	0.06 ± 0.01	0.66 ± 0.06	0.60 ± 0.00
<b>Cenizas (%)</b>	3.03	3.97	37.26	40.41

**Nota:** Porcentaje de C, H, N, S en base seca.

<sup>a</sup> Inóculo utilizado en PBH, PBH2 y PBHCAG.

<sup>b</sup> Inóculo utilizado en CS y PFR.

En primer lugar, se encontró que los valores obtenidos del análisis elemental (CHN) de HR utilizada en este trabajo muestran similitud a los obtenidos por Olguín-Maciel [14]: 41.22% ± 0.80% de C, 6.41% ± 0.02% de H y 2.04% ± 0.10% de N; y Chan-González [97]: 43.63% ± 0.09% de C, 6.37% ± 0.01% de H, 2.20% ± 0.02% de N, sin embargo, la variación existente puede deberse a que las semillas utilizadas fueron colectadas en diferentes regiones y años de cosecha para cada estudio.

Una vez procesada la harina en el bioproceso consolidado, los valores de CHN presentes en el residuo (RBPC) presentaron cambios, cabe resaltar que existe un aumento de contenido de nitrógeno en RBPC en comparación con la harina inicial (Tabla 3.1), este incremento en el porcentaje de N ha sido reportado anteriormente por otros estudios [14,97], y puede estar asociado con trazas del micelio de *T. hirsuta* Bm-2 en el residuo. En cuanto al contenido de

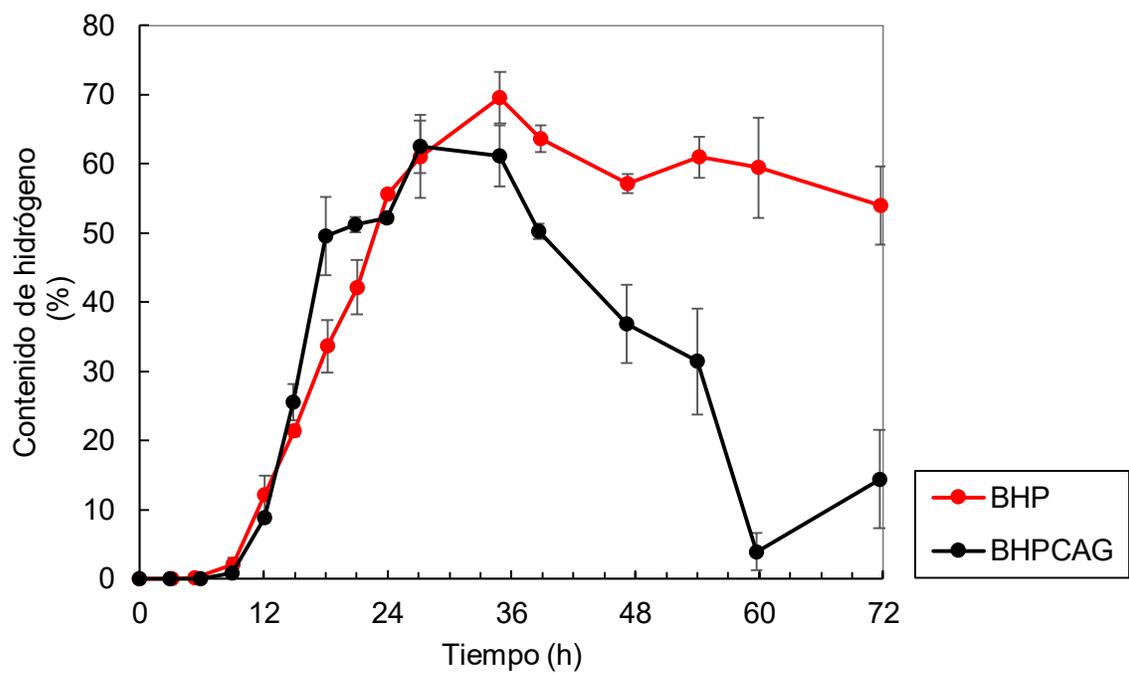
carbón, el valor disminuyó posterior al bioproceso consolidado, esto se debe a la extracción de etanol y azúcares reductores en la fase líquida. En cuanto a los dos inóculos utilizados presentaron entre ellos valores similares en cuanto a su perfil fisicoquímico y elemental, manteniendo una relación C/N de 13.24 a 13.25. (Tabla 3.1).

### **3.2. Producción de hidrógeno en pruebas de PBH y PBHCAG (Evaluación inicial)**

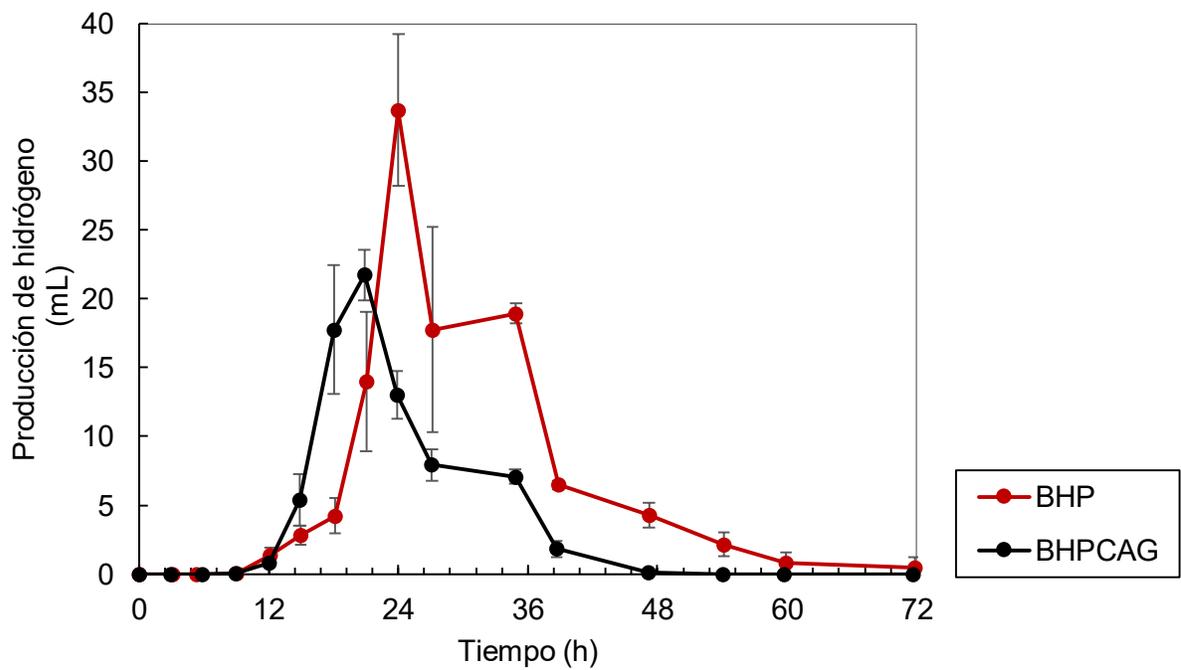
Se realizaron ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno con el fin de evaluar el efecto del carbón activado en la producción biológica de hidrógeno con RBPC.

Durante el análisis del biogás no se detectó la presencia de metano, por lo que el pretratamiento térmico aplicado al inóculo fue efectivo para inhibir la actividad de las bacterias metanogénicas, este tipo de pretratamiento físico sobre cultivos mixtos se ha utilizado con resultados favorables en diferentes estudios en la producción biológica de hidrógeno [4,96,98]. Por otra parte, el comportamiento del contenido de hidrógeno en el biogás de PBH y PBHCAG se presenta en la Figura 3.1, en la que se observa que el pico máximo de contenido de hidrógeno fue de 69.61% a las 34.89 h y 62.49% a las 27.12 h, respectivamente. Se han reportado concentraciones de hidrógeno arriba del 50% utilizando glucosa como sustrato, 50-56% [77,96,98] asimismo, Ma H. y Su H. [69] obtuvieron 56.46% de H<sub>2</sub> utilizando almidón como sustrato principal en operación batch a 35°C, a las 45h, por lo que las pruebas con RBPC fue posible obtener concentraciones superiores a los estudios con azúcares y almidón puro, después de 24 h, cabe resaltar que el RCBP, es un residuo el cual no contiene únicamente azúcares o almidón, si no metabolitos residuales del BPC, además de impurezas por el método de triturado en la preparación de harina de ramón [14,97]. Por otro lado, el contenido de hidrógeno tiende a disminuir después de 36 h (Figura 3.1), sin embargo, PBHCAG tuvo una reducción mayor que PBH, ya que después de ≈ 72h los valores de porcentaje de H<sub>2</sub> fueron 14.40% y 54.02%, respectivamente.

La producción puntal de hidrógeno durante el tiempo se observa en la Figura 3.2, cabe señalar que la concentración de biogás (Figura 3.1) no muestra una relación directa con la producción de hidrógeno (mL), debido a que la máxima producción de hidrógeno para PBH y PBHCAG fue de 33.70 mL a las 24.02 h y 21.73 mL a las 20.86 h, respectivamente, aun cuando no se presentaba la máxima concentración de hidrógeno.

