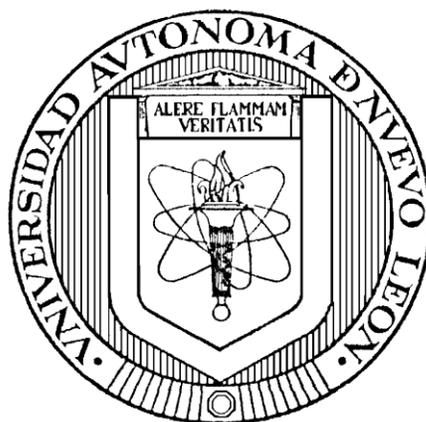


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS**

**PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO MEDIANTE FERMENTACIÓN  
OSCURA ACOPLADO CON FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA**

Por

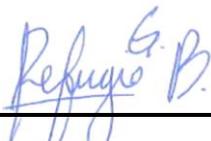
**MARINA MONTSERRAT ATILANO CAMINO**

Como requisito para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN PROCESOS  
SUSTENTABLES**

Diciembre, 2021

**PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO MEDIANTE FERMENTACIÓN  
OSCURA ACOPLADO CON FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA**

**AUTORIZACIÓN DE TESIS**



---

DR. REFUGIO BERNARDO GARCÍA REYES

**PRESIDENTE**

---

DR. JACOB JOSAFAT SALAZAR RÁBAGO

**SECRETARIO**

---

DRA. SHADAI LUGO LOREDO

**PRIMER VOCAL**

---

DR. CELESTINO GARCÍA GÓMEZ

**SEGUNDO VOCAL**

---

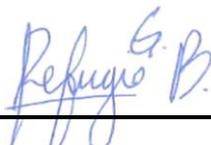
DR. CARLOS ESCAMILLA ALVARADO

**TERCER VOCAL**

---

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CARDENAS  
**SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO MEDIANTE FERMENTACIÓN  
OSCURA ACOPLADO CON FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA**



---

DR. REFUGIO BERNARDO GARCÍA REYES

**DIRECTOR**



---

DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ

**CODIRECTORA**



---

DRA. SHADAI LUGO LOREDO

**REVISOR**



---

DR. JACOB JOSAFAT SALAZAR RÁBAGO

**REVISOR**



---

DR. LUIS HUMBERTO ÁLVAREZ VALENCIA.

**REVISOR**

*A Dios, que todo lo hace posible.*

*A mi hijo y a mi esposo, Santiago y José, que siempre están impulsando mi vida, y en cada paso que doy están conmigo.*

*A mis padres, Marina y Jorge, que su apoyo es inigualable en todos los sentidos para el desarrollo de mis objetivos.*

*A mis hermanos, que siempre están cuando los necesito.*

*A mis abuelos, que aunque no están en vida, están en mi alma.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por su apoyo y motivación.

A mi asesor, Dr. Refugio Bernardo García Reyes, que gracias a su impecable dirección pude desarrollar amplias habilidades y conocimientos que forjarán mi próxima vida profesional.

A mi coasesora, Dra. Alcione García González, que gracias a su apoyo este proyecto se desarrolló de forma satisfactoria.

A la Dra. Patria Quintana Owen, por su apoyo en la caracterización de los materiales estudiados durante esta investigación.

A mi Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias y aportaciones durante la revisión de esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, que durante todo este tiempo pudimos tener diversas discusiones que enriquecían nuestros proyectos, y que han sido de gran apoyo para la culminación de esta investigación.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por todas las facilidades brindadas para concluir satisfactoriamente este proyecto.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante todo el periodo del doctorado.

Al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, Cinvestav-IPN; financiado por los proyectos FOMIX-Yucatán 2008-108160, CONACYT LAB-2009-01-123913, 292692, 294643, 188345 y 204822; por la caracterización de los materiales sintetizados en esta investigación. En especial a los técnicos especializados: Dr. William Santiago Gómez, Dr. Víctor Rejón, M.C. Daniel Aguilar Treviño, e Ing. Wilian Javier Cauich Ruiz.

# RESUMEN

**Marina Montserrat Atilano Camino**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Ciencias Químicas**

Diciembre, 2021

**Título del estudio:**  
**PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO MEDIANTE FERMENTACIÓN OSCURA**  
**ACOPLADO CON FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA**

**Número de páginas:** 196

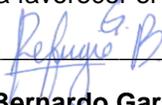
**Candidato para el grado de Doctor en**  
**Ciencias con Orientación en Procesos**  
**Sustentables**

**Área de estudio:** Procesos sustentables

**Propósito y Método de Estudio:** La energía producida a través de métodos alternativos y amigables con el medio ambiente es cada vez más indispensable; el hidrógeno como acarreador energético tiene amplias ventajas al generarse solo vapor de agua en su combustión, y proveer energía en una proporción mayor. Dentro de los procesos implicados en la producción de hidrógeno, la fermentación oscura tiene gran potencial, al poseer elevadas eficiencias y ser un bioproceso de baja demanda energética; no obstante, la generación de subproductos orgánicos como ácidos grasos volátiles y alcoholes podrían considerarse como una desventaja. Otro proceso enfocado a la producción de hidrógeno es el reformado fotocatalítico, donde un fotocatalizador es empleado para oxidar compuestos orgánicos sacrificables y, simultáneamente, reducir protones hacia la producción de hidrógeno. Esta investigación se enfoca en el estudio del acoplamiento de estos procesos, es decir, producir hidrógeno mediante fermentación oscura, y utilizar los subproductos orgánicos como agentes de sacrificio en un proceso de fotorreformado para la producción de hidrógeno en conjunto.

**Contribuciones y Conclusiones:** En esta investigación se encontró que la adición de mediadores redox influye en la producción de hidrógeno y la acumulación de subproductos líquidos durante la fermentación oscura empleando *Clostridium beijerinckii* y un lodo anaerobio granular tratado (LAG). El mejor resultado se obtuvo con lawsona inmovilizada en carbón activado (CA-LQ) con el LAG, alcanzando  $1.98 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosa}}$  y 37.35% mayor acumulación de subproductos líquidos; sugiriendo un efecto sinérgico entre el CA y LQ que mejora la transferencia de electrones hacia rutas metabólicas solventogénicas. Con relación al fotorreformado, el semiconductor sintetizado por reducción química ( $\text{TiO}_2\text{-Pt}$  (RQ)) logró el mejor desempeño, alcanzando  $2217.7 \mu\text{mol}/\text{g}_{\text{cat}}$  al emplear una mezcla sintética de subproductos de la fermentación; sin embargo, se observó una disminución del 58% al usar buffer como disolvente, mostrando una competencia hacia los radicales generados en el fotoproceso. Finalmente, el acoplamiento de estos procesos mostró un decremento en la etapa del fotorreformado debido a la presencia de múltiples compuestos orgánicos que mermaron la producción de hidrógeno; por ello, se recomienda un pretratamiento del efluente fermentativo para eliminar especies orgánicas complejas, así como aniones inorgánicos para favorecer el proceso de reformado fotocatalítico.

**Firma del asesor:** \_\_\_\_\_

  
**Dr. Refugio Bernardo García Reyes**

# CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Hidrógeno como fuente de energía.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Rutas de producción de hidrógeno.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3. Fermentación oscura y su metabolismo.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4. Factores que provocan efectos en la fermentación oscura .....</b>	<b>26</b>
2.4.1. pH del medio de cultivo .....	26
2.4.2. Temperatura.....	27
2.4.3. Presión parcial de hidrógeno en el medio de cultivo .....	27
2.4.4. Tipos de sustrato.....	28
<b>2.5. Bacterias productoras de hidrógeno por fermentación oscura.....</b>	<b>32</b>
2.5.1. Bacterias anaerobias facultativas .....	33
2.5.2. Bacterias anaerobias estrictas .....	33
2.5.3. Microorganismos termófilos .....	34
2.5.4. Cultivos mixtos .....	34
<b>2.6. Estrategias y uso de aditivos para la mejora de la fermentación oscura.....</b>	<b>35</b>
2.6.1. Aditivos metálicos.....	36
2.6.2. Acarreadores para la inmovilización de microorganismos.....	37
2.6.3. L-cisteína como agente reductor.....	38
2.6.4. Bioaugmentación.....	39
2.6.5. Enzimas.....	39
2.6.6. Mediadores redox.....	40
<b>2.7. Modelo de Gompertz modificado en la fermentación oscura.....</b>	<b>41</b>
<b>2.8. Procesos avanzados de oxidación.....</b>	<b>42</b>
<b>2.9. Fotocatálisis heterogénea y su mecanismo .....</b>	<b>42</b>

<b>2.10.</b>	<b>Producción de hidrógeno por fotocátalisis heterogénea.....</b>	<b>44</b>
2.10.1.	Semiconductores para la producción de hidrógeno.....	45
<b>2.11.</b>	<b>Estrategias de mejora para la fotocátalisis heterogénea .....</b>	<b>47</b>
2.11.1.	Dopaje de semiconductores.....	47
2.11.2.	Dopaje con metales .....	47
2.11.3.	Dopaje con no metales .....	50
2.11.4.	Acoplamiento entre semiconductores .....	51
2.11.5.	Sensibilización de la superficie del semiconductor.....	51
<b>2.12.</b>	<b>Factores que afectan la fotocátalisis heterogénea en la producción de hidrógeno .....</b>	<b>52</b>
2.12.1.	Energía de banda prohibida.....	52
2.12.2.	Área superficial y estructural del semiconductor .....	53
2.12.3.	Intensidad de luz .....	53
2.12.4.	Temperatura.....	54
2.12.5.	pH.....	54
2.12.6.	Agentes de sacrificio .....	55
<b>3.</b>	<b>APORTACIÓN CIENTÍFICA .....</b>	<b>56</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>58</b>
7.1.	<b>Materiales y reactivos .....</b>	<b>58</b>
7.2.	<b>Etapa I. Fermentación oscura empleando mediadores redox disueltos e inmovilizados .....</b>	<b>59</b>
7.2.1.	Inmovilización de riboflavina en bagazo de agave.....	59
7.2.2.	Inmovilización de LQ y AQS en carbón activado .....	60
7.2.3.	Activación de la cepa <i>Clostridium beijerinckii</i> .....	61
7.2.4.	Tratamiento del lodo anaerobio granular .....	61
7.2.5.	Optimización de la producción de hidrógeno empleando riboflavina soluble e inmovilizada durante la fermentación oscura por <i>Clostridium beijerinckii</i> .....	62
7.2.6.	Evaluación de LQ y AQS en forma disuelta e inmovilizada durante la fermentación oscura por lodos anaerobios granulares .....	63
7.2.7.	Análisis estadístico del uso de LQ y AQS en la fermentación oscura .....	64

7.2.8.	Caracterización electroquímica de los mediadores redox a diferente pH ...	65
7.3.	Etapa II. Fotocatálisis heterogénea de productos derivados de la fermentación oscura.....	65
7.3.1.	Síntesis de la resina fenólica .....	65
7.3.2.	Incorporación superficial del ZnO y TiO <sub>2</sub> con la resina fenólica.....	66
7.3.3.	Deposición de platino en los semiconductores por fotorreducción .....	66
7.3.4.	Deposición de platino en los semiconductores por reducción química.....	66
7.3.5.	Caracterización de los semiconductores .....	67
7.3.6.	Sistema fotocatalítico para la producción de hidrógeno.....	69
7.4.	Pruebas de reusabilidad .....	70
	.....	70
7.5.	Acoplamiento de la fermentación oscura y el fotorreformado para la producción de hidrógeno .....	70
7.5.1.	Etapa 1: Fermentación oscura de glucosa empleando CA-LQ por un lodo anaerobio pretratado .....	70
7.5.2.	Etapa 2: Fotorreformado del efluente real de la fermentación oscura empleando TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ).....	71
7.6.	Métodos analíticos .....	71
a.	Determinación de biogás e hidrógeno.....	71
b.	Determinación de subproductos de fermentación .....	72
c.	Pruebas adicionales .....	72
7.7.	Disposición de residuos generados .....	72
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	74
8.1.	Etapa I. Fermentación oscura empleando mediadores redox disueltos e inmovilizados .....	74
8.1.1.	Caracterización de la riboflavina inmovilizada en el bagazo de agave .....	74
a.	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).....	74
8.1.2.	Inmovilización de LQ y AQS en carbón activado mineral.....	77
8.1.3.	Optimización de la producción de hidrógeno usando riboflavina disuelta e inmovilizada por <i>Clostridium beijerinckii</i> .....	79
8.1.3.1.	Efecto de la temperatura en la fermentación oscura por <i>Clostridium beijerinckii</i> .....	84
8.1.3.2.	Efecto de la riboflavina en la fermentación oscura por <i>Clostridium beijerinckii</i> .....	86

8.1.3.3.	Producción de subproductos líquidos en la fermentación oscura por <i>Clostridium beijerinckii</i> .....	88
8.1.4.	Efecto de LQ y AQS en la producción de hidrógeno por el lodo anaerobio granular.....	92
8.1.5.	Efecto de LQ y AQS en la producción de subproductos líquidos por el lodo anaerobio granular.....	97
8.1.6.	Efecto en la dirección metabólica por los mediadores redox en la fermentación oscura por el lodo anaerobio granular.....	102
<b>8.2.</b>	<b>Etapa II. Fotocatálisis heterogénea de productos derivados de la fermentación oscura.....</b>	<b>109</b>
8.2.1.	Exploración de los materiales sintetizados para la producción de hidrógeno .....	109
8.2.1.1.	Pruebas fotocatalíticas preliminares de agentes de sacrificio por individual.....	109
8.2.1.2.	Pruebas fotocatalíticas preliminares de agentes de sacrificio en mezcla.....	118
<b>8.3.</b>	<b>Caracterización de los semiconductores .....</b>	<b>122</b>
8.3.1.	Análisis BET y DLS .....	122
8.3.2.	Análisis DRX.....	124
8.3.3.	Análisis SEM-EDS .....	125
8.3.4.	Análisis XPS .....	130
8.3.5.	Propiedades ópticas .....	138
<b>8.4.</b>	<b>Voltamperometrías cíclicas .....</b>	<b>141</b>
<b>8.5.</b>	<b>Efecto del tipo de matriz en la producción de hidrógeno por el fotorreformado de la mezcla de agentes de sacrificio .....</b>	<b>143</b>
<b>8.6.</b>	<b>Reusabilidad de TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) empleando mezcla sintética en buffer y agua.....</b>	<b>154</b>
<b>8.7.</b>	<b>Mecanismo fotocatalítico principal propuesto para la formación de hidrógeno .....</b>	<b>156</b>
<b>8.8.</b>	<b>Acoplamiento de la fermentación oscura y fotorreformado para la producción de hidrógeno .....</b>	<b>158</b>
8.8.1.	Fermentación oscura (Etapa 1).....	158
8.8.2.	Fotorreformado (Etapa 2) .....	160

**9. CONCLUSIONES ..... 164**  
**10. REFERENCIAS ..... 167**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Métodos disponibles para la producción de hidrógeno. ....	23
<b>Fig. 2.</b> Ruta metabólica de la producción de hidrógeno. (NFOR: nicotinamida adenin dinucleótido (reducido) (NADH) ferredoxina oxidorreductasa; NFR: nicotinamida adenin dinucleótido (oxidado) (NAD) ferredoxina reductasa; Fd: ferredoxina; Hyd: hidrogenasa; Bcd/EtfAB: Butiril-CoA deshidrogenasa/"Electron transferring flavoprotein"). Imagen adaptada de Demmer et al. <sup>15</sup> , Hallenbeck et al. <sup>16</sup> y Ruggeri et al. <sup>17</sup> . ....	24
<b>Fig. 3.</b> Mecanismo de la fotocatalisis en un proceso de "water splitting" para la producción de hidrógeno <sup>143</sup> . ....	43
<b>Fig. 4.</b> Comparativo de potenciales redox (pH 7) y Eg de varios semiconductores comunes <sup>143</sup> . ....	46
<b>Fig. 5.</b> a) Esquema de transferencia de carga del TiO <sub>2</sub> /metal bajo irradiación UV debido a la existencia de la barrera de Schottky; b) Esquema de transferencia de carga del TiO <sub>2</sub> /metal bajo irradiación de luz visible debido a los efectos de resonancia de plasmón superficial (RPS) <sup>161</sup> . ....	49
<b>Fig. 6.</b> Propuesta del esquema de la ruta de producción de H <sub>2</sub> . ....	58
<b>Fig. 7.</b> Espectros FTIR con reflectancia total atenuada de la secuencia de la modificación química del bagazo de agave durante la inmovilización de la riboflavina. ....	75
<b>Fig. 8.</b> Estructura química de la riboflavina. ....	75
<b>Fig. 9.</b> Mecanismo de inmovilización de la riboflavina en el bagazo de agave <sup>130</sup> . ....	76
<b>Fig. 10.</b> Mecanismo de transesterificación de la riboflavina en el bagazo de agave <sup>130</sup> . ....	76
<b>Fig. 11.</b> a) Isotermas de adsorción de LQ (a) y AQS (c) en CA (símbolos) y predicción por modelo de Langmuir (línea continua) y modelo de Freundlich (línea discontinua). Capacidad de adsorción restante de LQ (b) y AQS (d) en CA antes y después de los ciclos de desorción. Los resultados experimentales representan la media ± los intervalos de confianza (IC). ....	78
<b>Fig. 12.</b> Mecanismo propuesto de la adsorción de lawsona (LQ) en carbón activado (CA) por la esterificación de Fischer (a) y antraquinona-2-sulfonato (AQS) en CA por sustitución nucleofílica (b). ....	79
<b>Fig. 13.</b> Gráfico de superficie de respuesta de Rmax y Hmax durante la fermentación oscura empleando riboflavina disuelta. ....	81
<b>Fig. 14.</b> Gráfico de superficie de respuesta de Rmax y Hmax durante la fermentación oscura empleando riboflavina inmovilizada en bagazo de agave. ....	82
<b>Fig. 15.</b> Cinéticas de la producción de hidrógeno a las condiciones obtenidas de la optimización dual con riboflavina libre e inmovilizada (I: riboflavina inmovilizada en BA, L: riboflavina disuelta, BA: bagazo de agave, Cb: Control sin riboflavina, END: endógeno). Los símbolos representan los datos experimentales, mientras que las líneas continuas son los datos predichos con el modelo de Gompertz modificado (R <sup>2</sup> =0.999). ....	84

<b>Fig. 16.</b> a) Máxima producción de hidrógeno (Hmax) y tasa de producción de hidrógeno (Rmax), b) consumo de glucosa y rendimiento de la optimización de la producción de H <sub>2</sub> empleando riboflavina disuelta e inmovilizada. ....	86
<b>Fig. 17.</b> Perfiles de producción de acetato (a), butirato (b) y etanol (c) de los experimentos de fermentación a las condiciones obtenidas de la optimización con riboflavina disuelta. ....	89
<b>Fig. 18.</b> Perfiles de producción de acetato (a), butirato (b) y etanol (c) de los experimentos de fermentación a las condiciones obtenidas de la optimización con riboflavina inmovilizada. ....	91
<b>Fig. 19.</b> Producción de hidrógeno acumulado empleando mediadores redox disueltos (LQ y AQS), inmovilizados en CA (CA-LQ y CA-AQS) , y controles experimentales (Control: sin mediador redox; CA: carbón activado crudo) durante la fermentación oscura a 37 °C. Los símbolos representan resultados experimentales y la líneas continuas representan la predicción con el modelo de Gompertz. El intervalo de confianza de todos los experimentos fue menor que 3.5 mL. ....	93
<b>Fig. 20.</b> Gráfico simultáneo de Tukey con intervalo de confianza del 95% de las diferencias de medias para Rmax (a) y Hmax (b) de la cinética de producción de hidrógeno. Si un intervalo de confianza no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes. ...	95
<b>Fig. 21.</b> Remoción de DQO, consumo de glucosa y acumulación de subproductos líquidos al final de la fermentación de glucosa empleando lodo anaerobio tratado. ....	98
<b>Fig. 22.</b> Perfil de subproductos líquidos obtenidos de la fermentación de glucosa empleando lodo anaerobio tratado. ....	99
<b>Fig. 23.</b> Ruta metabólica de la glucosa por bacterias productoras de hidrógeno bajo condiciones anaerobias mediante la ruta PFOR (Piruvato ferredoxina oxidorreductasa). (NFOR: nicotinamida adenin dinucleótido (reducido) (NADH) ferredoxina oxidorreductasa; NFR: nicotinamida adenin dinucleótido (oxidado) (NAD) ferredoxina reductasa; Fd: ferredoxina; Hyd: hidrogenasa; Bcd/EtfAB: Butiril-CoA deshidrogenasa/"Electron transferring flavoprotein"). Imagen adaptada de Demmer et al. <sup>15</sup> , Hallenbeck et al. <sup>16</sup> y Ruggeri et al. <sup>17</sup> . ....	104
<b>Fig. 24.</b> Voltamperogramas de LQ (a) y AQS (b) a una velocidad de escaneo de 20 mV/s. ....	105
<b>Fig. 25.</b> Producción de H <sub>2</sub> empleando agentes de sacrificio en forma individual bajo irradiación LED UV (365 nm) mediante el uso de R-TiO <sub>2</sub> -Pt (FR), R-TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ) y TiO <sub>2</sub> . ....	111
<b>Fig. 26.</b> Producción de H <sub>2</sub> empleando agentes de sacrificio en forma individual bajo irradiación LED Vis mediante el uso de R-TiO <sub>2</sub> -Pt (FR), R-TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ) y TiO <sub>2</sub> . ....	113
<b>Fig. 27.</b> Tasas de producción de H <sub>2</sub> empleando diversos materiales con base al TiO <sub>2</sub> bajo irradiación LED UV y LED Vis para diversos agentes de sacrificio individuales. ....	116
<b>Fig. 28.</b> Producción de H <sub>2</sub> empleando agentes de sacrificio en mezcla bajo irradiación LED UV. ....	121
<b>Fig. 29.</b> Potenciales de oxidación y reducción de los AS, y de la BV y BC del TiO <sub>2</sub> y ZnO. ....	121

<b>Fig. 30.</b> Patrones de DRX de los fotocatalizadores evaluados para la producción de hidrógeno. a: TiO <sub>2</sub> , b: TiO <sub>2</sub> -Pt (FR), c: TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ), d: R-TiO <sub>2</sub> , e: R-TiO <sub>2</sub> -Pt (FR), f: R-TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ). Líneas grises continuas se refieren al patrón de TiO <sub>2</sub> anatasa (JCPDS No. Ficha 21-1272).....	124
<b>Fig. 31.</b> Imágenes SEM de TiO <sub>2</sub> (a y b), TiO <sub>2</sub> -Pt (FR) (c, d, e, f); y patrón DRX (g) del TiO <sub>2</sub> -Pt (FR). .....	126
<b>Fig. 32.</b> Imágenes SEM de TiO <sub>2</sub> (a y b), TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ) (c, d, e, f); y patrón DRX (g) del TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ).....	128
<b>Fig. 33.</b> Imágenes SEM de R-TiO <sub>2</sub> (a, b), R-TiO <sub>2</sub> -Pt (FR) (c, e), R-TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ) (d, f); y patrón DRX del R-TiO <sub>2</sub> -Pt (FR) (g) y R-TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ) (h). ....	129
<b>Fig. 34.</b> Espectros XPS del TiO <sub>2</sub> (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c).....	132
<b>Fig. 35.</b> Espectros XPS del R-TiO <sub>2</sub> (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c) y C1s (d). ....	133
<b>Fig. 36.</b> Espectros XPS del TiO <sub>2</sub> -Pt (FR) (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c) y Pt4f (d). ....	134
<b>Fig. 37.</b> Espectros XPS del TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ) (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c) y Pt4f (d). ....	135
<b>Fig. 38.</b> Espectros XPS del R-TiO <sub>2</sub> -Pt (FR) (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c), C1s (d) y Pt4f (e). .....	136
<b>Fig. 39.</b> Espectros XPS del R-TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ) (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c), C1s (d) y Pt4f (e). .....	137
<b>Fig. 40.</b> Tauc-plot (a), coeficiente de absorción ( $\kappa$ , b) y albedo de dispersión ( $\omega$ , c) de los semiconductores evaluados para la producción de hidrógeno.....	140
<b>Fig. 41.</b> Voltamperogramas de semiconductores sin resina (a) y semiconductores con resina (b) a una velocidad de escaneo de 50 mV/s, usando hexaferrocianato de sodio (1 mM) en KCl 1 M. .....	142
<b>Fig. 42.</b> Cinéticas de producción de hidrógeno y metano de los semiconductores evaluados bajo diferentes matrices. a: H <sub>2</sub> , matriz agua desionizada; b: H <sub>2</sub> , matriz buffer; c: CH <sub>4</sub> , matriz agua desionizada; d: CH <sub>4</sub> : matriz buffer. ....	145
<b>Fig. 43.</b> Punto de carga cero del TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ) y TiO <sub>2</sub> en matriz de buffer y agua desionizada. .....	148
<b>Fig. 44.</b> Diagrama de Pourbaix de especies fosfatadas (líneas horizontales punteadas en rojo representan los potenciales de la banda de valencia y conducción del TiO <sub>2</sub> ; línea vertical punteada en morado representa el pH del sistema de fotorreformado). ....	150
<b>Fig. 45.</b> Diagrama de Pourbaix de especies cloradas (líneas horizontales en rojo representan los potenciales de la banda de valencia y conducción del TiO <sub>2</sub> ; línea vertical punteada en morado representa el pH del sistema de fotorreformado). ....	151
<b>Fig. 46.</b> Porcentaje de conversión de cada agente de sacrificio (AS) de la mezcla después de la fotocatalisis para los diversos semiconductores evaluados, bajo diferentes matrices (a: agua desionizada, b: buffer).....	152
<b>Fig. 47.</b> Cinéticas de reusabilidad del TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ) en el fotorreformado de la mezcla de agentes de sacrificio en la producción de H <sub>2</sub> (a) y CH <sub>4</sub> (b) en matriz de buffer. ....	155

**Fig. 48.** Ciclos de reusabilidad en la producción de H<sub>2</sub> (a) y CH<sub>4</sub> (b) de TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) en matriz de agua. .... 156

**Fig. 49.** Mecanismo fotocatalítico principal propuesto para la formación de hidrógeno por TiO<sub>2</sub>-Pt (a) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (b). .... 157

**Fig. 50.** Cinéticas de producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura empleando lawsona inmovilizada en carbón activado (CA-LQ) con lodo anaerobio tratado en un volumen de trabajo de 0.7 L. . 158

**Fig. 51.** Consumo de glucosa y acumulación de subproductos líquidos al final de la fermentación oscura empleando lodo anaerobio tratado en un volumen de trabajo de 0.7 L (a), y perfil de los principales subproductos líquidos identificados (b). .... 159

**Fig. 52.** Cinéticas de producción de H<sub>2</sub> (a) y CH<sub>4</sub> (b) del fotorreformado del efluente real de la fermentación oscura de glucosa empleando TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) como fotocatalizador. .... 162

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Potenciales redox estándar de algunas especies <sup>153</sup> .....	46
<b>Tabla 2.</b> Diseño central compuesto 2 <sup>2</sup> .....	63
<b>Tabla 3.</b> Parámetros estimados de las isothermas a partir de los datos experimentales de la adsorción de LQ y AQS en CA, y los resultados de desorción después de cinco ciclos. ....	77
<b>Tabla 4.</b> Parámetros de Gompertz de la fermentación oscura con riboflavina disuelta e inmovilizada en bagazo de agave.....	80
<b>Tabla 5.</b> Condiciones óptimas de la fermentación oscura con riboflavina en bagazo de agave.	83
<b>Tabla 6.</b> Parámetros cinéticos estimados a partir del modelo de Gompertz modificado de los resultados experimentales, consumo de sustrato, y rendimiento de los tratamientos evaluados. ....	94
<b>Tabla 7.</b> Influencia de los mediadores redox en la fermentación oscura durante la producción de hidrógeno.....	96
<b>Tabla 8.</b> Efecto de los diferentes tratamientos en la selectividad de los subproductos y la concentración final de los subproductos de las fermentaciones empleando lodo anaerobio pretratado en reactores en lote. ....	101
<b>Tabla 9.</b> Potenciales redox de LQ y AQS a diferente pH y 500 $\mu\text{M}$ . ....	106
<b>Tabla 10.</b> Estudios de producción de hidrógeno por medio de fotorreformado de alcoholes y ácidos grasos como agentes de sacrificio. ....	117
<b>Tabla 11.</b> Producción de hidrógeno y metano en $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ del ensayo exploratorio de los materiales sintetizados empleando los agentes de sacrificio en forma individual bajo diferente fuente de irradiación. ....	118
<b>Tabla 12.</b> $H_{\text{maxFH}}$ y $R_{\text{maxFH}}$ de la fotocatalisis de la mezcla de agentes de sacrificio usando los diferentes materiales sintetizados bajo diferente fuente de irradiación, estimados por el modelo de Gompertz modificado. ....	119
<b>Tabla 13.</b> Potenciales de oxidación estándar (vs. ENH) para los diferentes AS utilizados en este estudio.....	122
<b>Tabla 14.</b> Propiedades físicas de los materiales a evaluar. ....	123
<b>Tabla 15.</b> Energías de enlace de C1s, Ti2p, O1s y Pt4f y contribuciones porcentuales de cada elemento en los semiconductores evaluados. ....	138
<b>Tabla 16.</b> Propiedades fisicoquímicas de los semiconductores evaluados en la producción de hidrógeno.....	141
<b>Tabla 17.</b> $H_{\text{maxFH}}$ y $R_{\text{maxFH}}$ de las cinéticas de producción de $\text{H}_2$ y $\text{CH}_4$ de los semiconductores evaluados bajo diferentes matrices. ....	145

<b>Tabla 18.</b> Potencial zeta de los semiconductores bajo diferentes matrices a pH 5.3. ....	147
<b>Tabla 19.</b> Constantes de disociación de los agentes de sacrificio empleados en la mezcla para el fotorreformado. ....	148
<b>Tabla 20.</b> $H_{max_{FH}}$ y $R_{max_{FH}}$ de las cinéticas de producción de $H_2$ y $CH_4$ del fotorreformado del efluente real de la fermentación oscura de la glucosa. ....	163

## 1. INTRODUCCIÓN

La dependencia de la sociedad moderna por el uso de energía es incuestionable; sin embargo, las fuentes de energía actuales provienen mayormente de combustibles fósiles a pesar de que su uso trae consigo grandes impactos ambientales, además su agotamiento será inevitable por su naturaleza no renovable. Entre el año 2000 y 2013, la demanda de energía global incrementó 38%, mientras que para el año 2025 se estima que el consumo de energía global será de 50 a 60% mayor, comparado con el consumo actual, ya que la población aumentará a 8.5 billones de personas. Esta creciente demanda de energía ocasionará indudablemente un incremento en la emisión de gases de efecto invernadero<sup>1</sup>. Asimismo, el sector energético incrementará sus emisiones de CO<sub>2</sub> del 50% en el 2030 a 80% en el 2050<sup>1</sup>, de acuerdo con la Agencia Internacional de Energía (IEA, por sus siglas en inglés), contribuyendo al calentamiento global.

Por las razones antes expuestas, el inicio de una revolución energética es necesario para reducir el impacto ambiental. Dentro de las opciones disponibles para la obtención de energía limpia, el hidrógeno emerge como una opción interesante ya que el agua es el único producto de su combustión. En la actualidad, se busca convertir el hidrógeno a electricidad mediante el uso de celdas de combustible y emplear esta tecnología para aplicaciones estacionarias y vehiculares. El H<sub>2</sub> posee un poder energético (*High Heating Value*, HHV:142 MJ/kg) mayor que los principales combustibles fósiles como la gasolina (HHV: 47.5 MJ/kg) y el diésel (HHV: 44.8 MJ/kg)<sup>2</sup>. No obstante, alrededor del 96% de las principales rutas de producción de H<sub>2</sub> emplean combustibles fósiles en su proceso, por lo que el estudio de rutas alternas de producción es indispensable para reducir la dependencia de los hidrocarburos fósiles.

La producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura está siendo evaluada como una estrategia para reducir la dependencia de combustibles fósiles y cubrir la demanda energética minimizando las emisiones de gases de efecto invernadero provocadas por la combustión de hidrocarburos. Además, esta tecnología presenta una eficiencia aproximada del 60 a 80% en producción de hidrógeno<sup>2</sup>.

Independientemente del tipo de crecimiento elegido (suspendido o adherido), una desventaja de la fermentación oscura es la formación de subproductos líquidos como ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta, principalmente ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, entre otros. Éstos AGV pueden inhibir o reducir la actividad del microorganismo durante la fermentación si no hay un buen control de la capacidad

amortiguadora en el medio líquido. Así mismo, el efluente líquido de la fermentación oscura debe ser sometido a un tratamiento biológico posterior (e.g. digestión anaerobia o lodos activados) para cumplir con los límites máximos permitidos de descargas de aguas tratadas en aguas o bienes nacionales.

Otra alternativa para el uso de los subproductos líquidos de la fermentación oscura es la obtención de H<sub>2</sub> por fotocátalisis heterogénea. Este proceso requiere un semiconductor, una fuente de emisión de fotones y agentes de sacrificio (i.e. compuestos orgánicos oxidables) capaces de utilizar los huecos generados y, de esta manera, posibilitar la utilización de los electrones fotogenerados para la reducción de iones hidronio presentes en agua para la generación de H<sub>2</sub>. Dentro de los semiconductores estudiados, los óxidos metálicos como el TiO<sub>2</sub> y el ZnO han sido destacados por su excelente desempeño en el proceso fotocatalítico, pero requieren luz ultravioleta para su activación. Las resinas fenólicas han atraído la atención por su buen desempeño como fotocatalizador, así mismo éstas pueden ser sensibilizadas para ser activadas bajo irradiación visible. Del mismo modo, la incorporación de cocatalizadores metálicos (e.g. Pt, Ag, Au, Ni) en semiconductores mejora la utilización de electrones para la reducción de iones hidronio, incrementando la producción de H<sub>2</sub>.

En esta propuesta de investigación se producirá H<sub>2</sub> mediante fermentación oscura empleando un monocultivo de *Clostridium beijerinckii* y un cultivo mixto a partir de un lodo anaerobio granular, y se buscará mejorar la producción de hidrógeno añadiendo mediadores redox en el bioproceso; además, se evaluará la utilización de los subproductos líquidos de la fermentación oscura para la generación de H<sub>2</sub> por fotocátalisis heterogénea utilizando semiconductores modificados a base de óxidos metálicos (TiO<sub>2</sub> y ZnO) con la presencia de un polímero como sensibilizador y con un cocatalizador metálico.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Hidrógeno como fuente de energía

En los últimos años, el hidrógeno ha ganado la atención de la comunidad científica como combustible para la generación de energía; entre sus principales ventajas se encuentra su disponibilidad en la naturaleza, al ser un recurso renovable, que se encuentra combinado en compuestos como hidrocarburos y agua. Las ventajas principales que tiene el hidrógeno al ser empleado como fuente de energía alternativa son<sup>3</sup>:

1. *Alta eficiencia energética.* El hidrógeno puede convertirse de forma directa en energía eléctrica. Este proceso se lleva a cabo en celdas de combustible, que convierten electroquímicamente, la energía química del H<sub>2</sub> en energía eléctrica. La electricidad producida puede emplearse para uso industrial y doméstico, o para fines de transportación.
2. *Dependencia energética a los combustibles fósiles.* La constante demanda de combustibles fósiles conlleva a una dependencia energética globalizada<sup>4</sup>. Sin embargo, las reservas de estos combustibles se agotarán, por lo cual la búsqueda de fuentes de energía alternativa es necesaria. El hidrógeno podría jugar un papel importante en la disminución de la dependencia energética.
3. *Fuente de energía limpia.* El hidrógeno al ser convertido en energía, solo libera vapor de agua, libre de CO<sub>2</sub>. Buscando la aplicación del H<sub>2</sub> en la conversión a electricidad y ésta a su vez aplicada para el funcionamiento de medios de transporte, se generaría un efecto importante en la reducción de emisiones de CO<sub>2</sub>. Mientras que el vapor de agua podría ser recuperado y aprovechado en otros fines.

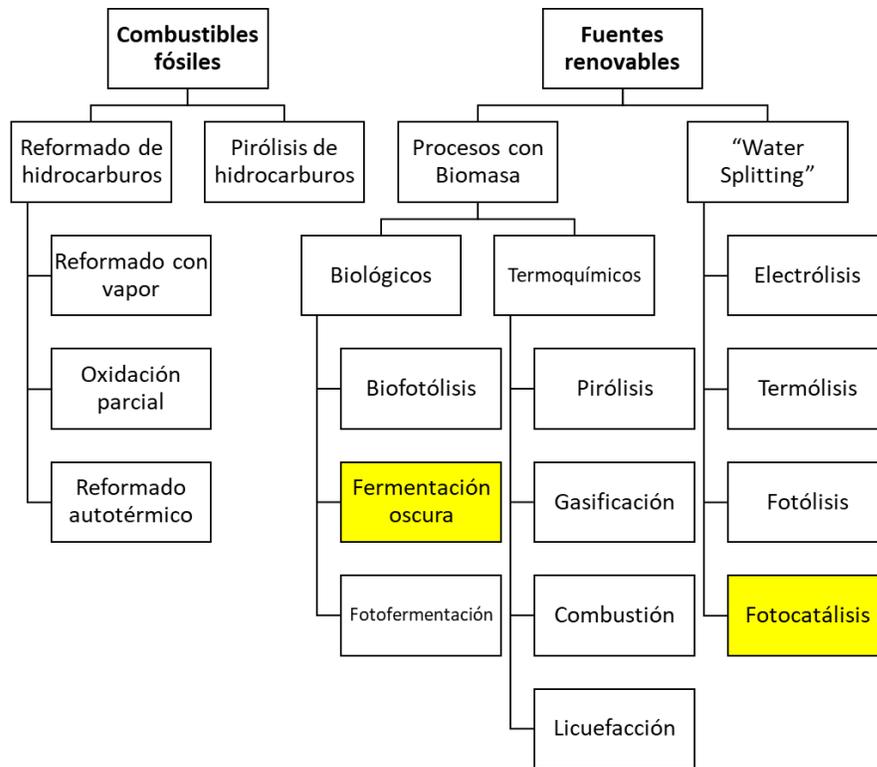
Sin embargo, a lo largo del estudio del hidrógeno como fuente de energía se han observado diversas situaciones que se tienen que tomar en cuenta para su utilización, entre las más importantes están los temas relacionados a la seguridad debido a su alto grado de ignición y explosividad; así mismo se encuentran los temas de almacenamiento de éste y los altos costos por compresión y purificación; y finalmente el desarrollo de tecnologías que sean viables para la utilización del hidrógeno y aumentar su alcance a usos no solo industriales, sino domésticos.

## 2.2. Rutas de producción de hidrógeno

El principal contratiempo de emplear el hidrógeno como combustible es su disponibilidad en la naturaleza y los métodos de producción costosos<sup>5</sup>. En la Fig. 1 se condensan una variedad de procesos para la producción de hidrógeno, y la clasificación de estos métodos puede dividirse de acuerdo al tipo de materia prima empleada: métodos convencionales que emplean combustibles fósiles y métodos que emplean fuentes renovables<sup>2</sup>.

La primera categoría corresponde a procesos con combustibles fósiles que incluyen los métodos de reformado de hidrocarburos y pirólisis. En el reformado de hidrocarburos participan procesos químicos como reformado con vapor, oxidación parcial y reformado autotérmico con vapor.

La segunda categoría son métodos que producen hidrógeno a partir de fuentes renovables, es decir, biomasa y agua. Dentro de los métodos que usan biomasa, existe una subdivisión: procesos termoquímicos y procesos biológicos. Los métodos termoquímicos incluyen pirólisis, gasificación, combustión y licuefacción; mientras que los métodos biológicos son biofotólisis (directa e indirecta), fermentación oscura, fotofermentación y la secuencia de la fermentación oscura y la fotofermentación. Por otro lado, se encuentran los métodos que producen hidrógeno por medio de reacciones con el agua (*water splitting*), en esta clase se incluyen procesos de electrólisis, termólisis, fotólisis y fotocatalisis.



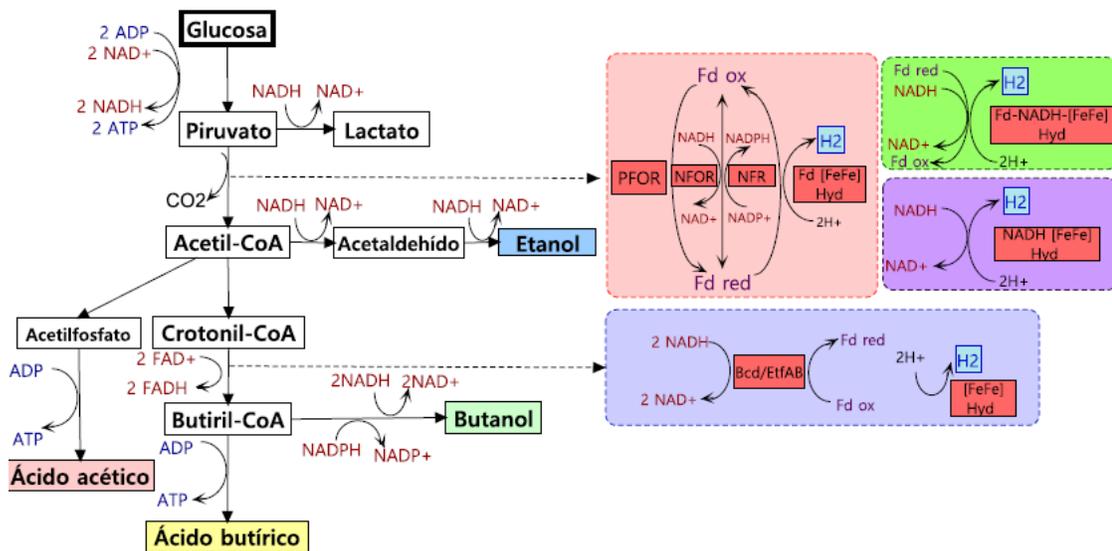
**Fig. 1.** Métodos disponibles para la producción de hidrógeno.

### 2.3. Fermentación oscura y su metabolismo

El proceso conocido como fermentación, es aquel que bajo condiciones anaerobias se desarrolla la regeneración de energía celular desencadenando una serie de reacciones metabólicas; bajo condiciones anaerobias el ciclo de Krebs es bloqueado, por lo que los reductores extracelulares son empleados para la formación de metabolitos reducidos, por ejemplo, los ácidos grasos volátiles y alcoholes. Gracias a este ambiente reductor, la producción de hidrógeno dentro de la célula se lleva a cabo para mantener el potencial redox del sistema biológico. Aunque estas reacciones son en su mayoría termodinámicamente favorables y espontáneas, también son reguladas por restricciones biológicas, es decir, por los microorganismos y por la interacción interespecies existente en la comunidad microbiana<sup>6</sup>.

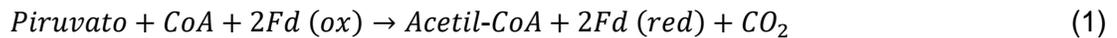
El sustrato modelo por excelencia ha sido la glucosa en el estudio de la fermentación oscura, esta fuente de carbohidratos al ser metabolizada produce principalmente algunos ácidos grasos volátiles como acetato y butirato, junto con hidrógeno y dióxido de carbono. Al emplear sustratos más complejos, como residuos lignocelulósicos, estiércol, lodos activados, etc., la producción de hidrógeno se desarrolla después de

hidrolizar estos sustratos y obtener azúcares más simples asimilables por los microorganismos. La producción de piruvato, que es un intermediario clave en la fermentación clave se lleva a cabo a través de la glucólisis de la glucosa para la regeneración de ATP (adenosín trifosfato); es entonces donde el piruvato puede entrar a diferentes rutas metabólicas que conducen hacia la producción de hidrógeno (Fig. 2). La producción de hidrógeno es una respuesta natural de la célula que necesita liberar el exceso de electrones y siempre es acompañada con la producción de ácidos grasos volátiles y alcoholes. La producción de la pareja hidrógeno-acetato genera más ATP por molécula de sustrato empleado en comparación con los alcoholes como el etanol o butanol, y esto hace que energéticamente sea preferida esta ruta metabólica por las bacterias fermentadoras<sup>7</sup>. El rendimiento estequiométrico es de 4 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa cuando el ácido acético es el subproducto<sup>8</sup>, y 2 moles de hidrógeno por mol de glucosa son producidos cuando el butirato es generado<sup>9-11</sup>. En la práctica, al usar sustratos complejos a partir de residuos que son ricos en nutrientes se emplea la demanda química de oxígeno (DQO) como parámetro para conocer la concentración de compuestos que pueden ser oxidados y transformados por el proceso biológico, los rendimientos de producción de hidrógeno se encuentran entre 10-20% de la DQO <sup>12</sup>, que es equivalente a 1.17-2.34 mol H<sub>2</sub>/ mol glucosa<sup>12-14</sup>.

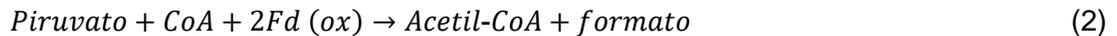


**Fig. 2.** Ruta metabólica de la producción de hidrógeno. (NFOR: nicotinamida adenin dinucleótido (reducido) (NADH) ferredoxina oxidoreductasa; NFR: nicotinamida adenin dinucleótido (oxidado) (NAD) ferredoxina reductasa; Fd: ferredoxina; Hyd: hidrogenasa; Bcd/EtfAB: Butiril-CoA deshidrogenasa/“Electron transferring flavoprotein”). Imagen adaptada de Demmer *et al.*<sup>15</sup>, Hallenbeck *et al.*<sup>16</sup> y Ruggeri *et al.*<sup>17</sup>.

Los anaerobios estrictos como los microorganismos del género *Clostridia* y algunos anaerobios termofílicos, convierten el piruvato a acetil-CoA por la acción de la enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductasa. Posteriormente, el acetil-CoA se convierte en acetato y ATP. La oxidación del piruvato a acetil-CoA requiere la reducción de la ferredoxina (Fd). La enzima hidrogenasa [FeFe] después oxida la Fd reducida y se produce hidrógeno. La reacción general se muestra en la Ec. 1.



Existen microorganismos facultativos, como *Escherichia coli*, que desarrollan otro tipo de reacción metabólica que produce hidrógeno; en la reacción, el piruvato es oxidado a acetil-CoA y formato. La enzima piruvato formato liasa (Ec. 2).



Más tarde, los gases de hidrógeno y dióxido de carbono son producidos a partir del formato por la enzima formato hidrógeno liasa (FHL)<sup>18</sup> (Ec.3).



Otra ruta metabólica que se puede presentar en algunos microorganismos es la producción de lactato; cuando el resultado del metabolismo termina en ácido láctico, etanol o propionato, entonces no existirá la generación de hidrógeno. Algunos microorganismos anaerobios facultativos llevan a cabo la respiración anaeróbica empleando nitrato, fumarato, entre otros, como aceptor terminal de electrones; este proceso respiratorio inhibe la producción de hidrógeno; debido a esto, en la fermentación oscura se debería evitar la adición de compuestos aceptores de electrones en el medio<sup>19</sup>. La generación de ácidos orgánicos durante la fermentación oscura puede promover la utilización de dichos compuestos como sustratos en un proceso de fotofermentación; donde los ácidos orgánicos son oxidados en hidrógeno y dióxido de carbono por bacterias fotofermentadoras (Ec. 4). Estos dos procesos combinados alcanzan una conversión teórica de 12 mol de hidrógeno por mol de dextrosa.



## 2.4. Factores que provocan efectos en la fermentación oscura

### 2.4.1. pH del medio de cultivo

Dentro de los factores que afectan la producción de hidrógeno por fermentación oscura, el pH es un parámetro que tiene gran influencia, debido a que afecta el funcionamiento de diferentes enzimas celulares, esto recae directamente en el metabolismo de los microorganismos encargados del proceso fermentativo. Además, es cierto que cada enzima tiene un rango de pH óptimo para alcanzar la máxima actividad<sup>20-22</sup>. Durante la fermentación oscura la disminución del pH es un hecho, y esto ocurre debido a la acumulación de ácidos en el medio de fermentación, esta situación ocasiona diversos efectos como lo son:

- a. Inhibición enzimática, en primer orden de las hidrogenasas que son las enzimas clave para la producción de hidrógeno<sup>23</sup>.
- b. Desencadenar un cambio en el metabolismo hacia la solventogénesis, es decir, la conversión de ácidos en alcoholes, para reducir la toxicidad que ofrece la acumulación de ácido<sup>24</sup>.
- c. Penetración de los ácidos no polares y no disociados presentes en el medio a las paredes celulares provocando su inactivación<sup>22</sup>.
- d. Si el pH baja más de 5.0, la producción de hidrógeno disminuye por la formación de subproductos ácidos, que afectan la capacidad de los microorganismos en mantener el pH interno celular<sup>25</sup>.
- e. También, la reducción del pH causa una disminución de los niveles de ATP intracelular e inhibe el aprovechamiento de la glucosa en el metabolismo<sup>19</sup>.

El pH óptimo varía para cada tipo de microorganismo y sustrato empleado. Diversos autores han demostrado que el pH del medio entre 5.0 y 6.0 ha sido apropiado para obtener altos rendimientos en la producción de hidrógeno<sup>26-28</sup>. Por todos los efectos antes mencionados, el control del pH es muy importante en el proceso de fermentación oscura con la finalidad de maximizar la producción de hidrógeno.

#### 2.4.2. Temperatura

La fermentación oscura puede llevarse a cabo a diferentes temperaturas, y esto es a causa del tipo de microorganismos elegido para el proceso. Los microorganismos pueden clasificarse según la temperatura a la que se reproducen: mesofílicos (25-40 °C), termofílicos (40-60 °C), termofílicos extremos (65-80 °C) o hipertermofílicos (>80 °C)<sup>29</sup>. La mayoría de los estudios desarrollados a nivel laboratorio han empleado temperaturas mesófilas<sup>30</sup>. Sin embargo, es notorio el efecto que puede tener la temperatura en la producción de hidrógeno, principalmente en la velocidad de crecimiento celular y en la velocidad de utilización de sustrato. Otro efecto importante que se presenta cuando la temperatura es alta, es la inactivación de las enzimas protagonistas del proceso fermentativo<sup>31,32</sup>.