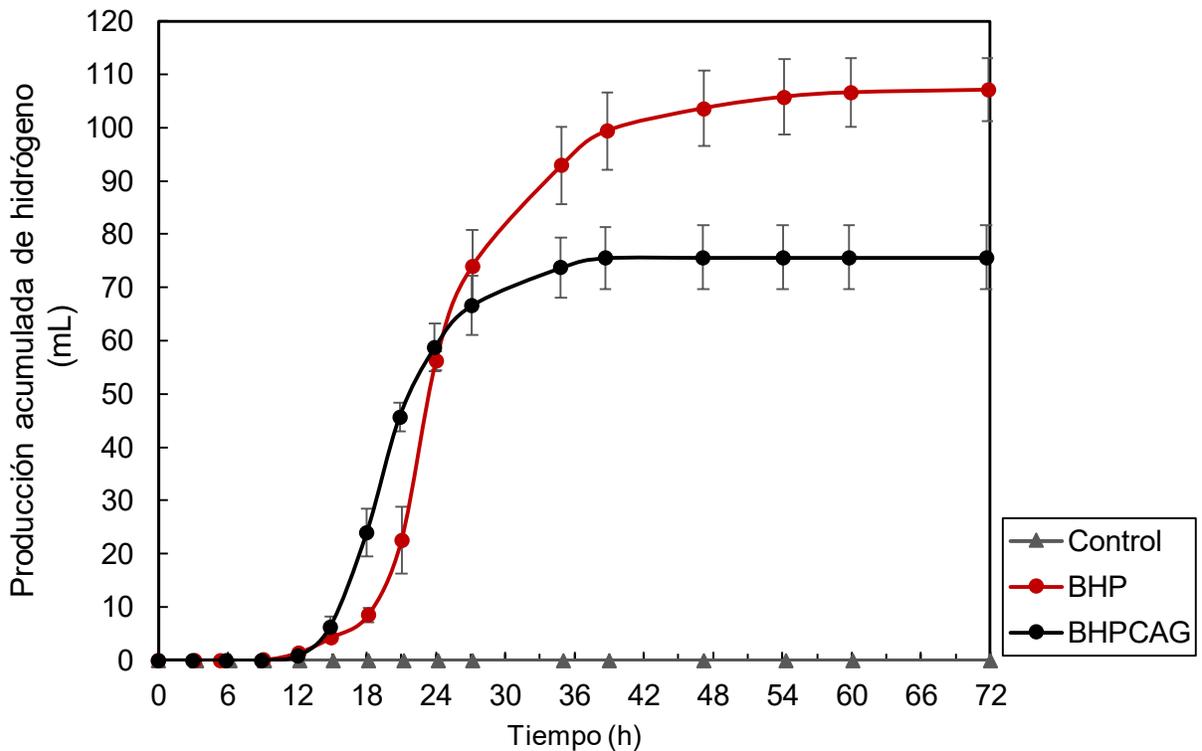


**Figura 3.1** Contenido de hidrógeno de PBH and PBHCAG.



**Figura 3.2** Producción de hidrógeno (mL) de PBH y PBHCAG.

La producción acumulada de hidrógeno se puede observar en la Figura 3.3. El volumen acumulado de H<sub>2</sub> en los ensayos de PBH y PBHCAG fue de 107.06 ± 5.93 mL y 75.62 ± 5.98 mL a las 72 h, respectivamente y considerando la cantidad añadida de sustrato, el rendimiento de hidrógeno en PBH y PBHCAG fue de 15.78 ± 0.87 mL/g-sustrato añadido y 11.15 ± 0.88 mL/g-sustrato añadido, respectivamente; mientras que el control presentó únicamente trazas de hidrógeno (< 1 mL). Esto significa que el uso de solo RBPC representó una producción de hidrógeno 42% mayor que la prueba con CAG. Por otra parte, ambas pruebas muestran un comportamiento estable en la producción de H<sub>2</sub> después de 38h, además de que el 95% de hidrógeno fue producido en un periodo de 36h.



**Figura 3.3** Producción acumulada de hidrógeno (mL) de PBH, PBHCAG y control.

El uso de materiales de soporte como carbón activado granular (CAG) se han implementado en diferentes estudios con el fin de formar una biopelícula fija que ayude a incrementar la producción de hidrógeno [99–102], debido a que el CAG tiene una superficie alta, baja toxicidad y evita la acidificación del sistema, además, su estructura altamente porosa ha permitido la formación de películas de microorganismos [100,101,103]. Park *et al.*, reportaron que la adición de CAG afectó la producción de hidrógeno de *Clostridium butyricum*, activando la vías de producción de hidrógeno (piruvato: ferredoxin oxidoreductasa y 3-oxoácido CoA-transferasa) y suprimiendo las vías de consumo de hidrógeno[102]. Asha *et al.*, y Sybounya *et al.*, [99,100] reportaron que el

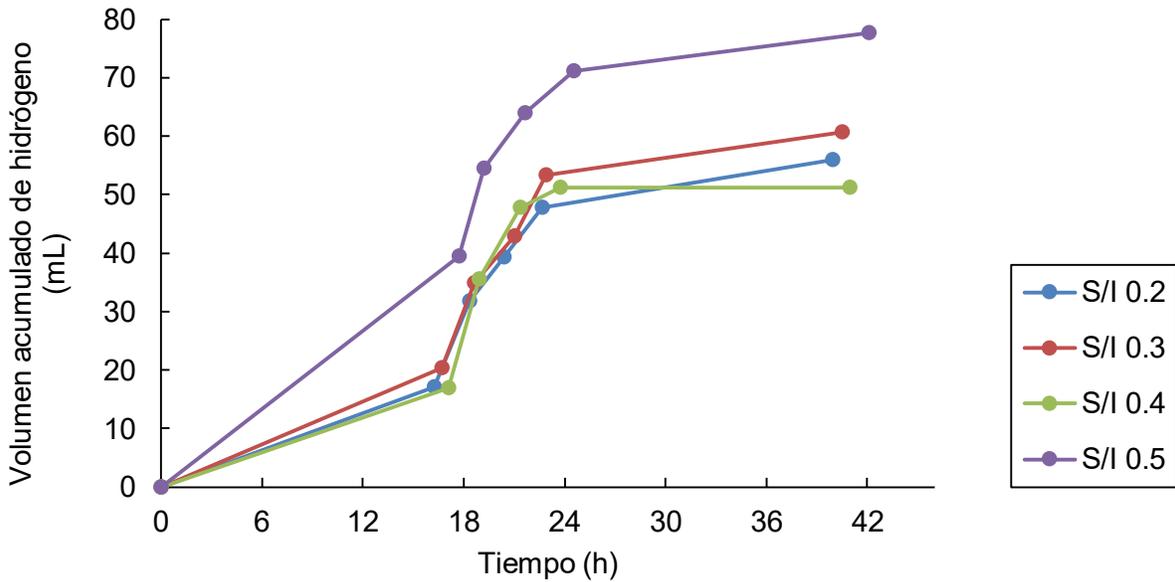
GAC mejoró un 10% la producción en volumen de hidrógeno que el control, utilizando efluente de molienda de aceite de palma y sacarosa como sustrato después de 10 días, respectivamente. Es importante considerar diferentes condiciones como el tiempo de retención hidráulico (TRH), concentración de CAG, la adición de otros materiales de soporte y tipo de proceso. Dzul *et al.*, [101] realizaron una aclimatación de medio sintético y lodo en un modo secuencial por lotes durante 2 días, con el fin de desarrollar una biopelícula en la superficie del CAG, también informaron que el uso de perlas de alginato con CAG puede aumentar la densidad del cultivo y el rendimiento molar de hidrógeno. Park *et al.*, [102] describió que la concentración de GAC tiene un efecto sobre la producción de hidrógeno; a medida que aumentaba la concentración de GAC, también lo hacía el volumen acumulado de hidrógeno, utilizando de 0 a 3 g/L de GAC, y *Clostridium butyricum* como cepa única. En contraste con resultados positivos en la utilización de CAG, la baja producción de hidrógeno con la adición de CAG en este estudio podría estar relacionada con el TRH (72h), siendo menor a otros estudios con resultados positivos, la operación en batch, el uso de un cultivo mixto, además la concentración de GAC podría no ser adecuada. Mientras que otros estudios han utilizado sustratos solubles como glucosa, almidón o medios sintéticos, el RBPC utilizado en este estudio es un sustrato sólido complejo [14], por lo que la accesibilidad de los microorganismos a la fuente de carbono es diferente. Sin embargo, es necesario realizar pruebas utilizando diferentes concentraciones de CAG, cultivo aclimatado y con alimentación discontinua para analizar su efecto sobre el rendimiento de hidrógeno y la producción de metabolitos.

### **3.3. Evaluación de diferentes parámetros (S/I, concentración de sustrato y CAG)**

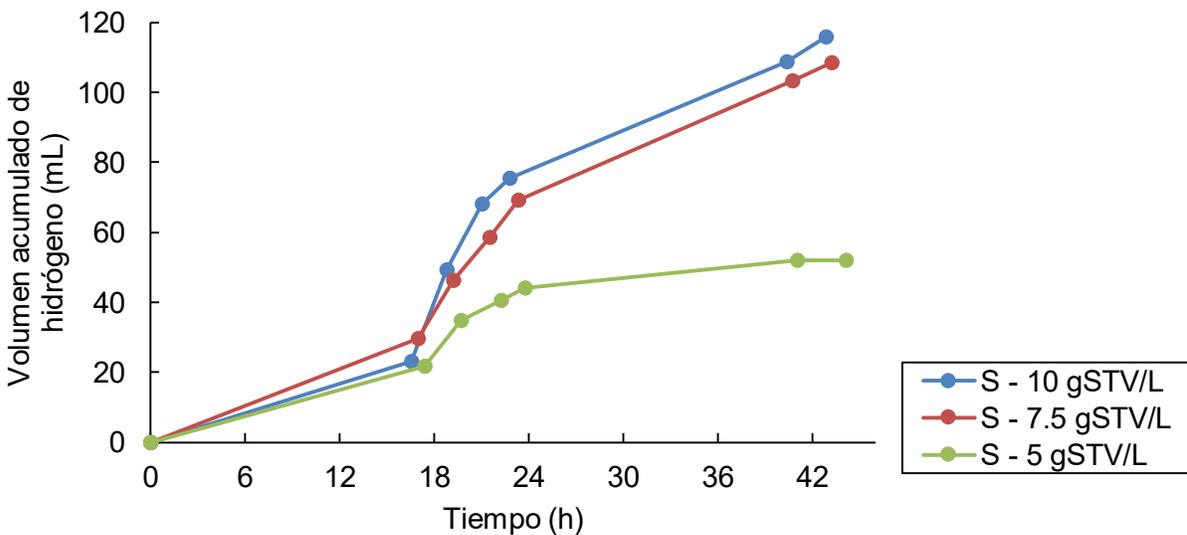
Se realizaron pruebas para analizar las condiciones iniciales propuestas, en las que se utilizaron diferentes valores de relación S/I, concentración de sustrato y CAG. Se realizó primeramente el análisis para evaluar la relación S/I (0.5; 0.4; 0.3 y 0.2), posteriormente se empleó el mejor valor (S/I 0.5) para analizar la variación de concentración de sustrato (5; 7.5 y 10 g/L SVT de RBPC), finalmente, se eligió la mejor condición (7.5 g/L STV de RBPC; 0.5 S/I) para evaluar la variación de concentración de CAG (5; 10 y 15 g/L de CAG). En la Figura 3.4 se puede observar el volumen acumulado de H<sub>2</sub> en cada de una de las condiciones con variación S/I, de las cuales la relación S/I 0.5 produjo el mayor volumen de hidrógeno (77.64 mL), utilizando 5 g STV/L de RBPC. En la Figura 3.5 se muestra el volumen de H<sub>2</sub> de las tres pruebas con diferentes concentraciones de sustrato, el uso de 7.5 y 10 g STV/L permitió obtener un volumen de hidrógeno de 108.59 mL y 116.00 mL, respectivamente, siendo más del doble en comparación con el uso de 5 g STV/L

(51.95 mL), sin embargo, la diferencia del volumen total de  $H_2$ , entre las pruebas con aumento de concentración no fue considerable, por lo tanto, se optó por emplear 7.5 g STV/L. En la Figura 3.6 se muestran los valores de volumen de  $H_2$  acumulado de pruebas con diferentes concentraciones de CAG y su control sin CAG. Los resultados muestran que el uso de CAG (15; 10 y 5 g CAG/L) no contribuyó al aumento de la producción de hidrógeno, siendo mayor el volumen producido (91.08 mL) por el control sin el uso de CAG.

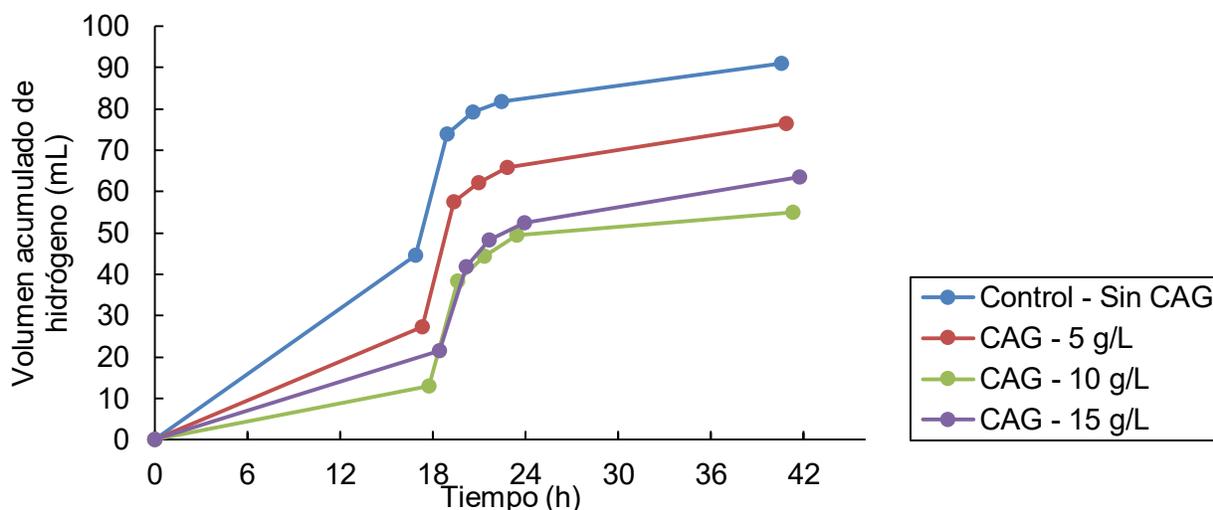
A partir de los resultados obtenidos en estas pruebas se realizaron ensayos con las mejores concisiones, las cuales se describen y discuten en el siguiente apartado.



**Figura 3.4** Producción acumulada de hidrógeno (mL) de diferentes relaciones S/I.



**Figura 3.5** Producción acumulada de hidrógeno (mL) de diferentes concentraciones de RBPC (g STV/L).



**Figura 3.6** Producción acumulada de hidrógeno (mL) de diferentes concentraciones de CAG con RBPC.

### 3.4. Rendimiento y producción de hidrógeno en pruebas utilizando mejores parámetros (efecto de la concentración de sustrato y relación S/I)

Se realizaron ensayos de PBH utilizando 7.5 g-VS/L de RBPC y una relación 0.5 S/I, esta concentración se eligió con base en las pruebas realizadas en colaboración con Ramírez, 2023 con RBPC en la Unidad de Energía Renovable [104]. El tiempo de retención hidráulico (TRH) fue de aproximadamente 36h, considerando que en los resultados de la primera etapa más del 95% del volumen de hidrogeno es producido después de 36h. Los principales parámetros de PBH y PBH2 se presentan en la Tabla 3.2. El rendimiento de hidrógeno se reportó en mL H<sub>2</sub>/g de sustrato agregado y mL H<sub>2</sub>/g de SV agregado.

**Tabla 3.2** Rendimiento de hidrógeno, pH y remoción de SV de pruebas de PBH y PBH2 con solo residuo de bioproceso consolidado.

	<b>PBH (evaluación inicial)</b>	<b>PBH 2 (mejores parámetros)</b>
<b>Producción de Hidrógeno (mL)</b>	107.06 ± 5.93	167.85 ± 3.65
<b>mL H<sub>2</sub>/g sustrato</b>	15.78 ± 0.87	19.52 ± 0.42
<b>mL H<sub>2</sub>/g SV</b>	40.58 ± 2.25	56.37 ± 4.80
<b>pH inicial</b>	5.57 ± 0.01	5.54 ± 0.02
<b>pH final</b>	5.18 ± 0.06	5.43 ± 0.04
<b>SVT inicial (g/L)</b>	15.99 ± 0.01	18.05 ± 1.18
<b>SVT final (g/L)</b>	12.62 ± 0.18	17.01 ± 0.92
<b>Remoción de SV (%)</b>	21.09 ± 0.02	5.72 ± 1.09

La producción de hidrógeno (mL) de PBH2 aumentó un 56.78 % en comparación con PBH con la adición de un 50 % de RBPC con un TRH de  $\approx$  36h. Además, tuvo un rendimiento de hidrógeno de 19.52 mL/g-RBPC añadido, esto significa un 23.7% más que utilizando 5g SV-RBPC/L. La concentración de sustrato es un parámetro importante a considerar en la fermentación oscura (DF). Panin *et al.*, [105] informaron que un alto contenido de SV podría inhibir la actividad bacteriana ( $> 158.5 \pm 0.08$  mg/g de SV), utilizando brócoli en polvo. En un proceso discontinuo, si la concentración de sustrato es demasiado alta, puede provocar una acidificación del medio, por lo que se inhibe el proceso [55]. Por el contrario, Turhal *et al.*, [43] reportó que la producción de hidrógeno aumentó al aumentar la concentración de una mezcla de sandía, debido al mayor contenido inicial de azúcares totales y Dávila *et al.*, [98] documentó las siguientes tasas de hidrógeno: 5.26 mL/h, 10,2 mL/h y 17,43 mL/h utilizando concentraciones de 5 g/L, 15 g/L y 20 g/L de glucosa respectivamente. Chang *et al.*, [66] analizaron el efecto de la concentración de almidón en la producción de hidrógeno. Se llevaron a cabo experimentos para concentraciones de almidón que oscilaban entre 15 y 70 g/L en condiciones termófilas. El mayor rendimiento de hidrógeno (2.82 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa) se encontró utilizando 20 g/L de almidón. Basado en el contenido de almidón de la harina de ramón (61%) [85], se usó aproximadamente 4.72 g/L de almidón teórico y se obtuvo un rendimiento de 1.56 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa, siendo menor. Sin embargo, se debe considerar que las condiciones termófilas consumen más energía que las mesófilas, para lo cual es necesario un balance energético para determinar la viabilidad económica del proceso, además de que la concentración fue casi 5 veces mayor. En cuanto a la concentración de almidón, el rendimiento de PBH2 fue mayor que el reportado por Ma H. y Su H., [69] (1.10 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa) utilizando 10 g/L de almidón de maíz a 35°C con *Bacillus cereus* ATCC 14579 como cepa única, por lo que el uso de RBPC resultó en un rendimiento mayor al uso de únicamente almidón en condiciones mesófilas y con un cultivo mixto, en comparación al uso de un solo microorganismo. Estos resultados variables, están relacionados con las condiciones de temperatura y tipo de inóculo utilizado. Por lo tanto, para mejorar la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura requiere un análisis exhaustivo para cada tipo de sustrato, con el fin de encontrar la concentración óptima, específicamente para RBPC. En relación al pH el valor inicial se ajustó a valores cercanos a 5.5 [60,74,78], debido a que alrededor de este valor hay una acumulación de acetato y butirato por encima de los del ácido propiónico, lo que resulta en una mejor producción de hidrógeno, por el contrario, un pH inferior a 5.0 o superior a 6.5 puede resultar en la inhibición de la actividad hidrogenasa, por lo tanto, un menor rendimiento de hidrógeno [51]. El valor del pH inicial disminuyó al final de la cinética, 5.23

$\pm 0.06$  y  $5.18 \pm 0.06$  para PBH y PBHCAG, respectivamente, estos valores similares sugieren que el CAG no tuvo un efecto en la regulación del pH, mientras que PBH2 tuvo un pH final de  $5.43 \pm 0.04$ , por lo que se mantuvo en un valor más cercano al óptimo al agregar más sustrato. También se ha reportado la disminución en el valor del pH de 6.5 a 4.3 [69] después de 36 h y hasta 4,2 [96]. Dávila *et al.*, [98] reportaron valores finales de 3.8 utilizando glucosa como sustrato. Se puede deducir que existe una mayor capacidad buffer en el medio al usar RBPC como sustrato que utilizando azúcares, lo cual es beneficioso ya que si el pH desciende por debajo de 5.0 la producción de hidrógeno disminuye debido a la formación de metabolitos ácidos, que afectan la capacidad de las células para mantener el pH interno. [51]. Cabe resaltar que no fue necesaria ninguna solución tampón adicional durante estos experimentos.

Los rendimientos de eliminación de STV para las pruebas PBH (Tabla 3.2) fueron similares a los reportados por Pecorini, Baldi e Iannelli [78], en los que se obtuvo una eficiencia de eliminación de STV entre 14.3% y 24.1% utilizando residuos de alimentos y diferentes inóculos. Por el contrario, a pesar de que PBH2 tuvo la menor eliminación de SV, mostro la mejor producción de hidrógeno (Tabla 3.2). Moreno *et al.*, [106] estudiaron el efecto de la relación de residuos de alimentos (S) y lodos activados (I), en la cual analizaron que la eficiencia de la eliminación de SV disminuyó a medida que la concentración de lodos aumentó, la mayor producción de H<sub>2</sub> (65 mL/gSV) y eliminación de SV (51%) se obtuvo al aplicar una relación S/I de 90/10, por el contrario, PBH2 tuvo un rendimiento de H<sub>2</sub> de 56.37 mL de H<sub>2</sub>/g de SV añadido con una relación de S/I de 33/66, menor que la reportada a Moreno *et al.* Se sugiere que la presencia de azúcares reductores o etanol del BPC, fueron aprovechados por los microorganismos para la producción de hidrógeno, incrementado el rendimiento de hidrógeno pese a tener una relación S/I menor.

### **3.5. Perfil elemental y fisicoquímico de pruebas de RBPC y sacarosa**

Las pruebas de PBH se realizaron bajo condiciones controladas (temperatura, agitación, hermeticidad), esto permite saber con precisión qué parámetros tienen efecto en las pruebas de fermentación oscura. Sin embargo, existen otros factores (temperatura ambiente, métodos de medición de biogás producido, almacenamiento del hidrógeno, controles de temperatura y métodos agitación) los cuales no pueden ser controlados de manera rigurosa durante el funcionamiento a mayor escala, por lo que el rendimiento de producción de hidrógeno podría verse afectado.

En este estudio, se realizaron pruebas de fermentación con RBPC en una escala 1:17 considerando el volumen útil, agregando 7.5 g de SV-RBPC (PFR) para evaluar los efectos de

aumento de escala sobre el rendimiento de hidrógeno y la producción de metabolitos. Además, se realizó un control con sacarosa (CS) para comparar el potencial de hidrógeno de RBPC.

Las características iniciales y finales de los experimentos a mayor escala se muestran en la Tabla 3.3. En primer lugar, CS y PFR tuvieron una eliminación de DQO de 0.2% y 2.43%, respectivamente. Por el contrario, se han reportado rendimientos de remoción de DQO entre 16.53-22.18% para aguas residuales con almidón, usando 20.5-24.7g DQO/L. Sin embargo, Carrillo *et al.*, [77] reportaron entre 1% y 11% de eliminación de DQO; en este estudio, la DQO se transformó principalmente en ácidos grasos volátiles e hidrógeno. Dado que 1 mol de H<sub>2</sub> equivale a 16 g de DQO, el proceso de fermentación oscura tiende a una baja eliminación de DQO [107]. Además, la eliminación de SV de CS (28.52%) fue mayor que la de PFR (11.56%); Pecorini *et al.*, [78] obtuvieron un mayor rendimiento de eliminación de SV utilizando sacarosa como sustrato. Además, el rendimiento de remoción de SV de PFR fue un 48 % mayor que PBH2, lo que sugiere que las pruebas a mayor escala (aumentando volumen) optimizó la eliminación de SV.