Algunos estudios han encontrado relación entre la temperatura y el cambio de metabolitos producidos, de acuerdo a los cambios que produce la temperatura en la comunidad microbiana, afectando o favoreciendo la producción de hidrógeno<sup>33-35</sup>. Por ejemplo, Lin *et al.*<sup>33</sup> estudiaron el efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno usando un consorcio microbiano en un rango de 30-55 °C, ellos encontraron que a 45 °C alcanzaban la mayor producción de hidrógeno<sup>36,37</sup>, principalmente por el aceleramiento del metabolismo microbiano y al tipo de microorganismos que toleraban temperaturas más elevadas.

#### 2.4.3. Presión parcial de hidrógeno en el medio de cultivo

El metabolismo de los microorganismos durante la producción de hidrógeno es muy sensible a la presión parcial de hidrógeno presente en un biorreactor. La presión parcial de hidrógeno tiende a aumentar en el biorreactor cuando el hidrógeno producido es acumulado en el sistema. Un incremento en la presión parcial de hidrógeno puede direccionar la ruta metabólica de los microorganismos hacia la síntesis de productos reducidos, esto afecta el rendimiento de la producción de hidrógeno<sup>38</sup>. El purgado del sistema con nitrógeno durante el proceso fermentativo incrementa la eficiencia ya que este permite mantener la presión parcial de hidrógeno a un nivel bajo y al mismo tiempo, ayuda a disponer el dióxido de carbono, que es un factor potencial a favorecer la acetogénesis<sup>39</sup>. Bastidas-Oyanedel *et al.*<sup>40</sup> emplearon un flujo de nitrógeno (58.4 L/día) en el espacio de cabeza del sistema, ellos reportaron un incremento en el rendimiento de la producción de hidrógeno de 1 a 3.25 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa a pH 4.5; explicaron que el aumento observado en el rendimiento de hidrógeno se debía al control termodinámico

por la baja presión parcial de hidrógeno que afectó enzimas como la lactato hidrogenasa, NADH hidrogenasa y reacciones de homoacetogénesis.

#### 2.4.4. Tipos de sustrato

El sustrato es la fuente de nutrientes principalmente como carbohidratos en un proceso catabólico para desencadenar todas las reacciones metabólicas y así la obtención final de los metabolitos de interés, en la fermentación oscura no es la excepción. Dentro del estudio de la fermentación oscura para la producción de hidrógeno se han evaluado diferentes sustratos, desde los sustratos modelo como la glucosa, dextrosa, sacarosa y fructosa, así como carbohidratos de mayor complejidad como la celulosa, hemicelulosa, galactosa, xilosa, etc. De igual manera, el uso de biomasa proveniente de diferentes fuentes ha sido evaluado para llevar la investigación hacia un nivel industrial.

##### 2.4.4.1. Empleo de residuos de lodos activados como sustrato

Los residuos de lodos activados han sido considerados una fuente viable para ser utilizada como sustrato en procesos biológicos, esto debido a la gran cantidad que se generan y por el contenido rico en materia carbonosa no tóxica. La composición de los lodos puede dividirse en 4 categorías: 1) fuentes no tóxicas de carbono, principalmente por células microbianas y compuestos poliméricos extracelulares; 2) nutrientes inorgánicos como compuestos nitrogenados y fosforados; 3) fuentes tóxicas inorgánicas y orgánicas por contaminantes como metales pesados, pesticidas, estrógenos, microorganismos patógenos, etc.; y 4) sustancias inorgánicas como silicatos, compuestos que contienen calcio y magnesio<sup>41</sup>.

La composición rica de sustancias orgánicas hace a este tipo de deshecho atractivo para su aprovechamiento en la producción de energía renovable<sup>42,43</sup>. Sin embargo, debido a que el mayor contenido de materia orgánica se encuentra encapsulado en las células microbianas es necesario someterlo a tratamientos previos para romper la membrana celular y liberar el contenido orgánico. De los pretratamientos estudiados para los residuos de lodo activado están el tratamiento térmico, químico, ultrasonido, microondas, radiación con rayos gamma, ozono, etc.

El uso de este tipo de residuos para la producción de hidrógeno ha sido evaluada por varios autores; tal es el caso de Wang *et al.*<sup>44</sup> que emplearon residuos de lodos activados pretratado térmicamente en un proceso de fermentación oscura con *Clostridium bifermentans* alcanzando un rendimiento de 70.6 mL H<sub>2</sub>/g ST (sólidos totales); mientras

que otros autores como Assawamongkhol Siri *et al.*<sup>45</sup> utilizaron este tipo de residuo tratado químicamente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ellos implementaron un inóculo de lodo anaerobio y reportaron un rendimiento aproximadamente de 12 a 41 mL H<sub>2</sub>/g ST. Yasin *et al.*<sup>46</sup> obtuvieron un rendimiento de 1.5 mL H<sub>2</sub>/g ST con la combinación de residuo de lodo activado y jugo de hojas de palma de aceite con un inóculo de *Escherichia coli*.

#### 2.4.4.2. Empleo de algas como sustrato

Las algas representan una opción viable para ser empleadas como sustrato en los procesos biológicos para la generación de energía, esto radica en que constituyen una excelente fuente de almacenamiento de carbono debido a que su reproducción se considera fácil y rápida<sup>47</sup>.

La composición química de las algas puede variar según la especie; las macroalgas presentan un contenido alto de agua, minerales y carbohidratos. Dentro de las macroalgas, las algas verdes y cafés son las más empleadas en procesos fermentativos para la obtención de energía. Las algas verdes poseen altos contenidos de carbohidratos (25-60%) como manosa, almidón y celulosa. Mientras que las algas cafés su contenido de carbohidratos varía entre 30-50% y los componentes principales son el alginato, celulosa y laminarina<sup>48</sup>. Las microalgas son microorganismos con capacidad de adaptarse a diferentes ambientes, ya que pueden ser cultivadas en agua dulce, salada o agua residual. Su composición química varía dependiendo la especie; sin embargo, los principales componentes son: proteínas (40-60%), carbohidratos (5-60%), lípidos (8-30%) y ácidos nucleicos (5-10%)<sup>48</sup>.

Debido a su composición química, las algas y/o microalgas son consideradas una materia prima viable para la producción de bioetanol, biodiesel y biogás. Respecto a su aplicación en la producción de hidrógeno, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Saccharina sp.* han sido especies estudiadas para este uso, reportando rendimientos de 0.4-760 mL H<sub>2</sub>/g SV (sólidos volátiles), 0.42-113.1 mL H<sub>2</sub>/g SV y 23.4-159.6 mL H<sub>2</sub>/g SV, respectivamente<sup>49-54</sup>. Las principales dificultades encontradas de la aplicación de este tipo de biomasa, es principalmente el cultivo de la biomasa y su recolección; se considera que es necesario desarrollar metodologías y condiciones que sean más eficientes y económicas para su producción y recuperación del medio<sup>55</sup>.

#### 2.4.4.3. *Empleo de residuos lignocelulósicos como sustrato*

Los residuos lignocelulósicos se encuentran principalmente en deshechos agrícolas y deshechos municipales; como por ejemplo rastrojo, pajas, tallos, residuos forestales, recortes de jardín, hierba, astillas de madera, cáscaras, mazorcas, bagazo y otros residuos lignocelulósicos. La generación de este tipo de biomasa ha sido evaluada en aproximadamente 220 billones de toneladas por año a nivel mundial<sup>56</sup>, que equivale a 60-80 billones de toneladas de aceite crudo<sup>57</sup>, por lo cual representa una materia prima atractiva y de bajo costo para la generación de energía. Alrededor del 14% del suministro de energía es a través de esta biomasa lignocelulósica, siendo la cuarta fuente de energía después del carbón, petróleo y gas natural<sup>58</sup>.

La composición química de la biomasa lignocelulósica esta constituida principalmente por tres biopolímeros: celulosa (30-70%), hemicelulosa (15-30%) y lignina (10-25%); sin embargo, la composición específica de cada tipo de residuo varía según la especie vegetal que lo conforma. Los biopolímeros mencionados se encuentran unidos químicamente entre ellos, creando una red polimérica compleja de celulosa-hemicelulosa-lignina. En dicha red, las fibras de celulosa y la lignina están unidas por la hemicelulosa, que está unida covalentemente a la lignina<sup>59</sup>. Esta estructuración química dificulta la disponibilidad de la celulosa, que es el sustrato con mayor facilidad a ser metabolizado en procesos biológicos; por lo que la eliminación de la lignina, que no es biodegradable por los microorganismos, es un paso necesario para utilizar estos residuos. La eliminación de la lignina se realiza por tratamientos previos mediante procesos físicos, químicos y/o biológicos<sup>60</sup>.

La producción de hidrógeno a partir de residuos lignocelulósicos presenta inconvenientes debido a la baja actividad hidrolítica de los microorganismos para romper la estructura microcristalina y heterogénea de la materia lignocelulósica liberando azúcares solubles celulósicos. Debido a esto es necesario la aplicación de pretratamientos apropiados a estos residuos<sup>61</sup>. Dentro de los pretratamientos más empleados, la molienda o trituración precede a cualquier otro pretratamiento; esta disminución de partícula aporta una mayor área superficial disponible en el proceso fermentativo. Los métodos químicos también son ampliamente usados en el tratamiento de residuos lignocelulósicos a través del uso de agentes oxidantes, ácidos, álcalis y sales<sup>62</sup>. Otro tipo de pretratamiento realizado a estos deshechos lignocelulósicos son los métodos biológicos a través del uso de enzimas como oxidasas y peroxidasas, entre otras, que descomponen la estructura ligninolítica y facilitan la presencia de azúcares en

el medio; otro método biológico es el uso directo de microorganismos como hongos de pudrición blanca o café que degradan la lignina a través de su sistema enzimático complejo<sup>60,63</sup>.

Algunos estudios han sido realizados empleando residuos agrícolas como sustrato en la producción de hidrógeno obteniendo resultados favorecedores, tal es el caso de Kongjan *et al.*<sup>64</sup> que trataron térmicamente paja de trigo a 70 °C y la emplearon en un proceso de fermentación oscura con un inóculo de lodo anaerobio alcanzando un rendimiento de hasta 178 mL H<sub>2</sub>/g ST; Wu *et al.*<sup>65</sup> emplearon un pretratamiento combinado con ozono y enzimas a un residuo de paja de maíz, utilizaron un inóculo de estiércol de vaca y reportaron un rendimiento de 93.4 mL H<sub>2</sub>/g ST; Song *et al.*<sup>66</sup> aplicaron un pretratamiento mecánico mediante la trituración de un residuo de tallos de maíz y mediante una fermentación oscura con *Clostridium butyricum* FS3 reportando un rendimiento de 92.9 mL H<sub>2</sub>/g ST. Zhang *et al.*<sup>67</sup> utilizaron un pretratamiento térmico a 100 °C y ácido sulfúrico en un residuo de rastrojo de maíz, ellos emplearon un inóculo de lodo anaerobio y reportaron un rendimiento de 112.7 mL H<sub>2</sub>/g ST; Pattra *et al.*<sup>68</sup> utilizaron un residuo de bagazo de caña de azúcar el cual trataron térmicamente junto con ácido sulfúrico, mediante el uso de *Clostridium butyricum* TISTR 1032 reportaron un rendimiento de tan solo 1.73 mL H<sub>2</sub>/g ST.

#### 2.4.4.4. Estiércol animal y residuo de ganado

Los residuos de origen animal pueden dividirse en tres tipos: desechos urinarios como estiércol líquido de ganado o aves de corral, desechos sólidos como estiércol sólido de ganado o de aves de corral, y aguas residuales que se recolectan del agua de proceso en las granjas como escurrimientos en lotes de alimentación y ensilaje, camas, desinfectantes y abonos líquidos<sup>69</sup>. Estos residuos animales representan un riesgo de contaminación directa al aire y agua; otros problemas son la lixiviación de nutrientes nitrogenados y fosforados, la liberación de patógenos al ambiente, y la generación de gases de efecto invernadero como CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub><sup>70</sup>.

Los residuos de ganado han sido empleados para la generación de energía principalmente para la producción de CH<sub>4</sub>, por otro lado, su aplicación en la producción de hidrógeno ha sido menos eficiente debido a la presencia de microorganismos metanógenos que convierten el hidrógeno a metano. Por este motivo, el pretratamiento de estos residuos, ya sea químico o térmico, para eliminar la actividad metanogénica es importante<sup>31</sup>. Yokoyama *et al.*<sup>31</sup>, reportaron un rendimiento de 65 mL H<sub>2</sub>/g SV empleando

un tratamiento térmico a un residuo de estiércol de vaca. Otro inconveniente de estos residuos es el contenido alto de compuestos nitrogenados (generalmente  $\text{NO}_3^-$ ), principalmente de residuos de aves y porcinos, que debido a estas elevadas concentraciones de nitrógeno (aproximadamente 4 g/L) fomenta la generación de amonio que provoca un efecto inhibitorio en los microorganismos fermentadores o metanogénicos<sup>71,72</sup>. Adicionalmente, la presencia de sulfatos en algunos residuos animales también ocasiona efectos adversos en la producción de hidrógeno, ya que existe competencia por el hidrógeno disponible en el medio por las bacterias sulfato reductoras produciendo  $\text{H}_2\text{S}$ <sup>32</sup>. Zhu *et al.*<sup>73</sup> reportaron inhibición en el proceso de producción de hidrógeno por un alto contenido de sulfatos al emplear un residuo porcino. La solución que se ha implementado por diversos autores para mediar el efecto inhibitorio de estos residuos animales, es emplearlos como cosustratos, es decir acompañados con otro sustrato, necesariamente con alto contenido en carbohidratos y de fácil asimilación metabólica<sup>43,73-75</sup>.

## **2.5. Bacterias productoras de hidrógeno por fermentación oscura**

Existe una amplia variedad de microorganismos que pueden producir hidrógeno a través de rutas metabólicas específicas bajo la ausencia de oxígeno. Bajo estas condiciones, la ausencia de oxígeno provoca que estos microorganismos necesiten la presencia de otros aceptores terminales de electrones, los protones o el azufre pueden tener este papel para las bacterias. En este momento es cuando el hidrógeno es producido ya que un electrón es transferido a un protón. De esta manera, es como se produce principalmente el hidrógeno por fermentación oscura. Los microorganismos protagonistas de la fermentación oscura son sensibles a la presencia de oxígeno y a la temperatura, la mayoría de ellos son anaerobios estrictos; sin embargo, también hay microorganismos que pueden sobrevivir bajo condiciones aerobias y anaerobias, llamados anaerobios facultativos. Estos últimos microorganismos son más fáciles de cultivar en laboratorios; sin embargo, sus rendimientos en cuanto a la producción de hidrógeno son menores.

La fermentación oscura puede efectuarse empleando un solo tipo de microorganismo o un consorcio de varios microorganismos. Para considerar un escalamiento del proceso, el uso de consorcios presenta mayores ventajas que los cultivos puros ya que como ventaja principal se encuentra que el proceso puede realizarse bajo condiciones no

estériles y, por lo tanto, los costos de operación disminuyen. En los consorcios microbianos pueden coexistir una gran variedad de microorganismos, desde bacterias hidrolíticas que realizan la conversión de carbohidratos complejos a más simples; metanógenos que producen metano y microorganismos sulfatorreductores que producen H<sub>2</sub>S, entre otros. La coexistencia en un consorcio de microorganismos que no son productores de hidrógeno tiene efectos tanto positivos como negativos en el desempeño general de la fermentación oscura.

#### 2.5.1. *Bacterias anaerobias facultativas*

Las bacterias anaerobias facultativas bajo ausencia de oxígeno producen ATP a través de la respiración anaerobia, mientras que cuando el oxígeno está presente lo hacen a través de la fermentación anaerobia. Nakashimada *et al.*<sup>76</sup> emplearon *Enterobacter* sp., que es una bacteria facultativa de la familia *Enterobacteriaceae* que tiene capacidad para favorecer la producción de hidrógeno, además de que su manejo es fácil durante el proceso y puede mantener su actividad bajo alta presión parcial de hidrógeno. Este tipo de bacteria alcanza una elevada tasa y un alto rendimiento de producción de hidrógeno al tener la capacidad de producir [FeFe] hidrogenasa y formato hidrógeno liasa (FHL)<sup>77</sup>. Otra bacteria perteneciente a esta familia es la *Enterobacter cloacae*, que ha sido estudiada logrando rendimientos elevados en cuanto a la producción de hidrógeno. Kumas y Das<sup>78</sup> emplearon *E. cloacae* IIT-BT-08 usando glucosa, sucrosa y celobiosa como sustrato, alcanzando 2.2, 6.0 y 5.4 mol de H<sub>2</sub> por mol de sustrato consumido, respectivamente; con una tasa máxima de producción de hidrógeno de 35 mmol/L·h. Jo *et al.*<sup>79</sup> utilizaron *Enterobacter aerogenes* E.82005 logrando un rendimiento de 1 mol de hidrógeno por mol de hexosa, y una tasa de producción de hidrógeno de 21 mmol/L·h.

#### 2.5.2. *Bacterias anaerobias estrictas*

Las bacterias anaerobias estrictas son las más empleadas en la producción de hidrógeno por fermentación oscura. Tienen la habilidad de poder metabolizar diferentes carbohidratos, así como tipos de agua residual. Las tasas de producción que alcanzan son mayores que las reportadas por las bacterias facultativas. Dentro de este grupo, la clase *Clostridia* posee muchas especies que han sido estudiadas como productoras de hidrógeno. La producción de hidrógeno se lleva a cabo principalmente durante la fase log, y el metabolismo se dirige hacia la solventogénesis durante la fase estacionaria<sup>80</sup>. Algunas especies estudiadas son: *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium*

*tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium thermolacticum*, *Clostridium thermocellum*, y *Clostridium paraputrificum*. Lin et al.<sup>81</sup> mostraron una amplia lista de bacterias del género *Clostridium* empleadas para la producción de hidrógeno, reportando rendimientos en un rango de 1.47 a 2.81 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa.

### 2.5.3. Microorganismos termófilos

Los microorganismos termofílicos o termófilos son aquellos que pueden reproducirse a elevadas temperaturas, se han aislado principalmente en aguas termales y fuentes hidrotermales de aguas profundas. Estos microorganismos en su mayoría son anaerobios estrictos. Se ha reportado que tienen la capacidad de metabolizar una amplia gama de sustratos, como residuos lignocelulósicos y biomasa con alto contenido de pectina<sup>82</sup>. Algunos ejemplares de este grupo son *Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter*, y *Thermotoga* que han reportado rendimientos muy variados según el tipo de sustrato y condiciones de la fermentación; en el caso de *Caldicellulosiruptor* se ha reportado 1.034 mmol H<sub>2</sub>/mmol de sucrosa; mientras que *Thermoanaerobacter* se ha reportado 0.24 mmol H<sub>2</sub>/g de peptona; y *Thermotoga* alrededor de 45.6 mL H<sub>2</sub>/g de glucosa<sup>83-86</sup>.

### 2.5.4. Cultivos mixtos

El uso de consorcios microbianos es de gran utilidad para mejorar la utilización de sustratos complejos, que generalmente provienen de residuos. Esta ventaja se debe a la presencia de diferentes microorganismos que a su vez ponen a disponibilidad del proceso una variedad de enzimas que degradan los residuos empleados como sustratos. Además, la sinergia existente entre los diversos tipos de bacterias para el intercambio de metabolitos mejora la labor de la utilización del sustrato. Otra ventaja del uso de consorcios microbianos es la posibilidad de llevar a cabo el proceso bajo condiciones no estériles, por lo cual lo hace atractivo a ser escalable a nivel industrial por ser económicamente favorable.

Las fuentes principales de estos consorcios para ser empleados como inóculo en el proceso fermentativo son lodos anaerobios, residuos orgánicos de procesos fermentativos, lodos residuales de cocina, entre otros<sup>87</sup>. Sin embargo, existen ciertos inconvenientes en el uso de estos cultivos mixtos, y es la presencia de metanógenos y bacterias consumidoras de hidrógeno dentro de la comunidad microbiana. Lo más

utilizado para disminuir el efecto por estos microorganismos es un pretratamiento al inóculo, con la finalidad de suprimir la actividad metanogénica y de bacterias consumidoras de hidrógeno; los pretratamientos más comunes son el uso de temperatura elevada (mayor a 80 °C) y el enriquecimiento del inóculo<sup>88-90</sup>. Los rendimientos en producción de hidrógeno son muy variados usando cultivos mixtos, ya que el buen desempeño de este dependerá de diversos factores, principalmente la diversidad microbiana, sustrato empleado y condiciones de operación; por ejemplo, el uso de microflora como inóculo ha reportado rendimientos cercanos a 1.4 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa, el uso de lodo anaerobio varía bastante obteniendo valores entre 1.5 y 2.5 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa, entre otros.

## **2.6. Estrategias y uso de aditivos para la mejora de la fermentación oscura**

La fermentación oscura presenta diversas ventajas sobre otros métodos alternativos basados en la utilización de recursos renovables para la producción de hidrógeno, como el uso de residuos de biomasa de diferentes tipos, lodos residuales, desechos agrícolas, desechos forestales, residuos de comida, etc., así se tiene un efecto ambientalmente positivo al consumir un residuo y aprovecharlo para producir energía renovable. Por lo antes mencionado, el estudio para mejorar los rendimientos más allá a lo reportado por la mayoría de los autores (2 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa) ha ido aumentando exponencialmente en las últimas décadas<sup>91,92</sup>. Varios métodos han sido aplicados con la finalidad de aumentar la eficiencia en el proceso de fermentación oscura.

Dentro de los métodos empleados para mejorar el proceso fermentativo, se encuentran los pretratamientos (por ejemplo: trituración, ultrasonido, uso de enzimas, adición de ácidos o bases, etc.) a los sustratos complejos con el objeto de incrementar la biodisponibilidad del sustrato a los microorganismos presentes en la fermentación oscura<sup>60,93,94</sup>. Otros métodos enfocados directamente en la optimización del proceso operativo buscan encontrar las mejores condiciones como temperatura, tiempo de retención hidráulica, etc.<sup>79,95-97</sup>. Otras estrategias de mejora van dirigidas a la implementación de cofermentaciones empleando diversos sustratos con características diferentes que se complementen entre ellos para aumentar la eficiencia de la fermentación oscura<sup>98-100</sup>. Por otro lado, el uso de microorganismos genéticamente modificados con características específicas para optimizar la producción de hidrógeno también ha sido evaluado<sup>101,102</sup>.

Otro camino dirigido hacia el mismo objetivo de aumentar la eficiencia del proceso de fermentación oscura, es el uso de aditivos que tienen la finalidad de promover el crecimiento microbiano, y mejorar la actividad metabólica de las bacterias fermentadoras y la actividad catalítica de las enzimas clave, provocando un incremento en el rendimiento de producción de hidrógeno, aumentando la tasa de producción y mejorando la estabilidad del proceso<sup>103-105</sup>. El uso de aditivos es una estrategia que, desde el punto de vista de aplicación, presenta ventajas al ser de simple operación y bajo consumo de energía. La aplicación de aditivos en la fermentación oscura puede dividirse en seis categorías: aditivos metálicos (monómeros metálicos, iones metálicos y óxidos metálicos), acarreadores para la inmovilización de biomasa (carbón activado, hidrotalcita, quitosano, etc.), L-cisteína, augmentación por microorganismos, enzimas y mediadores redox<sup>92</sup>.

#### 2.6.1. Aditivos metálicos

La adición de trazas metálicas tienen un efecto importante en los procesos biológicos anaerobios, y han sido ampliamente reportadas, cerca del 57.5% del total del uso de aditivos le pertenece a este grupo<sup>92</sup>. Los efectos principales que causan estos aditivos metálicos en la fermentación oscura son:

- a) Acelerar la transferencia intracelular de electrones.
- b) Facilitar la formación de enzimas y mejorar su actividad catalítica.
- c) Proveer nutrientes esenciales al crecimiento microbiano.

Los aditivos metálicos pueden dividirse en tres tipos: monómeros metálicos, iones metálicos y óxidos metálicos. Dentro de la categoría referente al uso de monómeros metálicos, se han reportado la aplicación de metales como oro, plata, cobre, hierro, níquel y paladio. El hierro con valencia de cero, es el aditivo más atractivo debido a su bajo costo; éste es capaz de disminuir el potencial redox (PRO) en el sistema de fermentación<sup>106</sup>, y esto proporciona una ambiente favorable para las bacterias fermentadoras<sup>103</sup>. Zhang *et al.*<sup>107</sup> evaluaron el uso de hierro con valencia cero (400 mg/L) en la fermentación oscura a partir de glucosa, obtuvieron un rendimiento máximo de 1.22 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa, que fue 37.1% mayor al control con la ausencia del hierro; ellos, a través de estudios de secuenciación, observaron que el uso del hierro promovía la generación de bacterias del género *Clostridium* sp. que contribuyeron en la mejora de la producción de hidrógeno. Con respecto al uso de iones metálicos, el ion hierro es el más empleado ya que éste tiene un papel importante en el metabolismo de las bacterias

productoras de hidrógeno; el ion hierro es esencial para la síntesis de hidrogenasas y ferredoxina<sup>108</sup>. Los centros metálicos de las enzimas hidrogenasas fungen como sitio servidor para la transferencia de electrones entre el hidrógeno y el acarreador externo de electrones (NADH). Además, la proteína hierro-azufre de la ferredoxina actúa como acarreador de electrones en la oxidación del piruvato hacia acetil-CoA y CO<sub>2</sub>, así como en la reducción del protón hacia hidrógeno molecular<sup>109</sup>. Reddy *et al.*<sup>110</sup> encontraron que al adicionar Fe<sup>2+</sup> (200 mg/L) en la fermentación oscura empleando bagazo de azúcar de caña existía un incremento en el rendimiento de hidrógeno producido, ellos obtuvieron un rendimiento máximo de 1.154 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa, que fue 62.1% mayor al control con ausencia del Fe<sup>2+</sup>, encontraron también una mejora en la expresión del gen de la hidrogenasa y en las bacterias fermentadoras. Los óxidos metálicos también han sido empleados durante la fermentación oscura, su efecto es similar a los monómeros metálicos, ya que debido a su tamaño de partícula nanométrico éstos pueden ayudar a los microorganismos a la transferencia de electrones entre la ferredoxina y la hidrogenasa; los óxidos reportados son CoO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, NiO y TiO<sub>2</sub><sup>92</sup>; sin embargo, los óxidos de hierro son los más estudiados. Mohanraj *et al.*<sup>111</sup> evaluaron el efecto de nanopartículas de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (175 mg/L) empleando glucosa como sustrato, ellos reportaron un rendimiento máximo de 2.33 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa, que fue 33.9% mayor al control; los autores atribuyeron el incremento de la producción de hidrógeno al incremento en la actividad de la enzima ferredoxina oxidorreductasa e hidrogenasa en la interfase de las nanopartículas; sin embargo, debería de mencionarse que bajo concentraciones excesivas de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> puede presentarse la generación de especies reactivas de oxígeno que tienen un impacto negativo en las bacterias fermentadoras.

### 2.6.2. Acarreadores para la inmovilización de microorganismos

La inmovilización de microorganismos en cualquier proceso biológico representa la disminución de lavado de células microbianas en un proceso continuo, y en la fermentación oscura esto es más evidente debido a los tiempos de retención hidráulica bajos, sumado el efecto adicional cuando un sustrato contiene bajo contenido de DQO en el caso de aguas residuales<sup>112</sup>. La inmovilización celular aumenta la densidad microbiana mejorando el desempeño del proceso, adicional a ello, en contraste con los cultivos suspendidos, la inmovilización representa mayor tolerancia a la perturbación ambiental como cambios de temperatura, pH, etc., mejor estabilidad del proceso y, por lo tanto, mayor actividad bacteriana<sup>92</sup>.

El carbón activado es el material más utilizado como acarreador para la inmovilización en la fermentación oscura, esto debido a sus características como alta área superficial, buenas propiedades mecánicas, baja toxicidad y además es inerte<sup>113</sup>. Jamali *et al.*<sup>114</sup> evaluaron el impacto del carbón activado (200 g/L) en la producción de hidrógeno empleando una mezcla de glucosa y xilosa, ellos alcanzaron un rendimiento máximo de 1.77 mol H<sub>2</sub>/mol azúcar consumida lo que representaba un aumento del 105.88% con relación al control, dicho efecto se relacionó con el aumento del crecimiento celular, y en la formación de un biofilm en la superficie del carbón activado.

El biocarbón es otro material utilizado como acarreador de microorganismos en la inmovilización, este tiene una ventaja en costo en relación al carbón activado mineral; el biocarbón es producido a través de la pirólisis de biomasa carbonácea, principalmente residuos agrícolas y forestales<sup>115</sup>. Las propiedades de este material como la microporosidad y áreas superficiales específicas que rondan los 130 m<sup>2</sup>/g lo hacen un material atractivo para la inmovilización microbiana. Sharma y Melkania<sup>116</sup> examinaron el efecto del biocarbón (12 g/L) en la producción de hidrógeno empleando la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU), ellos reportaron un rendimiento máximo de 2.58 L/L sustrato que fue 430% mayor que el experimento control; encontraron que el biocarbón facilitaba la formación de biofilm y la eficiente colonización de los microorganismos en toda el área superficial del material. Otras propiedades que ha presentado el biocarbón es que actúa como agente buffer manteniendo el pH del medio fermentativo<sup>105</sup>. También, similar al carbón activado, el biocarbón puede absorber ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal lo que disminuye los efectos inhibitorios en el proceso<sup>116</sup>.

Otros materiales empleados de naturaleza inorgánica como la hidrotalcita, sílica (SB-15), entre otros han presentado resultados favorecedores en relación a la inmovilización de microorganismos; sin embargo, no alcanza los resultados reportados empleando carbón activado y biocarbón<sup>113,117</sup>.

### 2.6.3. *L-cisteína como agente reductor*

La fermentación oscura es un proceso cuya eficiencia esta relacionada con la actividad de la hidrogenasa y NAD<sup>+</sup>/NADH, esta relación favorece un bajo potencial redox (PRO) en el medio<sup>118</sup>. La L-cisteína es un agente reductor que puede disminuir el PRO en el sistema fermentativo gracias a su grupo tiol<sup>108</sup>. Además, se ha observado que la L-cisteína es un mediador entre bacterias fermentativas y sustrato debido a su estructura

única y asociación con algunas proteínas bacterianas<sup>119</sup>. Estas propiedades causan un efecto positivo en el crecimiento celular y en la utilización del sustrato. Guo *et al.*<sup>120</sup> evaluaron el impacto de L-cisteína en la producción de hidrógeno empleando glucosa como sustrato, ellos reportaron un rendimiento máximo de 1.93 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa y una tasa de 2.09 L/L·d, que fue 20.6% y 23.7% mayor al control, respectivamente; adicionalmente, reportaron un incremento de utilización de sustrato de 74 a 80.8%.

#### 2.6.4. Bioaugmentación

La bioaugmentación es un proceso de adición de cepas microbianas especializadas y de crecimiento activo en el inóculo del sistema, con el objetivo de mejorar la capacidad de la comunidad microbiana para resistir las fluctuaciones del proceso y lograr un mejor rendimiento del proceso<sup>121</sup>. Este procedimiento tiene la habilidad de acelerar el arranque de la fermentación oscura. Guo *et al.*<sup>122</sup> inocularon *Ethanoligenes harbinense* B49 para acelerar el arranque de la fermentación en continuo de un cultivo mixto; adicional a esto, el reactor bioaugmentado alcanzó 23.6% mayor producción de hidrógeno comparado con el reactor no bioaugmentado. La bioaugmentación puede también ser una estrategia para mejorar la hidrólisis de los compuestos complejos; ejemplo de ello, Kuo *et al.*<sup>123</sup> adicionaron *Clostridium* sp. que es una bacteria celulolítica, ellos emplearon desechos de cocina como sustrato y observaron una mejora en la hidrólisis del desecho con la adición de la cepa celulolítica; también, reportaron un aumento del rendimiento de la producción de hidrógeno de 6 a 14 mol H<sub>2</sub>/kg DQO. Otro efecto que puede producir la bioaugmentación es la protección del inóculo predominante contra efectos adversos propios de la fermentación; por ejemplo, Chandra y Mohan<sup>124</sup> adicionaron bacterias fotosintéticas, con la finalidad de regular los efectos inhibitorios de los ácidos grasos volátiles en el inóculo; reportaron una contribución positiva del 40% de la producción de hidrógeno, mismo efecto que se observó en la disminución de la concentración de los ácidos grasos volátiles.

#### 2.6.5. Enzimas

El propósito de la adición de enzimas a la fermentación oscura ya sea empleando extractos crudos o enzimas comerciales, es principalmente hidrolizar los sustratos complejos y así facilitar la disponibilidad de azúcares al metabolismo microbiano. Quemeneur *et al.*<sup>125</sup> evaluaron el efecto de la adición de enzimas hidrolasas en un proceso de fermentación oscura con paja de trigo; logrando una mejora en el rendimiento

de producción de hidrógeno de 5.18 a 15.52-21.61 mL/g SV agregando enzimas en una concentración de 1 a 10 mg de proteína/g residuo.

#### 2.6.6. Mediadores redox

Los mediadores redox, también conocidos como “*electron shuttles*”, son un grupo de moléculas orgánicas que donan y aceptan electrones sin ser consumidas por el metabolismo microbiano, es decir, que circulan entre sus estados oxidado y reducido en los sistemas biológicos<sup>126,127</sup>. Los mediadores redox intercambian electrones extracelularmente, y éstos tienen un impacto según sea su estado de oxidación en el desarrollo de la fermentación oscura<sup>127</sup>. Los principales efectos en el metabolismo es que aumentan la tasa de producción de hidrógeno y también ha sido reportado un aumento en la utilización de sustratos más complejos. Los mediadores redox como la antraquinona-2-sulfonato (AQS), antraquinona-2,6-disulfonato (A<sub>2</sub>QDS), antrahidroquinona-2,6-disulfonato (AH<sub>2</sub>QDS), la riboflavina, lawsona, y compuestos con grupos quinona pueden mejorar la transferencia de electrones<sup>128-131</sup>. Estudios realizados con *Clostridium acetobutylicum* demostraron la influencia de los mediadores redox rojo neutro y metil viológeno en el metabolismo de este microorganismo, observaron que al adicionar estos compuestos de forma oxidada se dirigen los electrones y el flujo del carbono hacia la producción de solventes y se controla intracelularmente la concentración de NAD<sup>+</sup>/NADH, esto además regula la actividad de varias enzimas como la NADH-ferredoxina oxidorreductasa y la gliceraldehído deshidrogenasa<sup>132,133</sup>. Por otro lado, Hatch y Finneran<sup>126</sup> demostraron que la adición de los mediadores redox en una forma reducida mejoran el rendimiento de la producción de hidrógeno en un cultivo de *Clostridium beijerinckii*. Zhang *et al.*<sup>134</sup> encontraron que la presencia de NADH y NAD<sup>+</sup> fuera de la célula estimula la producción de hidrógeno, aumentando la tasa de producción y el rendimiento en un cultivo de *Enterobacter aerogenes*.

Ye *et al.*<sup>135</sup> estudiaron el uso de AH<sub>2</sub>QDS en la producción de H<sub>2</sub> con *Clostridium beijerinckii* utilizando xilosa como fuente de carbono, encontrando un aumento del 56% en la utilización de la xilosa como sustrato y un incremento de 37% en la producción de H<sub>2</sub>. Este mismo grupo de investigación evaluó el uso de AH<sub>2</sub>QDS en fermentación oscura empleando diferentes fuentes de carbono como glucosa, xilosa y celobiosa por *Clostridium beijerinckii*, encontrando que al agregar AH<sub>2</sub>QDS a concentraciones desde 100 µM a 500 µM la producción de H<sub>2</sub> aumenta de 0.80 a 1.35 mmol/L-h y de 1.20 a 2.70 mmol/L-h con xilosa y celobiosa, respectivamente<sup>136</sup>. En otro estudio, Martínez-Cobos<sup>131</sup>

evaluó diversos mediadores en la producción de H<sub>2</sub> con *Clostridium beijerinckii*, y reportó un aumento en la tasa de producción de H<sub>2</sub> de más de 10 veces empleando riboflavina como mediador redox.

El uso de mediadores redox en procesos biológicos anaerobios se ha efectuado mayormente en la degradación de contaminantes en medio acuoso, y es por ello, que el desarrollo en la aplicación de estos compuestos ha ido evolucionando; de tal manera, que se han propuesto estrategias para inmovilizar estos compuestos en soportes para que sean reutilizados y así disminuir los costos que contribuye el adicionar factores al sistema fermentador. Martínez *et al.*<sup>128</sup> inmovilizaron sustancias húmicas en una membrana de intercambio aniónico para la degradación de fenol y rojo reactivo, ellos reportaron una estabilidad de las sustancias húmicas soportadas de aproximadamente 300 días. Rodríguez *et al.*<sup>137</sup> realizaron una co-inmovilización de AQS y *Geobacter sulfurreducens* en perlas de alginato de bario para la biotransformación de 4-nitrofenol, mas no reportan estabilidad del material.

## 2.7. Modelo de Gompertz modificado en la fermentación oscura

Los modelos cinéticos son expresiones matemáticas que se han desarrollado y aplicado a diversos procesos con el objetivo de describir el efecto de diversos factores en un proceso. Se han desarrollado algunos modelos cinéticos con el propósito de describir cambios en la fermentación oscura durante la producción de hidrógeno, así como el consumo de sustrato, el crecimiento microbiano de los microorganismos productores de hidrógeno, la producción de metabolitos solubles del bioproceso y la misma producción de hidrógeno. Entre ellos, el modelo de Gompertz modificado (Ec. 5) desarrollado por Zwietering *et al.*<sup>138</sup>, ha sido ampliamente usado para describir el progreso de la degradación de sustratos, la producción de hidrógeno y metabolitos solubles, y para el crecimiento de microorganismos fermentadores en un proceso de fermentación en lote para la producción de hidrógeno<sup>139</sup>.

$$V = Hmax * \exp \left\{ -\exp \left( \frac{Rmax * e}{Hmax} * (\lambda - t) + 1 \right) \right\} \quad (5)$$

Donde:

- V: Volumen de hidrógeno producido (mL) a un tiempo t
- Hmax: Volumen máximo de producción de hidrógeno (mL)

- $R_{max}$ : Tasa de producción de gas (mL/h)
- $\lambda$ : Duración de la fase lag (h)
- $e$ : 2.718
- $t$ : Tiempo (h)

## 2.8. Procesos avanzados de oxidación

Los procesos avanzados de oxidación (PAO) son aquellos tratamientos empleados principalmente para la degradación de contaminantes orgánicos mediante la generación de radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) provocando, en el mejor de los casos, su mineralización. Los PAOs más conocidos son Fenton, foto-Fenton, ozonólisis, electrólisis, fotocátalisis heterogénea, entre otros. En este tipo de procesos se encuentra la fotocátalisis heterogénea, que mediante la generación de pares electrón-hueco puedan llegar a generar especies reactivas de oxígeno que son altamente reactivas y capaces de degradar contaminantes orgánicos e inorgánicos. Por la naturaleza del proceso fotocatalítico es posible aprovechar las reacciones de oxidación y reducción que se desencadenan en el sistema y producir hidrógeno, el cual puede ser utilizado como fuente de energía alternativa.

## 2.9. Fotocátalisis heterogénea y su mecanismo

La fotocátalisis cuenta con una serie de eventos en cadena los cuales deben ocurrir en orden para completar la reacción en presencia de un semiconductor. El primer evento más crítico es la absorción de luz y la formación de los acarreadores cargados (par electrón/hueco,  $e^-/h^+$ ). Preferentemente, la formación de  $e^-$  y  $h^+$  deberían llevarse a cabo bajo irradiación por luz solar en un rango de luz visible, para aprovechar un recurso natural y reducir costos de aplicación. La energía de banda prohibida ( $E_g$ ) es la energía mínima necesaria para excitar un electrón desde su estado ligado a un estado libre que le permita participar en la conducción. Cuando un semiconductor es expuesto a una fuente de luz con una energía mayor que su  $E_g$ , los  $e^-$  de la banda de valencia (BV) son excitados a la banda de conducción (BC) generando  $h^+$ . Después, los  $e^-$  y  $h^+$  fotogenerados pueden seguir distintas rutas. Una vez separados y transportados a la superficie del catalizador, estos pares  $e^-/h^+$  son capaces de llevar a cabo las reacciones de reducción y oxidación, respectivamente<sup>140-142</sup>.

El mecanismo de la fotocatalisis puede dividirse en seis pasos fundamentales (Fig. 3)<sup>143</sup>:

Paso 1: absorción de fotones

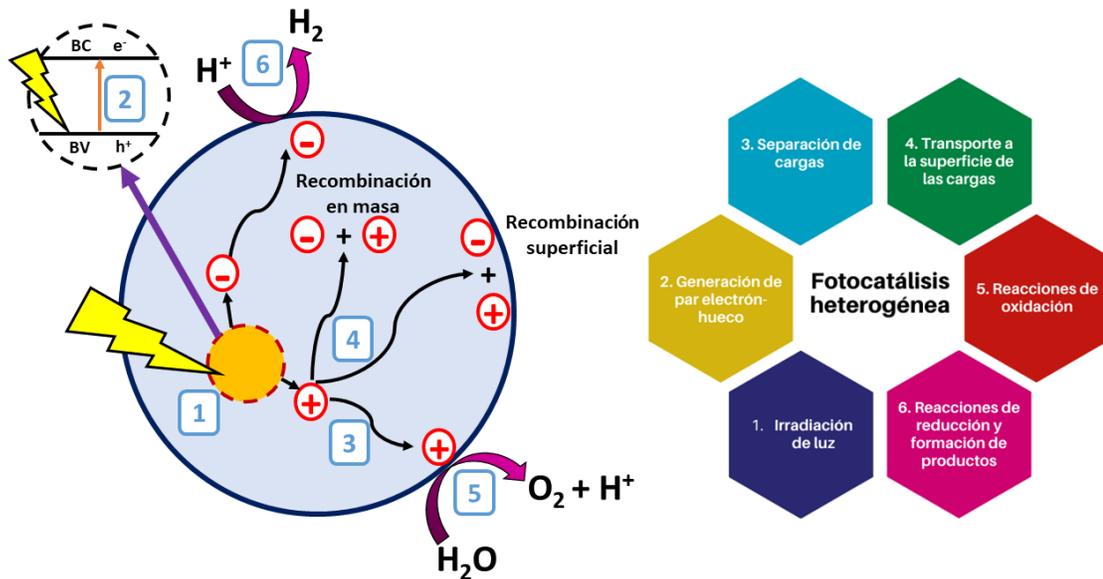
Paso 2: excitación de cargas

Paso 3: separación de cargas

Paso 4: transporte de cargas

Paso 5: reacciones catalíticas en la superficie del material (oxidación)

Paso 6: reacciones catalíticas en la superficie del material (reducción)



**Fig. 3.** Mecanismo de la fotocatalisis en un proceso de "water splitting" para la producción de hidrógeno<sup>143</sup>.

Durante el paso 1, comienza el proceso de fotocatalisis, y ocurre cuando un semiconductor es irradiado con una energía mayor o igual a la  $E_g$  del mismo; previamente, por las propiedades intrínsecas de los semiconductores que poseen de una BV y una BC separadas entre ellas por una  $E_g$ <sup>144</sup>. El fotocatalizador bajo una excitación fotónica favorable provoca las transiciones electrónicas y genera los pares  $e^-/h^+$  (paso 2). Después, las cargas son separadas y los electrones son excitados de la BV a la BC, dejando huecos ( $h^+$ ) en la BV (paso 3). Los electrones y huecos son los encargados de llevar a cabo las reacciones de oxidación (paso 5) y reducción (paso 6). Las reacciones redox en la superficie del fotocatalizador ocurren cuando el potencial de

oxidación y reducción están por debajo o por encima que los niveles de las BV y BC, respectivamente<sup>143,145-147</sup>.

El desempeño del proceso fotocatalítico puede presentar un obstáculo importante que es la recombinación de las cargas ( $e^-/h^+$ ). Los pares  $e^-/h^+$  pueden recombinarse principalmente durante el transporte de las cargas a la superficie del semiconductor (paso 4) liberando calor. Por esta razón se disminuye la efectividad de las reacciones redox. Por ejemplo, en la fotocatalisis aplicada a la producción de hidrógeno, la recombinación es un problema común; por ello, el uso de agentes de sacrificio o soluciones electrolíticas ha sido estudiado para contrarrestar este problema<sup>140</sup>.

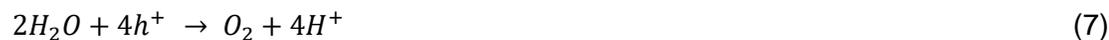
## 2.10. Producción de hidrógeno por fotocatalisis heterogénea

La producción de  $H_2$  por fotocatalisis heterogénea se lleva a cabo a través de un proceso químico conocido como ruptura de la molécula del agua ("*water splitting*") el cual consiste principalmente en dos reacciones: la reducción de protones y la oxidación del agua por cuatro electrones (Ec. 6-8). Sin embargo, en procesos donde existan compuestos de naturaleza orgánica, éstos pueden servir como fuente de protones, este proceso se conoce como fotorreformación ("*photoreforming*"). Por lo que, se puede considerar como un acoplamiento de la oxidación de una sustancia orgánica y la reducción de protones (Ec. 9-10).<sup>140-142</sup>

Semirreacción de reducción



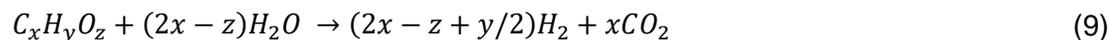
Semirreacción de oxidación



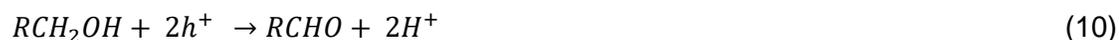
Reacción general del *water splitting*



Reacción general de la fotorreformación



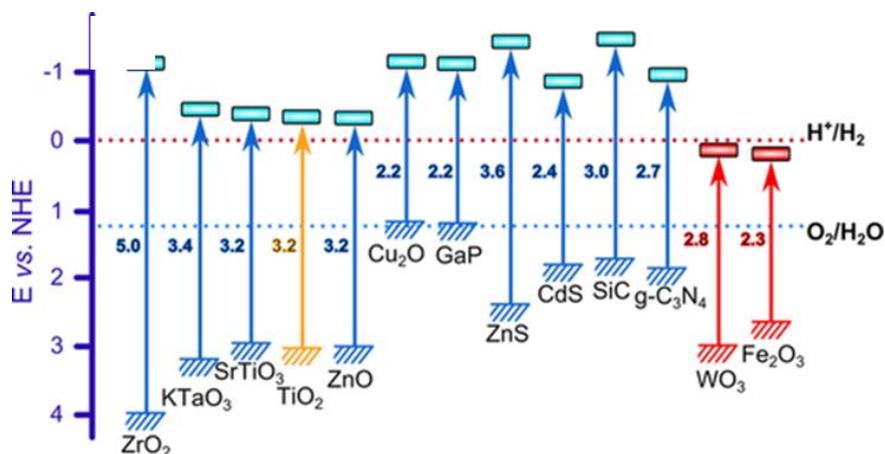
Reacción de oxidación de un alcohol



El proceso de *water splitting* se lleva cabo cuando el potencial redox de la banda de conducción es más negativo que el potencial redox del par  $H^+/H_2$  (0 V vs. NHE, pH 0); en este proceso, en relación con la semirreacción de oxidación, ésta deberá ocurrir en el borde de la banda de valencia con un potencial de oxidación más positivo que el potencial del par redox  $O_2/H_2O$  1.23 V vs. NHE, pH 0). Por lo tanto, la  $E_g$  teórica mínima para que se lleve a cabo la reacción completa de *water splitting* es 1.23 V; en la práctica este valor alcanza un  $E_g$  entre 2 y 2.4 eV debido al sobrepotencial cinético y a la pérdida de energía durante el proceso. Sin embargo, la elevada demanda de la reacción de la evolución del oxígeno hace que la reacción pura del *water splitting* no se efectúe satisfactoriamente ya que hay pocos materiales con un  $E_g$  estrecho que puedan catalizar ambas medias reacciones; además, trabajar a pH neutro es termodinámicamente más difícil debido a la menor disponibilidad de protones<sup>140</sup>. En contraste con el proceso de *water splitting*, los sustratos orgánicos empleados en el proceso de fotorreformado tienen potenciales de oxidación menores (0.08 V vs NHE etanol)<sup>148</sup>, consumiendo  $h^+$  más rápido y evitando la recombinación, mientras que al mismo tiempo, pueden servir como fuente de protones<sup>149</sup>. Por lo que, el fotorreformado es un proceso termodinámicamente menos demandante comparado con el *water splitting*<sup>150</sup>.

#### 2.10.1. Semiconductores para la producción de hidrógeno

La eficiencia de los semiconductores es afectada en gran manera por su  $E_g$  y el tipo de irradiación. En la Fig. 4 se ilustra un perfil de varios semiconductores comunes con sus valores de  $E_g$  y potenciales redox. Existen dos tipos de irradiación: la luz UV correspondiente a un rango de longitud de onda de 200 a 400 nm, y la luz visible con un rango de longitud de onda de 400 a 800 nm. Cuando la  $E_g$  es amplia, la longitud de onda a la que absorbe el semiconductor disminuye. Por ejemplo, cuando un semiconductor tiene una  $E_g$  mayor que 3.15 eV su activación solo se llevará a cabo bajo irradiación UV, mientras que si la  $E_g$  es menor que 3.15 eV su activación se dará bajo irradiación de luz visible. Debido a esto, la sensibilidad de un semiconductor para ser activado depende directamente de su valor de  $E_g$ <sup>151</sup>.



**Fig. 4.** Comparativo de potenciales redox (pH 7) y Eg de varios semiconductores comunes<sup>143</sup>.

Además de la Eg, el desempeño de la fotocatalisis se relaciona con los niveles de las BV y BC. Los potenciales de oxidación y reducción deben estar dentro de la Eg del fotocatalizador para obtener productos deseables<sup>145,152</sup>. Los potenciales de oxidación y reducción de varias especies típicas se muestran en la Tabla 1. La posición de la BC debería ser más negativa que el potencial redox  $H^+/H_2$  y la BV debería ser más positiva que el potencial redox de  $O_2/H_2O$ ; esto para llevar a cabo un proceso exitoso de *water splitting*.