De acuerdo a diferentes estudios, el amoníaco es un inhibidor en el proceso de fermentación oscura, valores de 3-7 g/L demostraron un efecto negativo en la producción de hidrógeno [108,109] por el contrario, el contenido de amoníaco en este estudio estuvo por debajo de estos valores. Además, se detectó una reducción del contenido de amoníaco, del 70% y 60% para CS y PFR, respectivamente.

En cuanto al contenido de fosfato, no hubo reducción significativa en ambas pruebas; es importante señalar que el RBPC aportó 0.30 g/L respecto al control. Cieciora-Włoch *et al.*, [110] informaron resultados efectivos añadiendo 1 g/L de K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.56 g-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L). El fosfato generalmente se agrega utilizando KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [111], ya que mejora la conversión del sustrato por parte de los microorganismos y tiene una capacidad buffer [112], por lo que la baja disminución del valor del pH del PFR podría atribuirse a la presencia natural de fosfato en el RBPC.

La composición elemental de PFR y CS se muestra en la Tabla 3.4. La relación C/N es un parámetro nutrimental importante; en este estudio se calculó una relación C/N de 15.96 y 12.85 para CS y PFR, respectivamente. Estos resultados son inferiores al valor recomendado por Lin C. y Lay C. (47 C/N) [113]; también, se ha reportado un rango de entre 47 y 200 como valores óptimos, esta relación nutrimental puede tener efectos en la producción de AGV por consiguiente en la producción de hidrógeno [114]. Por lo tanto, se puede decir que el valor óptimo puede estar relacionado a la diferencia de condiciones, sustrato e inóculo utilizados.

En materia de perfil elemental de la biomasa, se calcularon las fórmulas empíricas para CS y PFR iniciales, respectivamente:  $C_{162}H_{287}O_{128}N_9S$  y  $C_{193}H_{332}O_{96}N_{13}S$ ; las fórmulas finales para CS y PFR fueron  $C_{129}H_{227}O_{68}N_8S$  y  $C_{156}H_{265}O_{75}N_{10}S$ , respectivamente. Analizando el cambio de los subíndices elementales, hubo una disminución del contenido de carbono, principalmente relacionada con la producción de  $CO_2$  durante el proceso de fermentación oscura. Igualmente, el contenido de hidrógeno fue menor al final de CS y PFR en comparación con los valores iniciales, lo que valida la producción y extracción de hidrógeno. Así mismo, el contenido de C y H en el residuo del PFR se ha de encontrar en forma de AGV y azúcares reductores, detectados en este trabajo, por lo que, se tiene en cuenta que la recuperación energética por medio de la transformación de la biomasa de la harina de ramón no ha sido completa.

**Tabla 3.3** Caracterización fisicoquímica y elemental de condiciones iniciales y finales en CS y PFR.

Parámetro	CS		PFR	
	Inicial (g/L)	Final (g/L)	Inicial (g/L)	Final (g/L)
<b>DQO</b>	23.45	23.40	23.33	22.77
<b>ST</b>	25.14	21.75	29.30	27.18
<b>SV</b>	17.31	12.37	18.80	16.57
<b>Azúcares reductores</b>	0.45	0.26	2.13	0.52
<b>Nitrógeno total</b>	0.49	0.46	0.77	0.67
<b>NH<sub>3</sub>-N</b>	0.10	0.03	0.05	0.02
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	0.45	0.43	0.75	0.74
<b>AGV totales</b>	1.23	3.94	1.21	2.9

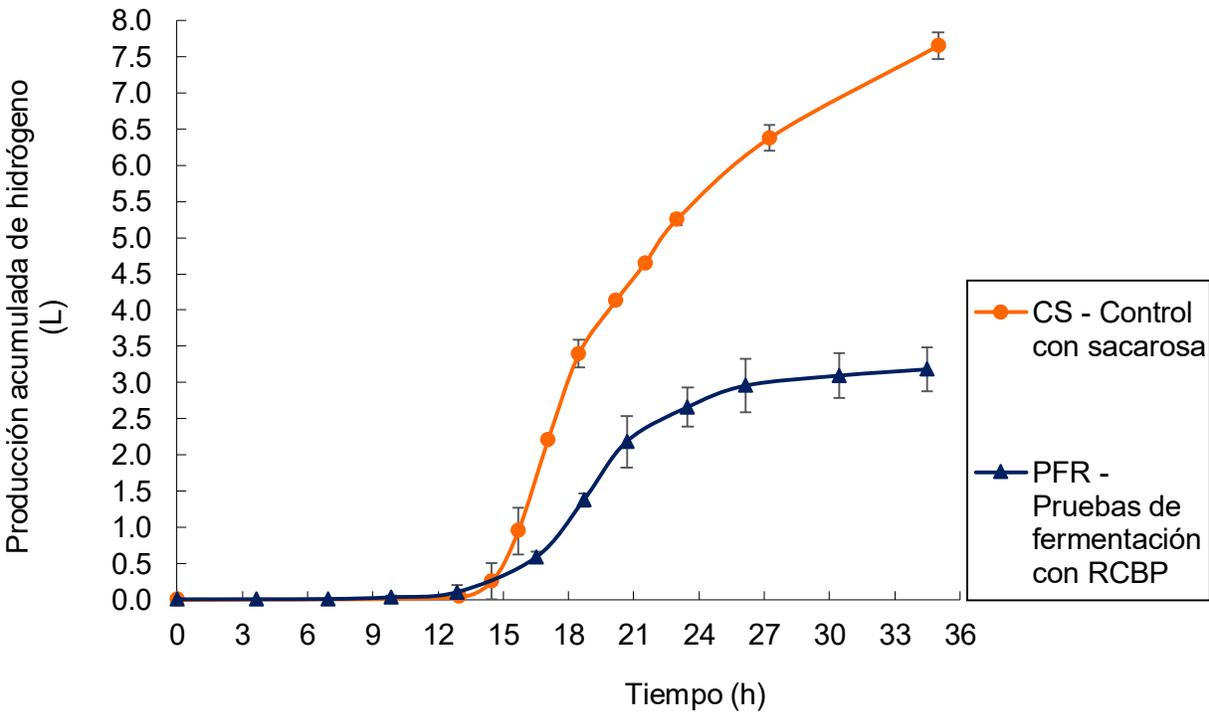
**Tabla 3.4** Perfil elemental inicial y final de pruebas de CS y PFR.

Parámetro	PFR		CS	
	Inicial (%)	Final (%)	Inicial (%)	Final (%)
<b>C</b>	33.80	32.46	30.16	29.28
<b>H</b>	4.85	4.60	4.46	4.28
<b>O</b>	22.41	20.88	31.81	20.61
<b>N</b>	2.63	2.47	1.93	2.09
<b>S</b>	0.47	0.56	0.50	0.60
<b>Ceniza</b>	35.85	39.04	31.15	43.13

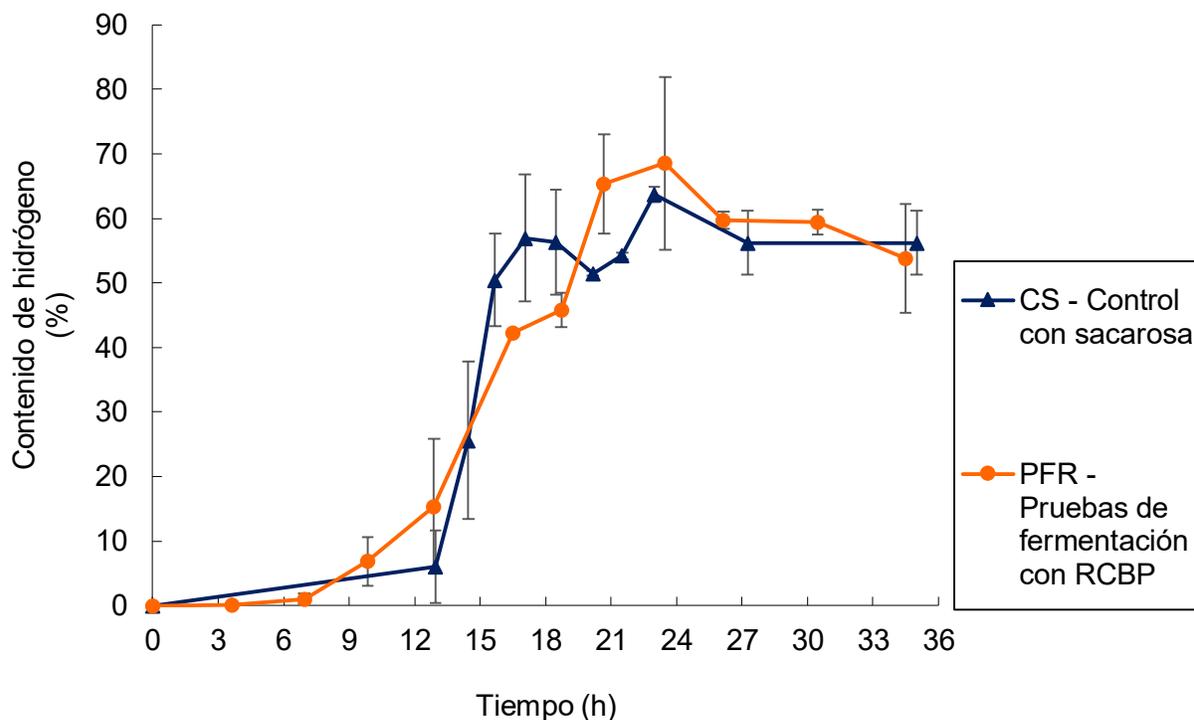
**Nota:** Porcentaje de C, H, N, S en base seca.

### 3.6. Producción de hidrógeno en pruebas de RCBP y sacarosa

La producción acumulada de hidrógeno y el contenido de CS y PFR se ilustran en la Figura 3.7 y Figura 3.8, respectivamente. CS produjo un total de  $7\,612 \pm 187$  mL de hidrógeno, más de 2.4 veces que PFR ( $3\,183 \pm 303$  mL). La Figura 3.5 muestra que ambas pruebas tuvieron un contenido de hidrógeno estable similar (>50%) después de 21 h, este resultado indica una capacidad constante del cultivo mixto pretratado para la producción de hidrógeno usando RBPC como sacarosa, además, en ambos experimentos, la producción de hidrógeno comenzó después de 15h (fase exponencial). Es importante tener en cuenta que para la concentración de sacarosa inicial se consideró la DQO agregada en RBPC; teóricamente, se agregaron 11.65 g-glucosa/L y 5.24 g-glucosa/L para CS y PFR, respectivamente. Por lo que existe una relación entre la concentración de sustrato (2.22 CS/PFR) y el volumen de hidrógeno producido.



**Figura 3.7** Producción acumulada de hidrógeno (mL) de CS y PFR.



**Figura 3.8** Contenido de hidrógeno (%) de CS y PFR.

En cuanto al rendimiento de hidrógeno, PFR fue un 11% mayor que PBH2, con un pH final de  $5.12 \pm 0.03$ . Estos resultados sugieren que existe una producción constante de hidrógeno a un valor de pH superior a 5.0, a pesar del aumento en los volúmenes de inóculo y sustratos. En la Tabla 3.5 se muestra una comparación de diferentes rendimientos de hidrógeno utilizando diferentes sustratos. Los desechos orgánicos tienen los mayores rendimientos de hidrógeno ( $\text{mL H}_2/\text{gSV}$ ) y sin pretratamiento del sustrato, esto debido a su alta biodegradabilidad, disponibilidad de carbohidratos solubles, contenido de carbono y nutrientes [78,106,111], sin embargo las pruebas con RBPC fueron superiores a los valores obtenidos utilizando FORSU (fracción orgánica de residuos sólidos urbanos). Además, se obtuvieron rendimientos de hidrógeno con RBPC similares al uso de almidón de yuca crudo considerando  $\text{molH}_2/\text{mol}$  azúcar y al almidón de maíz considerando  $\text{mLH}_2/\text{g}$ -sustrato. Cabe señalar, que los sustratos orgánicos deben hidrolizarse para obtener unidades como la glucosa y la fructosa, que son utilizadas por los microorganismos [40], lo que conduce a menores rendimientos de  $\text{H}_2$ . Para hidrolizar la materia orgánica se han aplicado pretratamientos alcalinos, térmicos, de microondas, termo-alcalinos, de microondas, alcalinos [57] y enzimáticos [60] para mejorar la producción de  $\text{H}_2$ . Por ejemplo, la pulpa de remolacha mediante el uso de un pretratamiento alcalino tuvo un mayor rendimiento ( $\text{mLH}_2/\text{g}$ -sustrato) que aquellos a los cuales no se les aplicó algún pretratamiento.

**Tabla 3.5** Rendimiento de producción de hidrógeno en modo batch y condiciones mesófilas utilizando diferentes sustratos.

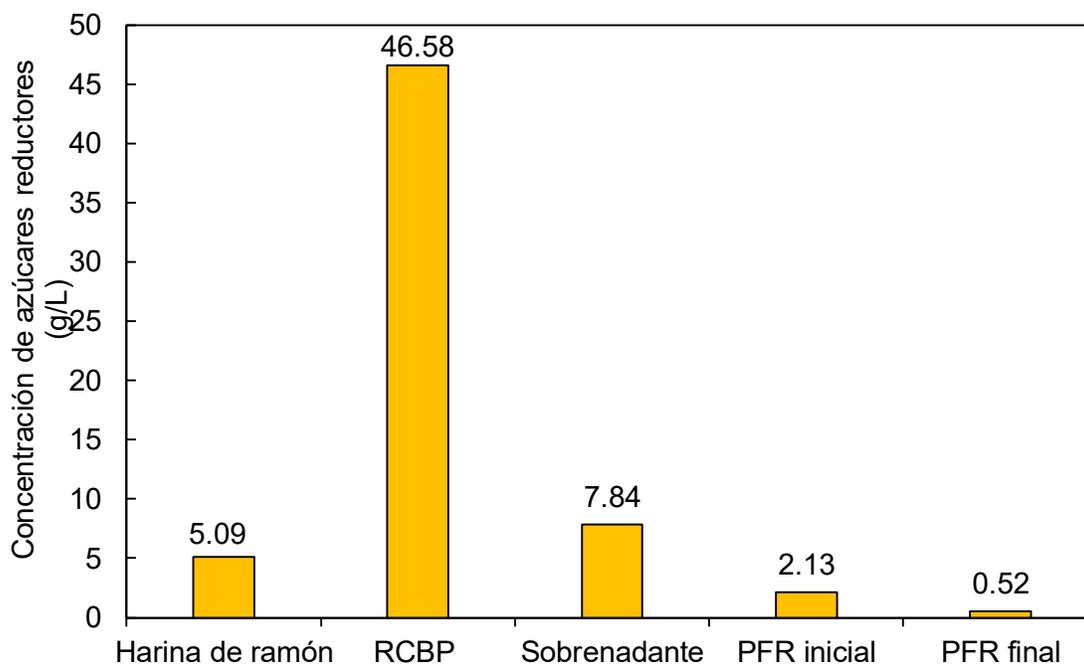
Sustrato	Pretratamiento	pH	molH <sub>2</sub> /mol azúcar <sup>a</sup>	mLH <sub>2</sub> /g-SV	mLH <sub>2</sub> /g-sustrato <sup>b</sup>	Referencia
Sacarosa	-	5.6	1.89	-	246.74	Este trabajo
RBPC	-	5.6	1.75	151.59	146.99	Este trabajo
Almidón maíz	-	6.5	1.10	-	151.40	[69]
Almidón de yuca	-	6.5	1.72	-	136.00	[115]
Vinaza	-	7.0	1.59	-	-	[116]
Paja de trigo	Enzimático	5.5	0.15-0.28	10.52-19.63	9.78-18.25	[60]
Hojas/cáscara de papa	-	5.0	1.60-2.20	8.80-24.00	7.89-21.53	[111]
FORSU	-	5.5	0.6-1.08	29-90	26.41-81.96	[78]
FORSU	-	5.5	0.78-1.20	56-101	50.99-91.98	[78]
Pulpa de remolacha	Alcalino	6.0	-	115.6	190.32	[57]

<sup>a</sup> Moles de azúcar de hexosas y pentosas iniciales.

<sup>b</sup> Gramos de sustrato en base seca.

### 3.7. Efecto del BPC y fermentación oscura en el contenido de azúcares reductores

El RBPC proviene de un proceso biológico integrado, en el que se produce sacarificación y fermentación gracias a la acción enzimática de la cepa *T. hirsuta* Bm-2 [14], Para analizar el efecto del BPC y el proceso de fermentación oscura, se cuantifican los azúcares reductores (AR) solubles en cada etapa (Figura 3.9). El BPC fue eficaz hidrolizando la harina de ramón, la concentración de AR aumentó de  $5.09 \pm 0.05$  g/L a  $46.58 \pm 2.04$  g/L. Por otro lado, el contenido inicial de AR de PFR fue de  $2.13 \pm 0.09$  g/L y presentó un consumo de RS del 75.35%, lo que representa un potencial de hidrógeno de 2.23 L. Dado que PFR produjo 3.18 L, se sugiere que había más AR disponibles producidos por la hidrólisis de almidón durante el proceso de fermentación oscura por los microorganismos del inóculo.



**Figura 3.9** Contenido de azúcares reductores en diferentes etapas del bioproceso consolidado y fermentación oscura.

### 3.8. Producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) de CS y PFR y ruta metabólica.

En la degradación completa de la glucosa durante la fermentación oscura se producen teóricamente 12 moles de hidrógeno, sin embargo, esto depende de los productos finales de la fermentación. Durante la producción de acetato (fermentación acética) se producen 4 moles de  $H_2$ , y en la formación de butirato (fermentación butírica) se obtienen 2 moles de  $H_2$  [102,117]. Por lo que estos metabolitos finales están relacionados con la eficiencia de producción de hidrógeno, por esta razón es importante cuantificar específicamente los AGV, para determinar el rendimiento de hidrógeno.

La Figura 3.10 muestra el contenido acumulado de ácidos grasos volátiles de CS (3.94 g/L) y PFR (2.90 g/L). Al final de CS se detectaron 1.22, 2.61 y 0.10 g/L de ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico, respectivamente. En el final de PFR se detectaron 1.18, 1.46 y 0.25 g/L de ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico. El contenido de ácido butírico fue relativamente mayor en la fermentación con sacarosa que con RBPC. Además, la relación acetato/butirato fue mayor en PFR (0.80) que en CS (0.47). Estos resultados revelan que la fermentación butírica predominó en CS, por el contrario, una ruta mixta (fermentación de acetato-butírica) fue más

equilibrada en PFR. Mahata *et al.* [96], también reportaron una producción de 1.6 g/L de acetato y 2.7 g/L de butirato en la fermentación oscura con residuos orgánicos.

Por otro lado, las altas concentraciones de AGV pueden provocar la lisis de las células a través de la penetración de protones en la membrana celular de las bacterias y por lo tanto se produce la alteración de las células, lo que reduce la producción de hidrógeno [73]. El ácido propiónico fue muy bajo en ambas pruebas, lo cual es benéfico, dado que se produce al consumir hidrógeno durante la degradación del azúcar, por lo que puede conducir a un menor rendimiento de H<sub>2</sub> [70].

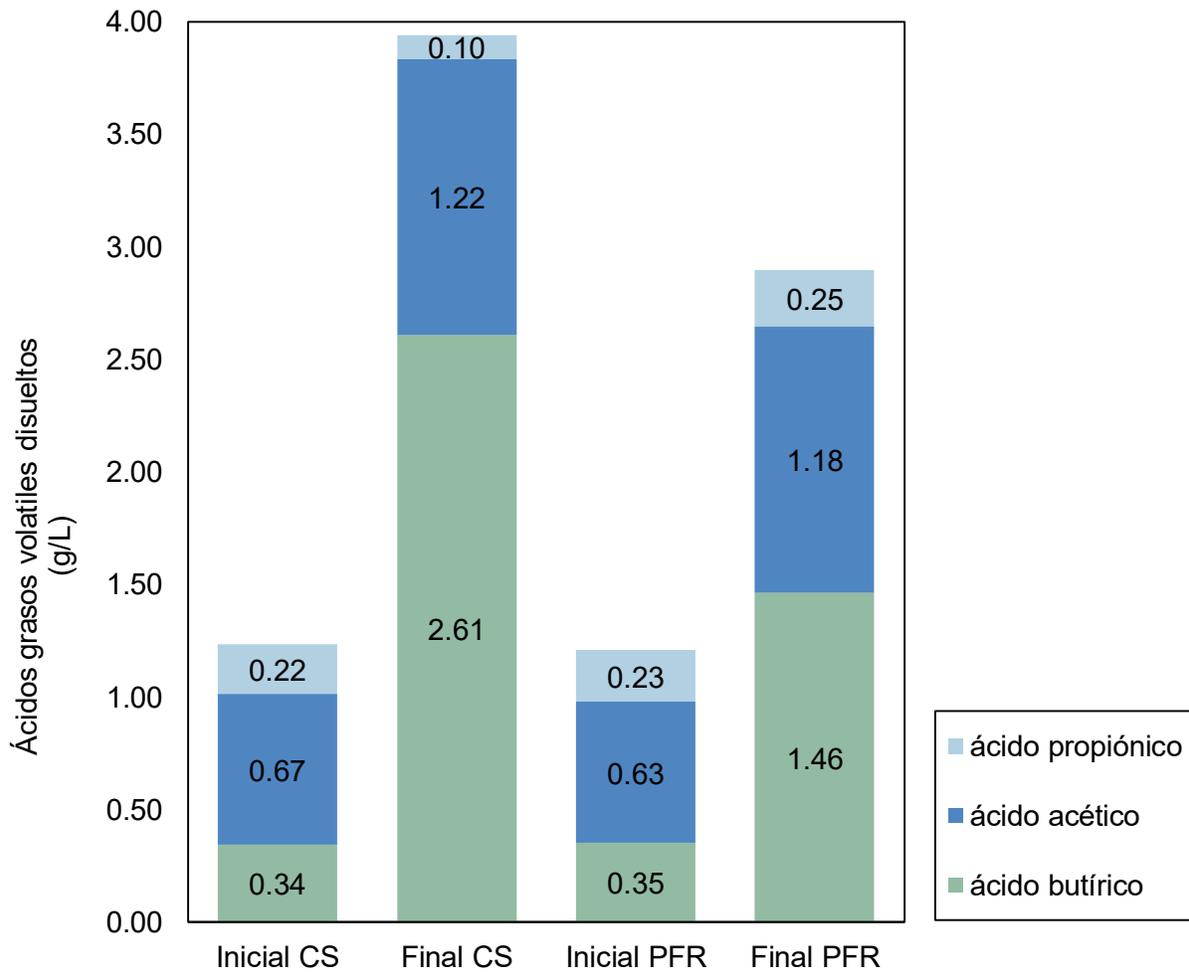


Figura 3.10 Contenido de ácidos grasos volátiles en inicio y final de CS y PFR.