**Tabla 1.** Potenciales redox estándar de algunas especies<sup>153</sup>.

Reacción	E° (V) vs ENH a pH 7
$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2 (g)$	-0.41
$O_2(g) + e^- \rightarrow O_2^-(aq)$	-0.33
$O_2(g) + H^+ + e^- \rightarrow HO_2^*(aq)$	-0.05
$O_2(g) + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2(aq)$	0.28
$2H_2O(aq) + 4h^+ \rightarrow O_2(g) + 4H^+$	0.82
$OH^- + h^+ \rightarrow ^*OH$	2.29
$CO_2(g) + 2H^+ + 2e^- \rightarrow HCOOH(aq)$	-0.61
$CO_2(g) + 2H^+ + 2e^- \rightarrow CO(g) + H_2O$	-0.53
$CO_2(g) + 4H^+ + 4e^- \rightarrow HCHO(aq) + H_2O$	-0.48
$CO_2(g) + 6H^+ + 6e^- \rightarrow CH_3OH(aq) + H_2O$	-0.38
$CO_2(g) + 8H^+ + 8e^- \rightarrow CH_4(g) + 2H_2O$	-0.20

Entre los semiconductores, el dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) es el más estudiado ya que no es tóxico, es relativamente barato y tiene alta estabilidad química; también el  $\text{TiO}_2$  presenta una velocidad de recombinación relativamente rápida y una banda prohibida amplia (3.2 eV para anatasa) bajo una luz cercana a la región UV<sup>154</sup>. Con el paso del tiempo, se ha encontrado que es difícil para un único componente fotocatalítico alcanzar al mismo tiempo una capacidad redox elevada y un rango de absorción de luz amplio, por lo que el uso de materiales con heteroestructuras como semiconductores ha ido evolucionando con la finalidad de mejorar la eficiencia del proceso fotocatalítico<sup>155</sup>. Algunas técnicas para modificar y crear heteroestructuras fotocatalíticas son por dopaje, sensibilización, control de la morfología, control de la red cristalina y por modificación de superficie<sup>156</sup>. Existe una variedad de semiconductores que han sido evaluados en las reacciones de producción de  $\text{H}_2$ , desde materiales como óxidos metálicos, oxinitruros y sulfuros, además del uso de cocatalizadores como  $\text{NiO}_x$ ,  $\text{RuO}_2$ , Pt, Rh-Cr, etc.<sup>140,141,155</sup>.

## **2.11. Estrategias de mejora para la fotocatalisis heterogénea**

### *2.11.1. Dopaje de semiconductores*

La eficiencia fotocatalítica de un semiconductor está dada por su estructura de bandas; por lo que la modificación de la  $E_g$  de un semiconductor es una manera de hacerlo activo bajo irradiación visible con una alta estabilidad fotoquímica y mejorar su eficiencia fotocatalítica. La  $E_g$  puede ser modificada si una nueva  $E_g$  es introducida entre la BV y BC, o por una interacción interfacial fuerte. Esta puede crearse por medio del dopaje con un ion metálico o una sustancia no metálica. Se sabe que las amplias  $E_g$  de algunos semiconductores los restringe a absorber luz en la región UV, lo que los limita a usos prácticos como ser usados bajo fuentes de irradiación visible. Por lo tanto, el introducir una nueva  $E_g$  entre los dos niveles cambia la  $E_g$  ancha de un semiconductor a una  $E_g$  estrecha, y esto a su vez, extiende el rango de absorción de luz UV a visible.

### *2.11.2. Dopaje con metales*

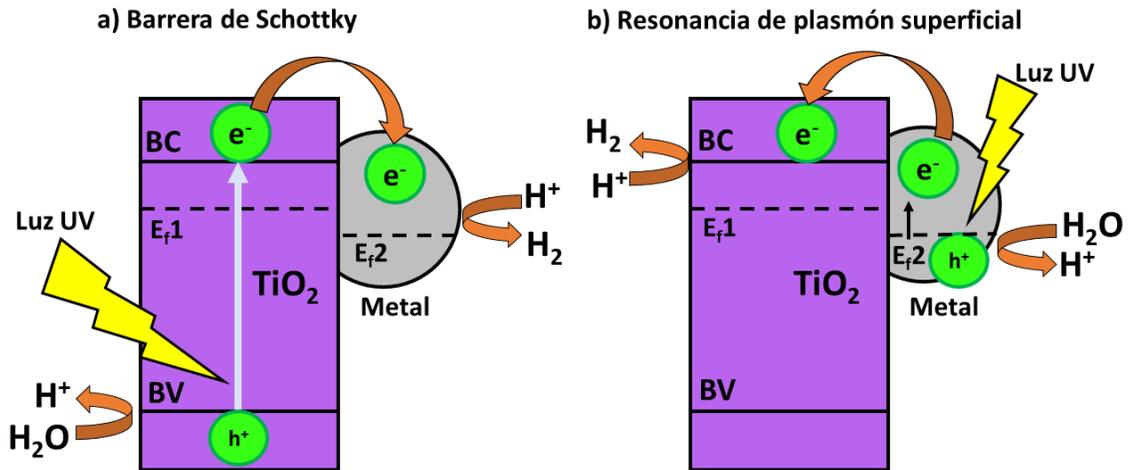
Con respecto al dopaje con metales, la eficiencia del fotocatalizador está relacionada con el valor de la función de trabajo de los metales ( $\phi$ ), la energía requerida para transferir electrones desde el nivel de Fermi al vacío (cuanto mayor es  $\phi$ , menor es el nivel de energía de Fermi)<sup>157</sup>. Entre mayor sea la diferencia de la función de trabajo de

los metales con el semiconductor, mayor será la barrera de Schottky, favoreciendo el incremento en la tasa de producción de hidrógeno.

La barrera de Schottky es la barrera de potencial electrónico desarrollada simplemente por la alineación de la banda en la hetero-unión del metal y el semiconductor, que en consecuencia aumenta la eficiencia con respecto a los electrones fotogenerados a ser transferidos y atrapados por el metal. Por lo tanto, el nivel de Fermi debe ser más bajo en energía que la BC del semiconductor, así los metales pueden capturar los electrones migrados, mientras que los huecos permanecen en la BV<sup>146</sup> (Fig. 5a). Por lo tanto, la modificación de semiconductores con metales puede mejorar el rendimiento de la fotocatalisis para que sea eficaz y funcional bajo irradiación de luz visible.

En los últimos años, algunos metales como Pt, Au, Ag, Ni y Pd han sido estudiados como dopantes en semiconductores, siendo el más estudiado el dopaje de alguno de estos metales en TiO<sub>2</sub>. El método de modificación superficial del material ha sido ampliamente usado para el dopaje metálico en TiO<sub>2</sub>, mostrando resultados favorables en la eliminación de la recombinación de los pares e<sup>-</sup>/h<sup>+</sup> generados. El metal que es un cocatalizador al atrapar los electrones proporciona sitios adicionales de reacción en la superficie del catalizador<sup>158</sup>.

El proceso de fotocatalisis también se puede mejorar dopando un semiconductor con nanopartículas de un metal noble a través del efecto de resonancia de plasmón superficial (RPS). Los metales nobles como Pt, Au y Ag tienen una banda de plasmón de superficie fuerte en el rango visible. En la Fig. 5b, se ilustra la transferencia de carga fotogenerada del semiconductor TiO<sub>2</sub>/metal bajo irradiación de luz visible debido a los efectos de resonancia de plasmón superficial (RPS). Los electrones fotogenerados localizados en la superficie de la resonancia de plasmón del metal pueden transferirse eficientemente a la BC del semiconductor por transferencia directa de electrones bajo irradiaciones de luz visible, cuando están directamente en contacto con el semiconductor y experimenta reacciones de reducción en la superficie del semiconductor<sup>159</sup>. Zhu *et al.*<sup>160</sup> reportaron que el TiO<sub>2</sub>/Pt (1% p/p) es un material prometedor en la producción de hidrógeno, ya que alcanzaba una tasa de producción de 1023.71 μmol/h·g<sub>cat</sub> después de 5 h de irradiación, y mostró estabilidad al no desactivarse después de 30 h de irradiación.



**Fig. 5.** a) Esquema de transferencia de carga del  $\text{TiO}_2/\text{metal}$  bajo irradiación UV debido a la existencia de la barrera de Schottky; b) Esquema de transferencia de carga del  $\text{TiO}_2/\text{metal}$  bajo irradiación de luz visible debido a los efectos de resonancia de plasmón superficial (RPS)<sup>161</sup>.

Considerando las potenciales aplicaciones futuras que tiene el uso de materiales semiconductores en la producción de  $\text{H}_2$ , es importante considerar cocatalizadores que sean baratos, eficientes y abundantes, aunado que su relación costo-conversión de hidrógeno sea favorable. En recientes estudios, el níquel ha demostrado ser un cocatalizador interesante en la producción de  $\text{H}_2$ , ya sea incluido como metal inorgánico, compuestos níquelados (sulfuros, fosfuros, óxidos, etc.), en las hidrogenasas o como complejos moleculares<sup>162</sup>. Simon *et al.*<sup>163</sup> depositaron Ni en CdS por el método de fotorreducción y alcanzaron una tasa de producción de  $\text{H}_2$  de  $6300 \mu\text{mol H}_2/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{cat}}$  utilizando etanol como agente de sacrificio bajo luz LED a 447 nm. También, Chen *et al.*<sup>164</sup> incorporaron Ni en CdS por el método hidrotérmico, ellos reportan  $3004.8 \mu\text{mol H}_2/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{cat}}$  en la fotocatalisis del ácido láctico bajo luz de Xe a 420 nm. Por otro lado, Zhang *et al.*<sup>165</sup> emplearon NiS como cocatalizador en  $\text{Zn}_{0.5}\text{Cd}_{0.5}\text{S}/\text{rGO}$  (rGO: óxido de grafeno reducido) en una solución de  $\text{Na}_2\text{S}$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  alcanzando una tasa de producción de  $\text{H}_2$  de  $7514 \mu\text{mol H}_2/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{cat}}$  bajo un simulador solar. Sreethawong *et al.*<sup>166</sup> sintetizaron un complejo NiO- $\text{TiO}_2$  por el método sol-gel y lo usaron en una solución de metanol para producir  $\text{H}_2$  a una tasa de  $813 \mu\text{mol H}_2/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{cat}}$  bajo una fuente de luz de UV-vis.

### 2.11.3. Dopaje con no metales

Con respecto al dopaje con compuestos o elementos no metálicos, los aniones han presentado un efecto positivo al aumentar el desempeño fotocatalítico del semiconductor modificado ya que es activo bajo irradiación visible. Cuando el semiconductor se dopa con un no metal, la  $E_g$  se reduce y provoca que se genere una banda de hibridación 2p entre la BC y BV de un semiconductor. Bajo irradiación de luz visible, los electrones son transferidos a la banda intermedia 2p desde la BV del semiconductor y luego migran a la BC desde la banda intermedia para producir hidrógeno. Este proceso de excitación electrónica requiere menor energía y también dificulta la recombinación de las cargas<sup>167</sup>. Se ha reportado el uso de una variedad de aniones ( $N^{2-}$ ,  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $S^{2-}$ , etc.) dopados en  $TiO_2$  causando una mejora en la absorción de luz visible<sup>168</sup>. Se descubrió que los dopantes no metálicos son más eficientes en comparación con la mayoría de los iones metálicos debido a la menor formación de centros de recombinación de carga y al estrechamiento de la energía de la banda prohibida, por lo que son altamente sensibles a la irradiación con luz visible<sup>169</sup>. Li *et al.*<sup>170</sup> encontraron que la producción de hidrógeno mejoraba al dopar  $TiO_2$  con nitrógeno, logrando una mejora de 0.73  $mmol/h \cdot g_{cat}$  a 2.98  $mmol/h \cdot g_{cat}$  empleando etilendiamina como agente precursor a una relación 1:1.

El número de pares  $e^-/h^+$  producidos durante una reacción fotocatalítica depende del número de sitios catalíticos activos presentes en la superficie; entre mayor sea el área superficial del fotocatalizador, mayor será el número de sitios activos en la superficie y, por consiguiente, mayor será la velocidad de la fotocatalisis. Entonces, tener una conductividad electrónica alta no es suficiente para mejorar la actividad, por lo tanto, para mejorar el desempeño de los semiconductores, es necesario incrementar el número de sitios activos en la superficie del material. Esto se puede lograr creando sitios activos por medio del dopaje sustitucional en el material o creando nuevos sitios activos sobre la superficie del semiconductor por medio de cocatalizadores. El dopaje por heteroátomos como B, N, P y S pueden generar sitios activos efectivamente y así desencadenar reacciones electrocatalíticas<sup>171</sup>. Jiao *et al.*<sup>172</sup> exploraron la aplicación de N y P en grafeno para la producción de hidrógeno, y lo compararon con  $g-C_3N_4$  dopado con N y observaron un mejor desempeño del primer material mencionado; propusieron que los heteroátomos dopados dirigen a un mayor contacto interfacial, una mayor conductividad electrónica, y una mayor generación de sitios activos los cuales son los responsables principales del transporte efectivo de cargas y la separación de cargas a diferentes direcciones.

#### 2.11.4. Acoplamiento entre semiconductores

La unión o acoplamiento entre semiconductores se realiza con la finalidad de mejorar el proceso fotocatalítico, principalmente para disminuir la  $E_g$  y así lograr que el material sea capaz de utilizar la luz visible, además de mejorar su habilidad de absorción de fotones y su estabilidad<sup>173</sup>. Las heterouniones pueden mejorar el desempeño del proceso al acoplar una  $E_g$  ancha con una  $E_g$  estrecha y así hacer funcional al semiconductor bajo luz visible y acelerar la separación de cargas. Esta técnica de modificación para semiconductores ha sido estudiada principalmente acoplando  $TiO_2$  con compósitos ( $WO_3$ ,  $SiO_2$ ,  $Al_2O_3$ ,  $SnO_2$ ,  $CdS$ ,  $PbS$ ,  $Bi_2S_3$ ) y con óxidos metálicos ( $Cu_2O$ ,  $Fe_2O_3$ ,  $ZnO$ ,  $NiO$ )<sup>151</sup>. Lakshmana *et al.*<sup>174</sup> reportaron el uso de  $Bi_2O_3$  inmovilizado en  $TiO_2$  para la producción de hidrógeno, depositaron sus materiales formando láminas, ellos reportaron una producción máxima de  $H_2$  de 100 mmol/g<sub>cat</sub> en cuatro horas de irradiación solar. No solo se ha reportado el acoplamiento de compósitos binarios, sino también de compuestos ternarios. Estos fotocatalizadores ternarios consisten en tres elementos diferentes o semiconductores con diferentes funciones en tres pasos distintos; los compósitos semiconductores ternarios proveen una oportunidad de multiplicar la excitación fotónica de los materiales fotoactivos con una energía menor y utilizar la heterounión para conducir el proceso electrónico en la dirección deseada. En consecuencia, se puede lograr la fotoexcitación selectiva de estados electrónicos localizados para obtener una mejor selectividad<sup>175</sup>. Xie *et al.*<sup>176</sup> sintetizaron un compósito ternario formado por  $TiO_2$ - $ZnO$ /Pt y lo emplearon en un proceso de *water splitting* logrando una tasa máxima de producción de hidrógeno de 2150  $\mu\text{mol/h}\cdot\text{g}_{\text{cat}}$ . Muchos compósitos ternarios contienen heterouniones de dos semiconductores y un metal depositado; la unión de un semiconductor con otro, con una  $E_g$  menor, puede también mejorar su activación hacia un rango de luz visible debido a que la fotogeneración de electrones pueden migrar hacia el semiconductor con la  $E_g$  mayor, resultando en una separación de cargas mayor<sup>151</sup>.

#### 2.11.5. Sensibilización de la superficie del semiconductor

La sensibilización es el proceso en el cual se transfiere la energía de excitación electrónica de una molécula a otra; generalmente los agentes sensibilizadores son colorantes que facilitan la transferencia de electrones hacia el semiconductor sin ser consumidos, ya que actúan de manera análoga a un semiconductor al aportar un electrón desde su BC hacia la BC del semiconductor. Durante la fotosensibilización,

gracias a la absorción de fotones, el fotosensibilizador supone la generación del estado excitado, de esta manera es capaz de ceder o transferir su exceso de energía a otra molécula cercana. La fotosensibilización por colorantes ha sido empleada para la evolución de hidrógeno a partir del agua y es una manera eficiente de aprovechar la energía solar<sup>177</sup>. Kong *et al.*<sup>178</sup> reportaron cerca del 32.5% de eficiencia fotocatalítica usando Eosina Y como fotosensibilizador empleando grafeno/NiS<sub>x</sub>, donde concluyen que el NiS<sub>x</sub> actúa como cocatalizador con sitios altamente activos para reducir el potencial excesivo de la generación de hidrógeno y el grafeno proporciona una gran superficie, además de fortalecer la migración de electrones desde eosina Y al cocatalizador NiS<sub>x</sub>. La clorofila es un pigmento fotosintético que juega un papel esencial en la absorción de luz (en el rango de luz roja y azul), además que esta energía absorbida es conducida al centro de reacción del compuesto por la transferencia de resonancia a través de anillos y dobles enlaces en la estructura del pigmento<sup>179</sup>. Algunos autores han estudiado la sensibilización de diferentes fotocatalizadores con clorofila, por ejemplo, Joshi *et al.*<sup>180</sup> inmovilizaron clorofila en diferentes soportes mesoporosos (silica gel, meso alumina, meso titania y MCM-41) con la finalidad de fotorreducir azul de metileno. Recientemente, Phongamwong *et al.*<sup>29</sup> evaluaron el uso de la clorofila en TiO<sub>2</sub> dopado con nitrógeno para reducir CO<sub>2</sub>. También, Kondo *et al.*<sup>181</sup> realizaron una fotosensibilización de un dímero de Zn-pirofeoforbido a (ZnPyOH) con clorofila para fotoinducir la producción de H<sub>2</sub>.

## **2.12. Factores que afectan la fotocatalisis heterogénea en la producción de hidrógeno**

### *2.12.1. Energía de banda prohibida*

La estructura electrónica de un semiconductor está dada en términos de bandas de energía y pueden considerarse como una serie de niveles de energía debido a la diferencia energética entre la BV y BC. De manera general, el potencial redox del aceptor de electrones debe ser termodinámicamente menor que el perteneciente a la BC del semiconductor<sup>159</sup>. El hidrógeno es producido de la hidrogenación inicial de intermediarios, los iones H<sup>+</sup> son adsorbidos en los sitios activos y reducidos a H<sub>2</sub> mediante los e<sup>-</sup> fotogenerados<sup>182</sup>. Por ejemplo, el TiO<sub>2</sub> tiene un E<sub>g</sub> apropiado para el proceso de *water splitting*, ya que la BV (+2.7 V vs. NHE pH 7) es más positiva que el par redox O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (+1.23 V vs. NHE), y por el otro lado, la BC (-0.5 V vs. NHE pH 7) es más negativo que el par redox H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub> (-0.41 V vs. NHE pH 7)<sup>183</sup>. Sin embargo, el TiO<sub>2</sub>

solo es activo bajo irradiación UV ya que tiene un  $E_g$  de 3.2 eV; por esta situación, para ser activo bajo irradiación visible, el  $TiO_2$  tendría que ser dopado con metales u otro elemento, o modificado con otro semiconductor para reducir su  $E_g$  y ser activo bajo irradiación visible.

### *2.12.2. Área superficial y estructural del semiconductor*

La modificación de la superficie de los semiconductores es una de las estrategias para disminuir la  $E_g$  de los fotocatalizadores y estos cambios estructurales tienen un efecto directo en el proceso de fotocatalisis<sup>184</sup>. La estructura cristalina de los fotocatalizadores afecta directamente la actividad catalítica y, por lo tanto, la producción de hidrógeno. Las nanopartículas de gran tamaño pueden contribuir a una interacción débil del metal soportado en el semiconductor<sup>185</sup>. Un área superficial grande puede proveer mayor número de sitios activos y, como consecuencia, un incremento en la actividad fotocatalítica<sup>186</sup>. Los fotocatalizadores cristalinos con un tamaño de partícula más pequeño tienen una distancia más corta para que los electrones y huecos fotogenerados se muevan rápidamente a los sitios activos de reacción en la superficie del catalizador, reduciendo así la probabilidad de recombinación<sup>187</sup>.

### *2.12.3. Intensidad de luz*

La eficiencia de un proceso fotocatalítico también está influenciado por la intensidad de luz a la cual es irradiado el semiconductor, ya que se ha reportado que un aumento en la intensidad de luz está relacionado con un aumento en la producción de hidrógeno<sup>188</sup>. Existen dos regímenes relacionados con la actividad fotocatalítica con respecto al flujo de electrones. El primer orden son los flujos empleados a nivel laboratorio, que oscila alrededor de 25 mW/cm<sup>2</sup> y los pares  $e^-/h^+$  son consumidos más rápido por las reacciones de interés que por efectos de recombinación. Mientras que el otro régimen se relaciona a intensidades muy altas, en las cuales la velocidad de recombinación domina y resulta en una disminución de la velocidad de reacción<sup>189</sup>. Baniyasi *et al.*<sup>190</sup> realizaron experimentos para la producción de hidrógeno empleando ZnS, evaluaron el efecto de la intensidad de luz y observaron un aumento del 20% en la fotoactividad del material al aumentar de 900 a 1000 W/m<sup>2</sup>.

#### 2.12.4. Temperatura

La temperatura no puede inducir la actividad fotocatalítica de un semiconductor, ya que esta no contribuye a la generación de  $e^-$  ni  $h^+$ . Sin embargo, la temperatura juega un papel importante en la desorción de productos en la superficie del fotocatalizador y así aumentar la actividad fotocatalítica; este efecto difiere según el tipo de catalizador usado. Otro efecto en el proceso es que la temperatura tiende a acelerar la velocidad de reacción de las especies reactivas generadas en el proceso fotocatalítico. También, altas temperaturas proveen una transferencia de  $e^-$  mayor, por lo que facilita que se lleven a cabo las reacciones redox. Huaxu *et al.*<sup>191</sup> emplearon  $TiO_2/Pt$  en la producción de hidrógeno y reportaron un incremento de 4.71 mmol  $H_2/g_{cat}$  a 15.18 mmol  $H_2/g_{cat}$  cuando la temperatura aumentaba de 45 a 55 °C. Por otro lado, Zhang y Maggard<sup>192</sup> reportaron que la temperatura óptima para la producción de hidrógeno por *water splitting* se encuentra entre 60 y 80 °C.

#### 2.12.5. pH

La producción de hidrógeno se ve favorecida según la concentración de protones en el sistema, la cual se relaciona con el pH de la solución en donde se lleva a cabo el proceso. Con respecto al proceso de fotorreformado, el pH tiene un papel importante debido a la presencia de las especies orgánicas empleadas como agentes de sacrificio. La producción de hidrógeno se ve favorecida a pH básico débil que en un pH ácido fuerte o pH básico fuerte (>10), y esto también impacta en los cambios de la  $E_g$  de los semiconductores modificados<sup>193</sup>. Tal fue el caso de Wu *et al.*<sup>194</sup> que reportaron el uso de  $TiO_2/CuOx$  para la producción de hidrógeno, y observaron que a pH 10 la producción era mayor en comparación que a pH 2, ellos observaron que bajo condiciones ácidas las especies de Cu(I) son menos estables en la superficie del  $TiO_2$ , por lo que el desempeño del sistema decaía notoriamente. Por otra parte, Fujita *et al.*<sup>195</sup> observaron que al usar  $TiO_2/NiO$  en un medio de reacción a pH 6.6 alcanzaba un rendimiento de 1200  $\mu mol H_2/h \cdot g_{cat}$ , por lo que concluyó que la velocidad en la evolución del hidrógeno dependía del pH del medio de reacción y que el pH óptimo estaba cerca al punto de carga cero del material. Otro estudio fue realizado por Nada *et al.*<sup>196</sup> que usaron  $TiO_2/RuO_2-MV^{2+}$  para la producción de hidrógeno empleando una mezcla de metanol-agua bajo condiciones ácidas, observaron que a pH ácido, los iones  $H^+$  eran adsorbidos en el fotocatalizador, y la posibilidad de que ocurriera la reducción hacia  $H_2$  aumentaba.

### 2.12.6. Agentes de sacrificio

El desempeño de la fotocatalisis puede aumentar cuando se emplean especies orgánicas como agentes de sacrificio, ya que estos compuestos actúan como secuestradores de  $h^+$ , lo que abre paso a que los  $e^-$  tengan camino libre para la reducción de  $H^+$  y así la generación de  $H_2$ <sup>197</sup>. Algunos derivados de la biomasa como el etanol, glicerol, azúcares y metano son sustratos biológicos que pueden provenir de plantas y residuos lignocelulósicos, así como de la fabricación de almidón, aceites y grasas; éstos compuestos son una fuente viable de agentes de sacrificio debido a su alto contenido de carbono. Además, dichos compuestos son considerados como una fuente renovable ya que a pesar de que existe formación de dióxido de carbono durante su utilización en la producción de  $H_2$ , éste puede convertirse nuevamente en biomasa a través de la fotosíntesis, contribuyendo al ciclo del carbono; por lo tanto, esto significa que el dióxido de carbono producido a partir de biomasa no debe contribuir al calentamiento global mientras el consumo de la biomasa no exceda la capacidad natural de convertir el dióxido de carbono en biomasa<sup>141</sup>.

Kawai y Sakata<sup>198-200</sup> realizaron los primeros estudios en producción de  $H_2$  por fotocatalisis de varios derivados de la biomasa como metanol, etanol, azúcares y aminoácidos, entre otros, empleando  $TiO_2$  dopado con Pt y  $RuO_2$  como cocatalizadores. Este mismo grupo de investigación estudió las reacciones que se llevan a cabo usando diversos ácidos orgánicos y agua en un proceso de fotocatalisis utilizando  $TiO_2$  dopado con Ag y Pt<sup>201</sup>. Años después, Kondarides *et al.*<sup>202</sup> realizaron el fotorreformado del glicerol con una tasa de producción de 4.98 mmol  $H_2/L \cdot h$ , así como varios carbohidratos como galactosa, lactosa, celobiosa, maltosa, almidón y celulosa con el uso de Pt/ $TiO_2$  como semiconductor y concluyó que estos agentes de sacrificio pueden proveer una fuente viable de  $H_2$  renovable. Li *et al.*<sup>203</sup> evaluaron la producción de  $H_2$  a partir de ácidos grasos orgánicos usando nanopartículas de  $TiO_2$  dopadas con carbono bajo irradiación de luz visible. Los autores realizaron las reacciones empleando sistemas con mezclas de los ácidos grasos (ácido acético, propiónico, butírico y láctico) y por separado obteniendo una tasa máxima de producción de  $H_2$  de 12  $\mu\text{mol } H_2/L \cdot h$  en 4 h de irradiación empleando una combinación de ácido láctico y acético.

### **3. APORTACIÓN CIENTÍFICA**

Al concluir este proyecto de investigación se esperan las siguientes aportaciones:

- ✓ Evaluación de la funcionalidad del uso de mediadores redox libre e inmovilizados en la fermentación oscura para incrementar la producción de hidrógeno.
- ✓ Diseño de un semiconductor funcional a base de  $\text{TiO}_2$  o  $\text{ZnO}$ , resina fenólica dopado platino para favorecer la producción de hidrógeno.
- ✓ Integración de un proceso biológico mediante fermentación oscura y un proceso fisicoquímico mediante fotocátalisis heterogénea para producir hidrógeno.

### **4. HIPÓTESIS**

La inmovilización de mediadores redox en soportes carbonáceos favorece la producción de hidrógeno por fermentación oscura, además los subproductos de la fermentación oscura pueden ser usados como agentes de sacrificio para producir hidrógeno por fotocátalisis heterogénea.

### **5. OBJETIVO GENERAL**

Producir hidrógeno mediante fermentación oscura con un consorcio anaerobio y *Clostridium beijerincki* empleando mediadores redox soportados en distintos materiales carbonáceos y evaluar la utilización de los subproductos líquidos de la fermentación oscura para la generación de hidrógeno por fotocátalisis heterogénea.

### **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Realizar la inmovilización de diferentes mediadores redox (riboflavina, AQS, y lawsona) en materiales carbonáceos (bagazo de agave y carbón activado mineral).
- b. Evaluar el efecto de la riboflavina inmovilizada en bagazo de agave como mediador redox en la producción de hidrógeno a diferentes temperaturas empleando *Clostridium beijerinckii*.
- c. Realizar un pretratamiento térmico a lodo anaerobio y acondicionamiento en reactor UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) para su posterior uso como inóculo en las pruebas de producción de hidrógeno.
- d. Evaluar el efecto de diversos mediadores redox inmovilizados en carbón activado granular en la producción de hidrógeno empleando un lodo anaerobio pretratado.

- e. Sintetizar semiconductores usando como base  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$  comercial, así como sensibilizar los fotocatalizadores con la incorporación de resina fenólica, y doparlos con un cocatalizador metálico (Pt).
- f. Caracterizar los mejores semiconductores sintetizados en la producción de hidrógeno.
- g. Efectuar pruebas fotocatalíticas de producción de hidrógeno en presencia y ausencia de agentes de sacrificio de manera individual o en mezcla.
- h. Utilizar los subproductos líquidos de la fermentación en pruebas de producción de hidrógeno por fotocátalisis heterogénea.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Materiales y reactivos

Triptona, extracto de levadura, ácido aminobenzoico, biotina, tiamina, riboflavina, y hexacloroplatinato de sodio hexahidratado fueron obtenidos de Sigma Aldrich. El carbón activado mineral “Carboactive” se obtuvo de la empresa CLARIMEX™, el diámetro de partícula tuvo un rango de 0.5 mm a 0.7 mm. Los mediadores redox estudiados (riboflavina (Rib), lawsona (LQ) y antraquinona-2-sulfonato (AQS)) fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Fenol (99%), formaldehído (37%), ácido clorhídrico (37%), acetona (80%) y etanol (96%) se obtuvieron de Desarrollo de Especialidades Químicas (DEQ). El ácido oxálico y bicarbonato de sodio fueron obtenidos de J.T. Baker. El  $\text{TiO}_2$  se obtuvo de *Inframat® Advanced Materials* (22N-0801<sup>a</sup>). El gas nitrógeno empleado para establecer condiciones anaerobias fue obtenido de AOC (80% de pureza).

La estructura de esta investigación fue dividida en dos etapas (ver Fig. 6): la etapa uno enfocada en la fermentación oscura bajo diversas condiciones evaluando el uso de mediadores redox, y una segunda etapa dirigida a la producción de hidrógeno por fotocatalisis heterogénea empleando los subproductos líquidos de la primera etapa fermentativa.

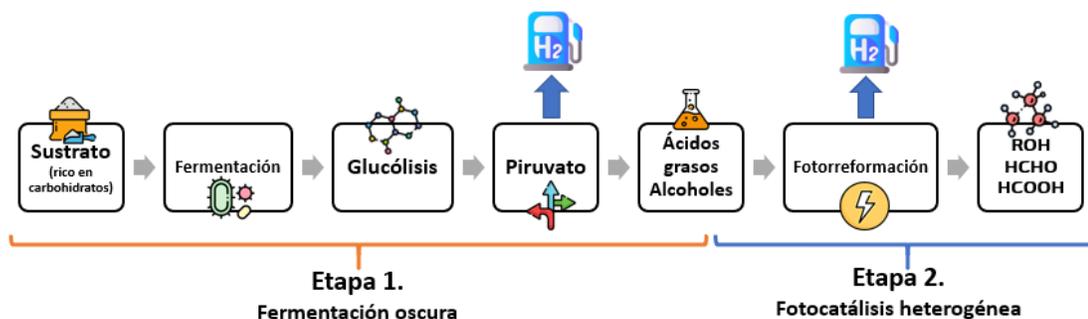


Fig. 6. Propuesta del esquema de la ruta de producción de  $\text{H}_2$ .

## 7.2. Etapa I. Fermentación oscura empleando mediadores redox disueltos e inmovilizados

### 7.2.1. Inmovilización de riboflavina en bagazo de agave

#### 7.2.1.1. *Modificación química del bagazo de agave*

La inmovilización de la riboflavina se llevó a cabo mediante la modificación química del bagazo de agave (BA). El proceso de modificación constó de cuatro etapas: mercerización, esterificación entre grupos hidroxilo y ácido succínico, formación de grupo anhídrido en la estructura e incorporación de la riboflavina en el soporte<sup>130</sup>.

La mercerización se realizó agregando 15 g del soporte carbonoso y 400 mL de NaOH 20% w/v, la mezcla se mantuvo en agitación constante por 18 h a 25 °C. Posteriormente, se filtró la suspensión y se realizó lavado del material con agua destilada hasta obtener un pH neutro en la solución de lavado. Después, el material mercerizado se lavó con etanol 96% v/v y se secó por 90 min a 85 °C.

La esterificación comenzó agregando el material mercerizado obtenido junto con 35 g de anhídrido succínico en un matraz de fondo redondo. Se adicionaron posteriormente 233 mL de piridina y la suspensión se mantuvo a 120 °C por 6 h. Después, se filtró la suspensión y el material sólido obtenido fue lavado con las siguientes soluciones: ácido acético en cloruro de metilo (1 M), etanol 96% v/v, agua destilada, HCl (0.01 M) y acetona. Finalmente, el material lavado se secó a 80 °C por una hora.

Consecutivamente, el material obtenido de la esterificación junto con 265 mL de anhídrido acético se calentó a 100 °C por 24 h con agitación constante. La suspensión se filtró y se lavó con éter dietílico, para después ser secado a 100 °C por 20 min.

Por último, para la incorporación de la riboflavina en el soporte modificado, se mezcló el material obtenido junto con 2.35 g de riboflavina; después, se añadieron 140 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) y se llevó a calentamiento a 75 °C por 24 h bajo agitación constante. Después, se filtró el material y se lavó con DMF, dimetilsulfóxido (DMSO), agua destilada en exceso, etanol 96% v/v y acetona. Posterior a esto, se secó el material a 80 °C por 30 min. Finalmente, se midió la absorbancia de la solución de lavado a 267 nm con ayuda de un espectrofotómetro UV-Vis para corroborar un eficiente lavado del material.

#### 7.2.1.2. Determinación de concentración de riboflavina en bagazo de agave.

La determinación de la concentración de la riboflavina inmovilizada en el bagazo de agave se llevó a cabo por hidrólisis del enlace éster formado entre el material carbonoso modificado y la riboflavina. Para ello se colocaron 31 mg del soporte inmovilizado junto con 50 mL de NaOH 0.1 M (pH 12) y se sometió en agitación por 24 h a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugaron las suspensiones y se obtuvieron los sobrenadantes. Después, se midió la absorbancia de las muestras a 354 nm ( $\lambda_{\max}$  a la que absorbe la lumiflavina a pH 12) y se calculó la concentración de la riboflavina inmovilizada en el soporte a través de la curva de calibración correspondiente (Anexo A).

#### 7.2.2. Inmovilización de LQ y AQS en carbón activado

La inmovilización química de los mediadores redox en carbón activado (CA) se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Olivo-Alanis *et al.*<sup>204</sup> para LQ y Alvarez *et al.*<sup>205</sup> para AQS.

La realización de la inmovilización de LQ en el CA comenzó con la preparación de una solución de LQ a 360 mg/L en agua desionizada, para mejorar la solubilidad de la LQ en la solución, se añadieron algunas gotas de bicarbonato de sodio 1 M hasta alcanzar un pH neutro. Posteriormente, el pH de la solución se ajustó a 3 usando una solución de HCl 1 M. Después, se pesó 1 g de CA y se agregó a la solución de LQ, ésta se mantuvo en agitación constante (150 rpm) a 50 °C por 48 h. Luego, el material obtenido fue filtrado y lavado con agua desionizada, y se sometió a calentamiento a 85 °C por 24 h para promover la esterificación de Fisher. Alícuotas iniciales y finales fueron tomadas de las suspensiones para la determinación de la concentración de LQ por espectrofotometría UV-Vis a 450 nm, de esta manera se estimó la cantidad de LQ inmovilizada en el CA.

La inmovilización covalente de AQS en CA comenzó al pesar 10 g de CA y añadiéndolos a 250 mL de una solución de 250 g/L de ZnCl<sub>2</sub> disuelto en HCl concentrado, el CA se dejó en contacto en la solución por 24 h. Subsecuentemente, el carbón activado tratado (CA-Cl) fue lavado tres veces con HCl y secado a 80 °C por 12 h. Luego, el material seco se agregó en 1 L de solución de AQS a 1.5 g/L y se mantuvo en agitación constante (150 rpm) a 50 °C por 48 h. Finalmente, la cantidad de AQS inmovilizada en CA fue cuantificada según la concentración inicial y final de AQS en la suspensión empleando espectrofotometría UV-Vis a 350 nm.

La capacidad de adsorción ( $Q_{ads}$ , mg/g) se determinó empleando un balance de masa de acuerdo a la la Ec. 11.

$$Q_{ads} = \frac{V (C_0 - C_e)}{m} \quad (11)$$

Donde,  $V$  (L) es el volumen de la solución de LQ y AQS;  $C_0$  y  $C_e$  (mg/L) son la concentración inicial y al equilibrio de LQ y AQS, respectivamente; y  $m$  (g) es la masa del carbón activado.

La capacidad de desorción ( $Q_{des}$ , mg/g) se determinó a partir de la masa de carbón activado ( $m$ , g), y la concentración de LQ y AQS de la solución del lavado con el medio basal ( $C_d$ , mg/L) a partir de la Ec. 12. Finalmente, la capacidad remanente ( $Q_{remanente}$ ) se estimó de acuerdo a la Ec. 13.

$$Q_{des} = \frac{V C_d}{m} \quad (12)$$

$$Q_{remanente} = Q_{ads} - Q_{des} \quad (13)$$

### 7.2.3. Activación de la cepa *Clostridium beijerinckii*

Se llevó a cabo la revitalización de una suspensión de esporas de *Clostridium beijerinckii* en medio TYD (3 g/L triptona, 1 g/L extracto de levadura y 2 g/L dextrosa) y después se realizó la siembra en medio P2 modificado de acuerdo al método reportado por Ye *et al.*<sup>136,206</sup>. La composición del medio P2 modificado fue la siguiente: buffer (5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.6 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), solución de elementos traza (1 mL/L buffer) (20 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/L  $\text{MnSO}_4$ , 1 g/L  $\text{NaCl}$ , 1 g/L  $\text{FeSO}_4$ ) y solución de vitaminas (1 mL/L buffer) (1 g/L ácido aminobenzoico, 0.1 g/L biotina y 1 g/L tiamina). El pH del medio fue aproximadamente 6.8. El medio fue burbujeado con nitrógeno por 10 minutos para crear condiciones anóxicas y esterilizado a 121 °C por 20 min.

### 7.2.4. Tratamiento del lodo anaerobio granular

El uso del LQ y AQS como mediadores redox en la fermentación oscura fue evaluado empleando un lodo anaerobio granular, el cual fue obtenido de un digestor anaerobio de una industria cervecera en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México. Antes de ser

empleado como inóculo en el proceso fermentativo, el lodo fue sometido a un tratamiento térmico para inhibir la actividad de microorganismos consumidores de hidrógeno<sup>98</sup>; para ello, 1 L de lodo granular fue cribado con un tamiz de 0.4 mm; después, se sometió a calentamiento a 90 °C por 2 h; finalmente, el lodo se dejó enfriar a temperatura ambiente por 24 h. Después del tratamiento térmico, el inóculo tratado se sometió a un proceso de aclimatación en un reactor UASB con un TRH (tiempo de retención hidráulica) de 18 h a temperatura ambiente por 25 días. Durante la adaptación del lodo, previo a los experimentos de fermentación, el biorreactor fue alimentado con 2.5 g/L de glucosa, 2.55 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 g/L NH<sub>4</sub>Cl y 5 mg/L de una mezcla de medidores redox (LQ y AQS). Luego, varias muestras de lodo fueron tomadas para la determinación de ST (sólidos totales) y SVT (sólidos volátiles totales) siguiendo la metodología reportada por los métodos estándar <sup>207</sup>.

#### **7.2.5. Optimización de la producción de hidrógeno empleando riboflavina soluble e inmovilizada durante la fermentación oscura por *Clostridium beijerinckii***

Para la evaluación de la producción de hidrógeno por fermentación oscura se desarrolló un diseño de experimentos central compuesto (DCC); los factores a evaluar fueron: temperatura (25, 35 y 45 °C) y la concentración de riboflavina (100, 200 y 300 µM) (Tabla 2), mientras que las respuestas medidas fueron la tasa de producción y la máxima producción de hidrógeno. El diseño fue aplicado para los siguientes escenarios:

- a) Riboflavina libre en el medio.
- b) Riboflavina inmovilizada en bagazo de agave (BA).
- c) Riboflavina inmovilizada en carbón activado (CA).

La fermentación se llevó a cabo en botellas serológicas de 120 mL en medio P2 modificado utilizando glucosa a 3 g/L como única fuente de carbono. Los frascos fueron burbujeados con nitrógeno y esterilizados a condiciones estándar. Se inocularon los biorreactores con 6% (v/v) de *Clostridium beijerinckii* y fueron mantenidos bajo agitación orbital constante (120 rpm) a la temperatura del diseño de experimentos. Periódicamente, se midió el hidrógeno acumulado por desplazamiento en solución alcalina.

**Tabla 2.** Diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.

No.	Tipo	Temperatura (°C)	Riboflavina (µM)
1	Factorial	25	100
2	Factorial	45	100
3	Factorial	25	300
4	Factorial	45	300
5	Axial	25	200
6	Axial	45	200
7	Axial	25	100
8	Axial	45	300
9	Central	35	200
10	Central	35	200
11	Central	35	200
12	Central	35	200
13	Central	35	200

Una vez realizadas las cinéticas de producción de hidrógeno de cada tratamiento obtenido por el diseño de experimentos, se implementó el modelo de Gompertz modificado (Ec. 5) y mediante el software Statistica se determinaron los parámetros siguientes: Volumen máximo de hidrógeno producido ( $H_{max}$ ), tasa de producción de hidrógeno ( $R_{max}$ ), y tiempo de duración de fase lag ( $\lambda$ ).

Las respuestas evaluadas para los diseños de experimentos fueron los parámetros  $H_{max}$  y  $R_{max}$ . El análisis estadístico y los índices de deseabilidad se obtuvieron usando el software Design Expert 7.

#### **7.2.6. Evaluación de LQ y AQS en forma disuelta e inmovilizada durante la fermentación oscura por lodos anaerobios granulares**

Los experimentos fermentativos para la producción de hidrógeno usando LQ y AQS en forma disuelta e inmovilizada se llevaron a cabo en frascos serológicos de 120 mL empleando el medio P2 modificado con la siguiente composición<sup>206</sup>: la solución buffer que contenía  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (4.55 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (4 g/L) y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1.2 g/L); la solución de elementos traza (1 mL/L buffer) compuesta por  $\text{MgSO}_4$  (20 g/L),  $\text{MnSO}_4$  (1 g/L),  $\text{NaCl}$  (1 g/L) y  $\text{FeSO}_4$  (1 g/L); y la solución vitamínica (1 mL/L buffer) que contenía ácido aminobenzoico (1 g/L), biotina (0.1 g/L) y tiamina (1 g/L). La fuente de carbono fue glucosa a 3 g/L, y se inoculó con 1  $\text{g}_{\text{SVT}}/\text{L}$  del lodo anaerobio aclimatado. Durante la fermentación oscura se mantuvo agitación constante a 150 rpm, a 37 °C; el volumen de

trabajo fue de 84 mL, y el oxígeno presente en los frascos fue desplazado por burbujeo con nitrógeno gas por 10 min. Se realizaron controles experimentales con la ausencia del mediador redox para la evaluación del desempeño del consorcio anaerobio en la producción de hidrógeno; también se adicionó un control del CA sin mediador redox presente, con el objetivo de evaluar el efecto del material carbonáceo en la fermentación oscura. Finalmente, para identificar el papel del mediador redox en la fermentación oscura, los mediadores redox (LQ y AQS) fueron adicionados en estado oxidado a una concentración de 500  $\mu$ M, ambos fueron adicionados en forma disuelta (LQ y AQS) e inmovilizados (CA-LQ y CA-AQS). Todos los experimentos fueron efectuados por triplicado con medio basal, glucosa y lodo anaerobio como inóculo.

El biogás acumulado fue medido a intervalos regulares liberando la presión de los frascos y haciendo pasar el gas por una trampa de CO<sub>2</sub> con una solución alcalina. Adicionalmente, se tomaron diversas muestras líquidas al inicio y final de la fermentación, las cuales fueron filtradas (diámetro de poro del filtro: 0.2  $\mu$ m) y acidificadas con 10% v/v con una solución de ácido fosfórico (relación 1:3) y almacenadas a -4 °C.

La información obtenida de las cinéticas experimentales fue ajustada mediante una regresión no lineal, empleando mínimos cuadrados como la función error, y usando el software estadístico Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) para determinar los parámetros de interés del modelo de Gompertz modificado (Ec. 5).

#### **7.2.7. Análisis estadístico del uso de LQ y AQS en la fermentación oscura**

La información obtenida de las cinéticas de producción de hidrógeno fue expresada como promedios  $\pm$  intervalo de confianza (IC) a un nivel de confianza de 95%. La diferencia significativa fue determinada por análisis de varianza (ANOVA) de un factor, además se realizó la prueba de comparativos múltiples de Tukey (ambos con un nivel de confianza de 95%) para los parámetros cinéticos de la producción de hidrógeno ( $H_{max}$  y  $R_{max}$ ), también se efectuaron los mismos análisis estadísticos para la acumulación de subproductos líquidos de los experimentos fermentativos. Este análisis estadístico fue efectuado mediante el uso del software OriginPro 2018.

### 7.2.8. Caracterización electroquímica de los mediadores redox a diferente pH

El potencial redox de los mediadores redox estudiados fue estimado mediante el uso de voltamperometría cíclica (VC) empleando un potenciostato/galvanostato marca Epsilon E2. Se realizaron escaneos electroquímicos a 20 mV/s usando una rampa de potencial de -1.4 V a 0.2 V. Los voltamperogramas registrados fueron usados para obtener la derivada de la voltamperometría cíclica con la finalidad de obtener el potencial de oxidación y reducción exacto. Las pruebas electroquímicas fueron desarrolladas usando soluciones a 500  $\mu$ M de LQ, AQS y Rib a diferente pH, con el objetivo de simular las condiciones iniciales (pH 6.6), un pH intermedio del proceso biológico (pH 6), y a condiciones finales (pH 5.3). Los ensayos electroquímicos fueron realizados usando como electrolito un buffer fosfatos bajo las concentraciones del medio basal del proceso fermentativo. Adicionalmente, se empleó un electrodo de grafito como electrodo de trabajo, un electrodo de platino como electrodo de contrabajo, y un electrodo de referencia Ag/AgCl. Los potenciales medidos vs. Ag/AgCl se convirtieron con relación a la escala del electrodo normalizado de hidrógeno (ENH), según la ecuación de Nernst (Ec. 14).

$$E_{ENH} = E_{Ag/AgCl}^{\circ} + 0.059pH \quad (14)$$

Donde,  $E_{ENH}$  es el potencial convertido vs. ENH,  $E_{Ag/AgCl}^{\circ}=0.197$  V a 25 °C, y  $E_{Ag/AgCl}$  es la medición experimental del potencial contra el electrodo de referencia Ag/AgCl.

### 7.3. Etapa II. Fotocatálisis heterogénea de productos derivados de la fermentación oscura

#### 7.3.1. Síntesis de la resina fenólica

Para el proceso de fotocatálisis heterogénea se sintetizó una resina fenólica a base de fenol-formaldehído como semiconductor. La síntesis se llevó a cabo mezclando 100 g de fenol con formaldehído a una relación molar de 1.5 (fenol:formaldehído) con 0.025 M de ácido oxálico por 30 minutos a 60 °C. Después, se dejó reaccionar hasta alcanzar 90 °C en agitación por 5 horas. Transcurrido el tiempo, se adicionó bicarbonato de sodio para neutralizar el ácido oxálico y detener la reacción de polimerización. Después, se

llevó a cabo el lavado del gel obtenido por tres ocasiones con 100 mL de agua y se secó a 100 °C por 14 h<sup>208-212</sup>.

### **7.3.2. Incorporación superficial del ZnO y TiO<sub>2</sub> con la resina fenólica**

Se llevó a cabo el anclaje superficial del ZnO y TiO<sub>2</sub> con la resina fenólica siguiendo la metodología reportada por Zhang *et al.*<sup>213</sup> la cual se describe a continuación. El proceso comenzó dispersando 2.5 g del óxido metálico (ZnO ó TiO<sub>2</sub>) en 250 mL de acetona en un matraz y sonicando por 15 minutos. Después, se sometió el gel de la resina fenólica a un proceso de calentamiento moderado para favorecer su manipulación y tomar la cantidad requerida para el proceso de anclaje. Luego, 0.5 g del gel polimérico fue adicionado a la suspensión del semiconductor en acetona mientras se encontraba en agitación a 50 °C; en este paso, se observó un cambio de coloración en la suspensión hacia un color amarillo. La suspensión se mantuvo a 50 °C en agitación constante por 2 h. Posteriormente, se eliminó la acetona de la suspensión a 80 °C y, finalmente, se recuperó el polvo obtenido.

### **7.3.3. Deposición de platino en los semiconductores por fotorreducción**

La deposición de platino por fotorreducción se desarrolló siguiendo la metodología reportada por Lee & Choi<sup>214</sup>. La masa teórica de platino depositada fue 1.5 wt%; y los materiales modificados siguiendo esta metodología fueron los siguientes: TiO<sub>2</sub>, ZnO, R-TiO<sub>2</sub> y R-ZnO. Primero, se pesó 1 g de cada material, se adicionó la masa correspondiente de Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>·6H<sub>2</sub>O, y se agregaron 100 mL de metanol 1 M. Después, se desplazó el oxígeno presente con nitrógeno gas por 15 min. Posteriormente, se irradió el sistema de fotorreducción empleando una lámpara UV-LED a 365 nm por 180 minutos bajo agitación constante. Finalmente, se filtró el material obtenido y se lavó con agua desionizada, para después ser secado a 80 °C durante 24 h.