### 3.9. Recuperación de energía del BPC y fermentación oscura con RBPC

Las eficiencias energéticas de la fermentación oscura y la BPC se presentan en la Tabla 3.6. Se calcularon a partir del poder calorífico superior (PCS) [118] del hidrógeno y el etanol producidos

en relación con la harina de ramón utilizada en cada estudio y la composición elemental de la harina de ramón. La recuperación de energía del etanol producida en dos estudios diferentes de BPC utilizando *T. hirsuta* Bm-2 fue similar. Asimismo, el PCS de la harina de ramón no tuvo variación importante, a pesar de emplear semillas de ramón de diferente sitio y año. Estos resultados indican que el PCS de la harina de ramón es de alrededor de 18 kJ/g y que el 24% de la energía se puede recuperar en forma de etanol a partir del BPC e hidrógeno empleado fermentación oscura. Se informó una recuperación de energía de 7.0–9.5% mediante fermentación oscura [107], también se logró obtener un rendimiento energético de 1.28 kJ/g utilizando vinaza tequilera [119].

**Tabla 3.6** Recuperación energética de harina de *B. alicastrum* mediante el bioproceso consolidado y fermentación oscura con base en poder calórico superior.

PCS <sup>a</sup> Harina de ramón (kJ/g)	PCS <sup>a</sup> RBPC (kJ/g)	PCS H <sub>2</sub> prod. (kJ/g) <sup>b</sup>	Recuperación de energía (%)	Referencia
18.55	18.25	1.63	8.92	Este trabajo
PCS <sup>a</sup> Harina de ramón (kJ/g)	PCS <sup>a</sup> RBPC (kJ/g)	PCS etanol prod. (kJ/g) <sup>c</sup>	Recuperación de energía (%)	Otros estudios
17.44	17.38	2.75	15.78	BPC [14]
18.12	-	2.85	15.72	BPC [97]

<sup>a</sup> Gramos en base seca.

<sup>b</sup> 286 kJ/mol-H<sub>2</sub>.

<sup>c</sup> 1300 kJ/mol-etanol

Además, existe aún la energía procedente del residuo de la fermentación oscura (nutrientes y metabolitos), comentada en el apartado 3.4. La recuperación se puede realizar en otro proceso, como la digestión anaeróbica, en la que se puede recuperar entre el 26 y el 52% de la energía [120]. Buback dos Santos *et al.*, en 2021 estudiaron una producción secuencial de hidrógeno-metano, utilizando sólidos fermentados residuales de la esterificación del destilado de aceite de palma para la producción de biodiesel [121]. Teniendo esto en cuenta, existe interés en desarrollar procesos lineales para obtener diversos productos de diferente valor agregado (combustibles) a partir de materias primas residuales.

## CONCLUSIONES

- La biomasa residual del bioproceso consolidado en la producción de bioetanol (RBPC) a partir de harina de semilla de ramón con *Trametes hirsuta* Bm-2, mostro tener propiedades que le permite ser considerada como una materia prima potencial para la producción de biohidrógeno. Destacando el contenido de carbono (44.16%) la relación C/N (23.48), azúcares reductores disueltos (46.58 g/L) y el bajo contenido de azufre (0.06%).
- Los estudios relacionados con la contribución del CAG en la producción de biohidrógeno demuestran que los rendimientos de hidrógeno para pruebas de BHP sin CA fue de 125.68 mL H<sub>2</sub>/g sustrato y BHP + CAG fue de 90.89 mL H<sub>2</sub>/g sustrato, por lo que la adición de CAG no contribuyó al aumento en el rendimiento de hidrógeno.
- Durante las pruebas de PBH se logró un control de temperatura de 37°C ± 2°C (valor recomendado en condiciones mesófilas) y pH por encima de 5.0 (valor mínimo requerido), sin la necesidad de buffer de manera continua, lo cual se asocia al efecto buffer del RBPC, debido a su contenido de fosfatos durante el proceso de fermentación (0.75 g PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L).
- El aumento en la concentración de RBPC contribuyó al incremento del rendimiento de biohidrógeno (131.61 H<sub>2</sub>/g-sustrato base seca) utilizando 7.5 g/L de SV-RBPC siendo 22.76% mayor en comparación al uso de 5 g/L de SV-RBPC. Esto demuestra el potencial de producción de biohidrógeno del RBPC. Al incrementar el volumen de trabajo del reactor de fermentación (2.8 L) se obtuvo un rendimiento de 146.99 mL H<sub>2</sub>/g-sustrato base seca. Esto significa una mejora del 11.68% respecto a pruebas en frascos serológicos (0.165 L). El mayor rendimiento molar de biohidrógeno obtenido fue de 1.75 mol H<sub>2</sub>/mol-glucosa esto representa el 43% del rendimiento molar teórico (4 mol H<sub>2</sub>/mol-glucosa) y el 92% del rendimiento molar obtenido utilizando sacarosa como sustrato (1.89 mol H<sub>2</sub>/mol-glucosa).
- El proceso de fermentación oscura utilizando RBPC y cultivo mixto se condujo por una vía metabólica mixta acetato/butírica, con una concentración final de ácido acético de 1.18 g/L y ácido butírico de 1.46 g/L, en condiciones mesófilas (37°C) con agitación y utilizando una concentración de 7.5 g/L de SV-RBPC.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Abdalla, A.M., Hossain, S., Nisfindy, O.B., Azad, A.T., Dawood, M., y Azad, A.K. (2018). Hydrogen production, storage, transportation and key challenges with applications: A review. *Energy Conversion and Management* 165, 602–627. doi:10.1016/j.enconman.2018.03.088.
- [2]. Hitam, C.N.C., y Jalil, A.A. (2023). A review on biohydrogen production through photo-fermentation of lignocellulosic biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery* 13, 8465–8483. doi:10.1007/s13399-020-01140-y.
- [3]. Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., y Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy* 144, 73–95. doi:10.1016/j.apenergy.2015.01.045.
- [4]. Magrini, F.E., de Almeida, G.M., da Maia Soares, D., Fuentes, L., Ecthebehere, C., Beal, L.L., da Silveira, M.M., y Paesi, S. (2020). Effect of different heat treatments of inoculum on the production of hydrogen and volatile fatty acids by dark fermentation of sugarcane vinasse. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 10.1007/s13399-020-00687-0.
- [5]. Stern, A.G. (2018). A new sustainable hydrogen clean energy paradigm. *International Journal of Hydrogen Energy* 43, 4244–4255. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.12.180.
- [6]. Burhan, M., Shahzad, M.W., y Ng, K.C. (2018). Hydrogen at the rooftop: Compact CPV-hydrogen system to convert sunlight to hydrogen. *Applied Thermal Engineering* 132, 154–164. doi:10.1016/j.applthermaleng.2017.12.094.
- [7]. Graetz, J., y Vajo, J.J. (2018). Controlled hydrogen release from metastable hydrides. *Journal of Alloys and Compounds* 743, 691–696. doi:10.1016/j.jallcom.2018.01.390.
- [8]. Wang, Y., y Zhang, S. (2017). Economic assessment of selected hydrogen production methods: A review. *Energy Sources, Part B: Economics, Planning and Policy* 12, 1022–1029. doi:10.1080/15567249.2017.1350770.

- [9]. Adolf, J., Balzer, C. H., Louis, J., Schabla, U., Fishedick, M., Arnold, K., ... & Schüwer, D. (2017). Energy of the future? - Sustainable Mobility through Fuel Cells and H<sub>2</sub>; Shell hydrogen study. Shell Deutschland Oil GmbH.
- [10]. Reddy, N.L., Rao, V.N., Vijayakumar, M., Santhosh, R., Anandan, S., Karthik, M., Shankar, M. V., Reddy, K.R., Shetti, N.P., Nadagouda, M.N., *et al.* (2019). A review on frontiers in plasmonic nano-photocatalysts for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 44, 10453–10472. doi:10.1016/j.ijhydene.2019.02.120.
- [11]. IHS (2021). Market Hydrogen Market Outlook, Supply & Demand, Forecast and Analysis.
- [12]. Baeyens, J., Zhang, H., Nie, J., Appels, L., Dewil, R., Ansart, R., y Deng, Y. (2020). Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 131. doi:10.1016/j.rser.2020.110023.
- [13]. Gopalakrishnan, B., Khanna, N., y Das, D. (2019). Dark-Fermentative Biohydrogen Production. En *Biohydrogen* (Elsevier), pp. 79–122. doi:10.1016/b978-0-444-64203-5.00004-6.
- [14]. Olguin-Maciel, E., Larqué-Saavedra, A., Lappe-Oliveras, P.E., Barahona-Pérez, L.F., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacis, R., Domínguez-Maldonado, J., Pacheco-Catalán, D., Ruíz, H.A., y Tapia-Tussell, R. (2019). Consolidated bioprocess for bioethanol production from raw flour of *Brosimum alicastrum* seeds using the native strain of *Trametes hirsuta* Bm-2. *Microorganisms* 7, 1–16. doi:10.3390/microorganisms7110483.
- [15]. Barquera, Z. (2014). Obtención de bioetanol a partir de semillas de Ramón (*Brosimum alicastrum* Sw). Tesis de maestría. CICY, México.
- [16]. Olguín, E. (2020). Bioproceso consolidado para la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*), utilizando el aislado nativo *Trametes hirsuta* Bm-2. Tesis de doctorado. CICY. México.
- [17]. Zohuri, B., & Zohuri, B. (2019). The Chemical Element Hydrogen. *Hydrogen Energy: Challenges and Solutions for a Cleaner Future*, 1-35.

- [18]. Keçebaş, A., & Kayfeci, M. (2019). Hydrogen properties. In *Solar Hydrogen Production* (pp. 3-29). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-814853-2.00001-1
- [19]. Gielen, D., Boshell, F., Saygin, D., Bazilian, M.D., Wagner, N., y Gorini, R. (2019). The role of renewable energy in the global energy transformation. *Energy Strategy Reviews* 24, 38–50. doi:10.1016/j.esr.2019.01.006.
- [20]. McCarty, R. D. (1981). *Selected properties of hydrogen (engineering design data)* (Vol. 168). US Department of Commerce, National Bureau of Standards.
- [21]. NASA (1997). *Safety Standard for Hydrogen and Hydrogen Systems Guidelines for Hydrogen System Design, Materials Selection, Operations, Storage and Transportation*.
- [22]. Hydrogen Council (2020). *Path to hydrogen competitiveness A cost perspective*.
- [23]. Sazali, N. (2020). Emerging technologies by hydrogen: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 45, 18753–18771. doi:10.1016/j.ijhydene.2020.05.021.
- [24]. Zhang, B., Zhang, S.X., Yao, R., Wu, Y.H., y Qiu, J.S. (2021). Progress and prospects of hydrogen production: Opportunities and challenges. *Journal of Electronic Science and Technology* 19, 1–15. doi:10.1016/J.JNLEST.2021.100080.
- [25]. Tarancón, A. (2020). *Hidrógeno. Vector energético de una economía descarbonizada*.
- [26]. IBERDROLA (2023). *Somos la primera compañía con el certificado de hidrógeno renovable de AENOR. Somos la primera compañía con el certificado de hidrógeno renovable de AENOR.* <https://www.iberdrola.com/sala-comunicacion/noticias/detalle/somos-la-primera-compania-con-el-certificado-de-hidrogeno-renovable-de-aenor>. Consultado: 05 de enero de 2024.
- [27]. Markets and Markets (2021). *Hydrogen generation market by application (petroleum refinery, ammonia & methanol production, transportation, power generation), generation & delivery mode (captive, merchant), source (blue, green & grey hydrogen), technology, and region-forecast to 2025*.

- [28]. Poskozim, P. S. (1998). Principles of Modern Chemistry, (Oxtoby, David W.; Nachtrieb, Norman H.).
- [29]. Steinberg, M., y Cheng, H.C. (1989). Modern and prospective technologies for hydrogen production from fossil fuels. *International Journal of Hydrogen Energy* 14, 797–820. doi:10.1016/0360-3199(89)90018-9.
- [30]. Balthasar, W. (1984). Hydrogen production and technology: today, tomorrow and beyond. *International Journal of Hydrogen Energy* 9, 649–668. doi:10.1016/0360-3199(84)90263-5.
- [31]. Holladay, J.D., Hu, J., King, D.L., y Wang, Y. (2009). An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today* 139, 244–260. 10.1016/j.cattod.2008.08.039.
- [32]. Krumpelt, M., Krause, T.R., Carter, J.D., Kopasz, J.P., y Ahmed, S. (2002). Fuel processing for fuel cell systems in transportation and portable power applications. *Catalysis Today* 77, 3–16. doi:10.1016/S0920-5861(02)00230-4.
- [33]. Ehsan, S., y Wahid, M.A. (2016). Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: Promising green energy carrier for clean development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 57, 850–866. doi:10.1016/j.rser.2015.12.112.
- [34]. Meher Kotay, S., y Das, D. (2008). Biohydrogen as a renewable energy resource-prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 258–263. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.07.031.
- [35]. Das, D., y Veziroglu, T.N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 6046–6057. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.098.
- [36]. Li, C., y Fang, H.H.P. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37, 1–39. doi:10.1080/10643380600729071.

- [37]. Srivastava, R.K., Shetti, N.P., Reddy, K.R., y Aminabhavi, T.M. (2020). Sustainable energy from waste organic matters via efficient microbial processes. *Science of the Total Environment* 722, 137927. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137927.
- [38]. Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H., y Sumathy, K. (2006). An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology* 87, 461–472. doi:10.1016/j.fuproc.2005.11.003.
- [39]. Singh, H., y Das, D. (2018). Biofuels from Microalgae: Biohydrogen. *Green Energy and Technology* 0, 201–228. doi:10.1007/978-3-319-69093-3\_10.
- [40]. Das, S.R., y Basak, N. (2021). Molecular biohydrogen production by dark and photo fermentation from wastes containing starch: recent advancement and future perspective. *Bioprocess and biosystems Engineering* 44, 1–25. doi:10.1007/s00449-020-02422-5.
- [41]. Kumar, G., Mathimani, T., Rene, E.R., y Pugazhendhi, A. (2019). Application of nanotechnology in dark fermentation for enhanced biohydrogen production using inorganic nanoparticles. *International Journal of Hydrogen Energy* 44, 13106–13113. doi:10.1016/j.ijhydene.2019.03.131.
- [42]. Liu, X., He, D., Wu, Y., Xu, Q., Wang, D., Yang, Q., Liu, Y., Ni, B.J., Wang, Q., y Li, X. (2020). Freezing in the presence of nitrite pretreatment enhances hydrogen production from dark fermentation of waste activated sludge. *Journal of Cleaner Production* 248. doi:10.1016/j.jclepro.2019.119305.
- [43]. Turhal, S., Turanbaev, M., y Argun, H. (2019). Hydrogen production from melon and watermelon mixture by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 18811–18817. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.10.011.
- [44]. Balat, H., y Kirtay, E. (2010). Hydrogen from biomass - Present scenario and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 7416–7426. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.04.137.

- [45]. Nikolaidis, P., y Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 67, 597–611. doi:10.1016/j.rser.2016.09.044.
- [46]. Acar, C., y Dincer, I. (2019). Review and evaluation of hydrogen production options for better environment. *Journal of Cleaner Production* 218, 835–849. 10.1016/j.jclepro.2019.02.046.
- [47]. Staffell, I., Scamman, D., Velazquez Abad, A., Balcombe, P., Dodds, P.E., Ekins, P., Shah, N., y Ward, K.R. (2019). The role of hydrogen and fuel cells in the global energy system. *Energy and Environmental Science* 12, 463–491. doi:10.1039/c8ee01157e.
- [48]. Salem, A.H., Brunstermann, R., Mietzel, T., y Widmann, R. (2018). Effect of pre-treatment and hydraulic retention time on biohydrogen production from organic wastes. *International Journal of Hydrogen Energy* 43, 4856–4865. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.01.114.
- [49]. Srivastava, N., Srivastava, M., Malhotra, B.D., Gupta, V.K., Ramteke, P.W., Silva, R.N., Shukla, P., Dubey, K.K., y Mishra, P.K. (2019). Nanoengineered cellulosic biohydrogen production via dark fermentation: A novel approach. *Biotechnology Advances* 37, 107384. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.04.006.
- [50]. Akhlaghi, N., y Najafpour-Darzi, G. (2020). A comprehensive review on biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 45, 22492–22512. doi:10.1016/j.ijhydene.2020.06.182.
- [51]. Gopalakrishnan, B., Khanna, N., & Das, D. (2019). Dark-fermentative biohydrogen production. In *Biohydrogen* (pp. 79-122). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-64203-5.00004-6.
- [52]. Van Ginkel, S., Sung, S., y Lay, J.J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology* 35, 4726–4730. doi:10.1021/es001979r.
- [53]. Banu J, R., Usman T M, M., S, K., Kannah R, Y., K N, Y., P, S., Bhatnagar, A., y Kumar, G. (2021). A critical review on limitations and enhancement strategies associated with biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 46, 16565–16590. doi:10.1016/j.ijhydene.2021.01.075.

- [54]. Bundhoo, M.A.Z., Mohee, R., y Hassan, M.A. (2015). Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management* 157, 20–48. doi:10.1016/j.jenvman.2015.04.006.
- [55]. Weide, T., Brüggling, E., Wetter, C., Ierardi, A., y Wichern, M. (2019). Use of organic waste for biohydrogen production and volatile fatty acids via dark fermentation and further processing to methane. *International Journal of Hydrogen Energy* 44, 24110–24125. doi:10.1016/j.ijhydene.2019.07.140.
- [56]. Dinesh Kumar, M., Kaliappan, S., Gopikumar, S., Zhen, G., y Rajesh Banu, J. (2019). Synergetic pretreatment of algal biomass through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced microwave in acidic condition for biohydrogen production. *Fuel* 253, 833–839. doi:10.1016/j.fuel.2019.05.066.
- [57]. Ozkan, L., Erguder, T.H., y Demirer, G.N. (2010). Effects of pretreatment methods on solubilization of beet-pulp and bio-hydrogen production yield. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 382–389. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.10.006.
- [58]. Kim, D. H., Kim, S. H., & Shin, H. S. (2009). Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(3), 181-187. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.06.013.
- [59]. Gadhe, A., Sonawane, S.S., y Varma, M.N. (2014). Ultrasonic pretreatment for an enhancement of biohydrogen production from complex food waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 39, 7721–7729. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.03.105.
- [60]. Bittel, M., Trably, E., Dumas, C., Que, M., Fourage, L., Ravot, G., Steyer, J., Biotechnologie, L. De, Environnement, D., Etangs, A., *et al.* (2012). Effect of enzyme addition on fermentative hydrogen production from wheat straw. *me.* 7, 1–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.04.083.
- [61]. Li, D., Jiao, C., He, W., Yan, Z., Yuan, Y., Li, Z., Guo, Y., y Liu, X. (2016). Comparison of micro-aerobic and anaerobic fermentative hydrogen production from corn straw. *International Journal of Hydrogen Energy* 41, 5456–5464. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.01.141.

- [62]. Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., Anzola-rojas, M.P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Cabrol, L., y Carminato, V.M. (2016). Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. doi:10.1007/s00253-016-7325-y.
- [63]. Mohanraj, S., Anbalagan, K., y Rajaguru, P. (2016). Effects of phytogetic copper nanoparticles on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* and *Clostridium acetobutylicum*. *International Journal of Hydrogen Energy* 41, 10639–10645. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.04.197.
- [64]. Karaosmanoglu Gorgec, F., y Karapinar, I. (2019). Biohydrogen production from hydrolyzed waste wheat by dark fermentation in a continuously operated packed bed reactor: The effect of hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, 136–143. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.08.155.
- [65]. Saady, N.M.C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy* 38, 13172–13191. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.07.122.
- [66]. Chang, S., Li, J., y Liu, F. (2011). Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. *Renewable Energy* 36, 1517–1522. doi:10.1016/j.renene.2010.11.023.
- [67]. Wang, Y.Y., Ai, P., Hu, C.X., y Zhang, Y.L. (2011). Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the fermentation pathway of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 390–396. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.09.092.
- [68]. Soares, J.F., Confortin, T.C., Todero, I., Mayer, F.D., y Mazutti, M.A. (2020). Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 117. doi:10.1016/j.rser.2019.109484.
- [69]. Ma, H., y Su, H. (2019). Effect of temperature on the fermentation of starch by two high efficient H<sub>2</sub> producers. *Renewable Energy* 138, 964–970. doi:10.1016/j.renene.2019.01.126.

- [70]. Kongjan, P., y Angelidaki, I. (2010). Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: Effect of reactor configuration. *Bioresource Technology* 101, 7789–7796. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.024.
- [71]. Sutthipattanasomboon, C., y Wongthanate, J. (2017). Enhancement of biohydrogen production from starch processing wastewater and further inside its ecosystem disclosed by 16S rDNA sequencing and FISH. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 60, 1–12. doi:10.1590/1678-4324-2017160260.
- [72]. Sakinah, N., Mohamed, P., y Wu, S. (2017). Influence of iron (II) oxide nanoparticle on biohydrogen production in thermophilic mixed fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1–12. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.05.224.
- [73]. Preethi, Usman, T.M.M., Rajesh Banu, J., Gunasekaran, M., y Kumar, G. (2019). Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview. *Bioresource Technology Reports* 7. doi:10.1016/j.biteb.2019.100287.
- [74]. Sarangi, P.K., y Nanda, S. (2020). Biohydrogen Production Through Dark Fermentation. *Chemical Engineering and Technology* 43, 601–612. doi:10.1002/ceat.201900452.
- [75]. Ziara, R.M.M., Miller, D.N., Subbiah, J., y Dvorak, B.I. (2018). Lactate wastewater dark fermentation: The effect of temperature and initial pH on biohydrogen production and microbial community. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1–13. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.11.045.
- [76]. Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., y Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 91, 665–694. doi:10.1016/j.rser.2018.04.043.
- [77]. Carrillo-Reyes, J., Tapia-Rodríguez, A., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Maluf Braga, A.F., *et al.* (2019). A standardized biohydrogen potential protocol: An international round robin test approach. *International Journal of Hydrogen Energy* 44, 26237–26247. doi:10.1016/j.ijhydene.2019.08.124.