### **7.3.4. Deposición de platino en los semiconductores por reducción química**

La deposición de platino por reducción química fue de acuerdo a la metodología reportada por Terán-Salgado *et al.*<sup>215</sup>. La masa teórica de platino depositada fue 1.5 wt%; y los materiales modificados siguiendo esta metodología fueron los siguientes: TiO<sub>2</sub>,

ZnO, R-TiO<sub>2</sub> y R-ZnO. Primero, se pesaron 2.5 g de cada material y se agregó la masa correspondiente del precursor del platino utilizado (Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>·6H<sub>2</sub>O). Posteriormente, se añadieron 900 mg de citrato de sodio y 100 mL de agua desionizada. Después, se desplazó el oxígeno presente en los frascos con nitrógeno gas por 15 minutos. Luego, se adicionó 1 mL NaBH<sub>4</sub> (0.627 mmol/400 µL) bajo constante agitación, se mantuvo la agitación por 30 min. Finalmente, se filtró el material obtenido y se lavó dos veces con agua desionizada, para después ser secado a 80 °C durante 24 h.

### 7.3.5. Caracterización de los semiconductores

La caracterización de los materiales obtenidos se llevó a cabo empleando diversas técnicas instrumentales. Se empleó un difractorómetro Bruker D-8 Advance para obtener los patrones de difracción de los fotocatalizadores. La morfología de los fotocatalizadores fue analizada usando un microscopio electrónico de barrido JSM-7600F Field Emission *Scanning Electron Microscope* (FE-SEM), marca JEOL, y la información para el análisis elemental fue obtenida con el EDX-Oxford INCA Energy 250 EDS. Adicionalmente, se evaluaron por XPS (*X-ray photoelectron Spectroscopy*) los materiales empleando un equipo K-Alpha Surface Analysis, marca Thermo Fisher Scientific usando una línea K-alpha monocromada de Al (1486.6 eV) a 12 kV y 40 W, con la finalidad de analizar la conformación elemental de los catalizadores, así como su estado de oxidación en el material. Las propiedades ópticas, así como la energía de banda prohibida (E<sub>g</sub>) de los materiales fueron obtenidas mediante un espectrofotómetro Carry 5000 UV-Vis-NIR, Agilent Technologies equipado con una esfera de integración para obtener los espectros UV-Vis DRS (*Diffuse Reflectance Spectroscopy*). Además, para las mediciones del diámetro hidrodinámico (d<sub>h</sub>) se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), así zeta métricas se utilizó un Zetasizer nano zsp, marca Malvern Panalytical.

Las propiedades ópticas de los materiales fueron obtenidas mediante el uso de un espectrofotómetro UV-Vis y de reflectancia difusa. Se determinaron los coeficientes de extinción específica de acuerdo con los resultados de extintancia; dichos experimentos se realizaron mediante barridos de absorbancia (300-800 nm) de una suspensión del semiconductor. La determinación del coeficiente de extinción específica se obtuvo a partir de la Ec.15:

$$\beta_{\lambda} = \frac{2.303 EXT_{\lambda}}{L(cm)C_{cat}} \quad (15)$$

Donde  $EXT_{\lambda}$  son los valores de la extinción para cada longitud de onda y  $L$  es la longitud de paso de luz de la celda.

Los espectros de reflectancia difusa se registraron en un rango de 300 a 800 nm, empleando  $BaSO_4$  como referencia; posteriormente, de acuerdo con la teoría de Kubelka-Munk (Ec. 16-19) se determinó el coeficiente de absorción ( $\kappa$ ), coeficiente de dispersión ( $\sigma$ ) y el albedo ( $\omega$ ). Finalmente, se usó la gráfica de Tauc para la determinación de la  $E_g$  de los semiconductores en estudio.

$$\omega_{\lambda} = \frac{\sigma_{\lambda}}{\beta_{\lambda}} = \frac{\sigma_{\lambda}}{\sigma_{\lambda} + \kappa_{\lambda}} \quad (16)$$

$$f(R_{\lambda}) = \frac{(1 - R_{\lambda})^2}{2R_{\lambda}} = \frac{\kappa_{\lambda}}{\sigma_{\lambda}} \quad (17)$$

$$\omega_{\lambda} = \frac{2R_{\lambda}}{(1 - R_{\lambda})^2 - 2R_{\lambda}} \quad (18)$$

$$f(E_g) = (\kappa_{\lambda} h\nu)^{1/r} \quad (19)$$

Donde,  $R$  es la fracción de la reflectancia a la longitud de onda específica,  $h$  es la constante de Planck,  $\nu$  es la frecuencia de onda, y  $r$  es la naturaleza de la transición. Para los materiales en estudio, se tomó en cuenta una transición tipo directa de  $r = 1/2$ . Las voltamperometrías cíclicas (VAC), se realizaron en un potenciostato (épsilon E2). Se emplearon los siguientes electrodos: Ag/AgCl (referencia), grafito (carbono vítreo) (trabajo) y Pt (contrabajo). Los experimentos se llevaron a cabo con una velocidad de corriente de 50 mV/s. Previamente, se preparó una suspensión del material mezclando 20 mg del semiconductor y 5 gotas de alcohol isopropílico grado HPLC, se mantuvo bajo sonicación por 10 min; después, cuidadosamente se agregan algunas gotas de la suspensión homogénea en la parte inferior del electrodo de grafito y se deja secar a temperatura ambiente para la formación de la película. Seguido de esto, se corren las voltamperometrías cíclicas a las condiciones antes mencionadas, empleando 1 mM de hexaferrocianato de sodio (III) en KCl (1 M).

### 7.3.6. Sistema fotocatalítico para la producción de hidrógeno

Las pruebas fotocatalíticas para la producción de hidrógeno se llevaron a cabo empleando los diferentes materiales sintetizados en el estudio: TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ), R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ), ZnO-Pt (FR), ZnO-Pt (RQ), R-ZnO-Pt (FR), R-ZnO-Pt (RQ). Los agentes de sacrificio evaluados fueron los principales subproductos derivados de la fermentación oscura (ácido acético, ácido butírico, etanol y butanol).

Primero, se desarrolló una prueba de exploración de los materiales sintetizados empleando los agentes de sacrificio en forma individual (1 M cada uno, excepto butanol (0.5 M), matriz de agua, pH natural) y en mezcla (ácido acético: 10 mM, ácido butírico: 4.5 mM, etanol: 8.5 mM y butanol: 1.7 mM, en matriz de buffer fosfatos a pH 5.3; concentraciones relacionadas a las obtenidas en la fermentación oscura). Las reacciones fotocatalíticas fueron irradiadas bajo luz visible (luz LED, 645 W/m<sup>2</sup>) y luz UV (UV LED, 150 W/m<sup>2</sup>, λ:365 nm) (En anexos se encuentran los gráficos de potencia espectral de ambas lámparas). Posteriormente, se seleccionaron los materiales que presentaron mejores resultados y se evaluaron a detalle. Para ello, se realizaron cinéticas de producción de hidrógeno por 6 h, usando mezclas de los agentes de sacrificio (mismas concentraciones evaluadas anteriormente con relación a la fermentación oscura) en diferentes matrices como disolventes (agua y buffer fosfatos) a pH 5.3, para estas pruebas se irradió luz UV-LED (150 W/m<sup>2</sup>, λ: 365 nm). Todos los experimentos fotocatalíticos se desarrollaron empleando un volumen de reacción de 80 mL, bajo una atmósfera libre de oxígeno, una dosis del fotocatalizador de 1 g/L, bajo agitación constante y sin control de temperatura.

Adicionalmente, para las pruebas de fotocatalisis en mezcla, se evaluó el porcentaje de conversión de cada componente de la mezcla de acuerdo con la concentración inicial y final de cada agente de sacrificio, esto mediante el análisis cuantitativo de las alícuotas tomadas en los experimentos por medio de cromatografía de gases. El porcentaje de conversión se estimó de acuerdo con la Ec. 20. Donde  $C_a$  es la concentración inicial del analito en la muestra antes de la reacción de fotorreformado, mientras que  $C_b$  es la concentración después de la reacción de fotorreformado de cada analito.

$$\%Conversión = \frac{(C_a - C_b)}{C_a} \cdot 100 \quad (20)$$

#### **7.4. Pruebas de reusabilidad**

Los experimentos de reusabilidad se llevaron a cabo en el material que presentó mejores resultados en la producción de hidrógeno, que fue el TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ). Estos experimentos se desarrollaron evaluando la mezcla de agentes de sacrificio mencionada en la sección 7.3.6 a un pH 5.3, adicionalmente se llevaron a cabo tanto en agua desionizada, como en buffer fosfatos. Para la realización de cada ciclo de reuso, se deja en reposo el fotorreactor por 15 h para asegurar la sedimentación del material; posteriormente, se extrae cuidadosamente con una manguera delgada la fase acuosa sin succionar el material del fondo del reactor. Después, se rellena con solución fresca de la mezcla de agentes de sacrificio y se desplaza el oxígeno con un flujo constante de nitrógeno por 10 min. Finalmente, comienza la irradiación y agitación por 6 h continuas, y se monitorea la concentración de los productos gaseosos de interés durante la reacción de fotorreformado. Se repitió este procedimiento durante cuatro ciclos de reuso.

#### **7.5. Acoplamiento de la fermentación oscura y el fotorreformado para la producción de hidrógeno**

La evaluación del acoplamiento de los procesos de fermentación oscura y fotocatalisis heterogénea a través del proceso de fotorreformado se realizó en etapas separadas; siendo la etapa 1, la fermentación oscura de glucosa empleando CA-LQ por un lodo anaerobio pretratado; posteriormente, en la etapa 2, se llevó a cabo el fotorreformado del efluente real de la etapa 1, empleando como fotocatalizador TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) bajo luz UV LED.

##### **7.5.1. Etapa 1: Fermentación oscura de glucosa empleando CA-LQ por un lodo anaerobio pretratado**

La fermentación oscura se desarrolló en reactores de 1 L, con un volumen de trabajo de 0.7 L; la composición del medio fue la misma mencionada en la sección 7.2.3. Se empleó 3 g/L de glucosa, 1 g<sub>SVT</sub>/L de lodo anaerobio tratado y 500 µM de lawsona como mediador redox, la cual estaba inmovilizada en carbón activado (CA-LQ); además, se desplazó el oxígeno presente con un flujo constante de nitrógeno por 15 min. La biorreacción se llevó

a cabo a 37 °C, con agitación intermitente cada hora por 43 h. Se monitoreo la producción de hidrógeno por la técnica de desplazamiento en columna con solución de NaOH saturada, y se analizó en la fase acuosa la concentración final de glucosa (método de Miller), así como la concentración de subproductos finales por cromatografía de gases.

### **7.5.2. Etapa 2: Fotorreformado del efluente real de la fermentación oscura empleando TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ)**

Previamente de utilizar el efluente real de la etapa 1 de fermentación oscura, el efluente fue filtrado a vacío con filtro Whatman 1, y posteriormente la parte filtrada se sometió a centrifugación a 8500 rpm por 15 min a 7 °C. Las pruebas fotocatalíticas se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 80 mL, empleando TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) como fotocatalizador a una dosis de 1 g/L; se desplazó el oxígeno de los frascos con flujo continuo de nitrógeno por 10 min; la fotorreacción se llevó a cabo bajo irradiación UV LED 365 nm, bajo agitación constante. El pH del efluente real fue 5.6. Además, se evaluaron algunos experimentos control como fue el TiO<sub>2</sub> sin modificar y la fotólisis. La cinéticas de producción de hidrógeno tuvieron una duración de 6 h, y en cada hora se llevó a cabo el monitoreo de los subproductos gaseosos por cromatografía de gases.

## **7.6. Métodos analíticos**

### **a. Determinación de biogás e hidrógeno**

El hidrógeno acumulado fue medido por medio de desplazamiento de agua por probeta invertida en una solución alcalina para atrapar el dióxido de carbono presente. La concentración de hidrógeno fue analizada por cromatografía de gases (GC, Thermo Scientific Trace 1310) empleando un detector de conductividad térmica (TCD) usando nitrógeno como gas acarreador bajo las condiciones reportadas por Valentín-Reyes *et al.*<sup>28</sup>. Las condiciones de análisis del método fueron las siguientes: horno a 50 °C por 3 min, inyección modo “split” (split ratio: 20) a un flujo constante de 1.5 mL/min de nitrógeno como gas acarreador, y el detector a 150 °C (polaridad negativa) usando 1.5 mL/min de gas acarreador como referencia.

#### **b. Determinación de subproductos de fermentación**

Se determinaron los subproductos líquidos de fermentación por cromatografía de gases (GC, Thermo Scientific Trace 1310) empleando un detector de ionización de flama (FID) con una mezcla de gases (hidrógeno y nitrógeno), usando una columna MEGA-WAX-025-025-60 m. Las condiciones del método desarrollado fueron las siguientes: 10 µL de la muestra acidificada fueron inyectados en el puerto de inyección (250 °C) y el cromatógrafo de gases fue operado en modo “split” (split ratio: 50) a un flujo constante de 2 mL/min usando nitrógeno como gas acarreador. El horno fue calentado empleando una rampa de 80 °C por un minuto, después a 12.5 °C/min hasta alcanzar 200 °C, y finalmente, calentar a 10 °C/min hasta llegar a 240 °C por 1.5 min. El detector se mantuvo trabajando a 250 °C con aire, hidrógeno y nitrógeno (make-up gas) a un flujo de 175, 17.5, y 20 mL/min, respectivamente.

#### **c. Pruebas adicionales**

Como pruebas adicionales se determinó la concentración de azúcares reductores por medio del ensayo con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)<sup>216</sup> para conocer el consumo de sustrato de los microorganismos presentes. También, se determinó la demanda química de oxígeno (DQO) presente antes y después de la fermentación empleando el método de reflujo cerrado descrito en la literatura especializada de la APHA (*American Public Health Association*)<sup>207</sup>.

### **7.7. Disposición de residuos generados**

Durante la realización del proyecto todos los residuos generados fueron dispuestos de acuerdo con el procedimiento para la disposición final de residuos peligrosos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

La clasificación de los residuos generados se llevó de la siguiente manera:

Colector A: Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas.

Colector B: Sólidos inorgánicos, sales inorgánicas.

Colector C: Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos no halogenados.

Colector D: Tóxico e inflamables. Aminas, solventes orgánicos halogenados.

Colector E Orgánico: Muy tóxico, cancerígeno, orgánico.

Colector E Inorgánico: Muy tóxico, cancerígeno, inorgánico.

Colector F: Reciclo de sales de metales preciosos.

Colector G: Combinaciones orgánicas sólidas.

Colector H: Oxidantes.

Colector de colorantes y Lugol.

Vidrio impregnado con sustancias peligrosas.

Plástico impregnado con sustancias peligrosas.

Basura industrial

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

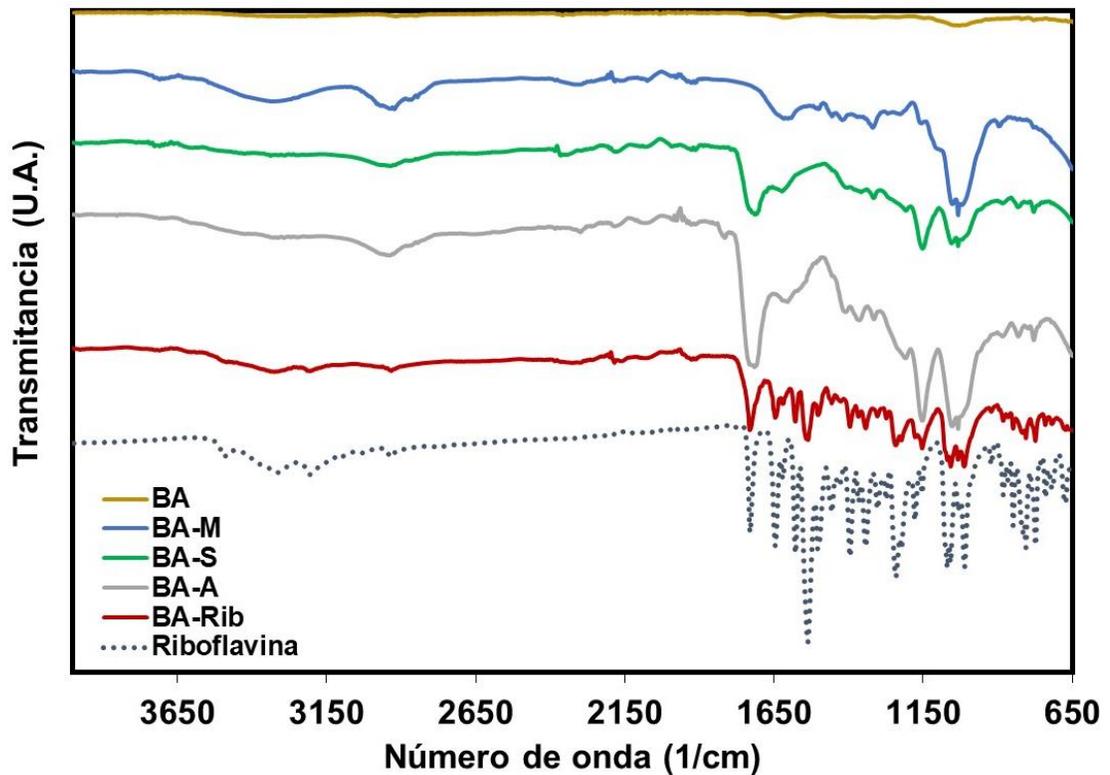
### 8.1. Etapa I. Fermentación oscura empleando mediadores redox disueltos e inmovilizados

#### 8.1.1. Caracterización de la riboflavina inmovilizada en el bagazo de agave

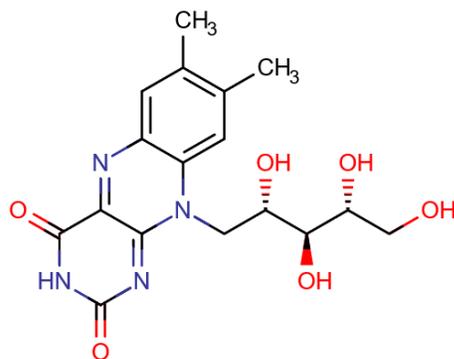
##### a. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

La modificación química del soporte carbonoso a base de bagazo de agave (BA) fue caracterizada por espectroscopía FTIR; en la Fig. 7 se muestra la secuencia de la modificación del bagazo de agave. El acrónimo BA-M fue asignado al bagazo de agave mercerizado, el objetivo de este paso fue incorporar grupos hidroxilo ( $\text{-HO}^\cdot$ ), cuando se compara el espectro FTIR, se observa la aparición de una banda a  $3303\text{ cm}^{-1}$  que puede ser atribuida a la presencia de los grupos  $\text{-HO}^\cdot$  en el material en comparación con el espectro del BA sin modificación que no presenta dicha banda. Posteriormente, se realizó la esterificación del material BA-M, que constó en unir a los grupos  $\text{-HO}^\cdot$  con el ácido succínico a través de la formación de un enlace éster con el grupo carboxílico ( $\text{-COOH}$ ), el material esterificado se denominó BA-S. En la Fig. 7 se observa el espectro FTIR del BA-S, donde se muestra la desaparición de la banda de los grupos  $\text{-HO}^\cdot$ ; además se nota la aparición de dos bandas a  $2938$  y  $2863\text{ cm}^{-1}$  que pueden ser atribuidas a grupos metileno ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ) de estiramiento simétrico y asimétrico. También, a  $1705\text{ cm}^{-1}$  se observó una banda intensa atribuida al grupo carbonilo al formar un enlace éster ( $\text{-O-C=O}$ ) introducido por el anhídrido succínico en el material a través de enlaces éster y consiguiente la liberación de grupos carboxílicos, esto podría corroborarse con la presencia de una banda a  $1152\text{ cm}^{-1}$  adjudicada a la deformación de la vibración de grupos hidroxilo y el estiramiento de grupos (C-O) del dímero del ácido carboxílico<sup>130,217</sup>. Después, el material BA-S fue tratado con anhídrido acético para formar grupos anhídrido a partir de los grupos carboxílicos, este material se nombró BA-A. La importancia de promover la formación de grupos anhídrido es que son grupos electrófilos capaces de reaccionar con grupos neutrofilos como los grupos hidroxilo presentes en la riboflavina (Fig. 8). El material BA-A mostró dos bandas nuevas a  $1815$  y  $1714\text{ cm}^{-1}$ , estas señales podrían ser atribuidas a la vibración del enlace C=O características de los grupos funcionales anhídrido<sup>218</sup>, lo cual sugiere la formación de un grupo anhídrido interno en el material modificado. Finalmente, se incorporó la riboflavina en el material

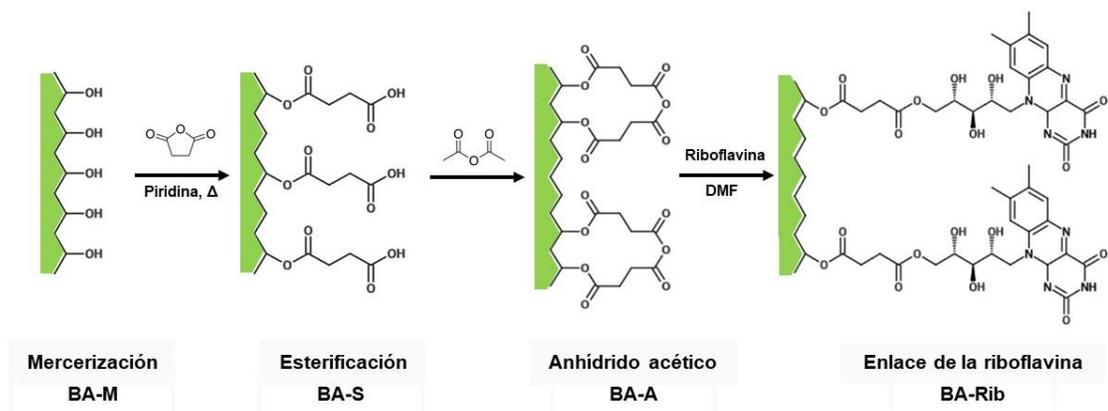
BA-A, que se denominó BA-Rib; este material mostró tres bandas a 1645, 1577, y 1537  $\text{cm}^{-1}$  las cuales demostraron la incorporación de la riboflavina en el soporte. De acuerdo a Abe *et al.*<sup>219</sup>, las bandas a 1537 y 1577  $\text{cm}^{-1}$  pueden ser atribuidas a las vibraciones de estiramiento del enlace C=N en los anillos isoalloxazina de la estructura de la riboflavina, así como la vibración a 1645  $\text{cm}^{-1}$  puede deberse a la vibración del grupo carbolino del anillo isoalloxazina (C=O) (Fig. 9).



**Fig. 7.** Espectros FTIR con reflectancia total atenuada de la secuencia de la modificación química del bagazo de agave durante la inmovilización de la riboflavina.

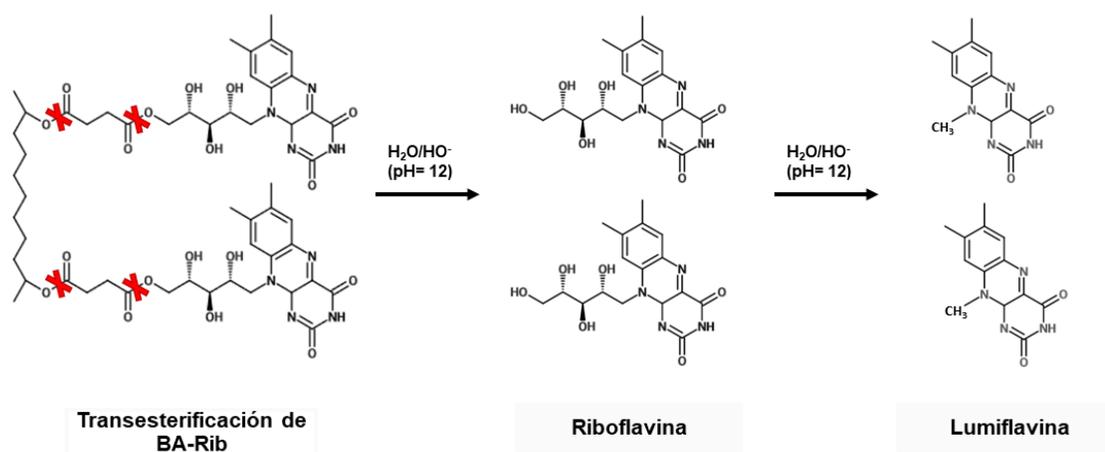


**Fig. 8.** Estructura química de la riboflavina.



**Fig. 9.** Mecanismo de inmovilización de la riboflavina en el bagazo de agave<sup>130</sup>.

Para la determinación de la concentración de riboflavina inmovilizada en los soportes carbonosos, se realizó la transesterificación del enlace éster formado entre el soporte modificado y la riboflavina (Fig. 10) (metodología mencionada en la sección 7.2.1.2) y se midió por espectroscopía UV-Vis empleando una curva de calibración de lumiflavina (Anexo A.1), la concentración de riboflavina inmovilizada en el bagazo de agave fue  $88.31 \pm 5$  mg/g. Este rendimiento de riboflavina inmovilizada fue aproximado a lo reportado por Martins *et al.*<sup>130</sup>, éstos autores alcanzaron 71.3 mg/g con la misma metodología de inmovilización.



**Fig. 10.** Mecanismo de transesterificación de la riboflavina en el bagazo de agave<sup>130</sup>.

### 8.1.2. Inmovilización de LQ y AQS en carbón activado mineral

La adsorción de LQ y AQS en carbón activado fue interpretada por el modelo de Langmuir y el modelo de Freundlich (Tabla 3), así como la capacidad de adsorción fue estimada de acuerdo a las ecuaciones planteadas en la sección 7.2.2. Adicionalmente, la capacidad de adsorción final de LQ en el carbón activado fue 1.754 mmol/g, este valor es 25% mayor a la capacidad de adsorción reportada por Olivo-Alanis *et al.*<sup>204</sup>; por otro lado, la capacidad de adsorción final de AQS en el carbón activado fue de 0.523 mmol/g que fue 10.2% mayor a la capacidad de adsorción reportada por Alvarez *et al.*<sup>220</sup>; esto podría deberse a las propiedades del carbón activado empleado, al poseer mayor número de grupos funcionales reactivos para cada tipo de inmovilización.

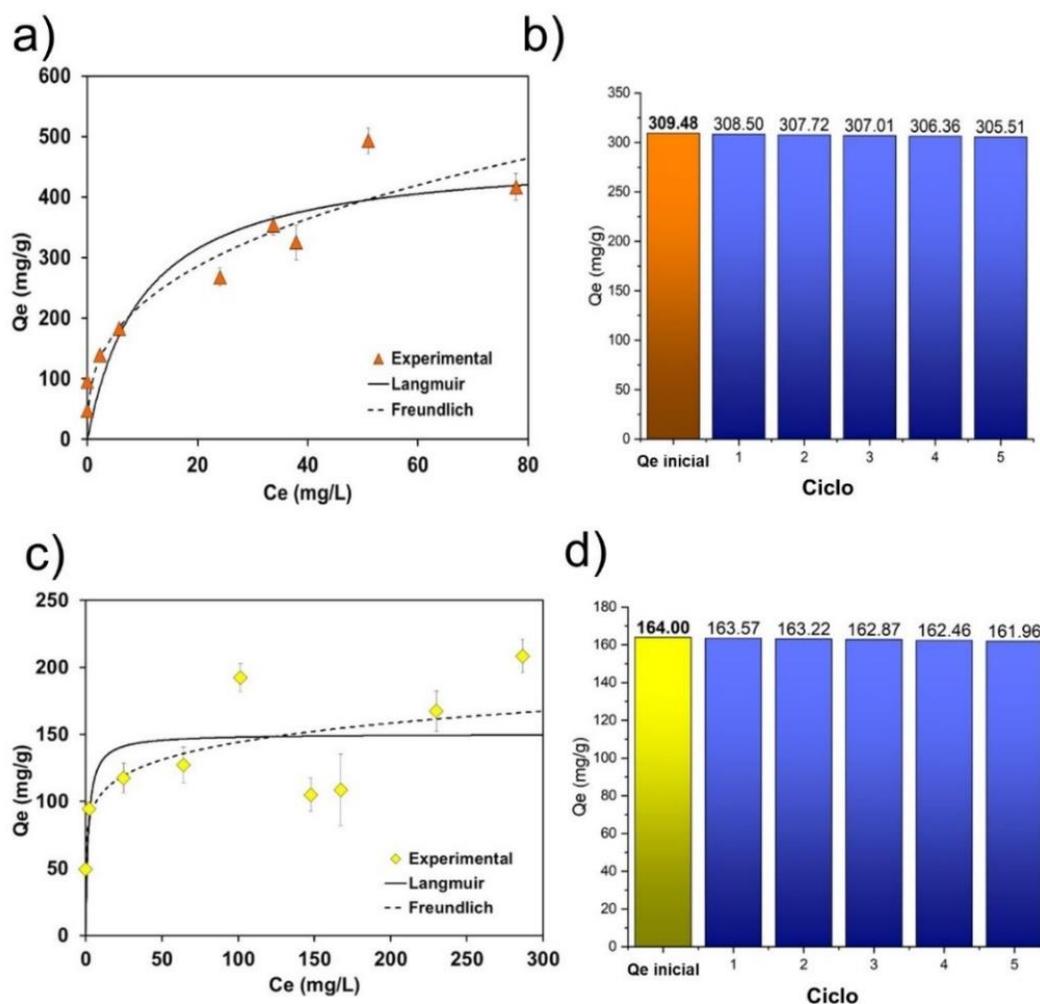
Las isothermas de adsorción de LQ en el carbón activado (CA-LQ) fueron obtenidas a pH 3 y 50 °C (Fig. 11). Las condiciones ácidas en los experimentos de adsorción favorecieron la inmovilización debido a que los grupos funcionales de LQ y el carbón activado no se encuentran disociados. De esta manera, la reacción de esterificación de Fischer entre el grupo hidroxilo de LQ y los grupos carboxílicos del CA puede ocurrir. Estudios previos han reportado este tipo de reacción empleando moléculas de hidroquinona debido a su alta reactividad en sus grupos hidroxilo con otros compuestos<sup>221,222</sup>; además, la reacción de esterificación de Fischer fue sugerida como unión covalente de los grupos fenólicos en los materiales carbonáceos<sup>223,224</sup>.

**Tabla 3.** Parámetros estimados de las isothermas a partir de los datos experimentales de la adsorción de LQ y AQS en CA, y los resultados de desorción después de cinco ciclos.

Material	Langmuir			Freundlich			Desorción (%)	$Q_e$ (final) (mg/g)
	$Q_{max}$ (mg/g)	$b$ (L/mg)	R <sup>2</sup>	$k_f$	$n$	R <sup>2</sup>		
CA-LQ	473.81	0.099	0.944	100.17	2.86	0.95	1.28	305.50
CA-AQS	150.41	0.616	0.70	77.08	7.35	0.75	1.24	162.00

Adicionalmente, se llevó a cabo la inmovilización de AQS en el carbón activado modificado (CA-Cl) y se obtuvieron las isothermas de adsorción de AQS en el carbón activado (CA-AQS). El uso del reactivo de Lucas (ZnCl<sub>2</sub>/HCl) promueve el intercambio de grupos hidroxilo en el CA por cloruros, y la modificación química del CA conduce a una mejora en la adsorción de AQS en el CA<sup>220</sup>. El mecanismo de inmovilización ocurre

cuando los cloruros del CA son sustituidos por los grupos sulfonato ( $-\text{SO}_3^-$ ) de las moléculas de AQS.

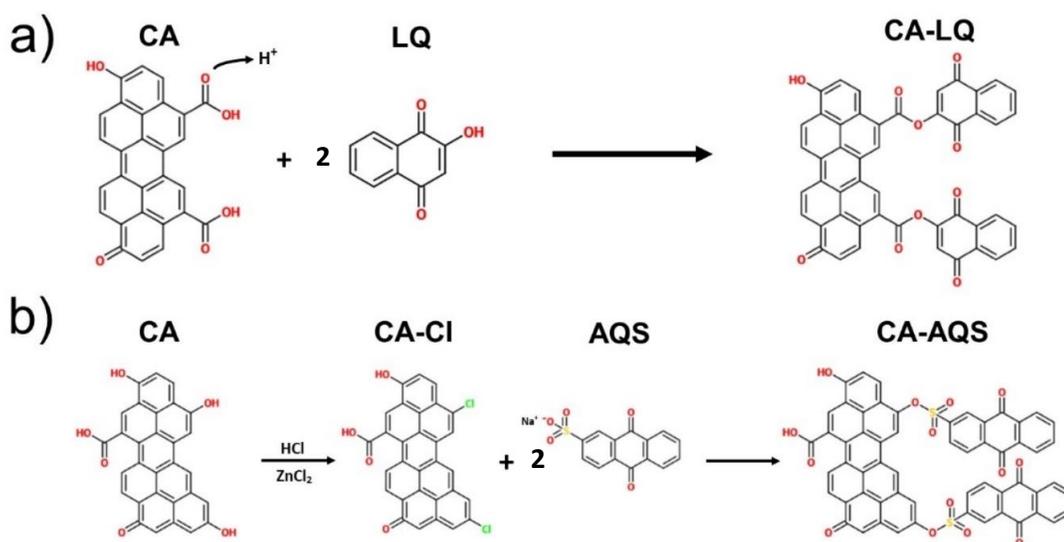


**Fig. 11.** a) Isothermas de adsorción de LQ (a) y AQS (c) en CA (símbolos) y predicción por modelo de Langmuir (línea continua) y modelo de Freundlich (línea discontinua). Capacidad de adsorción restante de LQ (b) y AQS (d) en CA antes y después de los ciclos de desorción. Los resultados experimentales representan la media  $\pm$  los intervalos de confianza (IC).

El mecanismo propuesto de la inmovilización de LQ en CA fue mediante una reacción de esterificación de Fischer (a), mientras que para el AQS adsorbido en el CA se sugiere una sustitución nucleofílica (b) como mecanismo de adsorción (Fig. 12).

Para demostrar la estabilidad de la inmovilización, se realizaron pruebas de desorción de LQ y AQS en CA, empleando medio basal como eluyente. El medio basal contenía una alta concentración de especies cargadas tanto positiva, como negativamente que podrían reaccionar con los grupos funcionales presentes en la superficie del CA

mediante interacciones electrostáticas y, consecuentemente, provocando la desorción del mediador redox unido no covalentemente en el CA. Sin embargo, después de cinco ciclos de desorción y de acuerdo con el empleo de las ecuaciones de la sección 7.2.2, LQ y AQS inmovilizados en CA presentaron un porcentaje de desorción bajo (1.28% y 1.24%, respectivamente) (Fig. 10). Estos resultados demostraron la elevada estabilidad de la inmovilización, lo que es atribuible a la unión covalente del mediador redox seleccionado en el carbón activado.



**Fig. 12.** Mecanismo propuesto de la adsorción de lawsona (LQ) en carbón activado (CA) por la esterificación de Fischer (a) y antraquinona-2-sulfonato (AQS) en CA por sustitución nucleofílica (b).

### 8.1.3. Optimización de la producción de hidrógeno usando riboflavina disuelta e inmovilizada por *Clostridium beijerinckii*

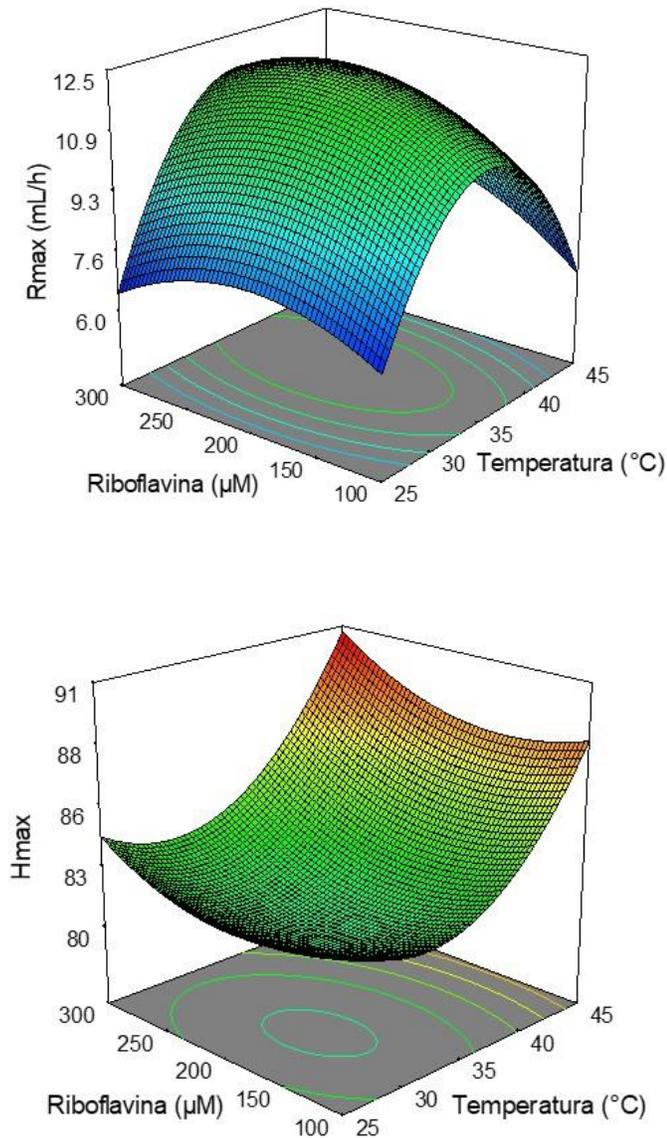
Se llevó a cabo la optimización de la producción de hidrógeno empleando riboflavina inmovilizada en bagazo de agave. Los factores evaluados fueron temperatura y concentración de riboflavina (disuelta e inmovilizada), se desarrolló el diseño de experimentos DCC 2<sup>2</sup> (Tabla 2) y se obtuvieron los parámetros  $H_{max}$ ,  $R_{max}$  y  $\lambda$  mediante el modelo de Gompertz modificado (Ec. 5). Adicionalmente se construyeron las cinéticas de producción para cada escenario (Anexos B.1, B.2 y B.3). Los resultados para cada tratamiento se muestran en la Tabla 4. De los resultados obtenidos se construyeron los gráficos de superficie de respuesta de  $R_{max}$  y  $H_{max}$  con el mediador

redox libre e inmovilizado (Fig. 13 y 14). En ambos casos, la temperatura fue el factor significativo, mientras que la concentración de riboflavina no resultó ser significativo para los dos escenarios de acuerdo con el análisis de varianza (Anexo D y E).

**Tabla 4.** Parámetros de Gompertz de la fermentación oscura con riboflavina disuelta e inmovilizada en bagazo de agave.

Tratamiento	Concentración riboflavina ( $\mu\text{M}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	<i>Hmax</i> (mL)	<i>Rmax</i> (mL/h)	$\lambda$ (h)
Disuelto	100	25	85.56	6.96	15.92
Disuelto	300	25	84.73	6.66	15.58
Disuelto	200	25	79.43	7.2	15.74
Disuelto	100	35	79.05	10.53	7.77
Disuelto	300	35	83.84	11.76	7.64
Disuelto (PC)	200	35	81.99 $\pm$ 5.44	12.13 $\pm$ 3.13	9.25 $\pm$ 3.29
Disuelto	100	45	89.48	6.19	5.27
Disuelto	300	45	90.15	8.11	3.9
Disuelto	200	45	87.52	9.37	4.04
Inmovilizado	100	25	87.4	7.05	16.92
Inmovilizado	300	25	84.17	7.53	16.25
Inmovilizado	200	25	86.28	7.39	17.1
Inmovilizado	100	35	86.82	10.22	7.29
Inmovilizado	300	35	81.02	9.93	7.28
Inmovilizado (PC)	200	35	82.38 $\pm$ 2.15	10.10 $\pm$ 1.79	7.50 $\pm$ 0.76
Inmovilizado	100	45	87.53	5.26	6.2
Inmovilizado	300	45	91.43	9.33	4.5
Inmovilizado	200	45	87.14	7.37	4.08
Control	0	25	68.82 $\pm$ 11.71	7.60 $\pm$ 0.43	15.79 $\pm$ 0.1
Control	0	35	85.09	10.62	7.69
Control	0	45	99.39 $\pm$ 34.85	5.81 $\pm$ 2.22	15.82 $\pm$ 5.66

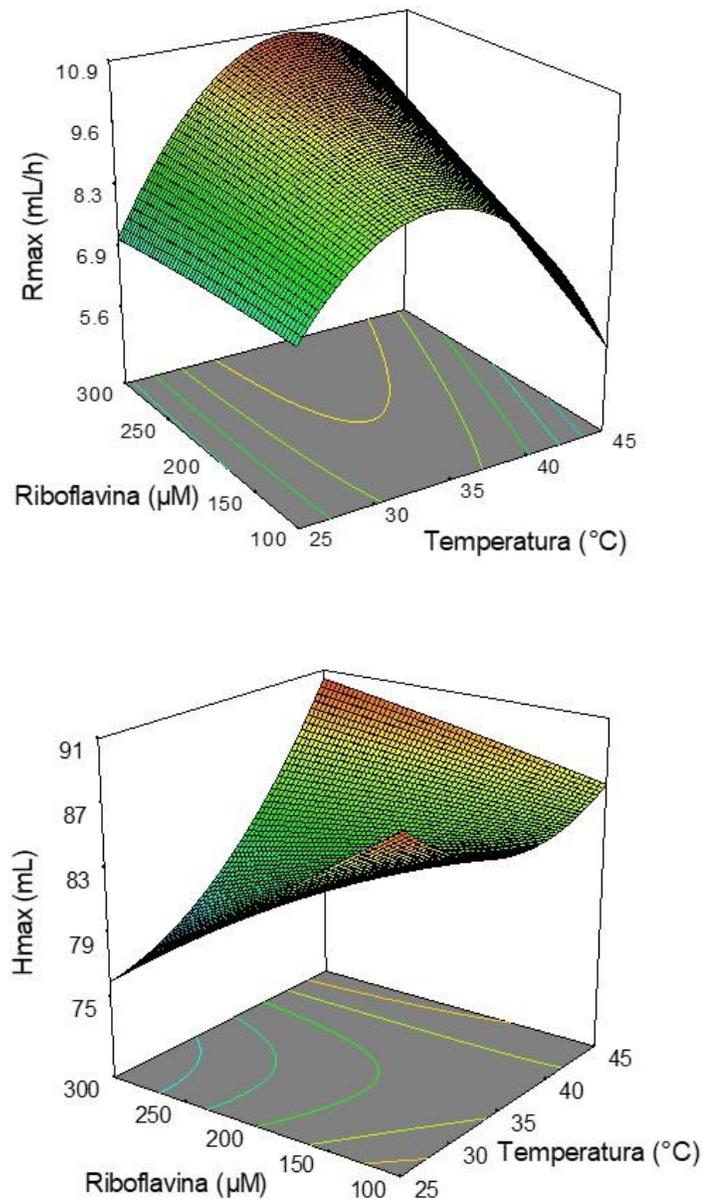
PC: punto central. PC reportados con su desviación estándar.



**Fig. 13.** Gráfico de superficie de respuesta de  $R_{max}$  y  $H_{max}$  durante la fermentación oscura empleando riboflavina disuelta.

Se obtuvieron las condiciones óptimas de acuerdo con el análisis estadístico con el software Design Expert 7.0, para ello se realizó una optimización dual, considerando como respuestas  $R_{max}$  y  $H_{max}$ , dichas condiciones se reportan en la Tabla 4. De acuerdo con las condiciones óptimas, tanto para el escenario con la riboflavina disuelta como inmovilizada, 300  $\mu\text{M}$  de riboflavina fue la máxima concentración evaluada experimentalmente y fue el valor optimizado, y considerando que el factor de la concentración de la riboflavina resultó ser no significativo, es posible que no se llegó a

encontrar un valor óptimo, ya que puede ser mayor al intervalo de concentración estudiado. Con respecto a la temperatura, cerca de 40 °C resultó ser la condición ideal en el escenario con la riboflavina libre, mientras que 43.38 °C fue la temperatura ideal para el escenario con la riboflavina inmovilizada; ambas temperaturas resultaron mayor a lo reportado por diferentes autores que han empleado *Clostridium beijerinckii* en la producción de hidrógeno<sup>28,126,135</sup>; sin embargo, ningún estudio ha reportado una optimización donde considere la temperatura como factor usando este microorganismo



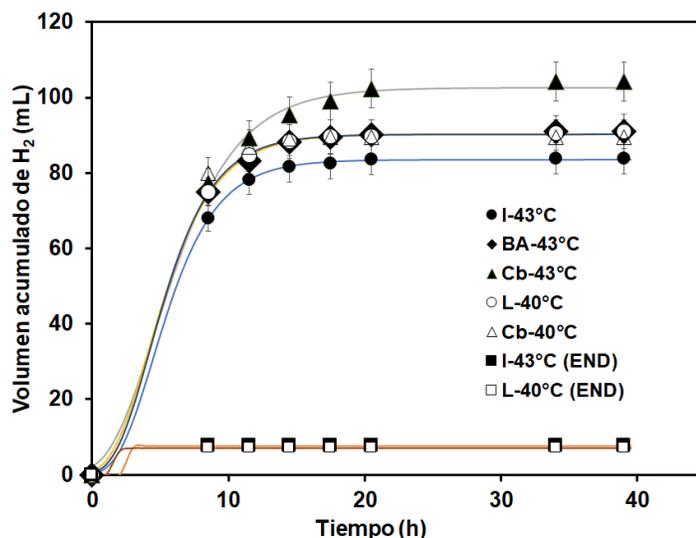
**Fig. 14.** Gráfico de superficie de respuesta de  $R_{max}$  y  $H_{max}$  durante la fermentación oscura empleando riboflavina inmovilizada en bagazo de agave.

Para los escenarios en estudio, se determinó el índice de deseabilidad alcanzando un valor de 0.58 para el escenario donde la riboflavina estaba disuelta y 0.76 para el escenario donde la riboflavina estaba inmovilizada (Anexo C.1). Estos valores, relativamente bajos, pueden deberse por considerar una optimización de dos respuestas al mismo tiempo, además dado el tipo de sistema biológico en estudio existen otros factores como concentración del inóculo, pH, agitación, concentración de sustrato, entre otros, que, al no ser evaluados, aumentan la desviación de los experimentos.

**Tabla 5.** Condiciones óptimas de la fermentación oscura con riboflavina en bagazo de agave.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Riboflavina (µM)	<i>Rmax</i>	<i>Hmax</i>	Índice de deseabilidad
Disuelto	40.09	300	11.00	86.41	0.58
Inmovilizado	43.38	300	9.58	88.37	0.76

Se llevó a cabo una validación de las condiciones predichas por el análisis estadístico (Tabla 5) de manera experimental para ambos escenarios. Una vez replicadas dichas condiciones óptimas, se obtuvieron los parámetros de interés usando el modelo de Gompertz modificado. En la Fig. 15 se presenta la producción de hidrógeno bajo las condiciones replicadas de la optimización, los tratamientos con los símbolos sólidos representan la evaluación del escenario cuando la riboflavina esta inmovilizada en BA (I), y las figuras sin relleno representan la evaluación del escenario donde la riboflavina esta disuelta (L), para ambos escenarios se agregó un control en ausencia del mediador redox (Cb), y otro control endógeno (END). Además, para el escenario con la riboflavina inmovilizada se agregó otro control, en presencia del bagazo de agave sin el mediador redox (BA). Según la validación realizada de los datos experimentales contra los predichos, para *Hmax* se observó un comportamiento similar en ambos escenarios (riboflavina libre: 86.41 mL ± 8.08 (predicción) vs. 90.3 mL ± 17.47 (experimental)); riboflavina inmovilizada: 88.37 mL ± 12.27 (predicción) vs. 83.62 mL ± 20.6 (experimental)); mientras que para *Rmax* se observó una desviación cercana al 20% entre lo predicho por el análisis estadístico y los resultados experimentales (riboflavina libre: 11 mL/h ± 4.42 (predicción) vs. 12.93 mL/h ± 3.74 (experimental); riboflavina inmovilizada: 9.58 mL/h ± 6.2 (predicción) vs. 11.91 mL/h ± 4.26 (experimental)).

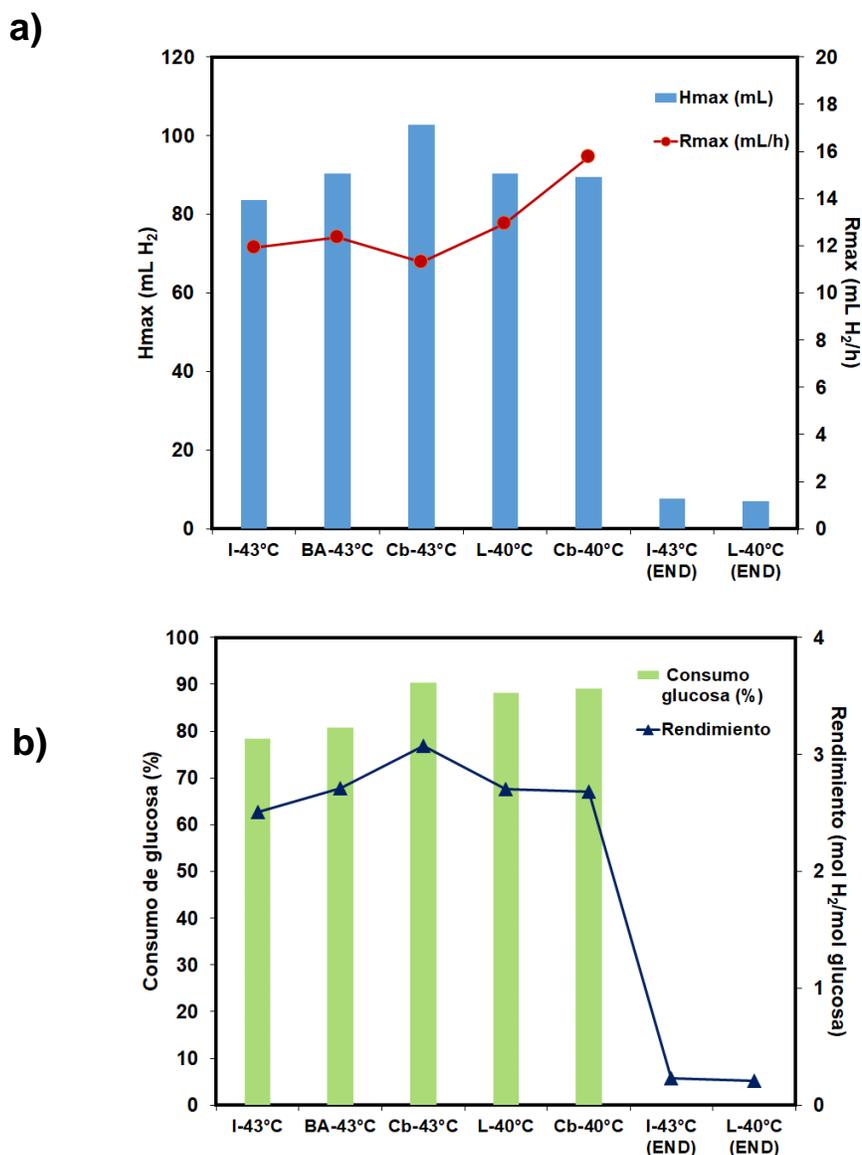


**Fig. 15.** Cinéticas de la producción de hidrógeno a las condiciones obtenidas de la optimización dual con riboflavina libre e inmovilizada (I: riboflavina inmovilizada en BA, L: riboflavina disuelta, BA: bagazo de agave, Cb: Control sin riboflavina, END: endógeno). Los símbolos representan los datos experimentales, mientras que las líneas continuas son los datos predichos con el modelo de Gompertz modificado ( $R^2=0.999$ ).

### 8.1.3.1. Efecto de la temperatura en la fermentación oscura por *Clostridium beijerinckii*

Como se mencionó anteriormente, la temperatura resultó ser el factor significativo en la producción de hidrógeno empleando riboflavina de manera disuelta como inmovilizada en bagazo de agave. Sin embargo, este efecto no solo se observó con los tratamientos que contenían mediador redox, sino también en los controles experimentales que estaban ausentes de riboflavina (Fig. 16a), incluso la máxima producción de hidrógeno (104 mL) se logró a 43 °C en ausencia de mediador redox (Cb-43 °C). No se encontró ningún estudio reportado en la literatura que evaluara el efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno usando *Clostridium beijerinckii*; no obstante, existen otras bacterias del género *Clostridium* que han presentado un efecto positivo en la producción de hidrógeno al aumentar la temperatura por encima de los 37 °C. Por ejemplo, Evvyernie *et al.*<sup>225</sup> encontraron que *Clostridium paraputrificum* M-21 tenía un mejor desempeño al incrementar la temperatura, alcanzó un rendimiento de 1.9 mol H<sub>2</sub>/mol glucosamida a 45 °C. Por otro lado, Chin *et al.*<sup>226</sup> reportaron que por encima de 37 °C, *Clostridium acetobutylicum* lograba un rendimiento de 2 mol H<sub>2</sub>/mol hexosa, empleando glucosa (2.5 g/L) como sustrato. Lee *et al.*<sup>227</sup> evaluaron el efecto de la temperatura (30-

45°C) en la producción de hidrógeno empleando un biorreactor de lecho granular, usaron un lodo anaerobio como inóculo y lo alimentaron con sucrosa, el máximo rendimiento (3.88 mol H<sub>2</sub>/mol sucrosa) lo alcanzaron a una temperatura de 40 °C y fue también donde obtuvieron la máxima utilización de sustrato (95%). El mismo comportamiento fue observado en el presente estudio, la máxima producción de hidrógeno se relacionó con los tratamientos que tuvieron mayor utilización de sustrato (90.42%) a 43 °C (Cb-43 °C); el consumo de glucosa en promedio de los demás tratamientos fue de 85%, mismos que no alcanzaron un mayor aprovechamiento del sustrato debido a la acidificación del medio (pH 4.5) provocando la inhibición metabólica del microorganismo fermentador. Así mismo, es posible también que no se alcanzó mayor utilización de sustrato debido a la aceleración del metabolismo de *Clostridium beijerinckii* por las altas temperaturas de las fermentaciones (Fig. 16b). En la figura 16b, se pueden observar los rendimientos de la producción de hidrógeno alcanzado por los diferentes tratamientos, donde todos presentaron un desempeño similar en conversión de sustrato a hidrógeno, ya que los resultados tuvieron un valor entre 2.5 y 3.05 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa.



**Fig. 16.** a) Máxima producción de hidrógeno ( $H_{max}$ ) y tasa de producción de hidrógeno ( $R_{max}$ ), b) consumo de glucosa y rendimiento de la optimización de la producción de  $H_2$  empleando riboflavina disuelta e inmovilizada.

### 8.1.3.2. Efecto de la riboflavina en la fermentación oscura por *Clostridium beijerinckii*

El análisis estadístico mostró que la presencia de la riboflavina no tenía un efecto significativo en las respuestas evaluadas; específicamente se esperaba un aumento en  $R_{max}$ , ya que la función de la riboflavina como mediador redox es acelerar el proceso de transferencia de electrones durante la ruta metabólica para así favorecer la tasa de producción de hidrógeno. En la Figura 16a, se observa la  $R_{max}$  obtenida para los

tratamientos con la riboflavina inmovilizada en BA (I-43 °C), y con la riboflavina disuelta (L-40 °C) con respecto al efecto del mediador redox inmovilizado, se puede observar que no existe una diferencia significativa entre los valores reportados en los tratamientos I-43 °C, BA-43 °C y Cb-43 °C, obteniendo 11.91, 12.34 y 11.32 mL H<sub>2</sub>/h, respectivamente. En el caso del escenario con la riboflavina disuelta, la *R*<sub>max</sub> fue mayor en ausencia del mediador redox (Cb-40 °C: 15.78 mL H<sub>2</sub>/mL). Una posible razón de no haber observado un efecto significativo en los tratamientos que presentaban riboflavina fue que no se alcanzó una concentración óptima de mediador redox en el medio, ya que en el caso de la riboflavina, Martínez-Cobos<sup>131</sup> durante su estudio evaluó 500 μM de riboflavina en el medio observando un aumento de 10 veces la producción de hidrógeno, mientras que en este estudio el valor más alto fue de 300 μM. Adicionalmente, se observó que el estado de oxidación en que se encontraba la riboflavina era diferente al empleado en el presente estudio, ya que el mediador redox se evaluó en un estado reducido.

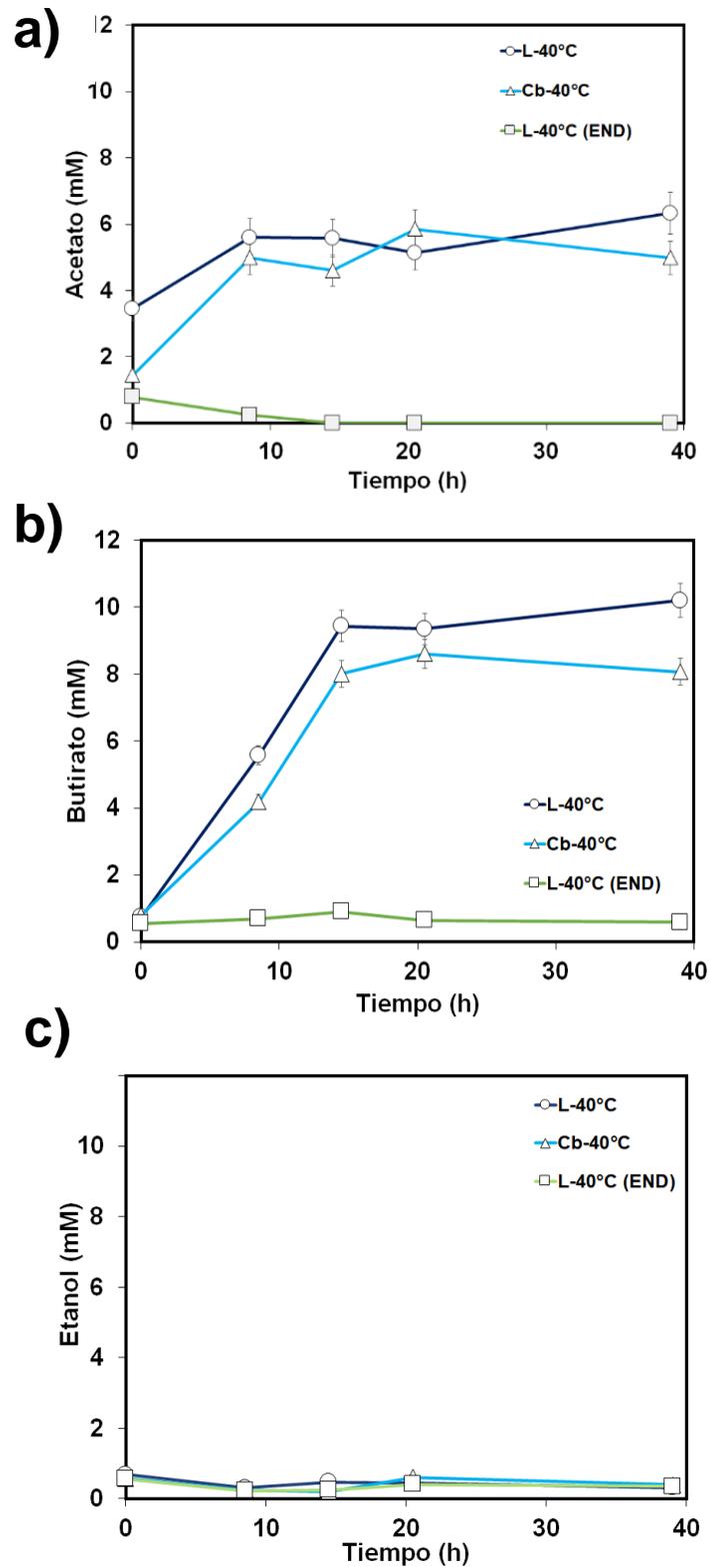
Diversos autores han estudiado el efecto que tiene el estado de oxidación del mediador redox en la fermentación oscura, ya que este repercute en la dirección de la ruta metabólica de los microorganismos presentes. Hatch y Finneran<sup>126</sup> realizaron un estudio para evaluar la influencia de varios mediadores redox en la producción de hidrógeno con *Clostridium beijerinckii*. Estos autores observaron un aumento significativo en la producción de hidrógeno al emplear AH<sub>2</sub>QDS y sustancias húmicas; concluyeron que estos mediadores fungieron como intercambiadoras de electrones al canalizar los electrones seguramente a la ruta de las hidrogenasas por ser una reacción simple de oxidación con 2 e<sup>-</sup> y tiene una cercana analogía a la oxidación del AH<sub>2</sub>QDS. Otro mecanismo posible que mencionan es que los electrones sean transferidos directamente a la ferredoxina; además, observaron el uso de mediadores redox oxidados no promovía la producción de hidrógeno, y que *Clostridium beijerinckii* no era capaz de reducir los mediadores redox. Ye *et al.*<sup>136,206,228</sup> realizaron varios estudios con *Clostridium beijerinckii* donde evaluaron el efecto de AH<sub>2</sub>QDS en la producción de hidrógeno y el aprovechamiento del sustrato, principalmente xilosa. En todos los casos de estudio, el empleo de AH<sub>2</sub>QDS mejoró el rendimiento de producción de hidrógeno alcanzando una mejora de hasta 37%, así como un incremento en la utilización de sustratos como xilosa logrando en algunos casos de estudio su completa utilización, efectos que no observaron al emplear el mediador redox oxidado (AQDS). Es posible que *Clostridium beijerinckii* no pueda reducir los mediadores redox debido a que éstos interfieren en el metabolismo central de la célula, en procesos metabólicos como transporte de electrones o síntesis

de ATP<sup>126</sup>. Sin embargo, es necesario mayores estudios para identificar dichos mecanismos. Existen reportes que indican que algunas bacterias fermentativas pueden reducir quinonas como AQDS<sup>229</sup>, pero esta reducción no es específica y la célula no gana energía de esta reacción.

### **8.1.3.3. Producción de subproductos líquidos en la fermentación oscura por *Clostridium beijerinckii***

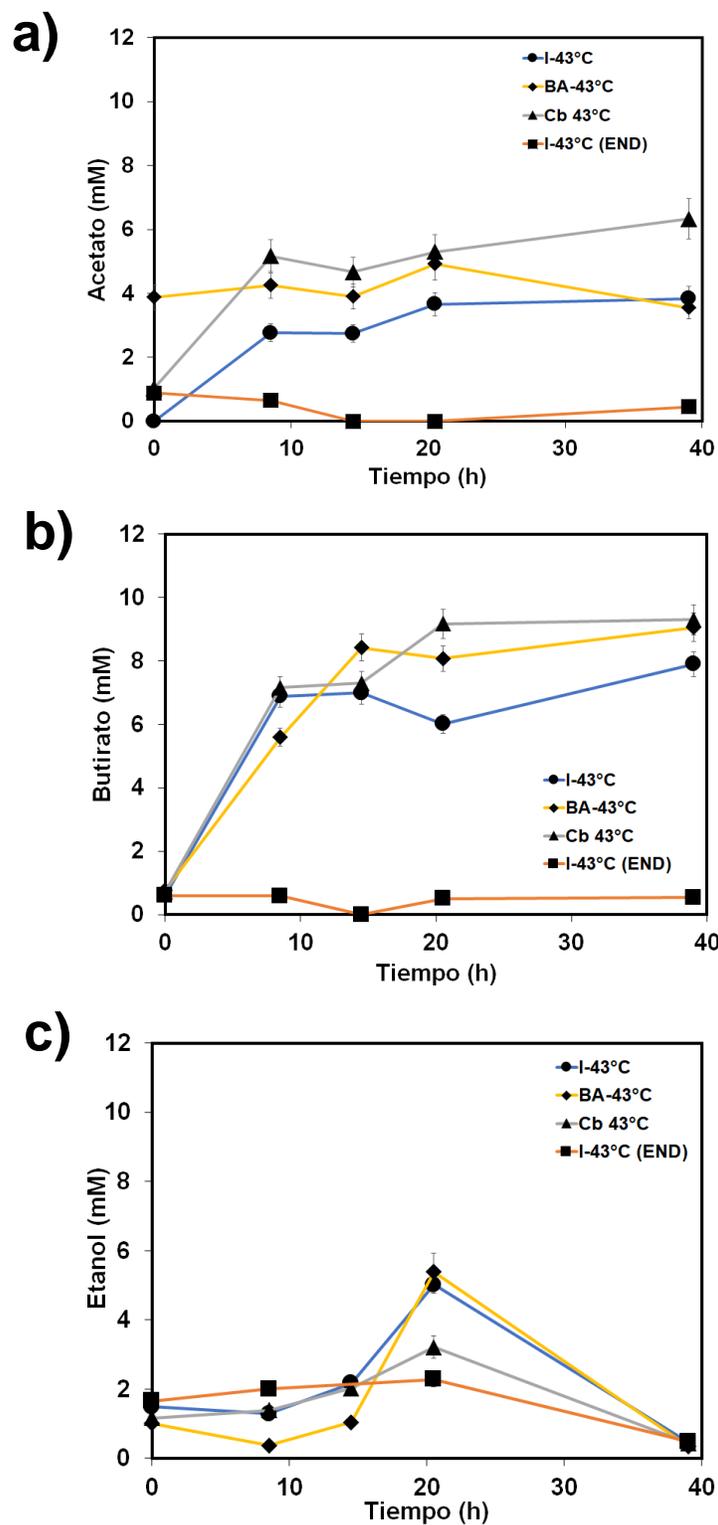
La producción de subproductos como ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes permite elucidar de cierta manera la dirección del metabolismo de los microorganismos presentes en la fermentación oscura; por este motivo se evaluaron los subproductos de fermentación. En la Fig. 17 se observan los perfiles de acetato, butirato y etanol para los tratamientos donde se empleó la riboflavina libre y sus controles; mientras que en la Fig. 17 se ilustran los perfiles de los mismos subproductos para los tratamientos con riboflavina inmovilizada en BA. De manera general, fue posible observar para ambos escenarios que el acetato y butirato fueron los principales subproductos de la fermentación, los cuales son los principales metabolitos reportados para *Clostridium beijerinckii* empleando glucosa como sustrato en la producción de hidrógeno<sup>28,81</sup>.

Básicamente, acetato y butirato fueron los únicos subproductos encontrados en los tratamientos evaluados cuando la riboflavina estaba disuelta; se observó un ligero aumento en la concentración de butirato con el uso de riboflavina (L-40 °C: 11 mM) en comparación con el tratamiento con la ausencia de ésta (Cb-40 °C: 9 mM), mientras que la concentración de acetato fue similar en ambos experimentos (5-6 mM). La concentración de ácido butírico y acético tiende a aumentar en presencia de mediadores redox, ya que el sistema NAD<sup>+</sup>/NADH está directamente relacionado a la ruta metabólica del butirato en la fermentación e indirectamente unida a la ruta metabólica del acetato<sup>126</sup>.



**Fig. 17.** Perfiles de producción de acetato (a), butirato (b) y etanol (c) de los experimentos de fermentación a las condiciones obtenidas de la optimización con riboflavina disuelta.

Con respecto a los experimentos realizados donde la riboflavina estaba inmovilizada en BA (I-43 °C), se logró identificar acetato, butirato y etanol como subproductos de la fermentación (Fig. 18). La presencia de etanol como subproducto de la fermentación resultó un hallazgo interesante en los experimentos realizados; ya que los tratamientos I-43 °C y BA-43 °C alcanzaron una concentración máxima de 5.02 y 5.33 mM, respectivamente a las 20 horas de fermentación; es posible que la presencia de bagazo de agave en el proceso haya influido en el metabolismo de *Clostridium beijerinckii* y que éste utilizó parte del material lignocelulósico como sustrato, generando etanol como subproducto de fermentación. Adicionalmente, la presencia del mediador redox en un estado oxidado dirige el metabolismo de *Clostridium beijerinckii* hacia la solventogénesis, ya que los electrones presentes en el NADH son consumidos en la ruta metabólica hacia la producción de solventes, en este caso el etanol<sup>126,136</sup>. Como consecuencia de ello, la producción de hidrógeno fue menor en comparación a los experimentos que no contenían bagazo de agave en su contenido. Por otro lado, en la Fig. 18, se observó una disminución en la concentración de etanol después de las 20 h de la fermentación, este suceso podría deberse a la utilización del etanol como sustrato intermediario en otras rutas metabólicas; se ha reportado que el etanol y algunos ácidos de cadena corta pueden ser empleados en cultivos puros anaerobios, por especies como *Clostridium* hacia la producción de ácidos de cadena larga como el ácido caproico por medio de la vía de elongación de cadena de ácidos carboxílicos a través de la ruta metabólica inversa de la  $\beta$ -oxidación<sup>230</sup>; sin embargo, en esta investigación no se llevó a cabo la identificación de subproductos como ácidos de cadena larga.

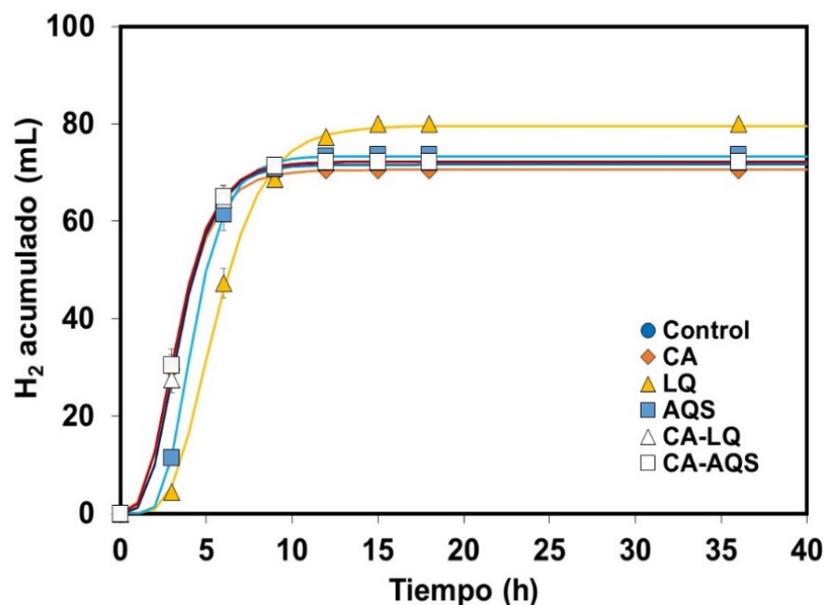


**Fig. 18.** Perfiles de producción de acetato (a), butirato (b) y etanol (c) de los experimentos de fermentación a las condiciones obtenidas de la optimización con riboflavina inmovilizada.

#### **8.1.4. Efecto de LQ y AQS en la producción de hidrógeno por el lodo anaerobio granular**

La fermentación de glucosa adicionando LQ y AQS como mediadores redox empleando un lodo anaerobio aclimatado fue evaluada. LQ y AQS fueron estudiados en forma disuelta e inmovilizados en carbón activado para la producción de hidrógeno. Adicionalmente, se realizaron experimentos control (lodo anaerobio aclimatado sin mediador redox y carbón activado crudo) con el objetivo de evaluar la producción de hidrógeno durante la fermentación oscura. En la Fig. 19 se muestran los resultados relacionados a la producción de hidrógeno bajo todas las condiciones experimentales evaluadas. La fase lag fue demasiado corta en todos los tratamientos ( $\lambda \leq 3$  h) comparado con otros estudios a condiciones similares<sup>231</sup>. Este resultado podría ser atribuido a la aclimatación previa del inóculo en el reactor UASB, ya que este fue alimentado con concentraciones traza de LQ y AQS con el medio basal, por lo que las bacterias fermentativas pudieron haber consumido el sustrato y además haber reducido los mediadores redox. Los experimentos fermentativos fueron desarrollados a un pH inicial de 6.6, y después de 36 h, el pH disminuyó a 5.3 provocando la inhibición de los microorganismos en el proceso de fermentación. El pH del medio es un parámetro influyente para la producción de hidrógeno debido a que éste afecta directamente el funcionamiento de diferentes enzimas celulares, causando daño en el metabolismo bacteriano<sup>19,27</sup>.

Los resultados obtenidos de la producción de hidrógeno acumulado fueron usados para estimar los parámetros cinéticos de interés aplicando el modelo de Gompertz modificado ( $H_{max}$  y  $R_{max}$ ) (Tabla 6). La producción de hidrógeno más alta fue obtenida usando LQ en forma disuelta, alcanzando una producción de hidrógeno acumulado de 79.61 mL (3.26 mmol). Este valor es 10% más que el control experimental sin mediador redox (solo lodo anaerobio) y 11.4% mayor que el control experimental con carbón activado y lodo anaerobio.



**Fig. 19.** Producción de hidrógeno acumulado empleando mediadores redox disueltos (LQ y AQS), inmovilizados en CA (CA-LQ y CA-AQS), y controles experimentales (Control: sin mediador redox; CA: carbón activado crudo) durante la fermentación oscura a 37 °C. Los símbolos representan resultados experimentales y las líneas continuas representan la predicción con el modelo de Gompertz. El intervalo de confianza de todos los experimentos fue menor que 3.5 mL.

Los experimentos con LQ y AQS inmovilizado en CA (CA-LQ y CA-AQS) alcanzaron la misma producción de hidrógeno 72.2 mL (2.95 mmol). Indudablemente, no existió efecto en la acumulación final de hidrógeno empleando CA-LQ y CA-AQS; sin embargo, la influencia en la producción de subproductos líquidos fue significativa, estas relaciones serán discutidas en la siguiente sección. Con relación a la tasa de producción de hidrógeno ( $R_{max}$ ), AQS en forma disuelta fue el tratamiento más veloz logrando 20.93 mL/h (0.856 mmol/h), siendo 11.5% y 15.6% mayor que los controles experimentales sin mediador redox y con CA crudo, respectivamente. Por lo contrario, LQ en forma disuelta fue el tratamiento más lento con la tasa de producción más baja, alcanzando solamente 15.34 mL/h (0.627 mmol/h). Finalmente, lawsona y AQS inmovilizados en CA (CA-LQ y CA-AQS) reportaron tasas de producción de hidrógeno similar como el control experimental con el lodo anaerobio (Tabla 6).

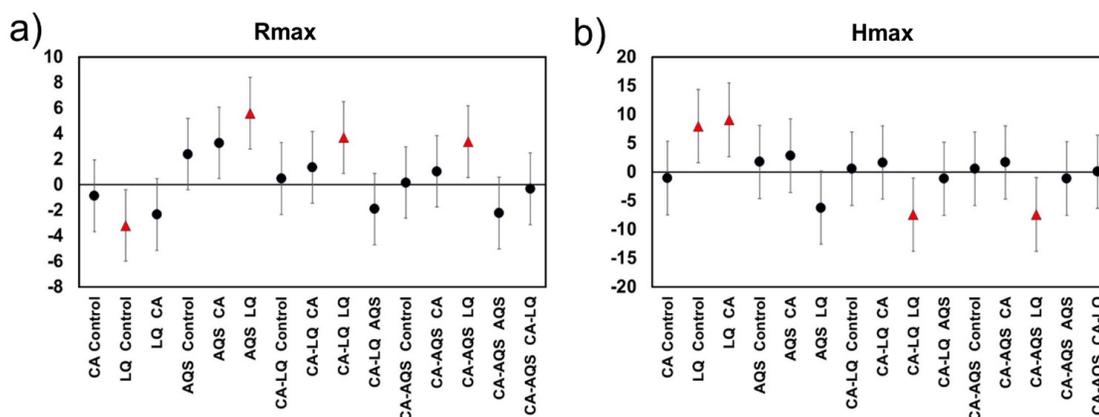
**Tabla 6.** Parámetros cinéticos estimados a partir del modelo de Gompertz modificado de los resultados experimentales, consumo de sustrato, y rendimiento de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	<i>Hmax</i> (mL)	<i>Rmax</i> (mL/h)	$\lambda$ (h)	R <sup>2</sup>	Consumo de sustrato (%)	Rendimiento (mol H <sub>2</sub> /mol glucosa)
Control	71.65±1.71	18.54±0.74	1.36±0.17	1.0000	99.14±0.03	1.96±0.05
CA	70.56±3.48	17.67±1.03	1.32±0.16	1.0000	98.9±0.96	1.93±0.10
LQ	79.61±1.71	15.34±1.12	2.95±0.06	0.9994	98.13±0.70	2.20±0.05
AQS	73.37±4.37	20.93±1.72	2.50±0.12	0.9999	99.50±0.26	2.01±0.13
CA-LQ	72.18±2.12	19.03±1.35	1.55±0.17	1.0000	97.71±0.31	1.98±0.06
CA-AQS	72.20±0.38	18.71±0.59	1.38±0.18	1.0000	97.65±0.05	1.98±0.01

Todos los resultados están dados como el promedio ± los intervalos de confianza.

De acuerdo con el ANOVA de un factor, *Rmax* y *Hmax* fueron estadísticamente significativas a un nivel  $p=0.05$  para la producción de hidrógeno en los experimentos cinéticos realizados. Además, se realizó un análisis estadístico con la prueba de Tukey para comparaciones múltiples de los tratamientos en pares, para encontrar las medias que son significativamente diferentes entre ellas. En la Fig. 18 se muestran las comparaciones múltiples para la tasa de producción de hidrógeno (*Rmax*). Se puede observar que todas las comparaciones con LQ (excepto LQ y CA) fueron estadísticamente significantes, demostrando que LQ tuvo la tasa de producción más baja, y la media comparativa incrementó la diferencia entre los tratamientos. No obstante, el contraste entre el experimento con AQS y el control con CA mostraron una diferencia significativa, este resultado confirmó que AQS incrementó la tasa de producción de hidrógeno.

En la Fig. 20 se muestran las diferencias en las medias de las comparaciones múltiples para el parámetro de producción máxima de hidrógeno (*Hmax*) de los experimentos fermentativos. Todos los pares contrastados presentaron una diferencia significativa cuando fueron comparados con el tratamiento de LQ, incluso con los dos controles experimentales y con los tratamientos con los mediadores redox inmovilizados; por lo que, es posible demostrar una posible influencia en el volumen máximo de hidrógeno producido usando LQ en forma disuelta.



**Fig. 20.** Gráfico simultáneo de Tukey con intervalo de confianza del 95% de las diferencias de medias para  $R_{max}$  (a) y  $H_{max}$  (b) de la cinética de producción de hidrógeno. Si un intervalo de confianza no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

El consumo de sustrato fue mayor que 97.5% al final de la fermentación en todos los tratamientos evaluados. La adición de mediadores redox, en forma disuelta, incrementaron el rendimiento molar de hidrógeno: 2.2 mol de  $H_2$ /mol de glucosa para LQ, y 2.01 mol de  $H_2$ /mol de glucosa para AQS. Estos rendimientos fueron 11% y 2.5% mayores que el control experimental sin mediador redox. Anteriormente se demostró que la adición de  $AH_2QDS$ , al ser empleado como mediador redox, incrementa el rendimiento molar de hidrógeno al menos 4% usando glucosa como sustrato en un monocultivo de *Clostridium beijerinckii*<sup>136</sup>. La adición de mediadores redox inmovilizados (CA-LQ y CA-AQS) solo logró un ligero incremento en el rendimiento molar de hidrógeno, cerca del 2.7% mayor que el control experimental de CA crudo, y 1% que el control experimental sin mediador redox. Estos resultados no pueden ser comparados con otros estudios en la literatura debido a que es el primer reporte empleando mediadores redox inmovilizados en CA para la producción de hidrógeno en la fermentación oscura.

Existen algunos reportes acerca de la influencia de los mediadores redox o “electron shuttles” en el proceso de fermentación oscura (Tabla 7); además, muchos de estos estudios se realizaron con monocultivos, específicamente con *Clostridium beijerinckii*, y reportaron la adición del mediador redox en un estado reducido, principalmente, para mejorar la transferencia de electrones a especies redox naturales que coexisten en el metabolismo bacteriano<sup>126,206,228,232</sup>. Recientemente, Popovic y Finneran<sup>233</sup> estudiaron el efecto de adicionar AQDS y riboflavina con  $Fe^{3+}$  como mediadores redox en un proceso fermentativo con diferentes fuentes como inóculo; ellos observaron que las comunidades pertenecientes a *Clostridiales* predominaron en el consorcio, y sugirieron que las

especies de  $\text{Fe}^{3+}$  y los mediadores redox contribuían a la proliferación de géneros fermentativos cuando los carbohidratos están disponibles y esto dependería en la proporción de las bacterias *Clostridiales* para obtener un incremento en la producción de hidrógeno y solventes. También, Del Ángel-Acosta *et al.*<sup>231</sup> estudiaron la influencia de AQS y  $\text{AH}_2\text{QDS}$  en forma soluble durante un proceso de fermentación oscura usando un lodo anaerobio tratado térmicamente para la producción de hidrógeno, ellos reportaron una máxima producción de hidrógeno de 1.9 mmol usando  $\text{AH}_2\text{QDS}$ ; además, identificaron microorganismos exoelectrogénicos en el inóculo que podrían contribuir con la transferencia de electrones entre especies.

**Tabla 7.** Influencia de los mediadores redox en la fermentación oscura durante la producción de hidrógeno.

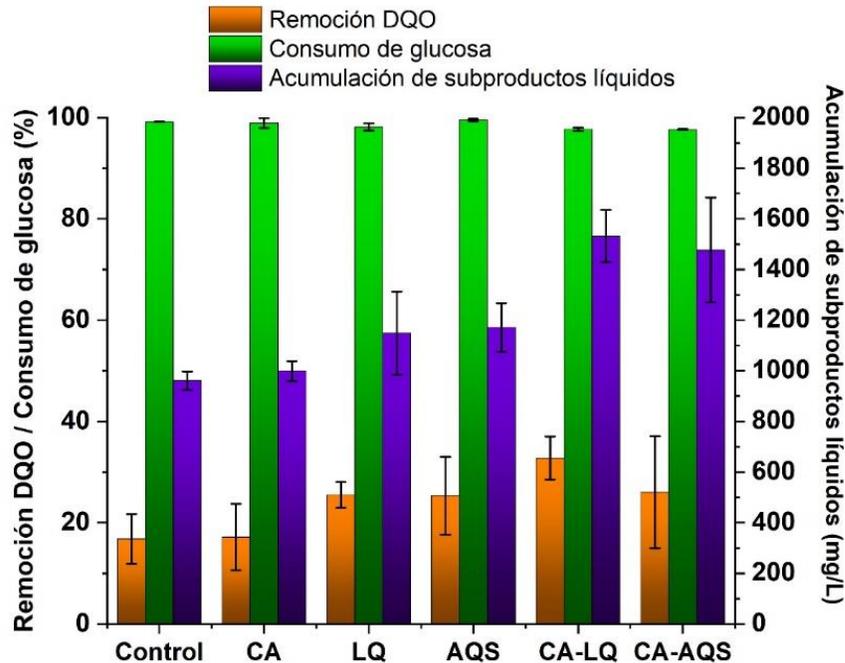
Mediador redox	Inóculo	Sustrato	<i>Hmax</i>	<i>Rmax</i>	Rendimiento	Referencia
$\text{AH}_2\text{QDS}$ , 500 $\mu\text{M}$	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Glucosa	30 $\mu\text{mol}$	-	-	126
$\text{AH}_2\text{QDS}$ , 500 $\mu\text{M}$	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Xilosa	200 $\mu\text{mol}$	26.25 $\mu\text{mol/h}$	1.98 $\text{molH}_2/\text{mol}_{\text{xilosa}}$	228
$\text{AH}_2\text{QDS}$ , 500 $\mu\text{M}$	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Glucosa	430 $\mu\text{mol}$	6.2 $\text{mmol/h}$	1.6 $\text{molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosa}}$	136
AQDS, 500 $\mu\text{M}$	Líquido de tanque séptico	Xilosa	70 mM	-	-	234
Riboflavina, 500 $\mu\text{M}$			60 mM			
$\text{Fe}^{3+}$						
AQS, 500 $\mu\text{M}$	Lodo anaerobio granular	Glucosa	1.68 $\text{mmol}$	324.84 $\mu\text{mol/h}$	2 $\text{molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosa}}$	231
$\text{AH}_2\text{QDS}$ , 500 $\mu\text{M}$	tratado térmicamente		1.78 $\text{mmol}$	1405.51 $\mu\text{mol/h}$		

Lawsona, 500 $\mu\text{M}$	Lodo anaerobio granular	Glucosa	3256.4 $\mu\text{mol}$	627.6 $\mu\text{mol/h}$	2.2 $\text{molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosa}}$	<b>Este estudio</b>
AQS, 500 $\mu\text{M}$	tratado térmicamente		3001.2 $\mu\text{mol}$	856.3 $\mu\text{mol/h}$	2.01 $\text{molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosa}}$	

### 8.1.5. Efecto de LQ y AQS en la producción de subproductos líquidos por el lodo anaerobio granular

Una variedad de subproductos líquidos pueden ser generados a partir de la fermentación anaeróbica de carbohidratos a través de rutas metabólicas de microorganismos anaerobios. La fermentación de glucosa usando cultivos mixtos conduce a la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y solventes, este hecho ha sido estudiado para la conversión de residuos a productos de valor agregado. Por otra parte, los mediadores redox han sido usados para mejorar el transporte de electrones en el mecanismo dirigiendo a cambios en el flujo de energía hacia diferentes rutas solventogénicas <sup>234</sup>.

El consumo de glucosa fue casi total en todos los experimentos de fermentación y también fue notable el diferente desempeño en la acumulación de subproductos líquidos en los tratamientos evaluados (Fig. 21) La concentración total de subproductos líquidos fue directamente relacionada a la remoción de DQO en los experimentos fermentativos. Los mediadores redox, LQ y AQS en forma disuelta, incrementaron 17% y 18% la cantidad total de subproductos líquidos, respectivamente; mientras, los mediadores redox inmovilizados en carbón activado, CA-LQ y CA-AQS, lograron 37.25% y 34.92% mayor acumulación de subproductos que los controles experimentales sin mediadores redox, respectivamente. En comparación con el control experimental con CA crudo, la acumulación de subproductos líquidos con LQ y AQS incrementó 13.8% y 14.7%, respectivamente; y para CA-LQ y CA-AQS incrementó 34.8% y 32.4%, respectivamente. De acuerdo con el análisis estadístico con la prueba de Tukey que se realizó para la acumulación de subproductos, existe diferencia significativa en los tratamientos contrastados con los mediadores redox inmovilizados.

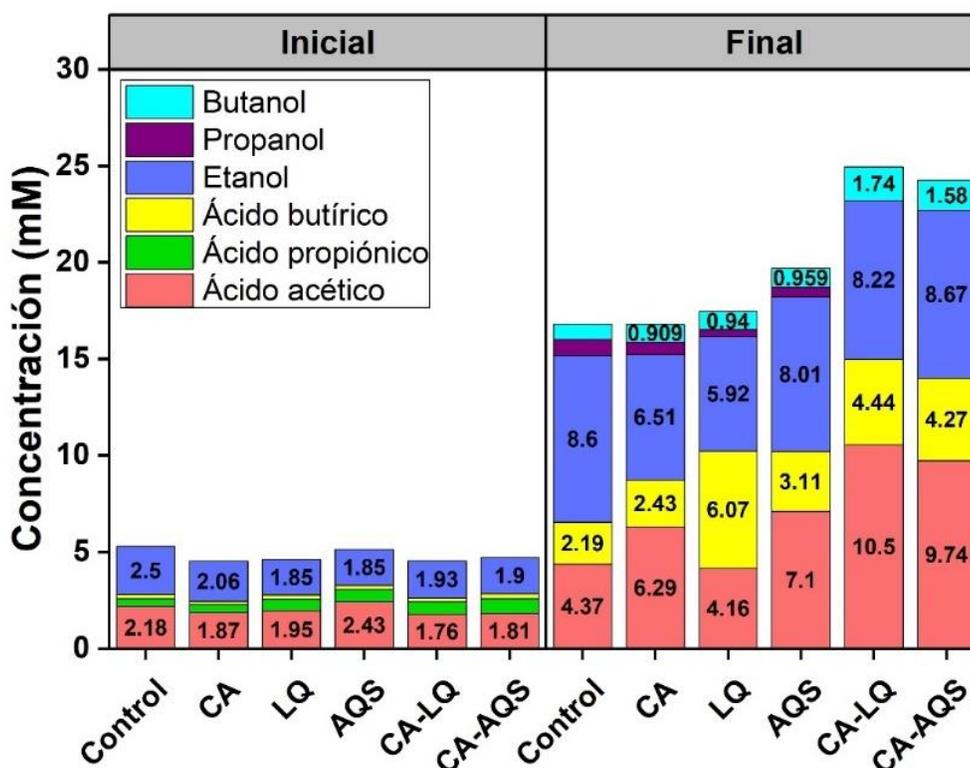


**Fig. 21.** Remoción de DQO, consumo de glucosa y acumulación de subproductos líquidos al final de la fermentación de glucosa empleando lodo anaerobio tratado.

Diversos subproductos pueden ser obtenidos durante la fermentación oscura, especialmente cuando un cultivo mixto es utilizado en el proceso, ya que la diversidad en la actividad catabólica incrementa la flexibilidad microbiana, buscando maximizar la producción de energía, cuando las comunidades microbianas afrontan cambios en el ambiente que limitan energéticamente el crecimiento microbiano<sup>235</sup>. La fermentación de glucosa, para la mayoría de las bacterias fermentadoras, produce principalmente subproductos líquidos como ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láctico y etanol, mientras que la fase gaseosa está compuesta por dióxido de carbono e hidrógeno.

Los mecanismos bioquímicos y bioenergéticos juegan un papel importante en los rendimientos de producción de cultivos mixtos durante la fermentación. Por lo tanto, la incorporación de acarreadores sintéticos de electrones como LQ y AQS al bioproceso podría expandir la diversidad de reacciones guiadas a la producción de subproductos, por ejemplo, hidrógeno, AGV, o solventes. En relación con la variedad de subproductos líquidos encontrados en los experimentos fermentativos (Fig. 22 y Tabla 8) al inicio y al final de las pruebas, los principales compuestos orgánicos obtenidos fueron acetato, butirato, etanol, y butanol; sin embargo, las proporciones y la concentración final en cada

tratamiento evaluado fue diferente. Para LQ en forma disuelta, el butirato fue el subproducto más abundante con una concentración de 6.07 mM, casi tres veces mayor que el control experimental sin mediador redox, y 2.5 veces más que el control experimental con CA crudo; también, subproductos como acetato (4.16 mM), etanol (5.92 mM), y butanol (0.94 mM) fueron determinadas. La fermentación oscura con AQS en forma disuelta, produjo 8.01 mM de etanol que fue el compuesto más abundante al final del bioproceso, similar al control experimental sin mediador redox (8.6 mM), pero 18.73% mayor que el control experimental con CA crudo, seguido por la formación de acetato (7.1 mM), butirato (3.11 mM), y butanol (0.96 mM).



**Fig. 22.** Perfil de subproductos líquidos obtenidos de la fermentación de glucosa empleando lodo anaerobio tratado.

En relación con el uso de mediadores redox inmovilizados en carbón activado es preciso mencionar que se obtuvo la mayor acumulación de subproductos líquidos (Fig. 21 y Tabla 8). El caso de lawsona inmovilizada en carbón activado (CA-LQ) logró una concentración de acetato de 10.5 mM y fue el compuesto más abundante evaluado, 58.4% y 40% mayor que los controles experimentales sin mediador redox y con CA

crudo, respectivamente; también se obtuvo 8.22 mM de etanol, 4.44 mM de butirato y 1.74 mM de butanol. Resultados similares se encontraron al emplear AQS inmovilizada en carbón activado (CA-AQS), el subproducto principal fue acetato con 9.74 mM, 55% y 35.7% mayor a los controles experimentales sin acarreadores de electrones y con CA crudo, respectivamente; también se produjeron 8.67 mM de etanol, 4.27 mM de butirato y 1.58 mM de butanol.

En general, la fermentación no es el metabolismo preferido por las bacterias para su crecimiento debido a que solo se generan pocas cantidades de ATP. Cuando un mol de glucosa es fermentado, por lo menos 2 moles de ATP son sintetizados, éstos no son dirigidos a rutas de biosíntesis debido al mantenimiento de fuerza protón-motriz que ocupa -120 mV en la hidrólisis del ATP. Este hecho sugiere que los microorganismos implicados atraviesan rutas alternativas para la generación y mantenimiento de la fuerza protón-motriz en el proceso de fermentación<sup>236</sup>. En la fermentación, algunas rutas metabólicas conducen a la obtención de ATP, estas rutas generan acetato y butirato como productos finales. La presencia de acarreadores de electrones (como mediadores redox) en procesos de fermentación ha sido reportado como causante de cambios en la dirección metabólica conduciendo a la mejora de la producción de hidrógeno o, adicionalmente, a la mejora de la formación de ácidos orgánicos y solventes; sin embargo, esto dependerá también del tipo de microorganismo y las condiciones operacionales. Popovic y Finneran<sup>233</sup> reportaron la adición de riboflavina y AQDS con Fe<sup>3+</sup> simultáneamente, en una cultivo mixto de diferentes fuentes; ellos observaron que las especies acarreadoras de electrones incrementaban el consumo de xilosa y la producción de solventes; específicamente, la riboflavina con Fe<sup>3+</sup> favorecieron la producción de butirato sobre el butanol, acetato e hidrógeno; adicional a esto, observaron que al emplear AQDS con Fe<sup>3+</sup> incrementaba la generación de butanol. Especies como *Clostridium beijerinckii* presentan fluctuación en la transferencia de electrones desde la ruta de síntesis del butirato al butanol, así como a nivel intracelular donde el ATP es usado en el transporte activo de la xilosa<sup>233,234</sup>. Otro estudio fue desarrollado por Huang *et al.*<sup>237</sup>, que adicionaron lawsona y riboflavina en un proceso de fermentación oscura con lodo activado como sustrato empleando lodo anaerobio como inóculo; 43.9% y 42.5% fue el incremento en la producción de AGVs usando lawsona y riboflavina, respectivamente. También observaron que la función del mediador redox fue transferir electrones durante las reacciones de hidrólisis, acidificación, y acetogénesis; esto podría ser atribuido al bajo potencial redox generado que aumentó la acumulación

de AGVs. Además, los microorganismos en la fermentación están cercanamente relacionados a la producción de AGVs, por ejemplo *Proteobacteria* y *Firmicutes* que son las bacterias más comunes que desempeñan la fermentación oscura; en el filum *Firmicutes* se encuentran especies *Clostridium* que han sido encontradas en diferentes cultivos mixtos fermentativos en una diversidad de fuentes de inóculo<sup>233,238,239</sup>.

**Tabla 8.** Efecto de los diferentes tratamientos en la selectividad de los subproductos y la concentración final de los subproductos de las fermentaciones empleando lodo anaerobio pretratado en reactores en lote.

Parámetros	Lodo anaerobio (control)	Carbón activado crudo (CA)	Mediadores redox disueltos		Mediadores redox inmovilizados	
			LQ	AQS	CA-LQ	CA-AQS
<b>Concentración final (mg/L)*</b>						
Ácido butírico	192.70±12.37	214.52±15.94	535.18±83.4	273.83±58	391.62±73	376.21±63.9
Ácido acético	307.16±49.21	342.19±16.17	313.11±46.3	417.78±24	630.91±38	601.57±88.5
Etanol	331.55±18.97	313.98±9.06	327.21±40.8	314.44±28	392.42±12	345.13±54.7
Butanol	67.37±0.06	80.42±0.14	71.06±0.16	99.23±0.28	117.03±0.0	113.69±0.31
<b>Selectividad (g/g)**</b>						
Ácido butírico	0.21	0.23	0.43	0.25	0.26	0.26
Ácido acético	0.34	0.36	0.25	0.38	0.41	0.42
Etanol	0.37	0.33	0.26	0.28	0.26	0.24
Butanol	0.07	0.08	0.06	0.09	0.08	0.08
<b>Productividad (g/L·h)</b>						
Ácido butírico	0.005	0.006	0.015	0.008	0.011	0.010
Ácido acético	0.009	0.010	0.009	0.012	0.018	0.017
Etanol	0.009	0.009	0.009	0.009	0.011	0.010
Butanol	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003

\*Concentraciones finales están expresadas como el promedio ± el intervalo de confianza.

\*\*Con relación al peso de cada subproducto generado al total de subproductos acumulado.

La importancia de inmovilizar los mediadores redox en CA radica en disminuir el costo de adicionar un elemento extra al proceso de fermentación mediante la reutilización del material, también la separación al final del proceso sería fácil y, adicionalmente, el CA ha sido reportado por ser un material biocompatible en los bioprocesos. Sin embargo, no existe estudio disponible acerca de la implementación de mediadores redox inmovilizados en carbón activado para la mejora de la producción de hidrógeno en un proceso de fermentación oscura. No obstante, es fácil encontrar estudios que empleen

el carbón activado como soporte en la formación de biopelículas, o como acarreador de electrones entre especies microbianas debido a sus propiedades como el tipo de grupos funcionales y estructuras redox activas, aunque su principal aplicación ha sido en la degradación y biotransformación de contaminantes en efluentes, y electrodos en las celdas de combustible microbianas (MFC, por sus siglas en inglés) <sup>240</sup>.

En acuerdo con el presente estudio, reportes previos han demostrado que el carbón activado incrementa la producción de AGVs en el proceso de fermentación oscura. Lu *et al.*<sup>241</sup> evaluaron biocarbones de diferentes precursores, reportaron un enriquecimiento en la concentración de acetato del 109.6% y 71.8% al emplear biocarbón a partir de coco y cáscara de longan, respectivamente; atribuyeron el incremento del acetato por encima del butirato a la presencia de grupos funcionales y alta cristalinidad en los materiales. También concluyeron que el biocarbón puede mejorar el crecimiento sintrófico de las bacterias fermentadoras y homoacetogénicas en la superficie del carbón mediante el mecanismo de DIET (“direct interspecies electron transfer”, por sus siglas en inglés) y lo cual provocó un efecto en la producción de acetato.

#### **8.1.6. Efecto en la dirección metabólica por los mediadores redox en la fermentación oscura por el lodo anaerobio granular**

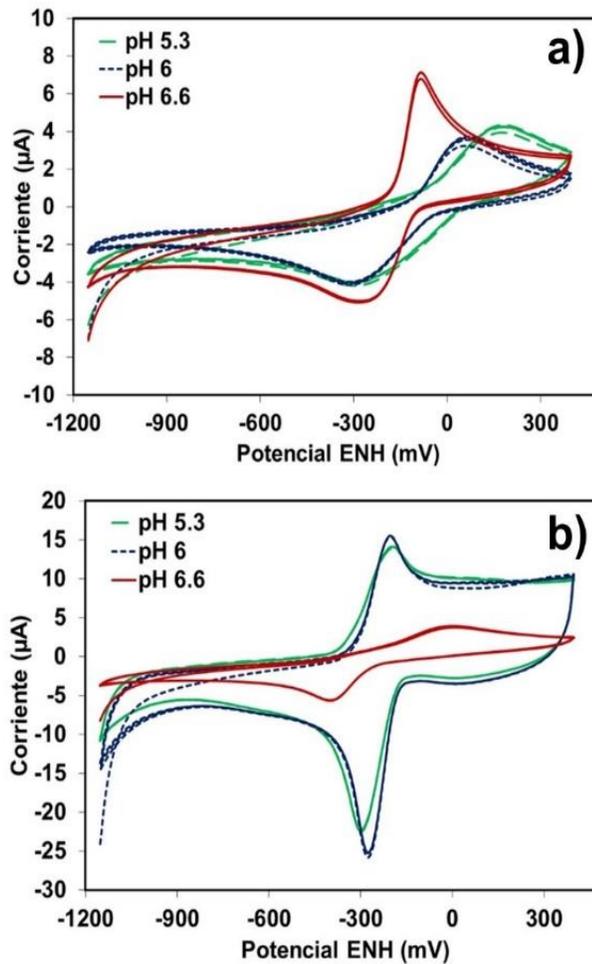
La ruta metabólica de la fermentación oscura ha sido estudiada por muchos años, y cada nuevo estudio interpreta los diferentes mecanismos que están implicados en todas las reacciones bioquímicas. En la actualidad, es posible conocer la función de cada enzima, coenzima, cofactor, etc., y esto puede ayudar a elucidar el papel de los mediadores redox en el metabolismo. Adicionalmente, las pruebas electroquímicas son una técnica útil para evaluar las posibles interacciones y flujo de electrones en una ruta metabólica. Los potenciales redox ayudan a conocer el comportamiento biocatalítico de las especies bioquímicas que son oxidadas y reducidas en un bioproceso. Durante el metabolismo de respiración bacteriana, los electrones son transferidos a través de la membrana plasmática, después los electrones son transportados por los mediadores redox a los sustratos para su reducción<sup>242</sup>.