- [78]. Pecorini, I., Baldi, F., & Iannelli, R. (2019). Biochemical hydrogen potential tests using different inocula. *Sustainability*, 11(3), 622. doi:10.3390/su11030622.
- [79]. García, C. A. (2012). Etanol de primera generación, estudio de la sustentabilidad de su producción considerando el ciclo de vida y análisis económico-ambiental de su introducción en el sector transporte Mexicano. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- [80]. Meiners, M., Sánchez, C., & De Blois, S. (2009). El ramón: Fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación. *Biodiversitas*, 87, 7-10.
- [81]. Pennington, T. D., & Sarukhán, J. (2005). Árboles tropicales de México: manual para la identificación de las principales especies. UNAM, México.
- [82]. Vega López, A., Valdez Hernández, J.I., y Cetina Alcalá, V.M. (2016). Zonas ecológicas de *Brosimum alicastrum* Sw. en la costa del Pacífico mexicano. *Madera y Bosques* 9, 27–53. doi:10.21829/myb.2003.911287.
- [83]. Centro de Investigación Científica de Yucatán (2010). Flora de la península de Yucatán. [https://www.cicy.mx/sitios/flora\\_digital/ficha\\_virtual.php?especie=1835](https://www.cicy.mx/sitios/flora_digital/ficha_virtual.php?especie=1835). Consultado el 13 de enero de 2024.
- [84]. Olguin, E. (2015). Estudio para optimizar la obtención de bioetanol a partir de harina de semillas de Ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.). Tesis de Maestría, CICY, México.
- [85]. Olguin-Maciel, E., Larqué-Saavedra, A., Pérez-Brito, D., Barahona-Pérez, L.F., Alzate-Gaviria, L., Toledano-Thompson, T., Lappe-Oliveras, P.E., Huchin-Poot, E.G., y Tapia-Tussell, R. (2017). *Brosimum alicastrum* as a novel starch source for bioethanol production. *Energies*. 10. doi:10.3390/en10101574.
- [86]. Jiménez Villarreal, I. (2019). Efecto del ultrasonido en el proceso de sacarificación para la producción de bioetanol a partir de la harina de Ramón. Tesis de maestría, CICY, México.
- [87]. Garza, C. (2021). Sacarificación y co-fermentación simultánea para la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de *Brosimum alicastrum*. Tesis de maestría. CICY, México.

- [88]. FAO (1993). Valor nutritivo y usos en alimentación humana de algunos cultivos autóctonos subexplotados de Mesoamérica.
- [89]. Lozano, O., Shimada, A.S., y Avila, E. (1978). Valor Alimenticio De La Semilla Del Ramon. *Técnica Pecuaria Mexicana* 34, 100–104.
- [90]. Peters, C.M., y Pardo-Tejeda, E. (1982). *Brosimum alicastrum* (Moraceae): uses and potential in Mexico. *Economic Botany* 36, 166–175. doi:10.1007/BF02858712.
- [91]. Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., y Nrel, J.W. (2008). Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples biomass and total dissolved solids in liquid process samples.
- [92]. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., y Templeton, D. (2008). Determination of ash in biomass laboratory analytical procedure (LAP) Issue Date: 7 / 17 / 2005 Determination of ash in biomass laboratory analytical procedure ( LAP ).
- [93]. Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–428. doi:10.1021/ac60147a030.
- [94]. Valero, D., Alzate-Gaviria, L., Montes, J.A., y Rico, C. (2020). Influence of a Conductive material and different anaerobic inocula on biochemical methane potential of substrates from alcoholic beverage production. *Waste and Biomass Valorization* 11, 5957–5964. doi:10.1007/s12649-019-00834-3.
- [95]. Magrini, F.E., de Almeida, G.M., da Maia Soares, D., Fuentes, L., Ecthebehere, C., Beal, L.L., da Silveira, M.M., y Paesi, S. (2021). Effect of different heat treatments of inoculum on the production of hydrogen and volatile fatty acids by dark fermentation of sugarcane vinasse. *Biomass Conversion and Biorefinery* 11, 2443–2456. doi:10.1007/s13399-020-00687-0.
- [96]. Mahata, C., Ray, S., y Das, D. (2020). Optimization of dark fermentative hydrogen production from organic wastes using acidogenic mixed consortia. *Energy Conversion and Management* 219, 113047. doi:10.1016/j.enconman.2020.113047.

- [97]. Chan González Edwin Josué (2023). Valorización integral de la semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*) bajo el concepto de biorrefinería. Tesis de maestría, CICY, México.
- [98]. Davila-Vazquez, G., Alatraste-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *international journal of hydrogen energy* 33, 4989–4997. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.06.065.
- [99]. Ashah, M.A., Lutpi, N.A., Wong, Y.S., Ong, S.A., y Malek, M.A. (2020). Study on biohydrogen production using different type of carrier materials in attached growth system. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 476. doi:10.1088/1755-1315/476/1/012105.
- [100]. Sybounya, S., Nitisoravut, R., y Wimonsong, P. (2019). Addition of activated carbon as supported material for hydrotalcite to promote fermentative hydrogen production. 2019 4th International Conference on Power and Renewable Energy, ICPRE 2019, 157–161. doi:10.1109/ICPRE48497.2019.9034774.
- [101]. Rashidi, N.F.D., Jamali, N.S., Mahamad, S.S., Ibrahim, M.F., Abdullah, N., Ismail, S.F., y Siajam, S.I. (2020). Effects of alginate and chitosan on activated carbon as immobilisation beads in biohydrogen production. *Processes* 8, 1–17. doi:10.3390/pr8101254.
- [102]. Park, J., Kim, D., Kim, H., Wells, G.F., y Park, H. (2019). *Clostridium butyricum* for enhanced biohydrogen production. *Bioresource Technology* 281, 318–325. doi:10.1016/j.biortech.2019.02.090.
- [103]. Bhatia, S.K., Jagtap, S.S., Bedekar, A.A., Bhatia, R.K., Rajendran, K., Pugazhendhi, A., Rao, C. V., Atabani, A.E., Kumar, G., y Yang, Y.H. (2021). Renewable biohydrogen production from lignocellulosic biomass using fermentation and integration of systems with other energy generation technologies. *Science of the Total Environment* 765, 144429. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144429.
- [104]. Ramírez Escorcía David (2023). Producción de hidrógeno a partir de residuos de ramón. Estadía de licenciatura, UPEG/CICY, México.

- [105]. Panin, S., Setthapun, W., Elizabeth Sinsuw, A.A., Sintuya, H., y Chu, C.Y. (2021). Biohydrogen and biogas production from mashed and powdered vegetable residues by an enriched microflora in dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 46, 14073–14082. doi:10.1016/j.ijhydene.2020.09.246.
- [106]. Moreno-Andrade, I., Berrocal-Bravo, M.J., y Valdez-Vazquez, I. (2023). 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, 230–237. doi:10.1002/jctb.7238.
- [107]. Kim, D., Kim, S., Kim, H., Kim, M., y Shin, H. (2011). Sewage sludge addition to food waste synergistically enhances hydrogen fermentation performance. *Bioresource Technology* 102, 8501–8506. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.089.
- [108]. Sterling, M.C., Lacey, R.E., Engler, C.R., y Ricke, S.C. (2001). Effects of ammonia nitrogen on H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production during anaerobic digestion of dairy cattle manure. *Bioresource Technology* 77, 9–18. doi:10.1016/S0960-8524(00)00138-3.
- [109]. Salerno, M.B., Park, W., Zuo, Y., y Logan, B.E. (2006). Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Research* 40, 1167–1172. doi:10.1016/j.watres.2006.01.024.
- [110]. Cieciora-Włoch, W., Borowski, S., y Domański, J. (2021). Dark fermentative hydrogen production from hydrolyzed sugar beet pulp improved by nitrogen and phosphorus supplementation. *Bioresource Technology* 340. doi:10.1016/j.biortech.2021.125622.
- [111]. Marone, A., Izzo, G., Mentuccia, L., Massini, G., Paganin, P., Rosa, S., Varrone, C., y Signorini, A. (2014). Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for biohydrogen production. *Renewable Energy* 68, 6–13. doi:10.1016/j.renene.2014.01.013.
- [112]. Dinesh, G.K., Chauhan, R., y Chakma, S. (2018). Influence and strategies for enhanced biohydrogen production from food waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92, 807–822. doi:10.1016/j.rser.2018.05.009.

- [113]. Lin, C.Y., y Lay, C.H. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy* 29, 41–45. doi:10.1016/S0360-3199(03)00083-1.
- [114]. Chen, Y., Yin, Y., y Wang, J. (2021). Recent advance in inhibition of dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 46, 5053–5073. doi:10.1016/j.ijhydene.2020.11.096.
- [115]. Wang, S., Ma, Z., Zhang, T., Bao, M., y Su, H. (2017). Optimization and modeling of biohydrogen production by mixed bacterial cultures from raw cassava starch. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 11, 100–106. doi:10.1007/s11705-017-1617-3.
- [116]. Sydney, E.B., Novak, A.C., Rosa, D., Pedroni Medeiros, A.B., Brar, S.K., Larroche, C., y Soccol, C.R. (2018). Screening and bioprospecting of anaerobic consortia for biohydrogen and volatile fatty acid production in a vinasse based medium through dark fermentation. *Process Biochemistry* 67, 1–7. doi:10.1016/j.procbio.2018.01.012.
- [117]. Keskin, T., Nalakath Abubackar, H., Arslan, K., y Azbar, N. (2019). Biohydrogen Production From Solid Wastes. *En Biohydrogen (Elsevier)*, pp. 321–346. doi:10.1016/b978-0-444-64203-5.00012-5.
- [118]. Yu, Z.T., Xu, X., Hu, Y.C., Fan, L.W., y Cen, K.F. (2011). Unsteady natural convection heat transfer from a heated horizontal circular cylinder to its air-filled coaxial triangular enclosure. *Fuel* 90, 1128–1132. doi:10.1016/j.fuel.2010.11.031.
- [119]. García-Depraect, O., y 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. doi:10.1016/j.fuel.2018.06.126.
- [120]. Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., y Longlong, M. (2011). Anaerobic fermentative co-production of hydrogen and methane from an organic fraction of municipal solid waste. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects* 33, 575–585. doi:10.1080/15567030903117653.

[121]. Buback dos Santos, S., de Oliveira Faber, M., de Araujo Collaço, A.C., Erika, E.C., Denise, D.M., A.P. Langone, M., y S. Ferreira-Leitão, V. (2021). Sequential hydrogen and methane production using the residual biocatalyst of biodiesel synthesis as raw material. *International Journal of Hydrogen Energy* 46, 23658–23669. doi:10.1016/j.ijhydene.2021.04.172.