Como en una tabla tradicional de potenciales redox de las reacciones químicas de reducción, una forma conveniente de visualizar la transferencia de electrones en sistemas biológicos es con una torre vertical como se muestra en la Fig. 23. En la torre se representa el rango del potencial de reducción de los pares redox, desde el más

negativo (nivel superior) al más positivo (nivel inferior), es importante mencionar que esta torre muestra los principales pares redox que están implicados en el metabolismo de fermentación oscura.

Los electrones son dirigidos a un aceptor de electrones con un potencial redox menor que el donador de electrones original. La diferencia en el potencial entre el pico de reducción y oxidación es determinado como  $\Delta E_0'$ ; por lo tanto,  $\Delta E_0'$  es proporcional a la energía libre de la reacción redox  $\Delta G_0'^{17}$ . En la Fig. 24, se muestra la evaluación electroquímica de LQ y AQS a 500  $\mu\text{M}$  usando medio basal como matriz electrolítica durante las pruebas de voltamperometría cíclica (VC). Los voltamperogramas fueron obtenidos bajo diferentes condiciones empleando soluciones de los mediadores redox a diferente pH (6.6, 6.0, y 5.3). Después, los potenciales redox de LQ y AQS fueron determinados con la ecuación de Nernst (Tabla 9); además, se usó la derivada de las pruebas de VC para la estimación del potencial formal de la estructura catalítica. Los mediadores redox estudiados en este trabajo presentan estructura quinónica; las quinonas, hidroquinonas, y catecoles son moléculas electrofílicas implicadas en las reacciones de transferencia de electrones en los sistemas biológicos importantes. Los pares quinona-hidroquinona son ejemplos de un sistema redox orgánico que puede participar en donar o aceptar electrones en las reacciones químicas<sup>243</sup>. Se ha demostrado que el pH es un factor importante en el comportamiento electroquímico del par quinona/hidroquinona ya que responde sencillamente a un modo Nernstiano; en una solución buffer, a pH ácido, la reducción es un proceso de dos electrones y dos protones de un solo paso; a pH alcalino, la reducción es solo de dos electrones sin necesidad de protones; y, a pH neutro, la reducción es de un protón y dos electrones o solo dos electrones. El  $E_0'$  de LQ a pH 6.6 fue -180 mV y este fue incrementando según el pH iba tornándose ácido, un potencial redox estándar similar de LQ fue reportado por Borghese *et al.*<sup>244</sup>; sin embargo, el  $E_0'$  de AQS a pH 6.6 fue -200.5 mV, contrariamente, ya que a pH 5.3 el  $E_0'$  fue -248 mV; un potencial redox estándar similar de AQS fue reportado por Dos Santos *et al.*<sup>245</sup>.





**Fig. 24.** Voltamperogramas de LQ (a) y AQS (b) a una velocidad de escaneo de 20 mV/s.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el uso de mediadores redox inducen a cambios en la máxima producción de hidrógeno, en particular, LQ incrementó la producción de hidrógeno total, AQS aumentó la tasa de producción de hidrógeno (Tabla 6) y, finalmente, el uso de mediadores redox inmovilizados (CA-LQ y CA-AQS) condujeron hacia un notorio incremento en la acumulación de AGVs (Fig. 22). Estos cambios podrían estar relacionados a las diferentes relaciones sinérgicas entre el acarreador de electrones adicionado, en una forma disuelta o inmovilizada, con los acarreadores de electrones naturales que coexisten en la fermentación. Para entender las posibles interacciones de los mediadores redox con los acarreadores de electrones naturales, las pruebas electroquímicas fueron útiles para proponer su rol en el metabolismo fermentativo. Adicionalmente, es importante mencionar que se empleó un cultivo mixto en este estudio y, por lo tanto, la contribución por la diversidad microbiana debería ser

considerada. Diferentes estudios han demostrado que el estado de oxidación del mediador redox es importante cuando es adicionado a la fermentación. Algunos estudios han probado que los mediadores redox (adicionados en estado reducido, por ejemplo: AH<sub>2</sub>QDS) donan electrones y mejoran la producción de hidrógeno, permitiendo la mejora en el consumo de sustratos complejos como xilosa debido a los electrones extra que son transferidos en las reacciones metabólicas<sup>228,232,246</sup>. Sin embargo, la reducción sintética de los mediadores redox implica un costo adicional al proceso que podría ser considerado al llevarse a una escala mayor; no obstante, el uso de cultivos mixtos representa una ventaja sobre otros cultivos, debido a la coexistencia de bacterias electrogénicas que son capaces de donar electrones al medio, esta habilidad ha sido explorada en diferentes aplicaciones como MFC y biotransformación de contaminantes<sup>215,247</sup>; algunas especies han sido reportadas que viven en diferentes ecosistemas, por ejemplo, ambientes naturales como sedimentos anaerobios de lagos, sedimentos anóxicos de pantanos marinos, suelos contaminados con hidrocarburos, lagos volcánicos, etc., y ambientes antropogénicos como desechos orgánicos, agua residual municipal e industrial, entre otros<sup>248</sup>.

**Tabla 9.** Potenciales redox de LQ y AQS a diferente pH y 500 µM.

Mediador redox	pH	E <sub>NHE</sub>	E <sub>NHE</sub>	E <sub>RHE</sub>	E <sub>RHE</sub>	E <sub>0'</sub> (mV)
		pico catódico (mV)	pico anódico (mV)	Oxidación (mV)	Reducción (mV)	
LQ	6.6	-84	-276	306.4	114.4	-180
	6.0	64	-315	418.9	39.9	-125.5
	5.3	183	-295	469.5	18.5	-56
AQS	6.6	-6	-395	306.4	-46	-200.5
	6.0	-204	-275	150.9	79.9	-239.5
	5.3	-196	-300	117.5	13.5	-248

Debido a la presencia de bacterias electrogénicas podría ser atribuida la reducción de los mediadores redox (LQ<sup>+</sup>/LQ<sup>-</sup>; AQS<sup>+</sup>/AQH<sub>2</sub>S), las especies reducidas podrían transferir electrones a los acarreadores de electrones naturales de la fermentación. El E<sub>0'</sub> de los mediadores redox estudiados no fue suficiente para contribuir en la reducción/oxidación de NAD<sup>+</sup>/NADH, Fd<sup>+</sup>/Fd<sup>-</sup>, o incluso en la reducción del protón (2H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>) de las enzimas hidrogenasas (Hyd) debido a que éstos no tuvieron la energía necesaria para llevar a

cabo estas reacciones redox. Sin embargo, existen otros importantes acarreadores de electrones que están relacionados en la producción de hidrógeno, como la cadena de transferencia extracelular de electrones desempeñada por sistemas complejos de citocromos que tienen un potencial redox menor<sup>249,250</sup>. Consecuentemente, LQ y AQS con un  $E_0'$  de -180 V y -200 mV, respectivamente, al pH inicial de 6.6 (Tabla 9), podría tener suficiente energía para ser capaz de interactuar en las reacciones redox de citocromos y moléculas tipo quinina que presentan un potencial mayor (>50 mV). Específicamente, NADH deshidrogenasa y citocromo bc1 facilitan el transporte de electrones mediante un grupo de quinonas (Q) a través de un complejo proteico unido a la membrana, luego, la interconversión de Q y  $H^+$  a  $QH_2$  y  $QH_2$  hacia Q y  $H^+$ , esto facilita la transferencia de electrones hacia los complejos citocromo bc1 y citocromo aa3, finalmente, los electrones son conducidos hacia Fd desde el citocromo aa3, posteriormente la Fd reducida dona un electrón a la [FeFe] hidrogenasa, la cual reduce los  $H^+$  a  $H_2$ <sup>250</sup>.

Adicionalmente, es relevante mencionar que el tratamiento con AQS en forma disuelta desarrolló un incremento en la tasa de producción de hidrógeno, esto podría ser atribuido a la interacción directa entre  $NAD^+/NADH_2$  o incluso con la reducción de Fd debido a que el pico de reducción a pH 6.6 alcanzó el potencial más negativo ( $E_{ENH \text{ pico anódico}}$ : -395 mV, Tabla 9) y estas reacciones redox podrían ser favorecidas por su interacción con el AQS. Por otra parte, a pesar que el mediador redox se encuentra fuera de la célula, éstas moléculas podrían difundirse sobre el medio y tener un contacto directo con las células, entonces por diversos mecanismos, los electrones pueden ser conducidos hacia el interior de la célula; el mecanismo más común que ha sido reportado es a través de pilis conductores a la célula, que aunque su función principal es la movilidad celular, también pueden desempeñar este tipo de papel al poseer la habilidad de transferir electrones; otro mecanismo podría ser a través de materiales conductores como el carbón activado o por proteínas transportadoras de electrones por el contacto con la superficie de la célula<sup>251</sup>. No obstante, es importante notar que los tratamientos con los acarreadores de electrones disueltos, LQ y AQS jugaron un papel diferente en la producción de hidrógeno durante la fermentación, y es incierto confirmar la razón por la que LQ incrementó la producción máxima de hidrógeno, mientras que AQS incrementó la tasa de producción de hidrógeno (Tabla 6 y Fig. 21).

En general, el uso de los mediadores redox mostró un incremento en la acumulación de subproductos líquidos; sin embargo, los resultados obtenidos con mediadores redox

inmovilizados fueron relevantes (Tabla 8 y Fig. 22). CA-LQ y CA-AQS alcanzaron la acumulación más alta de subproductos líquidos. Se observó similitud entre la producción de acetato/butirato por ambos materiales. De acuerdo con los resultados obtenidos, la producción final de acetato con CA-LQ fue 58% y 55% mayor que los controles experimentales (sin mediador redox y con CA crudo, respectivamente), y los valores para CA-AQS fueron 40% y 36% mayor que los controles. Para la producción de butirato se observó un incremento de 51% y 49% cuando CA-LQ fue empleado en comparación con los experimentos control, y, para CA-AQS, 45% y 43% incrementó con relación a los controles. En el caso del etanol y butanol, se observaron resultados similares en todos los tratamientos (Tabla 8). La producción elevada de acetato podría ser atribuida a la relación sinérgica entre el mediador redox y el CA en los materiales inmovilizados, el acoplamiento CA-LQ y CA-AQS podría inducir la formación de un gradiente de electrones que son conducidos a los acarreadores de electrones del proceso fermentativo; además, el CA ha sido estudiado por sus propiedades conductivas que le confieren los grupos funcionales que se encuentran en la superficie <sup>241</sup>.

Del mismo modo que los electrones son transmitidos de un aceptor con potencial redox menor que el donador original, es más fácil la transferencia de electrones entre un donador cercano a un aceptor. De esta manera, el potencial redox de LQ y AQS ( $E_0'$ : -180 mV y -200 mV, respectivamente, Tabla 9) está cercano al del par  $FAD^+/FADH$  ( $E_0'$ : -136 mV  $\alpha$ -FAD (SQ/HQ), -10 mV  $\delta$ -FAD), y también a la reducción del crotonil-CoA a butiril-CoA y butanol. No obstante, cuando el crotonil-CoA es reducido para formar butiril-CoA varias reacciones redox se desarrollan por un complejo enzimático llamado Bcd-EtfAB. Este complejo ha sido encontrado en especies *Clostridia* como *Clostridium kluyveri*. El complejo Bcd-EtfAB actúa en la transferencia de electrones en flavoproteínas y está ensamblado con la butiril-CoA deshidrogenasa, este par complejo lleva a cabo la reacción endergónica de la Fd con NADH a la reacción exergónica de la reducción del crotonil-CoA a butiril-CoA con el NADH <sup>252</sup>. La molécula de FAD puede adoptar un estado redox de dos electrones (quinona/hidroquinona, Q/HQ) o un estado redox de un electrón (quinona/semiquinona, Q/SQ o semiquinona/hidroquinona, SQ/HQ). Esta habilidad puede producir un proceso de bifurcación electrónica, y este mecanismo ha sido reconocido como un nuevo modelo de acoplamiento energético en bacterias estrictamente anaerobias y archaea<sup>15</sup>. Los mediadores redox pueden interactuar en el proceso de bifurcación electrónica de las flavinas ya que el complejo cuenta con tres subunidades (EtfA, EtfB, y Bcd), y cada una contiene FAD como grupo prostético (EtfA

contiene  $\alpha$ -FAD, EtfB contiene  $\beta$ -FAD, y Bcd contiene  $\delta$ -FAD). Las subunidades mencionadas poseen diferente potencial redox y éste depende de la transformación de la quinona,  $\beta$ -FAD posee el potencial más negativo ( $E_0'$ : -729 mV) y lleva a cabo la reacción redox de un electrón (Q/SQ), también efectúa la transformación Q/HQ ( $E_0'$ : -279 mV) y reacciones SQ/HQ ( $E_0'$ : 190 mV), mientras que  $\alpha$ -FAD realiza las reacciones de Q/SQ ( $E_0'$ : 81 mV) y SQ/HQ ( $E_0'$ : -136 mV);  $\delta$ -FAD desarrolla una relación con Bcd y facilita la reducción de crotonil ( $E_0'$ : 10 mV) <sup>15</sup>. El cruce de potenciales debido a la bifurcación electrónica podría producir hidrógeno siempre y cuando los protones derivados de la oxidación de Fd se encuentren cerca de la Hyd. Adicionalmente, los potenciales redox de LQ, AQS, CA-LQ, CA-AQS podrían cruzar con los diferentes subunidades de FAD según sus potenciales y podrían cambiar la dirección de la ruta metabólica hacia la formación de butirato o butanol (Fig. 23). No obstante, en los resultados obtenidos en esta investigación, la producción de acetato y butirato fueron mayores que otros subproductos debido a la afinidad de las rutas metabólicas por la producción de energía en forma de ATP.

## **8.2. Etapa II. Fotocatálisis heterogénea de productos derivados de la fermentación oscura**

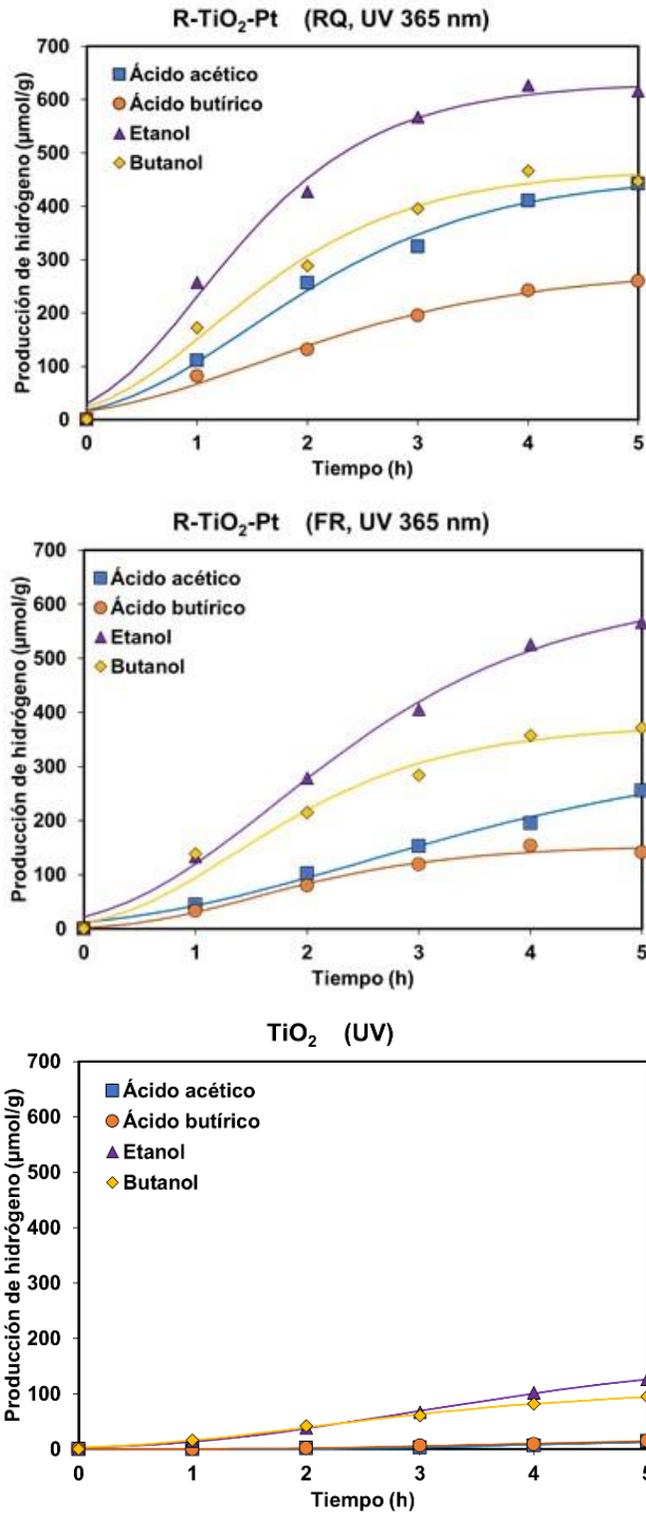
### **8.2.1. Exploración de los materiales sintetizados para la producción de hidrógeno**

#### **8.2.1.1. Pruebas fotocatalíticas preliminares de agentes de sacrificio por individual**

Durante el proyecto se sintetizaron ocho materiales con propiedades semiconductoras, dichos materiales fueron elaborados a base de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$  como fotocatalizador matriz y se realizó la incorporación superficial de la resina fenólica como sensibilizante, además se depositó Pt como cocatalizador por dos metodologías de reducción. Para la evaluación de los materiales sintetizados en el estudio, se optó por realizar un ensayo de exploración de los semiconductores en la fotocatalisis de los agentes de sacrificio claves en forma individual y en mezcla, bajo irradiación luz visible y luz UV. Las condiciones del sistema fotocatalítico, así como las concentraciones de los agentes de sacrificio fueron mencionadas en la sección de metodología. En la Tabla 11, se enlistan

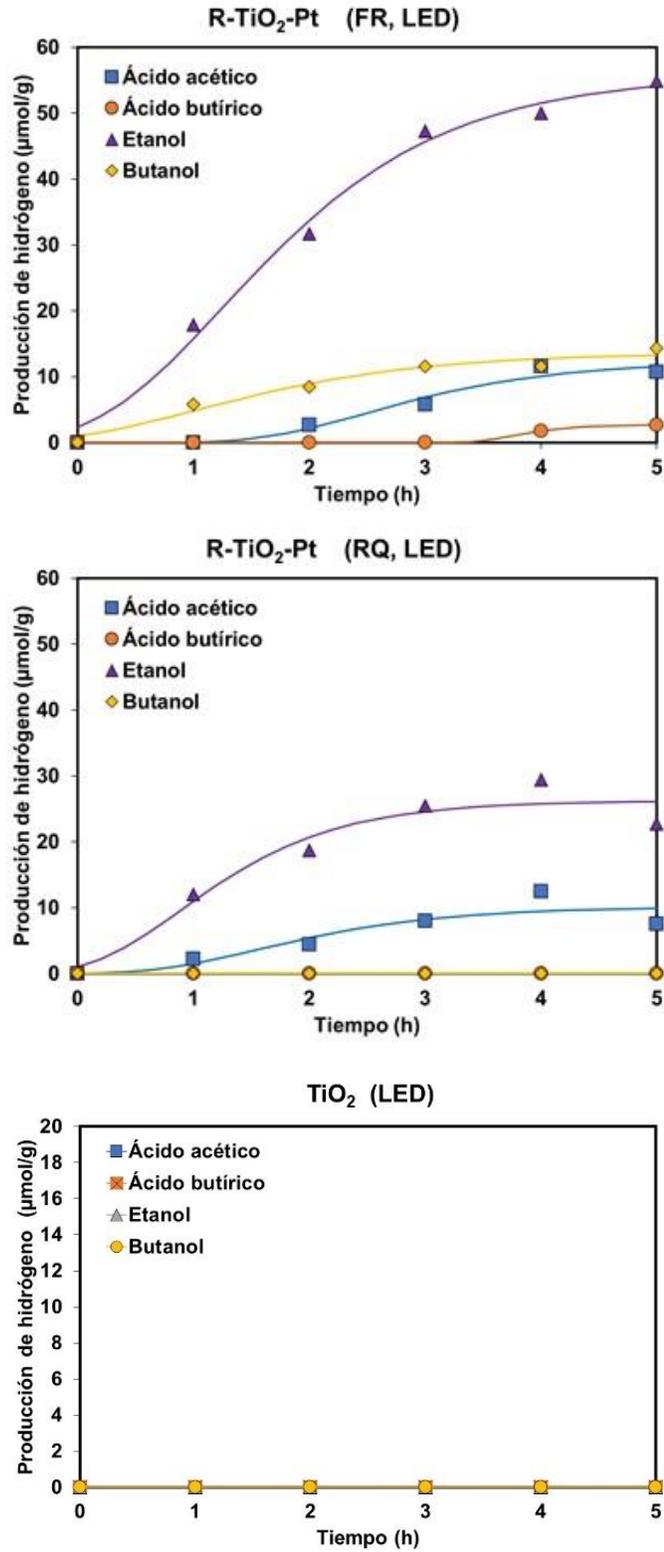
los materiales evaluados, su método de deposición de Pt y el tipo de irradiación empleada para la reacción fotocatalítica.

En la Fig. 25 se muestran las cinéticas de producción de hidrógeno evaluando los materiales a base de  $\text{TiO}_2$  (R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR), R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ) y  $\text{TiO}_2$ -control) bajo irradiación luz LED UV ( $\lambda$ : 365 nm) empleando los agentes de sacrificio en forma individual (ácido acético 1 M, ácido butírico 1 M, etanol 1 M, y butanol 0.05 M (debido a la solubilidad del butanol)). En todos los materiales evaluados se observó mayor producción de hidrógeno en los alcoholes, seguido por los ácidos carboxílicos; el orden de mayor a menor hidrógeno producido fue etanol>butanol>ácido acético>ácido butírico; esto concuerda con el rendimiento teórico de hidrógeno empleando alcoholes que es mayor que en ácidos carboxílicos<sup>253,254</sup>, este hecho se relaciona a la interacción de los agentes de sacrificio con la superficie del semiconductor que se da en un rango mayor de pH para los alcoholes en comparación con los ácidos carboxílicos, lo que sugiere una fácil descomposición de estos en el pH de solución utilizado. Por otro lado, el método de deposición del Pt entre la fotorreducción y la reducción química presentó una ligera diferencia en la producción de hidrógeno con el método de reducción química. Se registró la máxima concentración de hidrógeno de  $566 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  y  $627 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  a las 5 h usando etanol como agente de oxidación con el R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ), respectivamente; seguido del butanol con  $372 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  y  $466 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  para el R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ), respectivamente; después el ácido acético  $255 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  y  $442 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  para el R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ), respectivamente; y finalmente, el ácido butírico con  $154 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  y  $260 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  para el R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ), respectivamente (Tabla 11). Paralelamente, se llevó a cabo el uso de  $\text{TiO}_2$  como experimento control empleando los mismos agentes de sacrificio, y se observó una mínima producción de hidrógeno al registrar el valor más alto cercano a los  $100 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  cuando se utilizó etanol. En función que la mayor producción de hidrógeno se manifestó empleando los semiconductores con Pt, es posible mencionar que la presencia de éste como cocatalizador presentó una notable diferencia en la producción de hidrógeno, y que el rol del Pt está dirigido en actuar como trampa de electrones en las reacciones desencadenadas en la fotocatalisis, así como en la reducción de los protones hacia  $\text{H}_2$ <sup>253,255,256</sup>.



**Fig. 25.** Producción de H<sub>2</sub> empleando agentes de sacrificio en forma individual bajo irradiación LED UV (365 nm) mediante el uso de R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) y TiO<sub>2</sub>.

En la Fig. 26, se muestran las cinéticas de producción de hidrógeno evaluando los materiales a base de  $\text{TiO}_2$  (R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR), R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ) y  $\text{TiO}_2$ -control) bajo irradiación luz LED visible empleando los agentes de sacrificio en forma individual bajo las concentraciones ya mencionadas. Es importante mencionar que los materiales sintetizados en su composición contienen resina fenólica como sensibilizante y que fue incorporada en la superficie del  $\text{TiO}_2$  con la finalidad de incrementar la longitud de onda a la cual se active el material y emplear una fuente de irradiación de luz visible. Además, la inserción de partículas pequeñas del cocatalizador en la banda de conducción acorta la  $E_g$  mejorando la actividad en regiones de luz visible<sup>257,258</sup>. Sin embargo, al poseer menor energía disponible para la activación de los materiales, y sabiendo que la proporción del  $\text{TiO}_2$  es mayor en el compósito (80%) los valores alcanzados para la producción de hidrógeno fueron menores que al utilizar irradiación UV. En el caso de R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR), se alcanzó la mayor producción de hidrógeno con etanol como agente oxidante ( $61.6 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ ), seguido por el butanol, ácido acético y ácido butírico ( $20.98 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ ,  $14.72 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ ,  $3.125 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ , respectivamente). En el caso del R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ), la producción de hidrógeno fue menor que con el semiconductor con Pt fotorreducido al generar  $29.5 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  y  $7.6 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  para etanol y ácido acético, respectivamente; mientras que el ácido butírico y el butanol no presentaron producción de hidrógeno (Tabla 11). De acuerdo con los resultados mencionados y según la metodología de deposición de Pt, durante el protocolo de fotorreducción existió mayor dispersión de las partículas de R- $\text{TiO}_2$ <sup>258</sup>, y al final el tamaño de la partícula fue menor por lo que durante las pruebas fotocatalíticas el material podía mantenerse suspendido; por otro lado, durante la deposición por reducción química del Pt en los materiales se observaron aglomeraciones de partículas metálicas en la superficie del semiconductor lo que disminuyó el área superficial disponible y con ello la disponibilidad de sitios activos.

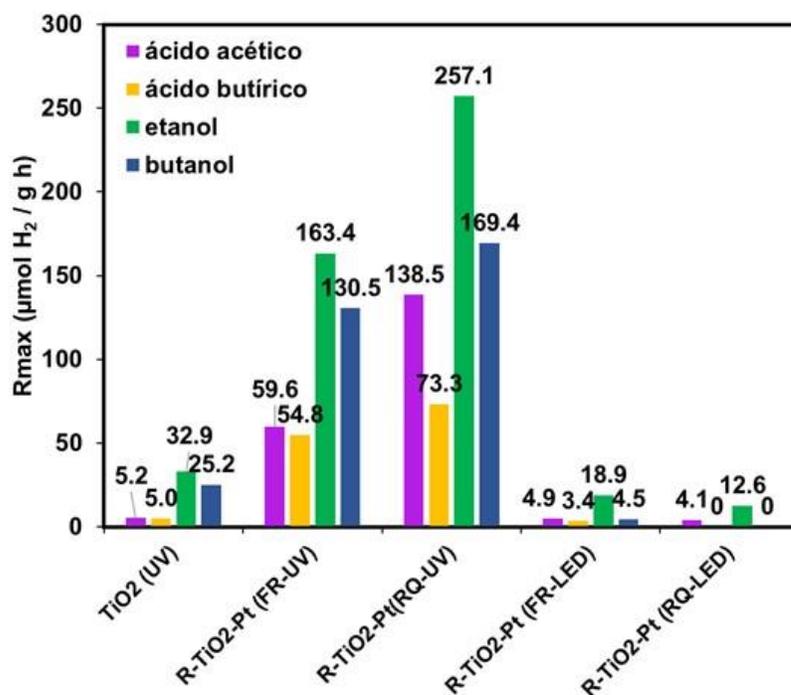


**Fig. 26.** Producción de H<sub>2</sub> empleando agentes de sacrificio en forma individual bajo irradiación LED Vis mediante el uso de R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) y TiO<sub>2</sub>.

Adicionalmente, se obtuvieron las tasas de producción de hidrógeno ( $R_{max_{FH}}$ ) para las cinéticas fotocatalíticas de la producción de hidrógeno de los diversos materiales con base de  $TiO_2$  bajo irradiación LED UV y LED Visible para los diferentes agentes de sacrificio evaluados. Las tasas más elevadas fueron alcanzadas en los ensayos realizados bajo irradiación luz LED UV (Fig. 25), debido a la mayor cantidad de energía disponible y a que los materiales estudiados están compuestos en mayor proporción de  $TiO_2$  que presenta una actividad fotocatalítica excelente bajo longitudes de onda menores. Además, en relación a la cantidad de hidrógeno producido, las tasas de generación de hidrógeno fueron mayores al utilizar alcoholes que ácidos carboxílicos, esto corresponde acertadamente a la cantidad teórica de hidrógeno que es mayor en los alcoholes<sup>254</sup>, aunado que los alcoholes primarios, como el etanol ha sido reportado como un buen agente de sacrificio para la producción de hidrógeno<sup>253,259</sup>. Por otro lado, las tasas de producción de hidrógeno más altas se presentaron con los materiales con la deposición de Pt por reducción química, al alcanzar  $257.1 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$  en el caso de R- $TiO_2$ -Pt bajo irradiación UV utilizando etanol como agente oxidante,  $169.4 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{ h}$  para el butanol,  $138.5 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$  para el ácido acético y  $73.3 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{ h}$  para el ácido butírico; mientras que el R- $TiO_2$ -Pt sintetizado por el método de fotorreducción bajo irradiación UV alcanzó  $163.4 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$ ,  $130.5 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$ ,  $59.6 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$  y  $54.8 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$  para etanol, butanol, ácido acético y ácido butírico, respectivamente; en contraste con el control experimental de  $TiO_2$  bajo irradiación UV que solo alcanzó  $32.9 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$ ,  $25.2 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$ ,  $5.2 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$  y  $5 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$  para etanol, butanol, ácido acético y ácido butírico, respectivamente (Fig. 27, Tabla 11). Estos resultados demuestran lo antes mencionado sobre la presencia del Pt que tiene un papel clave en la producción de hidrógeno y que al estar unido al  $TiO_2$  generan una interacción fotocatalítica favorable bajo luz UV, que permite la oxidación de los agentes de sacrificio presentes en la reacción y la reducción de los protones liberados durante la oxidación por los electrones dirigidos en la banda de conducción hacia el Pt o del mismo metal<sup>166,260</sup>. El uso de agentes de sacrificio como alcoholes y ácidos carboxílicos ha sido estudiado por diversos autores (Tabla 10), tal es el caso de Li *et al.*<sup>203</sup> que emplearon diversos ácidos grasos de cadena corta como agentes oxidantes para la producción de hidrógeno con un semiconductor de C/ $TiO_2$ , y en especial para el ácido acético reportaron una tasa de producción de hidrógeno de  $311.5 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$  y para el ácido butírico hasta  $267 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{-h}$ , ellos atribuyen este buen desempeño fotocatalítico a la naturaleza hidrofílica de los grupos -COOH que podrían facilitar la interacción con el

C/TiO<sub>2</sub> así como la oxidación y transferencia de electrones. Imizcoz & Puga<sup>261</sup> estudiaron el fotorreformado del ácido acético usando Cu/TiO<sub>2</sub>, observaron un comportamiento interesante el ensayo fotocatalítico dado que ocurría un ciclo redox en el funcionamiento del material; cuando el fotocatalizador era expuesto a una atmósfera oxidante, el Cu que se encontraba en la superficie del TiO<sub>2</sub> se oxidaba a CuO y durante el ensayo fotocatalítico ocurría una descarboxilación del ácido acético y la generación de CH<sub>4</sub>; mientras que cuando el fotocatalizador se sometía a un proceso previo de fotorreducción en una atmósfera reductora, la superficie sufría cambios al reducirse el CuO a Cu(0) y después en el proceso de fotocatalisis se formaba hidrógeno por la reducción de los protones liberados de la oxidación del ácido acético. Otro estudio fue realizado por Zheng *et al.*<sup>262</sup> que evaluaron el fotorreformado del ácido butírico con diferentes variaciones en la proporción de dos materiales semiconductores (Cu<sub>2</sub>O/Bi<sub>2</sub>WO<sub>6</sub>), y observaron que al incrementar la masa del Cu<sub>2</sub>O en la heterounión incrementaba la producción de hidrógeno hasta alcanzar 38 mL (34.37 wt.% Cu<sub>2</sub>O/Bi<sub>2</sub>WO<sub>6</sub>), esto va relacionado al potencial de reducción del Cu<sub>2</sub>O en su banda de conducción que al ser menor favorece la reducción de los protones presentes, adicional a esto observaron un incremento en la formación de diversos alcanos como CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> y C<sub>3</sub>H<sub>8</sub> principalmente cuando el Bi<sub>2</sub>WO<sub>6</sub> se encontraba en mayor proporción en el material. En cuanto al uso de alcoholes como agentes de sacrificio en el proceso de fotorreformado, Bahruji *et al.*<sup>259</sup> y Bowker *et al.*<sup>253</sup> llevaron a cabo una amplia investigación al emplear una gran variedad de alcoholes en el fotorreformado para la producción de hidrógeno usando TiO<sub>2</sub> con diversos cocatalizadores metálicos (Pd y Au), concluyendo que los alcoholes primarios y secundarios presentan el mayor rendimiento de producción de hidrógeno, mientras que los alcoholes terciarios es menor; también, que los dioles y trioles son excelentes productores de hidrógeno ya que existe mayor producción por mole de reactante orgánico y, finalmente, que los grupos alquilo unidos a los alcoholes corresponden a la producción de alcanos. Al-Azri *et al.*<sup>263</sup> llevaron a cabo el fotorreformado del etanol y evaluaron diversos cocatalizadores metálicos depositados en TiO<sub>2</sub>, específicamente para Pt/TiO<sub>2</sub> reportaron una tasa de producción de 18 mmol/ g<sub>cat</sub>-h, similar a la alcanzada en este estudio (13.71 mmol/g<sub>coocat</sub>-h) para el R-TiO<sub>2</sub>-Pt (reducción química), cabe mencionar que las condiciones del sistema de reacción fueron muy similares. En contraste con los resultados antes discutidos, los materiales sintetizados con base de ZnO (R-ZnO-Pt (FR) y R-ZnO-Pt (RQ)) presentaron resultados en su mayoría nulos para la producción de hidrógeno, tanto bajo irradiación visible como UV (Anexo H y Tabla

11); esto puede estar relacionado a que el material no posee el potencial necesario para reducir los protones, y que la función del Pt se ve mermada por una posible captura de los electrones por la resina fenólica, provocando otro tipo de reacciones que generen radicales con menor energía. Por otro lado, algunos autores han confirmado la presencia de hidrógeno al emplear semiconductores con ZnO, tal es el caso de Sampaio *et al.*<sup>264</sup> que evaluaron el fotorreformado de etanol usando Au/Zn bajo irradiación UV-vis (>300 nm) para la producción de hidrógeno, y atribuyeron que la morfología del ZnO tenía un papel clave para mejorar la dispersión de la luz entrante y así mejorar la eficiencia de adsorción de ésta y aumentando la fotoeficiencia del material, ya que al usar un ZnO con una morfología tipo flor lograban una producción de hidrógeno de hasta 427  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat-h}}$ , mientras que la morfología de tipo varilla, aguja o esférica la producción era mucho menor. La principal razón por la cual se evaluó el ZnO como semiconductor en la producción de hidrógeno en esta investigación, fue que este compuesto comparte propiedades fotocatalíticas similares al  $\text{TiO}_2$ , aunado que su costo es menor, lo que lo hacía un buen candidato; sin embargo, por lo anterior mencionado no se obtuvieron los resultados esperados para este material.



**Fig. 27.** Tasas de producción de H<sub>2</sub> empleando diversos materiales con base al TiO<sub>2</sub> bajo irradiación LED UV y LED Vis para diversos agentes de sacrificio individuales.

**Tabla 10.** Estudios de producción de hidrógeno por medio de fotorreformado de alcoholes y ácidos grasos como agentes de sacrificio.

Fotocatalizador	Dosis de fotocatalizador	Tipo de irradiación	Agente de sacrificio (AS)	Concentración AS	Producción de H <sub>2</sub>	Referencia
Pt <sub>0.5wt%</sub> /TiO <sub>2</sub>	80 mg	Lámpara Xe 280 W	Ácido acético	0.87 mM	292.5 μmol/g-h	Patsoura <i>et al.</i> <sup>265</sup>
Pd <sub>0.3wt%</sub> /TiO <sub>2</sub>	2 g/L	Xe arc 400 W	Etanol n-butanol Ácido acético	100 mL H <sub>2</sub> O/ 110 μL AS	0.32 mL/min mol 0.3 mL/min mol 0.04 mL/min mol	Bahruji <i>et al.</i> <sup>259</sup>
Au <sub>2wt%</sub> /TiO <sub>2</sub>	2 g/L	Xe arc 400 W	Etanol Butanol	100 mL H <sub>2</sub> O/ 110 μL alcohol	3.25 mL 3 mL	Bowker <i>et al.</i> <sup>253</sup>
Cu <sub>2</sub> O/Bi <sub>2</sub> WO <sub>6</sub>	0.22 g/L	Lámpara Hg 500 W	Ácido butírico	48 mM	38 mL	Zheng <i>et al.</i> <sup>262</sup>
C/TiO <sub>2</sub>	0.3 g/L	Lámpara Xe (Filtro UV) 300 W 135 mW/cm <sup>2</sup>	Ácido acético Ácido butírico Mezcla	0.5 M	78 μmol (311.5 μmol/g-h) 62 μmol (267 μmol/g-h) 80 μmol (318 μmol/g-h)	Li <i>et al.</i> <sup>266</sup>
Pt <sub>1wt%</sub> /TiO <sub>2</sub>	1 g/L	Luz solar simulada 100 mW/cm <sup>2</sup>	Ácido acético	01:01	32 μmol	Imizcoz & Puga <sup>261</sup>
Pd <sub>0.5wt%</sub> /TiO <sub>2</sub> Pt <sub>1wt%</sub> /TiO <sub>2</sub> Au <sub>1wt%</sub> /TiO <sub>2</sub>	0.325 g/L	Luz UV, 365 nm 300 W 6.8 mW/cm <sup>2</sup>	Etanol	10% v.v.	22 mmol/g <sub>cocat-h</sub> 18 mmol/h g <sub>cocat-h</sub> 16 mmol/h g <sub>cocat-h</sub>	Al-Azri <i>et al.</i> <sup>256</sup>

**Tabla 11.** Producción de hidrógeno y metano en  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  del ensayo exploratorio de los materiales sintetizados empleando los agentes de sacrificio en forma individual bajo diferente fuente de irradiación.

Material	Método de deposición de Pt	Fuente de irradiación	Ácido acético (1 M)		Ácido butírico (1 M)		Etanol (1 M)		Butanol (0.5 M)	
			H <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>
TiO <sub>2</sub>	Control	LED UV	14.29	600	15.18	0	125.9	0	95.09	0
ZnO	Control	LED UV	0	0	0	0	0	0	0	0
R-TiO <sub>2</sub> -Pt	FR	LED UV	255.36	615	154.02	0	566.5	0	371.88	0
R-TiO <sub>2</sub> -Pt	RQ	LED UV	442.41	741.25	259.82	13.75	627.23	0	466.52	0
R-ZnO-Pt	FR	LED UV	0	0	0	0	0	0	0	0
R-ZnO-Pt	RQ	LED UV	0	0	0	0	0	0	0	0
TiO <sub>2</sub>	Control	LED Visible	0	0	0	0	0	0	0	0
ZnO	Control	LED Visible	0	0	0	0	0	0	0	0
R-TiO <sub>2</sub> -Pt	FR	LED Visible	14.73	5	3.125	0	61.6	17.5	20.98	0
R-TiO <sub>2</sub> -Pt	RQ	LED Visible	7.6	0	0	0	29.5	0	0	0
R-ZnO-Pt	FR	LED Visible	0	6.25	0	0	6.7	10	6.25	0
R-ZnO-Pt	RQ	LED Visible	0	0	0	0	0	0	0	0

### 8.2.1.2. Pruebas fotocatalíticas preliminares de agentes de sacrificio en mezcla

Adicionalmente, durante los ensayos fotocatalíticos de exploración de los materiales sintetizados (Tabla 12), se evaluó un sistema reactivo empleando una mezcla de agentes de sacrificio con la siguiente composición: ácido acético (10 mM), ácido butírico (4.5 mM), etanol (8.5 mM) y butanol (1.7 mM) en buffer fosfatos a pH 5.3; esta mezcla se relaciona con los resultados en el tipo de subproducto, concentración y pH que se obtuvieron durante la etapa 1 de la fermentación oscura, y que emula la composición del efluente real. Los experimentos fotocatalíticos fueron realizados bajo luz UV-LED y luz LED-visible; además, en estos ensayos se adicionó la evaluación de los materiales TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ), ZnO-Pt (FR) y ZnO-Pt (RQ), donde la resina ya no estuvo presente en la estructura final de los semiconductores. En la Fig. 28 se muestran las cinéticas de

producción de hidrógeno para los materiales sintetizados con base de TiO<sub>2</sub> (a) y ZnO (b).

**Tabla 12.**  $H_{max_{FH}}$  y  $R_{max_{FH}}$  de la fotocatalisis de la mezcla de agentes de sacrificio usando los diferentes materiales sintetizados bajo diferente fuente de irradiación, estimados por el modelo de Gompertz modificado.

Material	Método de deposición	Fuente de irradiación	$R_{max_{FH}}$ ( $\mu\text{mol/g}_{\text{cat-h}}$ )	$H_{max_{FH}}$ ( $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ )	R <sup>2</sup>
TiO <sub>2</sub>	NA	UV LED	6.9	6.0	1.000
TiO <sub>2</sub> -Pt	FR	UV LED	188.6	1139.3	0.990
TiO <sub>2</sub> -Pt	RQ	UV LED	262.7	750.0	0.989
R-TiO <sub>2</sub> -Pt	FR	UV LED	47.0	282.6	0.994
R-TiO <sub>2</sub> -Pt	RQ	UV LED	92.0	328.1	0.996
R-TiO <sub>2</sub> -Pt	FR	LED Visible	5.4	8.4	0.971
R-TiO <sub>2</sub> -Pt	RQ	LED Visible	18.4	26.9	0.922
ZnO	NA	UV LED	0	0	0
ZnO-Pt	FR	UV LED	0	0	0
ZnO-Pt	RQ	UV LED	0	0	0
R-ZnO-Pt	FR	UV LED	0	0	0
R-ZnO-Pt	RQ	UV LED	0	0	0
R-ZnO-Pt	FR	LED Visible	0	0	0
R-ZnO-Pt	RQ	LED Visible	0	0	0

$H_{max_{FH}}$ : Producción máxima de H<sub>2</sub> en el proceso de fotocatalisis heterogénea.  $R_{max_{FH}}$ : Tasa máxima de H<sub>2</sub> en el proceso de fotocatalisis heterogénea.

Los materiales con TiO<sub>2</sub> presentaron resultados sobresalientes en la producción de hidrógeno bajo irradiación luz UV-LED. No obstante, los materiales sin resina fenólica presentaron mayor producción de hidrógeno, por lo que es posible que la presencia de resina fenólica cambia el mecanismo fotocatalítico del sistema reactivo; mientras que en los materiales TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) existió una interacción directa entre el TiO<sub>2</sub> y el Pt que favoreció la producción de hidrógeno<sup>150,267,268</sup>. Durante este ensayo exploratorio, la producción de hidrógeno más alta fue alcanzada por TiO<sub>2</sub>-Pt sintetizado por fotorreducción con 1139.3  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ , seguido por el TiO<sub>2</sub>-Pt sintetizado por reducción química con 750  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ , luego R-TiO<sub>2</sub>-Pt sintetizado por reducción química con 328.1  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ , seguido por R-TiO<sub>2</sub>-Pt sintetizado por fotorreducción con 282.6  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ , y finalmente el control experimental de TiO<sub>2</sub> con 6  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ . En relación con las tasas de producción de hidrógeno, el valor más alto obtenido fue 262.7  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat-h}}$  alcanzado por

TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ), seguido por 188.6 μmol/g<sub>cat</sub>-h del TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), 92 μmol/g<sub>cat</sub>-h y 47 μmol/g<sub>cat</sub>-h para R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), respectivamente. El uso de mezclas de agentes de sacrificio de este tipo no ha sido muy estudiado, por lo que la comparación de los resultados es un tanto difícil; no obstante, Li *et al.*<sup>203</sup> emplearon varias mezclas de ácidos grasos como agentes de sacrificio para la producción de hidrógeno con C/TiO<sub>2</sub> como fotocatalizador, observaron que no existía diferencia significativa en la producción de hidrógeno entre las mezclas ya que ésta no excedía de 80 μmol en un lapso de 6 h; por lo que concluyeron que existía una posible competencia entre los diferentes ácidos grasos orgánicos para ser adsorbidos sobre el C/TiO<sub>2</sub> y una subsecuente transferencia de electrones. Según los resultados obtenidos, es evidente un estudio más profundo de los posibles mecanismos que ocurren en una mezcla de agentes oxidantes ya que múltiples reacciones de transferencia de electrones pueden suceder debido a la sinergia entre los agentes de sacrificio y los radicales generados. Por otra parte, a pesar de que la concentración de los agentes de sacrificio fue más de cien veces menor que los ensayos individuales, no se observó una afectación en la producción de hidrógeno, lo que da una pauta relevante para el uso de estos materiales en el efluente real de la fermentación oscura donde los agentes de sacrificio presentan concentraciones similares. Con relación a los experimentos fotocatalíticos irradiados bajo luz LED-visible, se observó una escasa generación de hidrógeno al usar R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) (Tabla 12); este hecho puede estar relacionado a que la energía disponible para la activación del material no fue suficiente y que incluso los materiales con resina fenólica no pudieron actuar como sensibilizantes para provocar la activación del semiconductor. En contraste, los materiales evaluados con ZnO en su estructura no se observó presencia de hidrógeno durante todo el tiempo que se desarrollaron las cinéticas bajo las dos fuentes de irradiación usadas; estos resultados demostraron que el ZnO que se empleó para este estudio no es un buen semiconductor para la producción de hidrógeno. Aunque el ZnO y el TiO<sub>2</sub> presentan propiedades ópticas similares como su E<sub>g</sub>, las propiedades energéticas de éstos son muy diferentes<sup>142,269,270</sup>; el ZnO posee un rango menor en su potencial de oxidación y reducción en comparación con el TiO<sub>2</sub> lo que puede estar relacionado con la generación de radicales de menor energía que fueron capaces de oxidar los agentes de sacrificio, pero no lo suficiente como para favorecer la producción de hidrógeno (Fig. 29, Tabla 13).

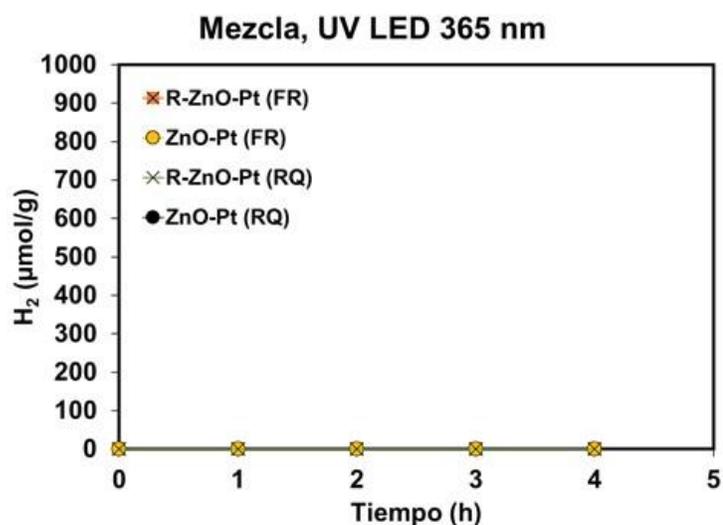
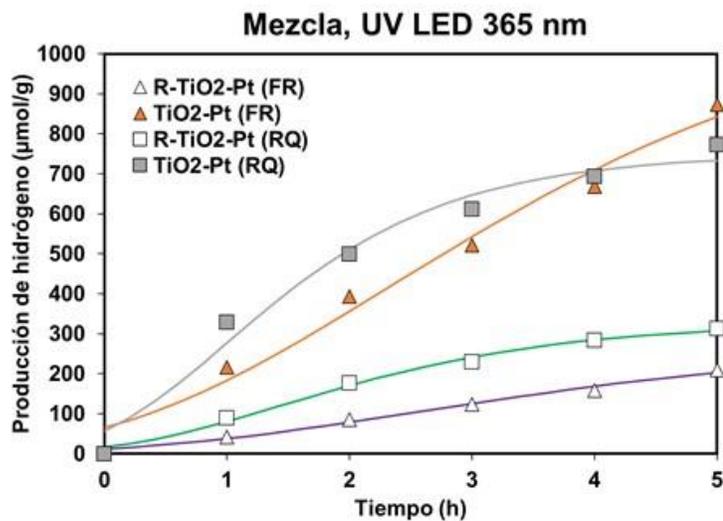


Fig. 28. Producción de H<sub>2</sub> empleando agentes de sacrificio en mezcla bajo irradiación LED UV.

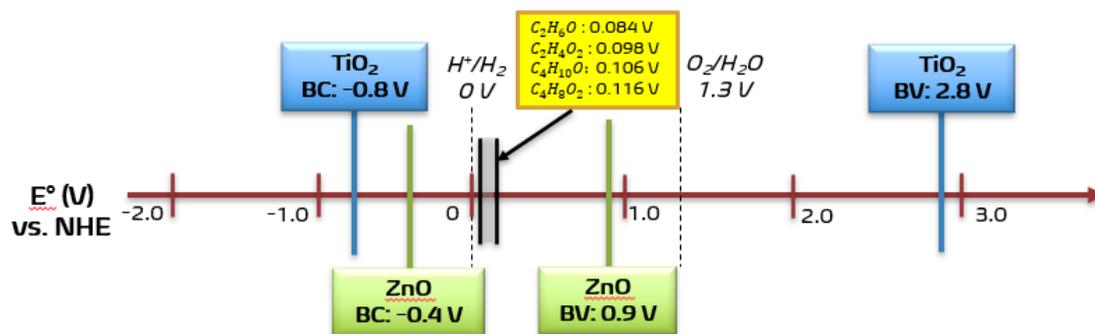


Fig. 29. Potenciales de oxidación y reducción de los AS, y de la BV y BC del TiO<sub>2</sub> y ZnO.

**Tabla 13.** Potenciales de oxidación estándar (vs. ENH) para los diferentes AS utilizados en este estudio.

Agente de Sacrificio (AS)	Ecuación redox balanceada de la oxidación del AS	$\Delta_f G^\circ$ (kJ/mol) <sup>a</sup>	(-) $\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	E° oxidación (V) vs. ENH
Ácido acético	$C_2H_4O_2 + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 8H^+ + 8e^-$	-390.2	75.7	0.098
Ácido butírico	$C_4H_8O_2 + 6H_2O \rightarrow 4CO_2 + 20H^+ + 20e^-$	-377.7	223.0	0.116
Etanol	$C_2H_6O + 3H_2O \rightarrow 2CO_2 + 12H^+ + 12e^-$	-174.8	97.4	0.084
Butanol	$C_4H_{10}O + 7H_2O \rightarrow 4CO_2 + 24H^+ + 24e^-$	-162.5	244.9	0.106

$$-\Delta G^\circ = x\Delta_f G^\circ(CO_2) - \Delta_f G^\circ(C_xH_yO_z) - (2x - z)\Delta_f G^\circ(H_2O)$$

$$E^\circ_{oxidación}(V) vs. NHE = -\frac{\Delta G^\circ}{nF}, \text{ donde } n = (4x - 2z + y)$$

$$\Delta_f G^\circ(CO_2) = -394.4 \text{ kJmol}^{-1}; \Delta_f G^\circ(H_2O) = -237.1 \text{ kJmol}^{-1}; F = 96485 \text{ Cmol}^{-1}$$

<sup>a</sup> $\Delta_f G^\circ$  valores tomados de "Dean, J. A. (Ed.) Lange's Handbook of Chemistry, 15th ed."<sup>271</sup>

### 8.3. Caracterización de los semiconductores

La caracterización de los semiconductores por diversas técnicas se desarrolló solo para los materiales con mejor desempeño en la producción de hidrógeno de la sección de exploración de materiales sintetizados. Los materiales seleccionados fueron: TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ), R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ); dentro de las características principales de estos fotocatalizadores se encuentran que están conformados químicamente por TiO<sub>2</sub>; también, que los semiconductores sensibilizados con resina fenólica (R) cuentan con ~80 wt% de TiO<sub>2</sub>; y finalmente, que todos los materiales tienen Pt como cocatalizador depositado ya sea por fotorreducción o por reducción química en la superficie del TiO<sub>2</sub> o R-TiO<sub>2</sub>.

#### 8.3.1. Análisis BET y DLS

El área superficial específica (BET), el diámetro hidrodinámico de las partículas ( $d_h$ ) y el índice de polidispersidad (PDI) de los materiales evaluados para el fotorreformado se muestran en la Tabla 14. El área superficial específica del TiO<sub>2</sub> comercial empleado fue de 43.9 m<sup>2</sup>/g, y una vez que el Pt se incorporó en la superficie del material, ésta disminuyó ligeramente en ambos materiales modificados, este hecho podría estar

relacionado a que los nanoagregados de Pt en el material se encuentren obstruyendo poros del TiO<sub>2</sub> y por consecuencia se observa una reducción en el área superficial. En relación a los materiales modificados con resina fenólica se observó un decremento notorio en el área superficial, para el R-TiO<sub>2</sub> se obtuvo un área específica 3 veces menor (10.52 m<sup>2</sup>/g) que el TiO<sub>2</sub> sin modificar; esto podría relacionarse a que la adición de la resina fenólica bloqueó de manera significativa los poros del dióxido de titanio provocando la disminución en el área superficial; por otro lado, los materiales R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR y RQ) mostraron un ligero incremento en el área superficial, esto se podría relacionar a que los cúmulos que se incorporaron en la superficie del R-TiO<sub>2</sub> formaron ligeros relieves que generan un ligero aumento en el área superficial. El diámetro hidrodinámico de partícula medido por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) hace referencia al tamaño real de la partícula dinámica hidratada y solvatada que estará presente en el medio de la reacción de interés; los materiales TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) mostraron un d<sub>h</sub> de 413.6 nm y 211.5 nm, respectivamente; y presentaron un aumento en el d<sub>h</sub> en comparación con el TiO<sub>2</sub> sin modificar (d<sub>h</sub>: 164.4 nm), lo que sugiere una atracción mayor entre las partículas que tienen Pt en su composición favoreciendo la formación de agregados de mayor tamaño. En el caso de los materiales con resina fenólica se obtuvieron partículas con un d<sub>h</sub> de 266.4 nm y 202.2 nm para el R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ), respectivamente. Con respecto al índice de polidispersidad (PDI) que representa la distribución de tamaño de las partículas con respecto a la dispersión de luz dinámica; por lo que al obtener valores por debajo de 0.5, representa que las muestras mostraron una distribución normal al estar medianamente monodispersos en el tamaño de los agregados formados.

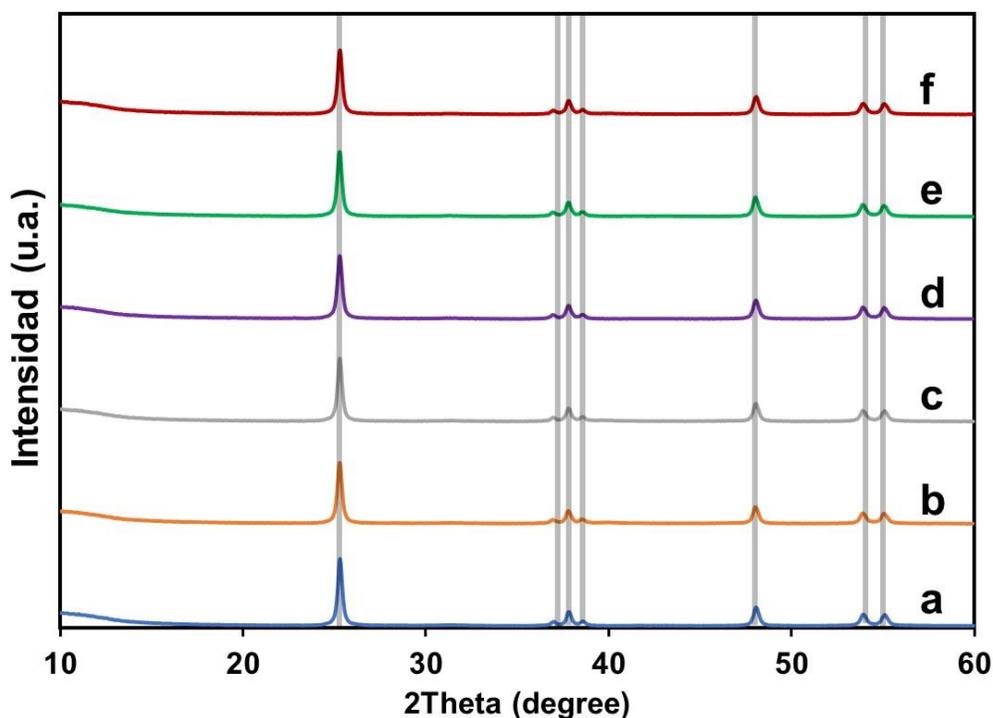
**Tabla 14.** Propiedades físicas de los materiales a evaluar.

Material	Área superficial específica (m <sup>2</sup> /g) BET	Diámetro hidrodinámico de partícula (d <sub>h</sub> , nm)	Índice de polidispersidad (PDI)
TiO <sub>2</sub>	43.90	164.4	0.22
TiO <sub>2</sub> -Pt (FR)	41.02	413.6	0.44
TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ)	41.31	211.5	0.37
R-TiO <sub>2</sub>	10.52	326.2	0.39
R-TiO <sub>2</sub> -Pt (FR)	14.90	266.4	0.30
R-TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ)	11.33	202.2	0.40

d<sub>h</sub>: diámetro hidrodinámico de partícula

### 8.3.2. Análisis DRX

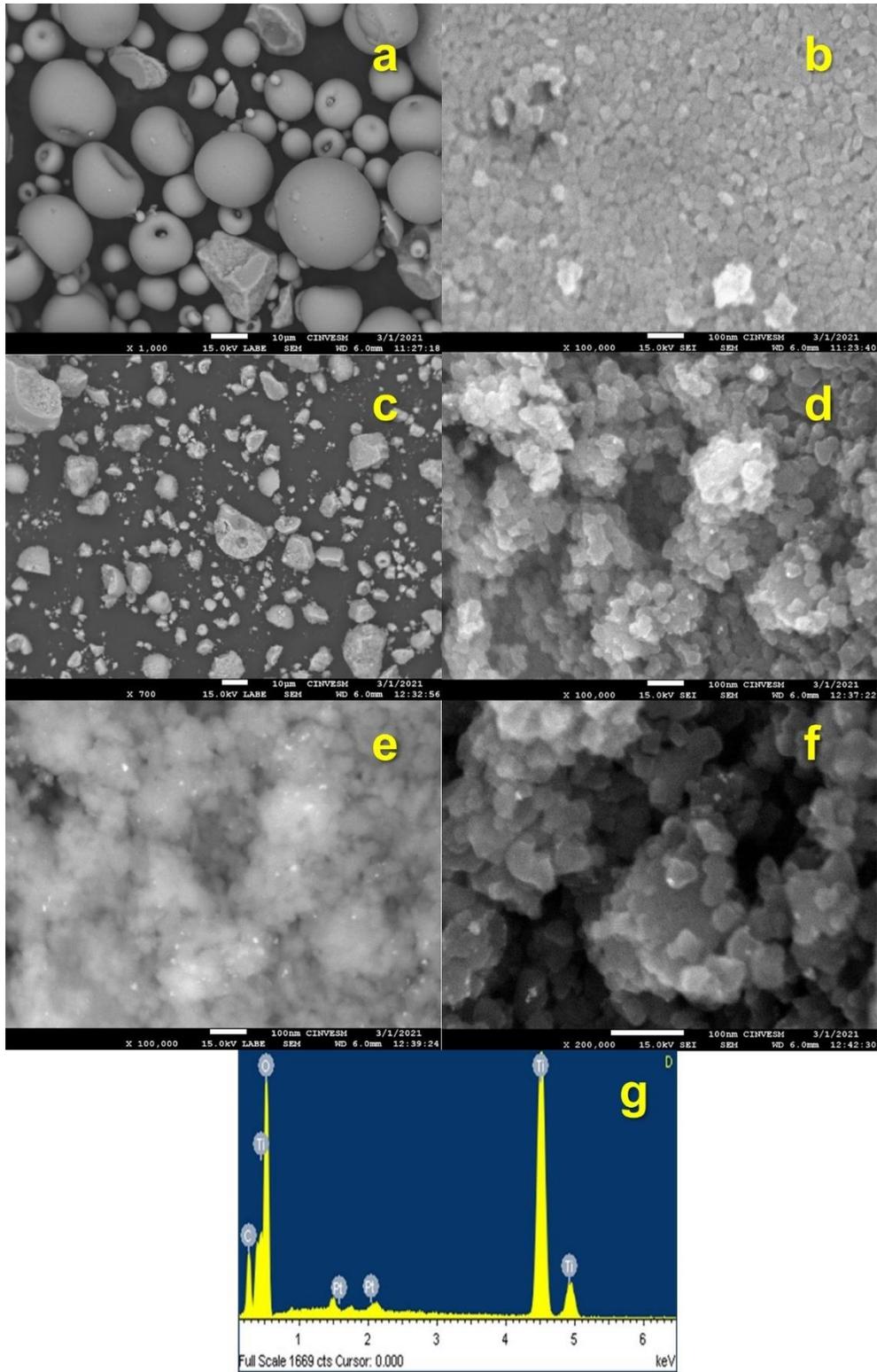
Para investigar la naturaleza cristalina de las muestras por el  $\text{TiO}_2$  se llevaron a cabo pruebas de difracción de rayos X (DRX). Los patrones de DRX en todos los fotocatalizadores fueron consistentes con los picos propios del  $\text{TiO}_2$  en su forma cristalina anatasa (Fig. 30) que corresponden a la ficha del JCPDS: No. 21-1272, y a la ficha técnica del  $\text{TiO}_2$  comercial (Inframat® No. Producto: 22N-0801A, 99.9% anatasa). No se observaron picos correspondientes al Pt metálico en los difractogramas debido al bajo porcentaje depositado en los materiales (<1.5 wt%); además, dicho resultado fue esperado debido al tamaño pequeño de las nanopartículas de Pt. Por otro lado, debido a que la presencia de resina fenólica en los semiconductores R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ) fue ~20 wt% no se observó una tendencia amorfa por la naturaleza de la resina en los patrones de difracción de los materiales.



**Fig. 30.** Patrones de DRX de los fotocatalizadores evaluados para la producción de hidrógeno. a:  $\text{TiO}_2$ , b:  $\text{TiO}_2$ -Pt (FR), c:  $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ), d: R- $\text{TiO}_2$ , e: R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR), f: R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ). Líneas grises continuas se refieren al patrón de  $\text{TiO}_2$  anatasa (JCPDS No. Ficha 21-1272).

### 8.3.3. Análisis SEM-EDS

Con la finalidad de conocer la morfología, el tamaño de partícula y corroborar la presencia de Pt en los materiales se llevó a cabo un análisis por SEM-EDS. Algunas micrografías obtenidas del TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) se pueden observar en la Fig. 31; adicionalmente, en la Fig. 31a y b, se observa el TiO<sub>2</sub> sin sufrir ninguna modificación, se aprecia la formación de aglomerados esféricos de 10-50 μm, mientras que a una magnificación mayor se corrobora el tamaño de partícula de 30-50 nm, además de presentar una morfología cúbica; las Figs. 31c,d,e,f y g corresponden al TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), se observa la formación de cúmulos de menor tamaño y de morfología irregular (c), esta disminución de tamaño en los aglomerados puede deberse a las afectaciones que puede sufrir el material durante el proceso de deposición fotoquímica; a una magnificación mayor se observó un tamaño de partícula ligeramente mayor al TiO<sub>2</sub> sin modificar rondando los 40 a 50 nm, con una ligera pérdida de la forma cúbica (d). Para lograr una mejora en el análisis de las muestras, se empleó un detector de alta energía (LABE, *Low-Angle Backscattered Electron*) que posee mayor sensibilidad para adquirir información superficial de las muestras que se analizan, esto debido a que es capaz de recolectar electrones retrodispersados que salen de la muestra en ángulos más bajos, en otras palabras, los electrones con un radio mayor en el campo magnético del lente objetivo. La Fig. 31e fue obtenida con el detector LABE, se muestran cúmulos nanométricos de Pt sobre la superficie del TiO<sub>2</sub>, estos cúmulos metálicos al poseer más carga se observan con mayor brillo durante el análisis, el tamaño de los cúmulos de Pt fue de aproximadamente 7 a 20 nm; asimismo en la Fig. 31f se muestra bajo una magnificación mayor los depósitos de Pt sobre las partículas de TiO<sub>2</sub>. Adicionalmente, el patrón DRX del TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) (Fig. 31g) muestra diversas señales características del Ti, O y Pt. Las señales del platino se distinguen alrededor de 1.5 eV y 2.1 eV<sup>272</sup>. Estos resultados confirman la existencia de átomos de Pt en la superficie del TiO<sub>2</sub> siguiendo la metodología de deposición por fotorreducción<sup>214</sup>, y que éstos átomos de Pt están dispersados uniformemente en los cristalitos de la anatasa.

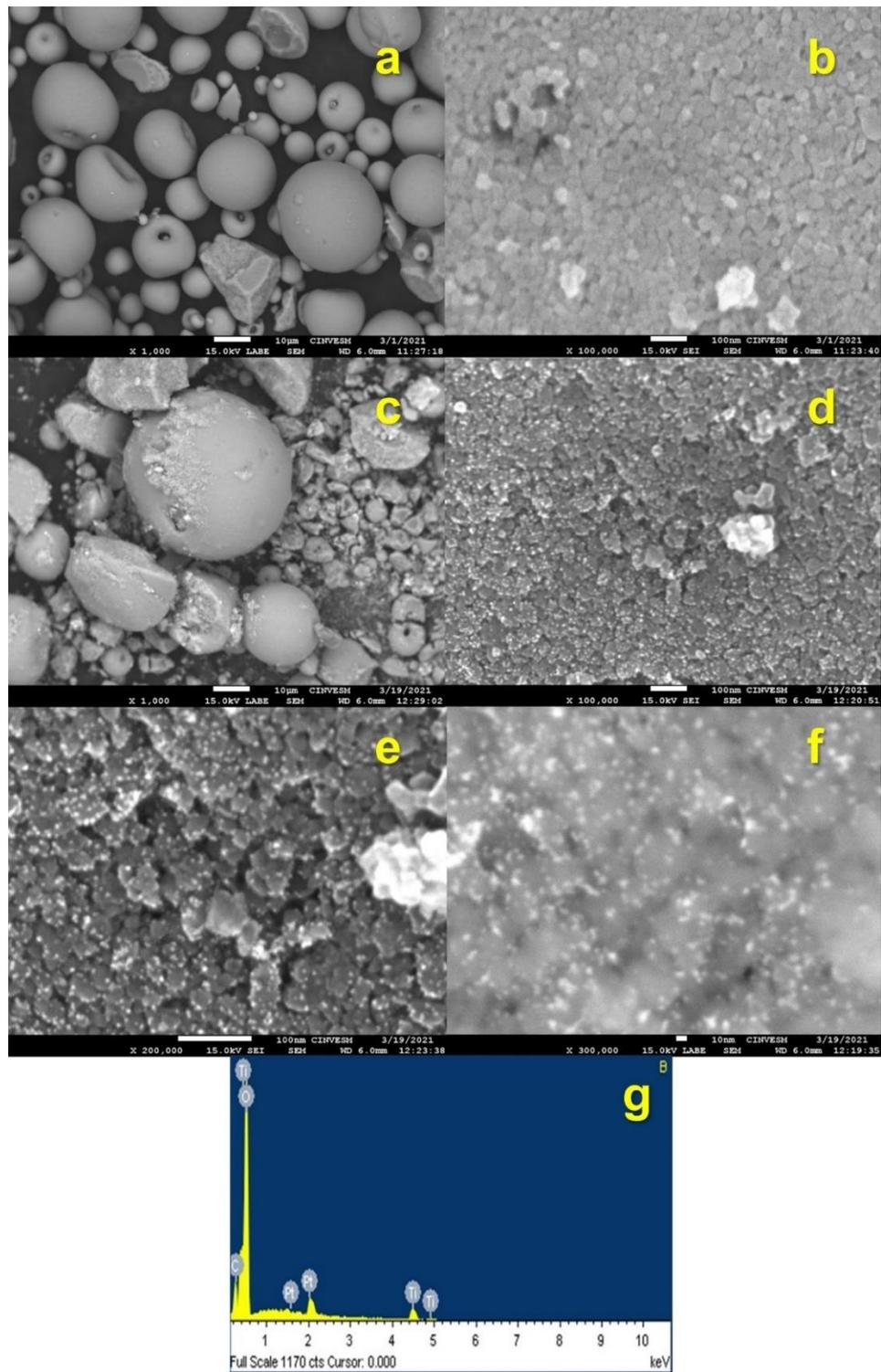


**Fig. 31.** Imágenes SEM de TiO<sub>2</sub> (a y b), TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) (c, d, e, f); y patrón DRX (g) del TiO<sub>2</sub>-Pt (FR).

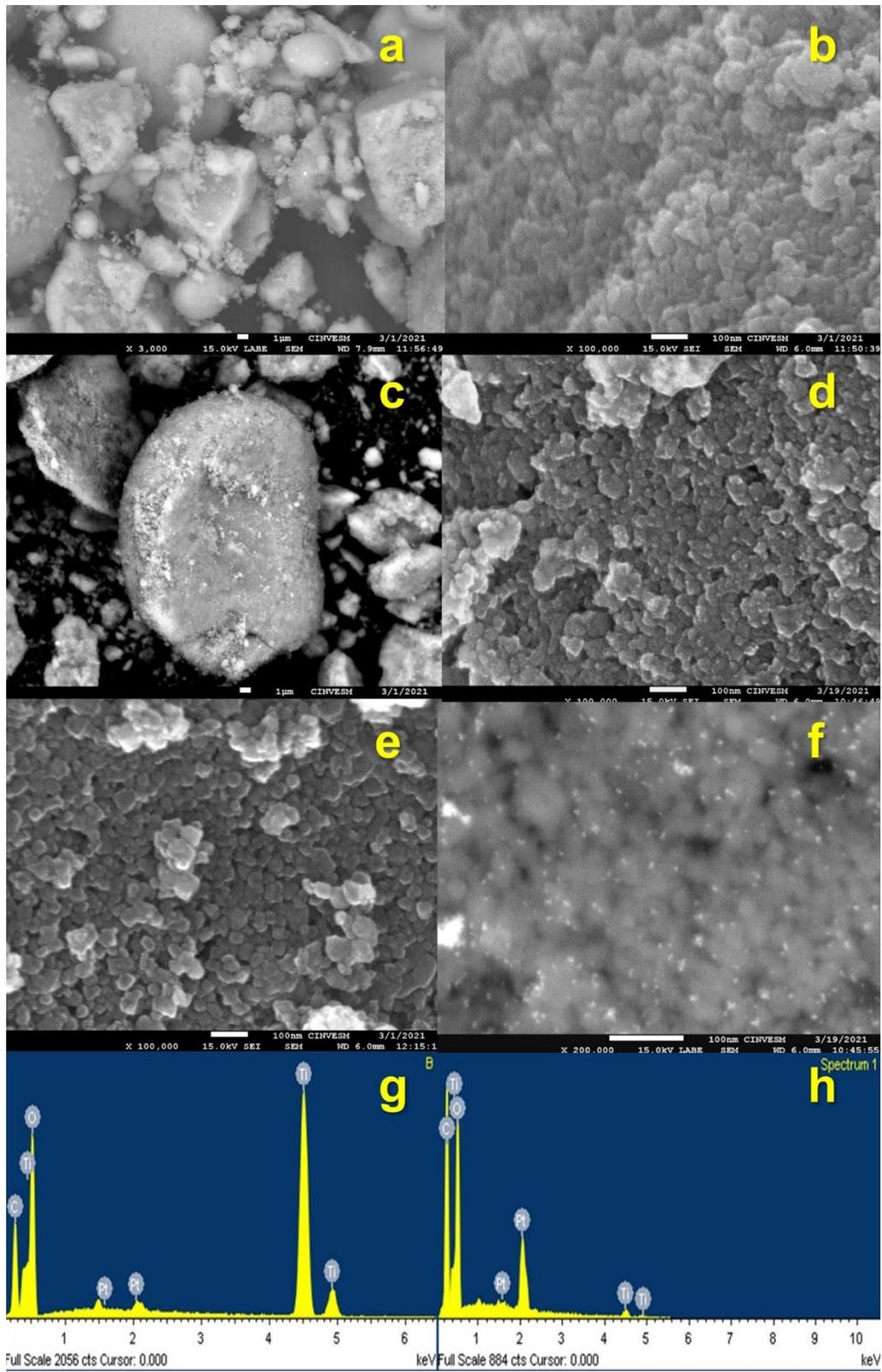
La Fig. 32 muestra las imágenes SEM del TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ); los incisos a y b de la Fig. 32 corresponden al TiO<sub>2</sub> sin modificar y que sus características morfológicas fueron discutidas en el párrafo anterior. Sin embargo, los incisos c, d, e, f y g son parte del análisis micrográfico del TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ); en la Fig. 32c se observan aglomerados irregulares de diversos tamaños entre 5 y 50 μm; mientras que en la Fig. 32d, se observan partículas de TiO<sub>2</sub> que perdieron ligeramente su forma cúbica, y que rondan entre los 20 a 40 nm. En la Fig. 32e se aprecia a una mayor magnificación la presencia de cúmulos de Pt con una mejor dispersión en la superficie del material, además de observarse mayor cantidad de cúmulos en la superficie del área analizada; los cúmulos de platino presentaron un tamaño cercano a los 2 a 10 nm; asimismo, al emplear el detector LBE (Fig. 32f) se observaron de una mejor manera los cúmulos de platino al poseer más carga, y de esta manera confirmar la adecuada dispersión del platino sobre el TiO<sub>2</sub> empleando el método de deposición por reducción química. Por otro lado, se obtuvo el patrón DRX de la muestra TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) (Fig. 32g) donde se confirmó la presencia de Ti, O y Pt en la muestra analizada. Los picos a 1.5 eV y 2.1 eV corroboraron la existencia del Pt<sup>272</sup>.

Las micrográficas pertenecientes a los materiales R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR y RQ) se muestran en la Fig. 33. Las imágenes de la Fig. 33a y b, corresponden al TiO<sub>2</sub> con la incorporación superficial de la resina sin la presencia de Pt (R-TiO<sub>2</sub>), se observaron aglomerados con morfología irregular y gran variedad de tamaños entre 1 y 20 μm; además, la morfología de las partículas se tornó modificada al observarse con formas irregulares, también se observaron aglomerados y un ligero aumento en el tamaño de la partícula (35-60 nm) con respecto al TiO<sub>2</sub> sin modificar. Las imágenes c y e (Fig. 33) pertenecen al R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), es posible observar cúmulos irregulares con diversas áreas cargadas que se observan con más brillo, debido a la naturaleza del material al poseer un metal además de un polímero semiconductor; el tamaño de partícula de este material rondó entre 40 y 60 nm; el patrón DRX del R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) demostró la presencia Ti, O, C y Pt en el área analizada. Por otra parte, las imágenes d y f (Fig. 33) que corresponden al R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) mostraron un tamaño de partícula del material de 35 a 80 nm, y la presencia de aglomerados; al emplear el detector LBE (Fig. 33f) se observaron cúmulos metálicos de Pt de forma adecuadamente distribuida de un rango de tamaño de 7 a 10 nm. Finalmente, el patrón de DRX del R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) corroboró la presencia de Ti, O, C y Pt en la superficie del material. Estos resultados demuestran la existencia de átomos de Pt

en la superficie del R-TiO<sub>2</sub> siguiendo el método de deposición por reducción química y que estos átomos de Pt están dispersados uniformemente en las partículas de R-TiO<sub>2</sub>.



**Fig. 32.** Imágenes SEM de TiO<sub>2</sub> (a y b), TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) (c, d, e, f); y patrón DRX (g) del TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ).



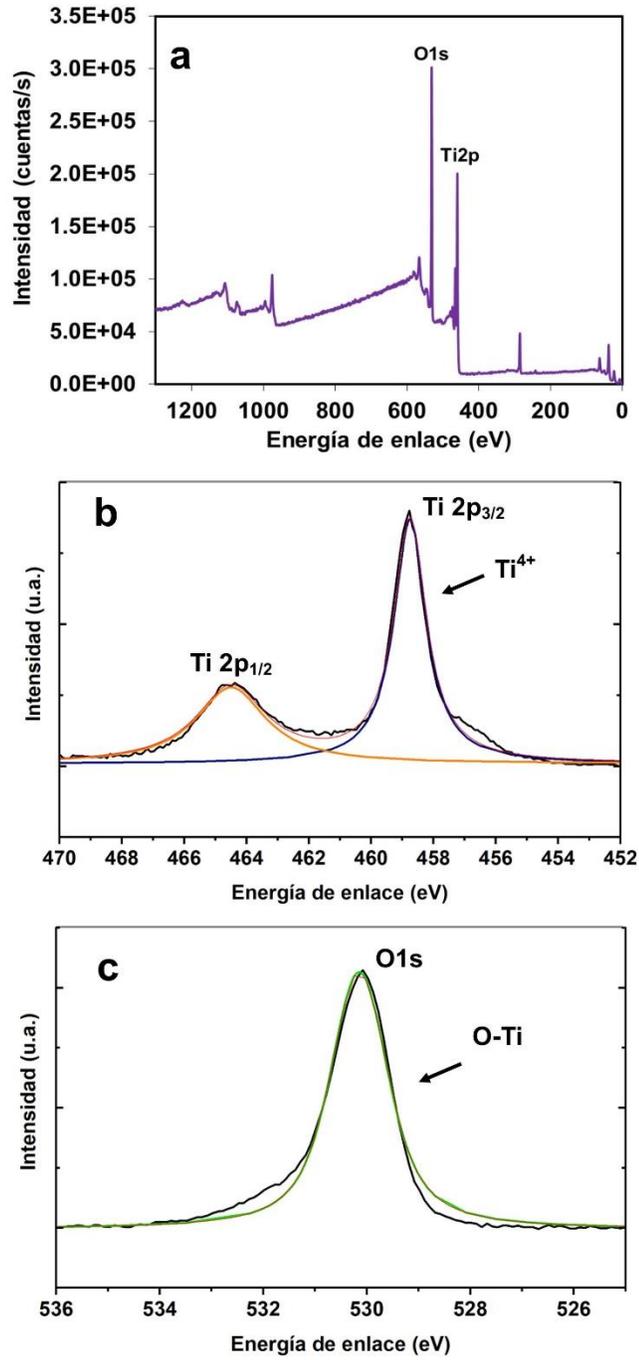
**Fig. 33.** Imágenes SEM de R-TiO<sub>2</sub> (a, b), R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) (c, e), R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) (d, f); y patrón DRX del R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) (g) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) (h).

#### 8.3.4. Análisis XPS

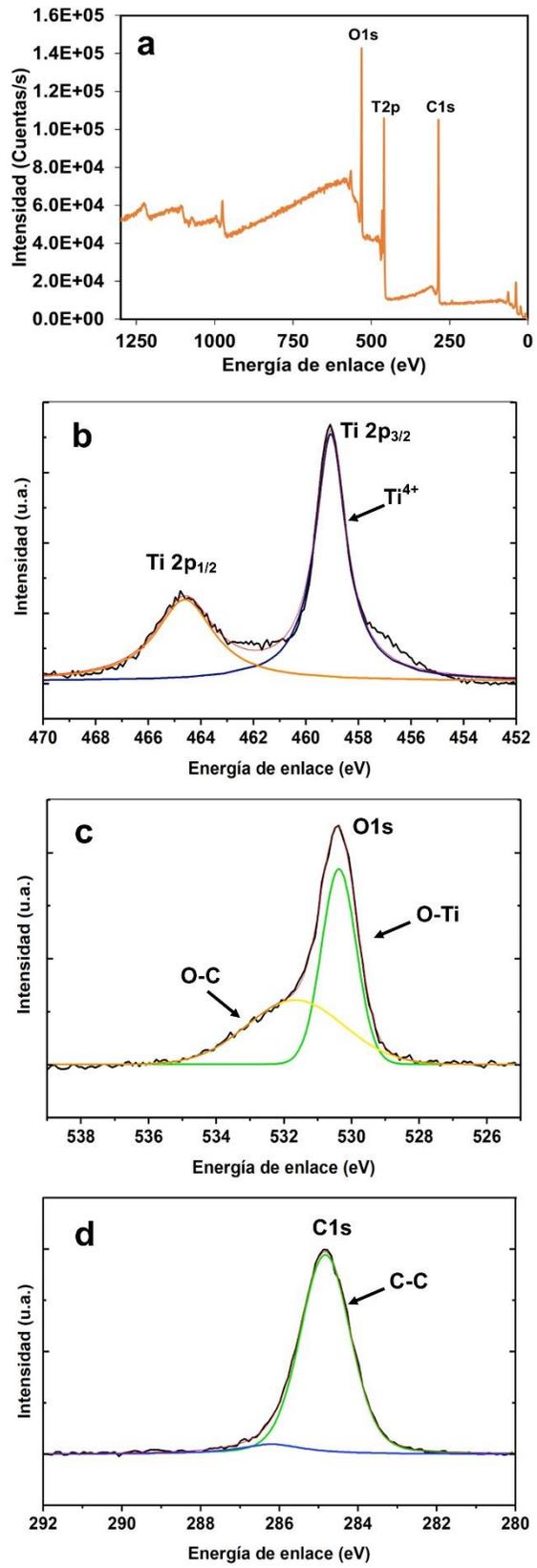
El análisis por XPS fue realizado en los diversos materiales elegidos para la producción de hidrógeno en mezclas de agentes de sacrificio para verificar el estado de oxidación esperado del cocatalizador de Pt después de la deposición por fotorreducción y reducción química; así como el análisis de los otros elementos que conforman los compósitos y sus posibles interacciones. Los espectros analizados para  $\text{TiO}_2$ , R- $\text{TiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ -Pt (FR),  $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ), R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR), y R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ) se muestran en la Fig. 34 a la 39, respectivamente. Se llevó a cabo el análisis del  $\text{TiO}_2$  empleado como matriz para corroborar los elementos que lo conforman además para realizar comparaciones entre las diversas modificaciones que sufrió; en la Fig. 34a se observa el espectro del  $\text{TiO}_2$ , y en las Figs. 34b y c, se muestran los acercamientos de las señales características de cada elemento con sus transiciones correspondientes para Ti2p y O1s, respectivamente; destacan las señales de Ti2p<sub>3/2</sub> a 458.8 eV y Ti2p<sub>1/2</sub> a 464.3 eV típicas del  $\text{TiO}_2$ ; y un pico a 530.1 eV del O1s propio de los óxidos metálicos. En la Fig. 35a se presenta el espectro XPS del R- $\text{TiO}_2$ , donde es evidente la existencia del carbono en el material, y a pesar que el  $\text{TiO}_2$  sin modificaciones presentó una señal a 284.75 eV perteneciente al C1s, ésta fue débil y podría deberse a la presencia de impurezas ubicuas del carbono; adicionalmente, en la Fig. 35d se observa a 284.8 eV el pico típico de C1s del enlace C=C (sp<sup>2</sup>), y una señal poco prominente a 286 eV del enlace C-OH, que son enlaces que se encuentran en las resinas fenólicas tipo novolacas<sup>211,213</sup>, y que confirman la incorporación de ésta en la superficie del  $\text{TiO}_2$ ; mismas señales del C1s se observaron en los materiales R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ) (Fig. 38d-39d), acompañados de un aumento en el porcentaje atómico del carbono en las muestras y una disminución del porcentaje atómico del oxígeno por la presencia del enlace C-O perteneciente a la resina fenólica (Tabla 15); por otro lado, las señales del Ti2p permanecieron en el material lo que confirma la presencia del  $\text{TiO}_2$  en el compósito.

Con respecto a los materiales con Pt como cocatalizador, se observó de manera generalizada para los semiconductores donde el Pt se depositó por fotorreducción y reducción química, con la presencia o ausencia de resina fenólica, la aparición de los picos de Pt4f<sub>7/2</sub> y Pt4f<sub>5/2</sub> característicos del Pt<sup>0</sup> (Tabla 15 y Fig. 35e-39e.); y que es evidencia de la formación de nanopartículas de Pt en la superficie de los fotocatalizadores; sin embargo, en cada material se observaron ligeras variaciones en la intensidad de los picos debido a la cantidad de Pt que posee cada semiconductor, por lo

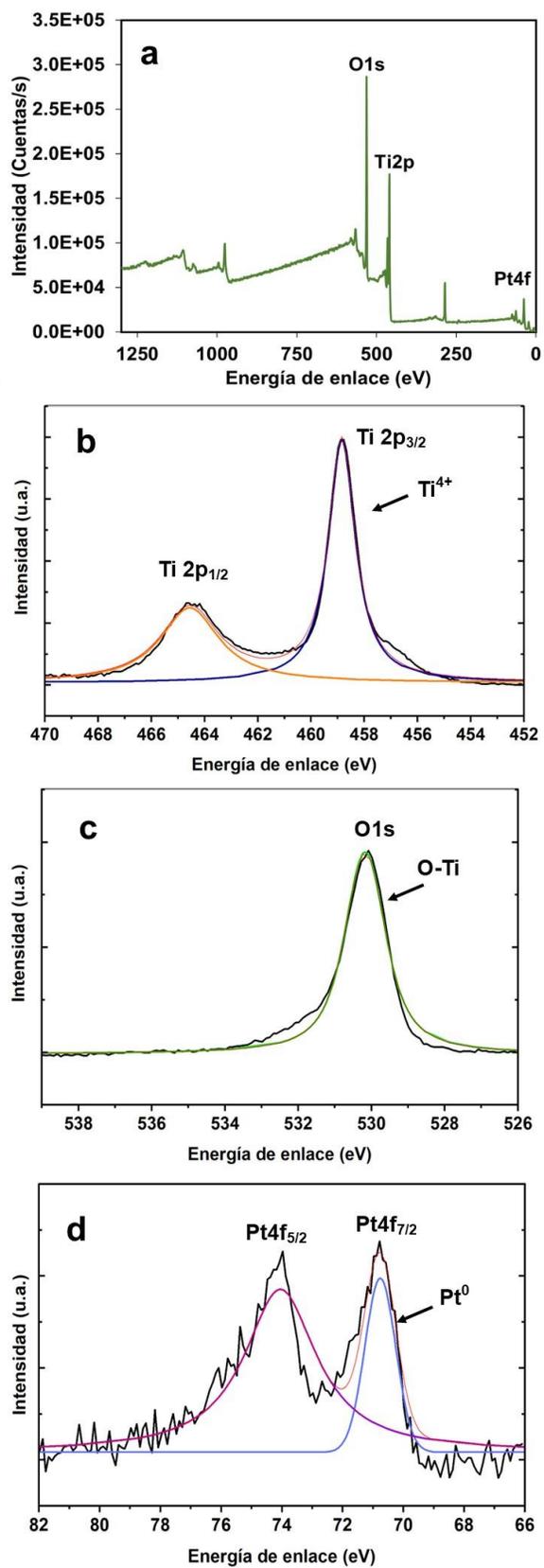
que es evidente el papel del método de deposición del metal sobre el fotocatalizador; siendo TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) el que presentó mayor intensidad en los picos y que de acuerdo al porcentaje atómico corresponde a 1.46% de Pt en el material; seguido por el R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) con 1% atómico, R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) con 0.64% atómico y, finalmente, TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) con 0.37%; es necesario recordar que el porcentaje teórico incorporado en los dos métodos de deposición del metal fue del 1.5 wt%, lo que destaca que la deposición por reducción química fue mejor al poseer un agente reductor poderoso como el NaBH<sub>4</sub> y proporcionar la energía necesaria para reducir el Pt hasta su estado elemental, y así éste quedara incorporado en la superficie del TiO<sub>2</sub>. Con relación al método de deposición por fotorreducción, es posible que la energía de las lámparas empleadas no haya sido suficiente para la reducción completa del Pt, aunado a los efectos de recombinación que sufre el TiO<sub>2</sub> que afectan la disponibilidad de electrones para los procesos de reducción del sistema. Con respecto a los materiales sin resina fenólica (TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ)), es relevante mencionar que las energías de enlace de la transición Pt4f<sub>7/2</sub> fueron ligeramente menores (Tabla 15) a las obtenidas por los materiales con resina fenólica (R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ)), es decir, 0.87 eV y 0.34 eV menor, para la RQ y FR, respectivamente. Este desplazamiento en energía de enlace se atribuye a una mejora en la interacción metal-soporte, y este efecto se conoce como SMSI (*Strong Metal-Support Interaction*)<sup>273</sup>. Algunos autores atribuyen la baja energía de enlace del Pt u otros metales a la existencia de algunos átomos de metal en la superficie con un número de coordinación bajo en sus partículas de metal ultrafino<sup>274,275</sup>. Por otro lado, los materiales con resina (R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ)), presentaron un ligero aumento en la energía de enlace de las transiciones Pt4f<sub>7/2</sub> y Pt4f<sub>5/2</sub>, lo que podría significar que algunas especies con estados de oxidación mayor como PtO y PtO<sub>2</sub> podrían estar presentes en la superficie del R-TiO<sub>2</sub><sup>150</sup>, lo que podría sugerir a un secuestro de los electrones por la resina fenólica en el proceso de reducción del Pt durante la deposición y, de esta manera, causar efectos adversos en la reducción total del Pt a su estado metálico.



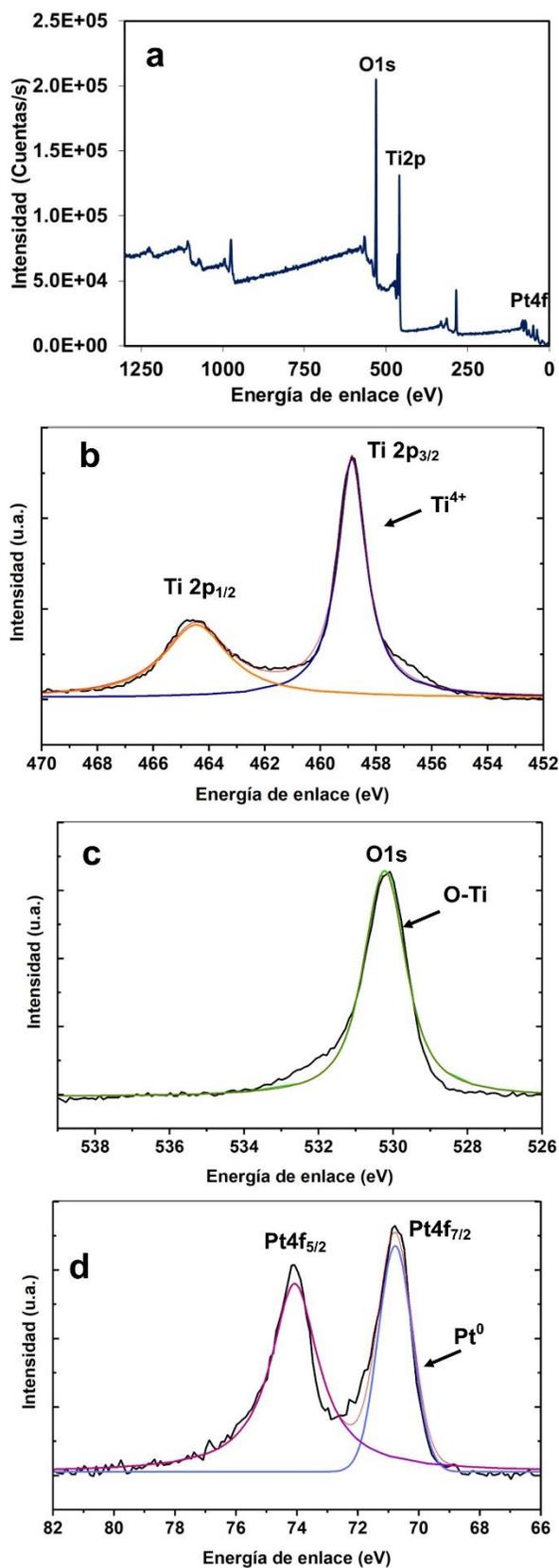
**Fig. 34.** Espectros XPS del  $\text{TiO}_2$ (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c).



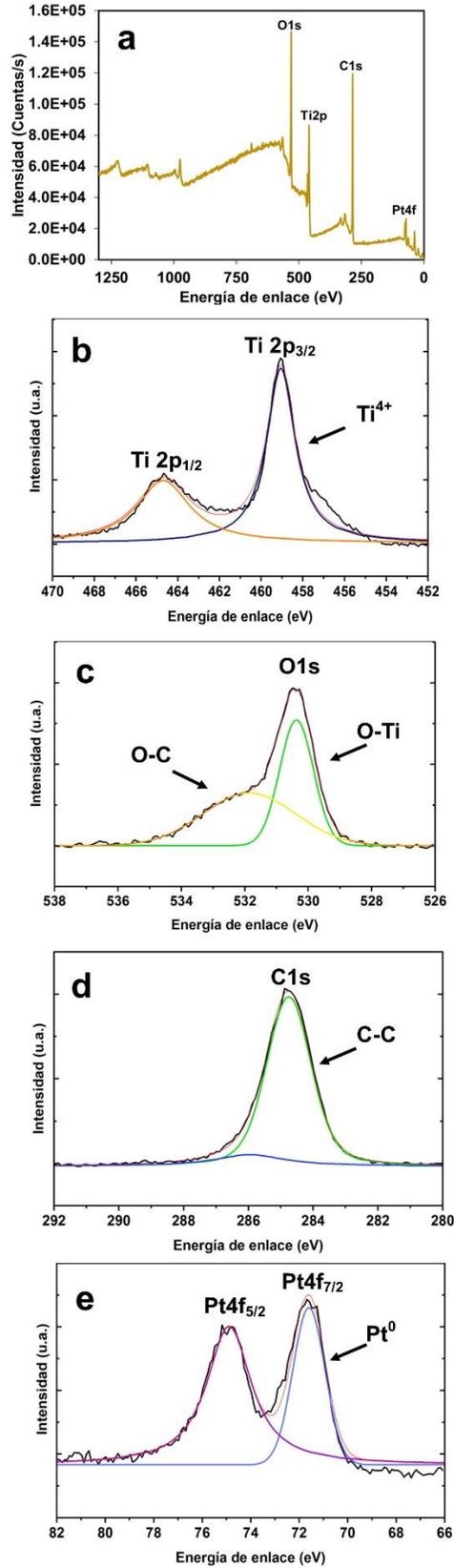
**Fig. 35.** Espectros XPS del R-TiO<sub>2</sub>(a). Espectros Ti2p (b), O1s (c) y C1s (d).



**Fig. 36.** Espectros XPS del TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c) y Pt4f (d).



**Fig. 37.** Espectros XPS del TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c) y Pt4f (d).



**Fig. 38.** Espectros XPS del R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c), C1s (d) y Pt4f (e).

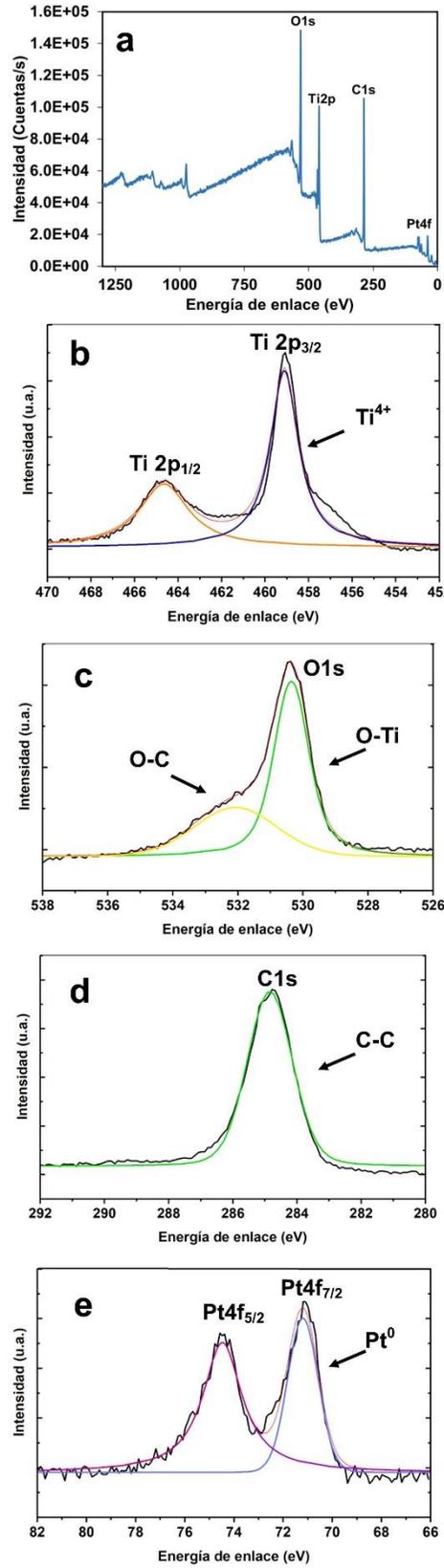


Fig. 39. Espectros XPS del R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) (a). Espectros Ti2p (b), O1s (c), C1s (d) y Pt4f (e).

**Tabla 15.** Energías de enlace de C1s, Ti2p, O1s y Pt4f y contribuciones porcentuales de cada elemento en los semiconductores evaluados.

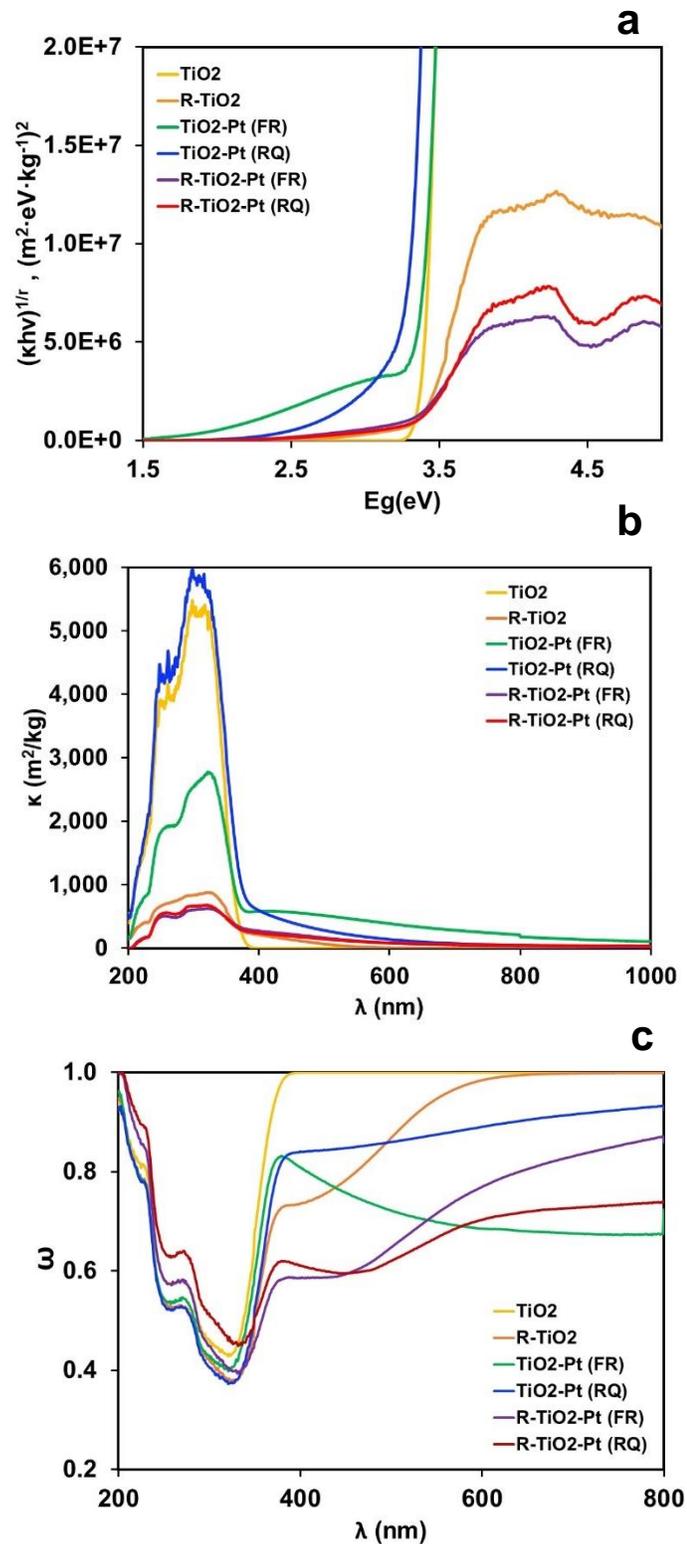
Material	Método de deposición	Elemento	Pico de energía de enlace (eV)	% atómico	R <sup>2</sup> deconvolución
R-TiO <sub>2</sub> -Pt	FR	C1s	284.74	63.71	0.9982
		Ti2p	459.04	9.04	0.9718
		O1s	530.41	26.25	0.9971
		Pt4f	71.64	1	0.9703
R-TiO <sub>2</sub> -Pt	RQ	C1s	284.8	58.81	0.987
		Ti2p	459.05	11.15	0.9658
		O1s	530.38	29.4	0.9939
		Pt4f	71.1	0.64	0.9617
TiO <sub>2</sub> -Pt	FR	C1s	284.8	32.25	0.9993
		Ti2p	458.82	19.91	0.9855
		O1s	530.11	47.47	0.9839
		Pt4f	70.77	0.37	0.766
TiO <sub>2</sub> -Pt	RQ	C1s	284.83	33.77	0.9992
		Ti2p	458.87	19.07	0.9861
		O1s	530.17	45.7	0.9813
		Pt4f	70.76	1.46	0.9696
R-TiO <sub>2</sub>	NA	C1s	284.84	59.45	0.9989
		Ti2p	459.06	11.21	0.984
		O1s	530.41	29.34	0.997
TiO <sub>2</sub>	NA	C1s	284.75	25.85	0.999
		Ti2p	458.79	22.12	0.9848
		O1s	530.1	52.03	0.9862

FR: fotorreducción, RQ: reducción química

### 8.3.5. Propiedades ópticas

Para conocer las propiedades ópticas de los materiales evaluados en la producción de hidrógeno se realizaron análisis de reflectancia difusa y extintancia. En la Fig. 40a, se observan las energías de banda prohibida ( $E_g$ ) estimadas a partir de la función de Kubelka-Munk de los diversos materiales estudiados; las  $E_g$  cambian durante la fotorreacción como consecuencia de la exposición del fotocatalizador a los fotones a diferentes energías. La  $E_g$  del TiO<sub>2</sub> sin modificar fue de 3.3 eV, mientras que al incorporar la resina fenólica en la estructura (R-TiO<sub>2</sub>) se obtienen dos bandas, una a 3.25 eV

correspondiente al  $\text{TiO}_2$  y otra banda atenuada a 2.55 eV perteneciente a la resina fenólica<sup>276</sup>; este efecto de mostrar dos bandas de energía prohibida similares coincidió con los materiales R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ), dichos valores de  $E_g$  se encuentran en la Tabla 16. Por otro lado, los materiales  $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y  $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ) presentaron una ligera disminución en la  $E_g$ , registrando 3.25 eV y 3.2 eV, respectivamente; este ligero desplazamiento se debe al efecto que tiene el Pt sobre el material al incidir energía sobre él. Adicionalmente, en las Figs. 40b y 40c se muestran el coeficiente de absorción ( $\kappa$ ) y el albedo de dispersión ( $\omega$ ) en todo el rango UV-Visible para los materiales evaluados. En la Fig. 40b se observa que todos los materiales presentan mayor capacidad de absorción de fotones en un rango de 200 nm a 400 nm, y presentan una longitud de onda óptima de activación en este rango (Tabla 16). Asimismo se destaca que por encima de 400 nm, los materiales  $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y  $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ) presentan un ligero aumento en su capacidad de absorber fotones; este hecho, junto con los valores registrados por los albedos de dispersión a longitudes de onda en el rango visible podría estar relacionado a los efectos por el tamaño cuántico de las nanopartículas de Pt depositadas en la superficie del fotocatalizador generando un efecto LSPR (*Localized Surface Plasmon Resonance*)<sup>161,185,277</sup>, este fenómeno puede provocar una mejora en la absorción de luz visible debido al hecho que la frecuencia de los fotones, que inciden en el material, está resonando con las excitaciones colectivas de los electrones de conducción de las nanopartículas de los metales nobles. De acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 16, a 365 nm el  $\text{TiO}_2$  sin modificación solo alcanza un 12% de aprovechamiento de la energía incidida, y al incorporar el Pt en la superficie del  $\text{TiO}_2$  logra aumentar a 22% y 30% para  $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y  $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ), respectivamente; esto se ve relacionado también con los valores de los coeficientes de dispersión ( $\sigma$ ). Con respecto a los materiales con resina fenólica, ambos (R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ)) presentaron una capacidad mayor de aprovechar la energía; sin embargo, su capacidad de absorción fue menor (Tabla 16).



**Fig. 40.** Tauc-plot (a), coeficiente de absorción ( $\kappa$ , b) y albedo de dispersión ( $\omega$ , c) de los semiconductores evaluados para la producción de hidrógeno.

**Tabla 16.** Propiedades fisicoquímicas de los semiconductores evaluados en la producción de hidrógeno.

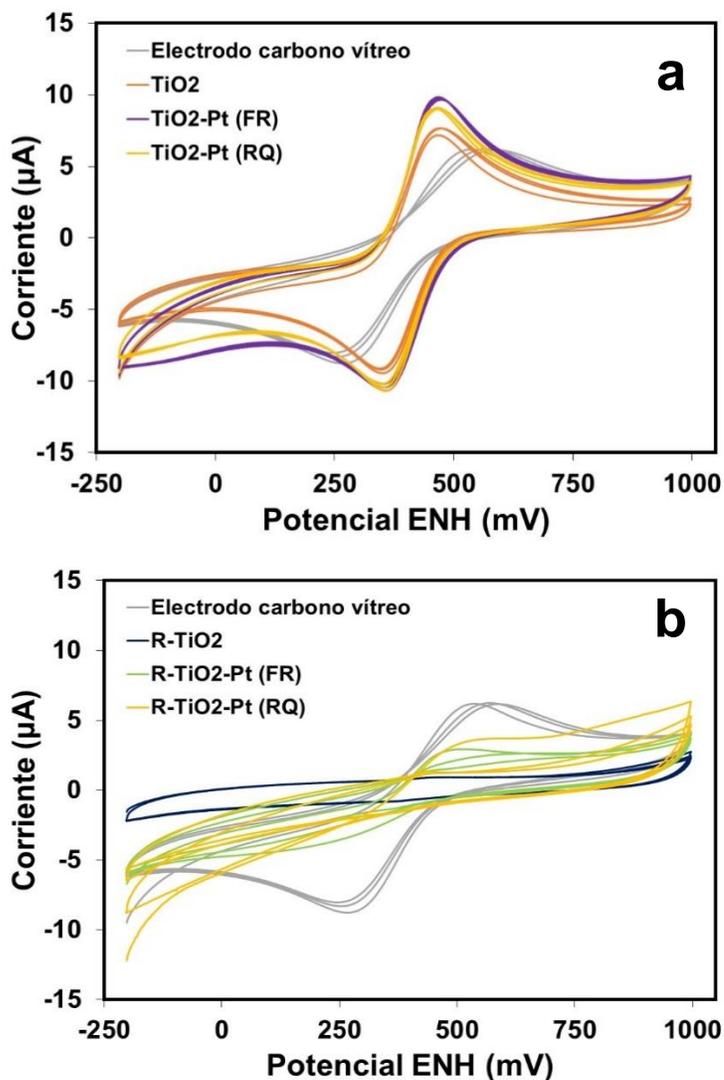
Material	TiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> -Pt	TiO <sub>2</sub> -Pt	R	R-TiO <sub>2</sub>	R-TiO <sub>2</sub> -Pt	R-TiO <sub>2</sub> -Pt
<b>Método de deposición</b>	NA	FR	RQ	NA	NA	FR	RQ
<b>E<sub>g</sub> (eV)</b>	3.3	3.25	3.2	2.5	3.3 2.55	3.28 2.3	3.25 2.3
<b>E<sub>BC</sub> (eV)*</b>	-0.4	-0.6	-0.5	ND	ND	ND	ND
<b>E<sub>BV</sub> (eV)*</b>	2.9	2.65	2.7	ND	ND	ND	ND
<b>λ<sub>act</sub> (nm)</b>	375.71	381.49	387.45	495.94	375.71 486.21	378.00 539.06	381.49 539.06
<b>ω<sub>365nm</sub></b>	0.88	0.78	0.70	0.35	0.66	0.54	0.58
<b>σ<sub>365nm</sub> (m<sup>2</sup>/kg)</b>	4537.9	2926.4	3576.6	28	682.2	428.7	468.8
<b>K<sub>365nm</sub> (m<sup>2</sup>/kg)</b>	634.6	848.2	1510.7	51.14	351.9	361.2	335.0

NA: No aplica; ND: No determinado; FR: Fotorreducción; RQ: Reducción química; R: Resina fenólica; BC: Banda de conducción; BV: Banda de valencia. \*E<sub>BC</sub> y E<sub>BV</sub> fueron determinados por espectrofotometría XPS

#### 8.4. Voltamperometrías cíclicas

Las voltamperometrías cíclicas se llevaron a cabo para conocer parte del comportamiento electroquímico de los materiales empleando un par redox en un sistema electrolítico favorable (Fig. 41). En la Fig. 41a, se muestran los voltamperogramas para los materiales sin resina fenólica (TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ)), así como el desempeño del electrodo de carbono vítreo donde se montaron las películas de los materiales; se puede observar los picos redox bien definidos de la oxidación del Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup> y la reducción del Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> para los tres materiales, sin embargo, se observa claramente un ligero incremento en la corriente en los materiales con Pt en su composición, lo que se traduce a una mejor transferencia de electrones debido al metal presente en el material. Por otro lado, en la Fig. 41b, se muestran los voltamperogramas para los materiales con resina fenólica en su composición (R-TiO<sub>2</sub>, R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ)), así como la ventana de potencial obtenida por el electrodo de carbono vítreo; en estos materiales fue posible observar un comportamiento similar, específicamente al presentarse una reducción notoria en la abertura de la ventana de

potencial en los materiales con resina fenólica; en los materiales con Pt se observó un ligero incremento en la corriente así como en la definición de los picos anódico y catódico de la especie redox; esta tendencia se relaciona a la baja conductividad de estos materiales, de esta manera la presencia de la resina fenólica en los fotocatalizadores reduce la transferencia de electrones hacia el  $\text{TiO}_2$  y/o al Pt; y posiblemente su desempeño fotocatalítico.

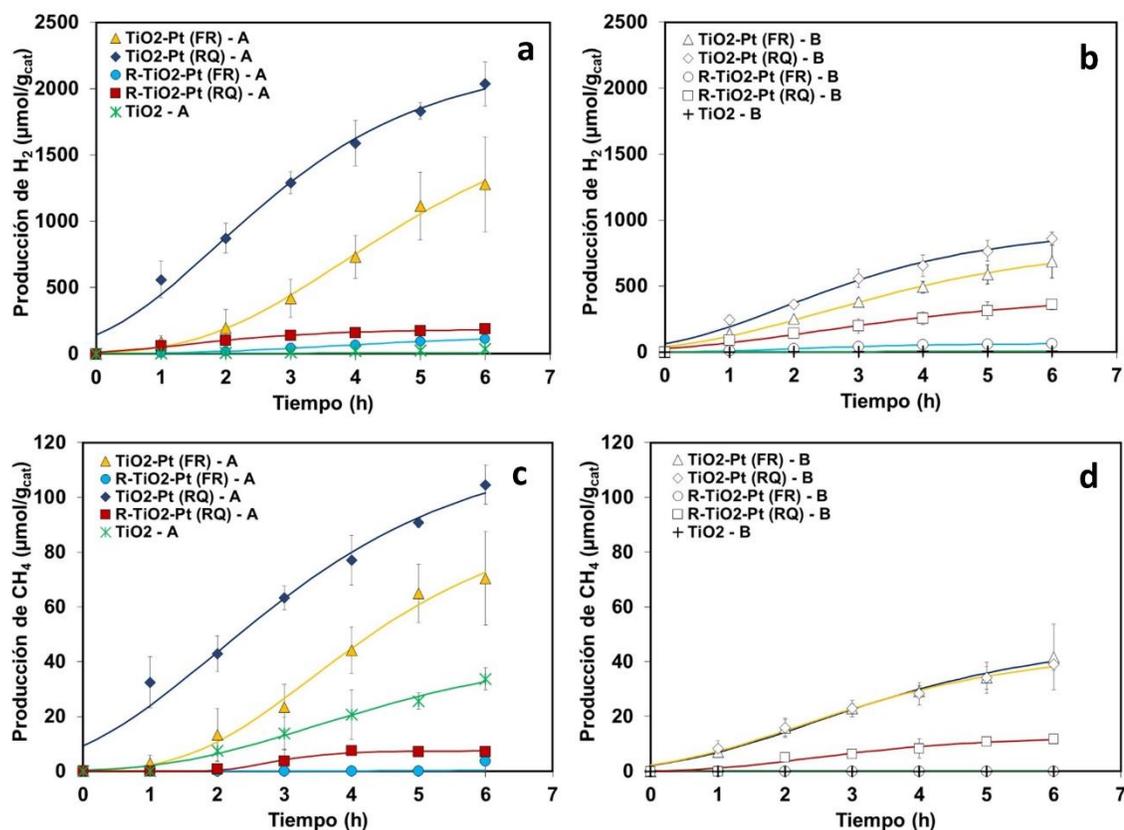


**Fig. 41.** Voltamperogramas de semiconductores sin resina (a) y semiconductores con resina (b) a una velocidad de escaneo de 50 mV/s, usando hexaferrocianato de sodio (1 mM) en KCl 1 M.

### 8.5. Efecto del tipo de matriz en la producción de hidrógeno por el fotorreformado de la mezcla de agentes de sacrificio

Una vez realizada la caracterización de los fotocatalizadores, se efectuaron ensayos de producción de hidrógeno por fotorreformado de la mezcla de agentes de sacrificio que se encuentran en un efluente de un bioproceso fermentativo, el cual contiene un medio rico en sales como fosfatos y cloruros con el objeto de amortiguar los cambios de pH generados por los subproductos ácidos de la fermentación de glucosa. Los experimentos fotocatalíticos se llevaron siguiendo las condiciones reportadas en la sección de la metodología y fueron irradiados con luz UV LED (365 nm). La composición de la mezcla de agentes de sacrificio fue ácido acético (10 mM), ácido butírico (4.5 mM), etanol (8.5 mM) y butanol (1.7 mM), bajo las concentraciones similares a los subproductos obtenidos de la fermentación oscura de dextrosa<sup>278</sup>. Cabe mencionar que las tasas máximas de producción de hidrógeno ( $R_{max_{FH}}$ ), así como la producción máxima de hidrógeno ( $H_{max_{FH}}$ ) fueron estimadas empleando el modelo de Gompertz modificado (Ec. 5). En la Fig. 42 se observan las cinéticas del fotorreformado de la mezcla de agentes de sacrificio empleando los fotocatalizadores  $TiO_2$ -Pt (FR),  $TiO_2$ -Pt (RQ), R- $TiO_2$ -Pt (FR), y R- $TiO_2$ -Pt (RQ) bajo una matriz de agua desionizada a pH 5.3 (a) y una matriz de buffer fosfatos a pH 5.3 (b) para la producción de hidrógeno. De acuerdo con la Fig. 39a, bajo la matriz de agua desionizada se alcanzó la mayor producción de hidrógeno, siendo  $TiO_2$ -Pt (RQ) el que mejor desempeño presentó con 2217.7  $\mu\text{mol}/g_{\text{cat}}$ , luego  $TiO_2$ -Pt (FR) con 1874.4  $\mu\text{mol}/g_{\text{cat}}$ , muy por encima del  $TiO_2$  sin modificar que solo alcanzó 79.5  $\mu\text{mol}/g_{\text{cat}}$ ; estos resultados están relacionados a la incorporación del Pt metálico en el  $TiO_2$  que crea una barrera de Schottky que captura los electrones fotogenerados y esto provoca una notoria mejora en la actividad fotocatalítica<sup>151,279</sup>. El  $TiO_2$ -Pt sintetizado por reducción química logró una mayor producción de hidrógeno que el sintetizado por fotorreducción, de acuerdo a los resultados obtenidos por XPS, la cantidad de Pt sobre el fotocatalizador fue de 1.46% atómico por reducción química, mientras que por fotorreducción fue 0.37% atómico, lo que podría estar relacionado con la mejora en la producción de hidrógeno<sup>280</sup>; adicional a esto, los efectos de tipo LSPR generado por el Pt metálico. Asimismo, las tasas de producción de hidrógeno para estos materiales presentaron la misma tendencia (Tabla 17), ya que el  $TiO_2$ -Pt (RQ) fue casi 30% más rápida que el  $TiO_2$ -Pt (FR). Por otro lado, los materiales con resina fenólica obtuvieron una muy baja producción de hidrógeno comparado con los materiales con la ausencia de la resina fenólica,

obteniendo 157.4 y 185.8  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ , para R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ), respectivamente, siendo alrededor de 10 veces menor a los materiales sin resina fenólica. Este hecho puede estar relacionado con varias características del material como lo fue el área superficial de los fotocatalizadores sintetizados con la resina fenólica, al presentar áreas 3 veces menores a los fotocatalizadores sin la resina fenólica (Tabla 14), lo que se traduce a una disminución en los sitios fotoactivos. Adicionalmente, las pruebas electroquímicas realizadas a través de las voltamperometrías mostraron una disminución importante en la ventana de potencial, lo que significa una menor capacidad de transferencia de electrones de estos materiales modificados con la resina fenólica (Fig.41b). Estas propiedades mencionadas podrían atribuir el deficiente desempeño de estos fotocatalizadores, ya que la interacción que tiene la resina con el TiO<sub>2</sub> provoca un cambio en el mecanismo fotocatalítico del semiconductor; es posible que la resina fenólica captura parte de los electrones de la banda de conducción del TiO<sub>2</sub> y los distribuye por su matriz polimérica hacia otras reacciones de reducción, impidiendo que el Pt pueda cumplir con su función reductora de protones y de este modo reduciendo su capacidad de reducción; sin embargo, el fotocatalizador no pierde su capacidad oxidante al continuar degradando los agentes de sacrificio presentes en la mezcla de reacción (Fig. 46). El uso de resina fenólica tipo novolaca como fotocatalizador ha sido evaluada en la degradación de contaminantes orgánicos como colorantes<sup>276</sup>, y se destaca el tipo de mecanismo de sensibilización que tiene sobre fotocatalizadores como TiO<sub>2</sub>, el efecto se conoce, por sus siglas en inglés, como LMCT (*Ligant-to-metal charge transfer*) y ocurre entre la superficie del adsorbato y el fotocatalizador; el electrón es fotoexcitado directamente desde el adsorbato en estado fundamental a la banda de conducción de semiconductores mientras que la sensibilización del colorante común está mediada por los estados excitados del colorante<sup>212</sup>. Este fenómeno podría estar asociado a la captura de electrones sobre la red polimérica y, en el caso de este estudio, el papel resultó perjudicial al no transferir los electrones al Pt efectivamente (Fig. 42).



**Fig. 42.** Cinéticas de producción de hidrógeno y metano de los semiconductores evaluados bajo diferentes matrices. a: H<sub>2</sub>, matriz agua desionizada; b: H<sub>2</sub>, matriz buffer; c: CH<sub>4</sub>, matriz agua desionizada; d: CH<sub>4</sub>: matriz buffer.

**Tabla 17.**  $H_{max_{FH}}$  y  $R_{max_{FH}}$  de las cinéticas de producción de H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> de los semiconductores evaluados bajo diferentes matrices.

Material	Matriz	Hidrógeno			Metano		
		$H_{max_{FH}}$ (µmol/g <sub>cat</sub> )	$R_{max_{FH}}$ (µmol/g <sub>cat</sub> h)	R <sup>2</sup>	$H_{max_{FH}}$ (µmol/g <sub>cat</sub> )	$R_{max_{FH}}$ (µmol/g <sub>cat</sub> h)	R <sup>2</sup>
TiO <sub>2</sub> -Pt (FR)	Agua	1874.4	317.8	0.998	92.9	18.5	0.996
	Buffer	819.4	137.4	0.997	48.4	8.3	0.995
TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ)	Agua	2217.7	445.1	0.994	119.1	20.3	0.989
	Buffer	932.4	185.5	0.993	44.5	8.1	0.996
R-TiO <sub>2</sub> -Pt (FR)	Agua	157.4	26.9	1.000	4.7	7.6	1.000
	Buffer	64.3	17.4	0.998	0.0	0.0	0.000
R-TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ)	Agua	185.8	52.0	0.996	7.4	4.5	0.991
	Buffer	442.1	68.7	0.994	12.6	3.0	0.985
TiO <sub>2</sub>	Agua	79.5	8.8	0.997	44.5	7.5	0.995
	Buffer	8.1	1.6	0.986	0.0	0.0	0.000

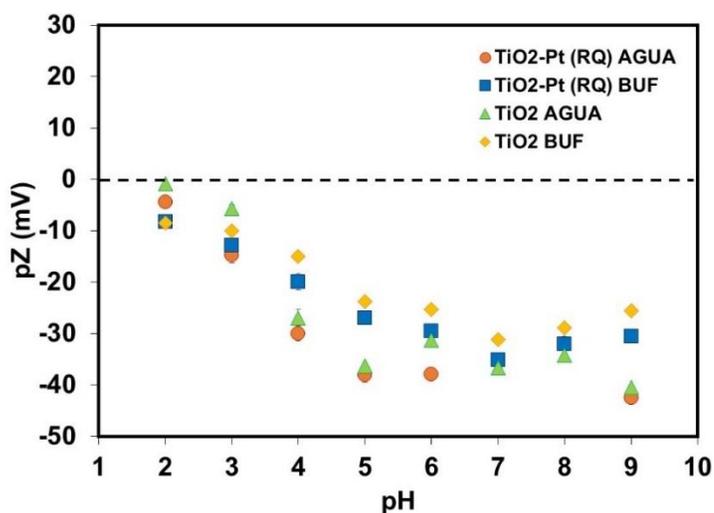
Por otro lado, se realizaron zetametrias de los diversos materiales sintetizados así como sus respectivos controles ( $\text{TiO}_2$  y R- $\text{TiO}_2$ ) bajo las diferentes matrices evaluadas al pH que se llevaron a cabo las cinéticas de fotorreformado (pH 5.3), con la finalidad de conocer la carga superficial que adquiere la partícula en los medios de estudio y relacionar que tipo de interacción electrostática existe entre las partículas. Los resultados se muestran en la Tabla 18, donde todos los materiales evaluados mostraron un potencial Z (pZ) negativo tanto en agua desionizada como en buffer a pH 5.3, lo que sugiere a que los materiales poseen una carga superficial negativa bajo estas condiciones. Posteriormente, se realizó el análisis de pZ en un rango de pH de 2 a 9 para conocer el punto de carga cero (PCZ) del material, estas pruebas se llevaron a cabo para el material que mejor desempeño mostró en el fotorreformado para la producción de hidrógeno, que fue el  $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ), también se realizaron las mismas pruebas al  $\text{TiO}_2$  sin modificar como control. En la Fig. 43, se observa que bajo el estudio de ambas matrices (agua desionizada y buffer fosfatos) el  $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ) permanece con una carga superficial negativa en todo el rango de pH evaluado, comportamiento similar que se presentó con el  $\text{TiO}_2$  sin modificar. En diversos estudios se reporta el punto de carga cero del  $\text{TiO}_2$  en forma general entre 3 y 6; sin embargo, existen diversos factores que influyen en las características superficiales que puede tener este compuesto, así como su fase cristalina. Zhou *et al.*<sup>281</sup>, demostraron que el tamaño de partícula, tanto para la fase cristalina rutilo como la fase anatasa, influye en la carga superficial de la partícula dirigiéndose a valores más negativos cuando el tamaño aumenta; específicamente, para la anatasa reportan que por encima de un tamaño de partícula mayor a 30 nm, el PCZ tiende a valores de pH menores. En relación con el sistema fotorreactivo, estas características son de gran apoyo para elucidar las posibles interacciones electrostáticas que pueden existir entre los semiconductores y las especies reactivas orgánicas presentes, y así relacionarlo con el desempeño del fotocatalizador. Los agentes de sacrificio en la reacción de fotorreformado fueron ácido acético, ácido butírico, etanol y butanol a diferentes concentraciones, estos compuestos orgánicos poseen diferentes valores de pKa (Tabla 19) que es una magnitud para cuantificar la tendencia de las moléculas a disociarse en una solución acuosa; a pH 5.3 se desarrollaron las cinéticas de fotorreformado para la producción de hidrógeno, por lo que la fracción de disociación y protonación para cada especie fue diferente. Dado que el pZ a pH 5.3 de todos los materiales fue negativo bajo las dos matrices evaluadas, se podría llevar a cabo una mayor atracción electrostática entre los alcoholes (etanol y butanol) al encontrarse en su

mayoría en estado no disociado, y así ser oxidados para la liberación de protones al medio para su posterior reducción a H<sub>2</sub>; mientras que, alrededor del 25% de la cantidad de moléculas de los ácidos carboxílicos a pH 5.3, tanto ácido acético, como ácido butírico, se encuentran no disociados; lo que resulta en una menor atracción electroestática con el fotocatalizador (Anexos J). De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 11, al evaluar los agentes de sacrificio de manera individual, se observa una mayor producción de hidrógeno al emplear etanol y butanol, mientras que el ácido acético y butírico alcanzan menores cantidades producidas; estos resultados podrían estar relacionados directamente al tipo de interacciones discutidas en este apartado. Sin embargo, al emplear una mezcla de agentes de sacrificio podrían darse otro tipo de fenómenos que redirijan la afinidad de los compuestos orgánicos a ser oxidados.

**Tabla 18.** Potencial zeta de los semiconductores bajo diferentes matrices a pH 5.3.

Material	Agua desionizada		Buffer	
	pZ (mV)	IC (mV)	pZ (mV)	IC (mV)
TiO <sub>2</sub>	-29.63	2.14	-20.97	1.31
TiO <sub>2</sub> -Pt (FR)	-30.33	1.59	-17.20	0.90
TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ)	-35.07	1.54	-22.63	0.75
R-TiO <sub>2</sub>	-25.83	0.73	-10.87	1.31
R-TiO <sub>2</sub> -Pt (FR)	-25.53	0.91	-6.22	1.15
R-TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ)	-26.03	2.56	-9.14	0.33

pZ: potencial Zeta, IC: intervalo de confianza



**Fig. 43.** Punto de carga cero del TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) y TiO<sub>2</sub> en matriz de buffer y agua desionizada.

**Tabla 19.** Constantes de disociación de los agentes de sacrificio empleados en la mezcla para el fotorreformado.

Agente de sacrificio	pKa	Concentración en la mezcla (mM)	Fracción de la especie no disociada a pH 5.3	Fracción de la especie disociada a pH 5.3
Ácido acético	4.8	10	0.24	0.76
Ácido butírico	4.82	4.5	0.25	0.75
Etanol	15.9	8.5	1	2.5x10 <sup>-11</sup>
Butanol	16	1.7	1	1.99x10 <sup>-11</sup>

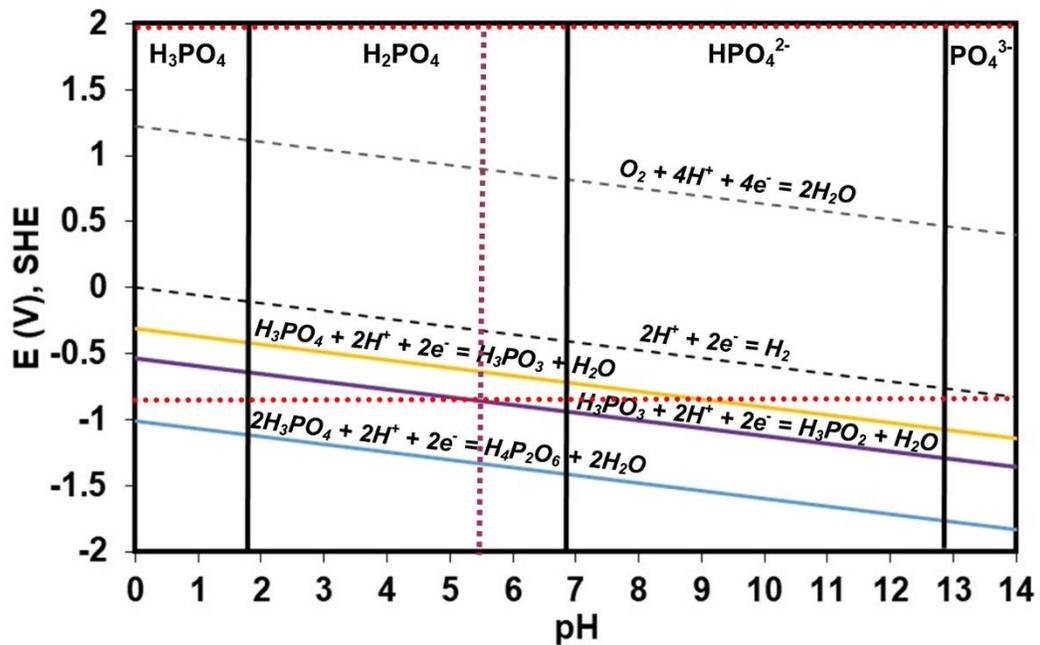
Debido a que el efluente de la fermentación oscura contiene aniones inorgánicos como fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) y cloruros (Cl<sup>-</sup>) por la composición química del buffer empleado (composición descrita en sección 7.2.6), fue trascendente evaluar una matriz del mismo buffer utilizado en la fermentación durante las pruebas fotocatalíticas de producción de hidrógeno en las mezclas de agentes de sacrificio. Las cinéticas de producción de hidrógeno, empleando buffer como matriz, se muestra en la Fig. 42b. De manera general se observa una disminución en la producción de hidrógeno para la mayoría de los materiales evaluados, se puede destacar que el desempeño de los mejores materiales en la matriz de agua disminuyó drásticamente hasta más del 50% con la matriz de buffer. La producción de hidrógeno más alta usando buffer como matriz fue obtenida por el TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) con 932.4 μmol/g<sub>cat</sub>, y para el TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) con 819.4 μmol/g<sub>cat</sub>, seguido por los materiales con resina fenólica produciendo 442.1 μmol/g<sub>cat</sub> y 64.3 μmol/g<sub>cat</sub> para R-TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (FR), respectivamente. Las tasas de producción siguen la misma tendencia (Tabla 16).

Los aniones tienen la habilidad de competir con los compuestos orgánicos por las especies reactivas (h<sup>+</sup>, e<sup>-</sup>, •OH, entre otros), y de adsorberse sobre los sitios activos de la superficie del fotocatalizador dependiendo su fuerza iónica afectando así las reacciones catalíticas<sup>282</sup>. Específicamente los fosfatos tienen la posibilidad de ser adsorbidos sobre la superficie del TiO<sub>2</sub> sobre un amplio rango de pH<sup>283</sup>, mientras que los aniones cloruro son adsorbidos fuertemente sobre la superficie del catalizador a pH bajo (pH 3) inhibiendo así la oxidación de los compuestos de interés, mientras que a pH alcalino se generan efectos repulsivos entre el cloruro y la carga negativa de la superficie del TiO<sub>2</sub> (PCZ: 6.25) obstaculizando la adsorción<sup>284</sup>. El hecho que los aniones sean adsorbidos en la superficie del material provoca un efecto secuestrante de las especies

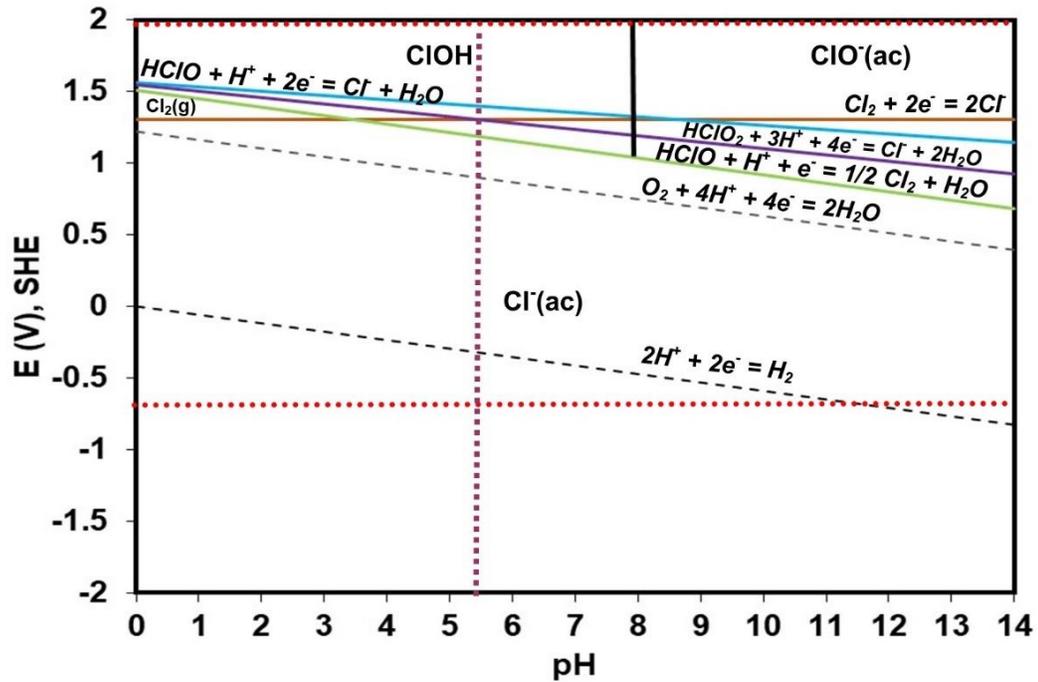
reactivas, esto puede ocasionar diferente influencia en el proceso fotocatalítico usando  $\text{TiO}_2$ : un escenario es el secuestro de los electrones para la reducción de los grupos fosfato a fosfito, esto provocaría una menor disponibilidad de electrones para ser transferidos al cocatalizador metálico y disminuir la tasa de reducción de protones<sup>194</sup>; otro escenario es la competencia de los aniones para ser adsorbidos en la superficie del catalizador y secuestrar las especies oxidantes como los huecos o algunos radicales como el  $\bullet\text{OH}$ , este hecho tiene mayor afinidad en ciertas especies, específicamente los radicales cloruro ( $\bullet\text{Cl}$ ) tienen mayor afinidad por los  $\text{h}^+$  que los radicales  $\bullet\text{OH}$ , y esto también previene la recombinación del par  $\text{e}^-/\text{h}^+$ <sup>285</sup>; otros autores han reportado un efecto positivo por la presencia de aniones como los  $\text{F}^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , debido a que los aniones adsorbidos en el  $\text{TiO}_2$  tienen una interacción específica con el  $\text{O}_2$ , aumentando la tasa de reducción del  $\text{O}_2$  y favoreciendo la separación de cargas, o también al remplazo de los grupos  $\text{OH}^-$  de la superficie del  $\text{TiO}_2$  por aniones que favorecen la generación de  $\bullet\text{OH}$ , y que son especies más reactivas en forma libre para la oxidación de los agentes de sacrificio<sup>286,287</sup>. Skaf *et al.*<sup>194</sup> reportaron una afectación de hasta el 60% en la producción de hidrógeno al adicionar  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20% menos producción al adicionar  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o cloruros, y 10% menos producción al añadir  $\text{NaNO}_3$  en una reacción de fotorreformado de glicerol empleando  $\text{Pt}/\text{TiO}_2$ , además ellos reportan que al incorporar un metal en la superficie del  $\text{TiO}_2$ , éste es más sensible a las fuerzas iónicas de la solución que el  $\text{TiO}_2$  sin modificar.

En las figuras 44 y 45, se muestran los diagramas de Pourbaix para especies fosfatadas y cloradas, respectivamente; estos diagramas muestran una relación entre el potencial y el pH, y se utilizan para pronosticar el estado estable de una especie redox, y sus iones asociados en una solución acuosa. Las condiciones más cercanas a las empleadas en las pruebas de fotorreformado se representan con una línea punteada vertical para el pH de la fotorreacción (pH 5.3), y con líneas punteadas horizontales que representan los potenciales de la banda de valencia (oxidación,  $E_{\text{SHE}}$ : 1.8 V) y banda de conducción (reducción  $E_{\text{SHE}}$ : -0.7 V) del  $\text{TiO}_2$ ; bajo la delimitación de estos ejes, se puede observar la interrelación entre el pH y los potenciales del  $\text{TiO}_2$ , y asociar las reacciones redox que pueden surgir y relacionarlo con el desempeño del fotoproceso. En la Fig. 44, se observa que a pH 5.3, el ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (ion fosfato dihidrógeno) permanecerá en mayor proporción en la solución, y que cuando el sistema esta activo, estos iones podrán ser reducidos a  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$  (ion fosfito dihidrógeno) ( $E_{\text{SHE}}$ : -0.5 V), incluso a pesar de estar en los límites termodinámicos, sería posible la reducción del  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (ácido fosforoso) a  $\text{H}_3\text{PO}_2$  (ácido

hipofosforoso) ( $E_{SHE}$ : -0.65 V) ; estas reacciones implican una competencia por los electrones disponibles en el sistema fotorreactivo; y por consecuencia el secuestro de estos electrones provoca una disminución en la disponibilidad de electrones para la reducción de los protones liberados y en la formación del hidrógeno. En el caso de las especies cloradas (Fig. 45), el ion  $Cl^-$  en estado acuoso se encontrará en mayor proporción en el sistema, sin embargo, también parte de éste estará como  $ClOH$  (ácido hipocloroso); el ion  $Cl^-$  tiende a secuestrar los huecos y formar  $ClOH$  ( $E_{SHE}$ : 1.5 V) o  $Cl_{2(g)}$  ( $E_{SHE}$ : 1.3 V), y termodinámicamente, también habría la posibilidad de que el  $ClOH$  ( $E_{SHE}$ : 1.25 V), formaran  $Cl_{2(g)}$  compitiendo también por los electrones disponibles en el sistema fotorreactivo; y mermando la tasa de producción del hidrógeno.

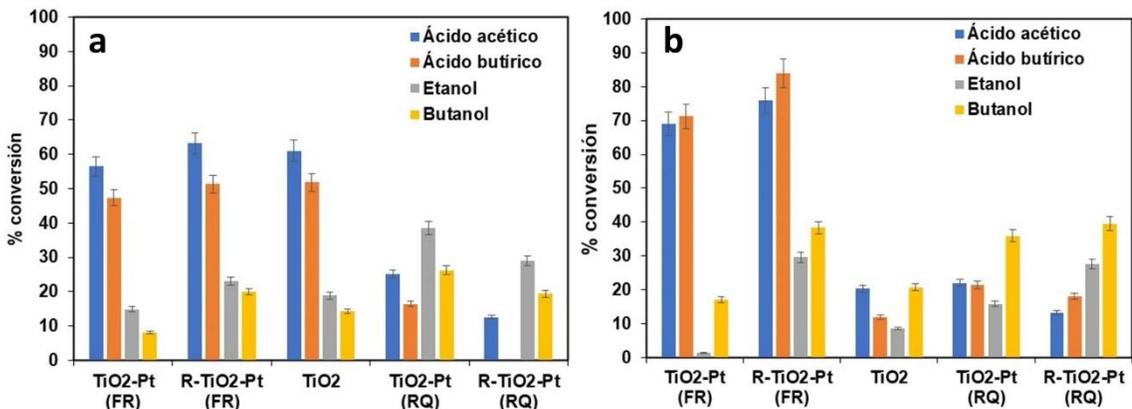


**Fig. 44.** Diagrama de Pourbaix de especies fosfatadas (líneas horizontales punteadas en rojo representan los potenciales de la banda de valencia y conducción del  $TiO_2$ ; línea vertical punteada en morado representa el pH del sistema de fotorreformado).



**Fig. 45.** Diagrama de Pourbaix de especies cloradas (líneas horizontales en rojo representan los potenciales de la banda de valencia y conducción del TiO<sub>2</sub>; línea vertical punteada en morado representa el pH del sistema de fotorreformado).

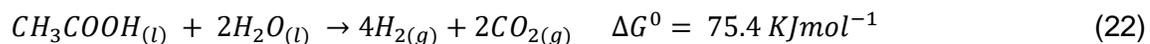
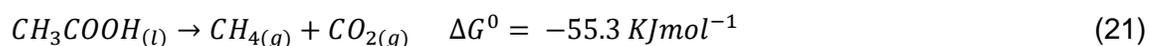
En este estudio es posible la aparición de diferentes escenarios en el sistema a causa de la presencia de aniones en la matriz, ya que es evidente un decremento en la producción de hidrógeno en todos los materiales y, por lo tanto, significa una desviación de los electrones hacia otras especies con potenciales menos negativas; sin embargo, los porcentajes de conversión de los agentes de sacrificio (Fig. 46) es mayor en casi todos los materiales evaluados en presencia de los aniones, por lo que es posible destacar la presencia de radicales con alto valor oxidativo que degraden éstas especies, y/o que evite la recombinación de cargas favoreciendo así la oxidación por acción de los h<sup>+</sup> hacia los agentes de sacrificio presentes en la mezcla.



**Fig. 46.** Porcentaje de conversión de cada agente de sacrificio (AS) de la mezcla después de la fotocatalisis para los diversos semiconductores evaluados, bajo diferentes matrices (a: agua desionizada, b: buffer).

El objeto de esta investigación es la generación de hidrógeno por fotocatalisis heterogénea a partir del uso de ácidos grasos volátiles y alcoholes provenientes de un bioproceso fermentativo; sin embargo, durante las reacciones desarrolladas en el sistema fotocatalítico pueden llevarse a cabo una diversidad amplia de reacciones de oxidación y reducción de los agentes de sacrificio involucrados. Es notable mencionar que durante las cinéticas de fotorreformado para la generación de hidrógeno empleando la mezcla de agentes de sacrificio, se observó la formación simultánea de hidrógeno y metano a lo largo del tiempo (Fig. 42c y d). Los fotocatalizadores TiO<sub>2</sub>-Pt (FR) y (RQ) presentaron la mayor producción de metano usando una matriz de agua desionizada, al igual para el hidrógeno, registrando una producción máxima de 119.1  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  y 92.9  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ , respectivamente; mientras que el TiO<sub>2</sub> sin modificación alcanzó 44.5  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ , que fue mayor a lo obtenido por los materiales con resina fenólica que fue no mayor a 7.5  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ . En el caso de los ensayos con la matriz buffer, la producción fue mucho menor (>50%) esto debido a la interacción que tienen los aniones presentes en el sistema reactivo y que se discutió con anterioridad; y que se confirman con los resultados obtenidos del TiO<sub>2</sub> sin modificar al inhibirse la formación de metano debido a la adsorción de los aniones presentes en el buffer en la superficie del fotocatalizador<sup>285</sup>. Las tasas de producción de metano fueron estimadas de igual manera con el modelo de Gompertz modificado (Ec. 5) y se muestran en la Tabla 16. Yasuda *et al.*<sup>254</sup> reportaron el uso de diversos agentes de sacrificio como alcoholes (monoalcoholes y polialcoholes), ácidos carboxílicos y carbohidratos para la producción de H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> empleando Pt/TiO<sub>2</sub> como fotocatalizador; de acuerdo con sus resultados, durante el fotorreformado de los ácidos

carboxílicos existe la formación de CH<sub>4</sub>, el rendimiento reportado varió según el tipo de ácido carboxílico, por ejemplo para el ácido acético reportan 0.27 mol<sub>CH<sub>4</sub></sub>/mol<sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub></sub>, mientras que el uso de alcoholes produjo trazas de metano; este hecho fue confirmado al evaluar los agentes de sacrificio en forma individual y observar la formación de metano en las reacciones de fotocátalisis del ácido acético (Tabla 11). Imizcoz & Puga<sup>261</sup> evaluaron el fotorreformado de ácido acético usando diversos metales como catalizadores soportados en TiO<sub>2</sub> (Pt, Au, Ag y Cu) y como resultado obtuvieron una mayor generación de CH<sub>4</sub> en comparación con la generación de H<sub>2</sub>; ésta inclinación hacia la producción de metano puede estar asociada a las energías de Gibbs de las reacciones (Ec. 21 y 22), al verse favorecida la reducción del CH<sub>3</sub>COOH a CH<sub>4</sub>, si el agente de sacrificio tuviera un contacto directo con los electrones; por otro lado, el CH<sub>3</sub>COOH puede ser oxidado por radicales •OH, al estar en presencia de H<sub>2</sub>O y los protones generados posteriormente reducidos para la formación de H<sub>2</sub>.



Por otro lado, la formación de metano también podría deberse a la reducción del CO<sub>2</sub>, haciendo mención que debido a la oxidación de los diversos agentes de sacrificio la generación de CO<sub>2</sub> fue simultánea, sin embargo, no fue posible cuantificarlo debido a las condiciones de medición del equipo cromatográfico empleado en esta investigación. El mecanismo molecular de las reacciones para la reducción del CO<sub>2</sub> esta lejos de comprenderse, sin mencionar el control de la selectividad de las reacciones. La reacción general de la fotorreducción del CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> es muy complicada debido a su alta demanda de electrones (8 e<sup>-</sup>) y protones (8 e<sup>-</sup>), el rompimiento del enlace C-O y la formación de enlaces C-H. Se han reportado dos mecanismos alternativos para la fotorreducción del CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>, el primero conocido como ruta del formaldehído o ruta de la hidrogenación rápida en donde las reacciones siguen el siguiente flujo CO<sub>2</sub> → HCOOH → H<sub>2</sub>CO → CH<sub>3</sub>OH → CH<sub>4</sub>, este mecanismo es termodinámicamente factible y diversos autores reportan la formación de estos intermediarios en sus estudios<sup>288,289</sup>; y el segundo mecanismo es llamado ruta del carbeno o ruta de la desoxigenación rápida en la que el flujo de reacciones es CO<sub>2</sub> → CO → C• → CH<sub>3</sub>• → CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>4</sub>, la formación de los radicales C• y CH<sub>3</sub>• ha sido detectada por algunos autores<sup>290</sup>. En este estudio, durante

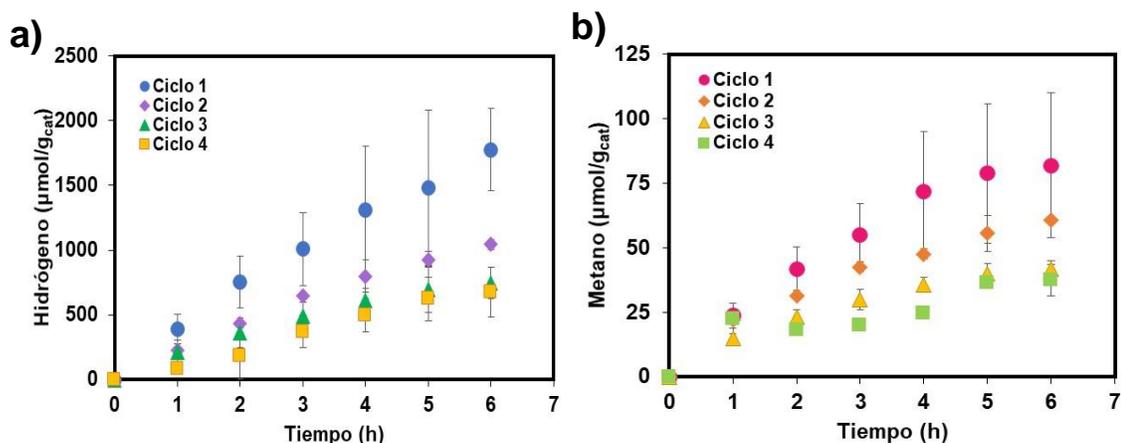
las pruebas de fotorreformado no se detectó la presencia de CO por el método cromatográfico, por lo que podría sugerirse que el mecanismo de reducción fue la ruta del formaldehído; no obstante, el método de análisis no fue robusto para la detección de otros compuestos que puedan confirmar dicha teoría. En la Tabla 1, se muestran los potenciales redox estándar de algunas reacciones referentes a la reducción de CO<sub>2</sub> a los diversos intermediarios para la obtención del CH<sub>4</sub>; se puede observar que los potenciales de reducción se encuentran en un rango de -0.61 V a -0.20 V y que de acuerdo a los potenciales de los materiales sintetizados en esta investigación serían termodinámicamente alcanzables (Tabla 11), sin embargo, la necesidad de electrones y protones es elevada lo que merma la generación de CH<sub>4</sub>.

Con la finalidad de conocer el grado de transformación de los agentes de sacrificio en la mezcla se evaluaron los porcentajes de conversión de los agentes de sacrificio presentes en la mezcla después de la reacción fotocatalítica. En la Fig. 46 se muestran los resultados porcentuales de conversión de los materiales evaluados bajo la matriz de agua desionizada (a) y la matriz de buffer (b). Debido a la interacción de diversos factores como tipo de semiconductor, tipo de radical generado, tipo de matriz, aunado con la presencia de diferentes agentes de sacrificio al mismo tiempo, es difícil elucidar una tendencia hacia la oxidación o la formación de otros compuestos debido a las diversas reacciones redox que se llevan a cabo en la reacción fotocatalítica.

#### **8.6. Reusabilidad de TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) empleando mezcla sintética en buffer y agua**

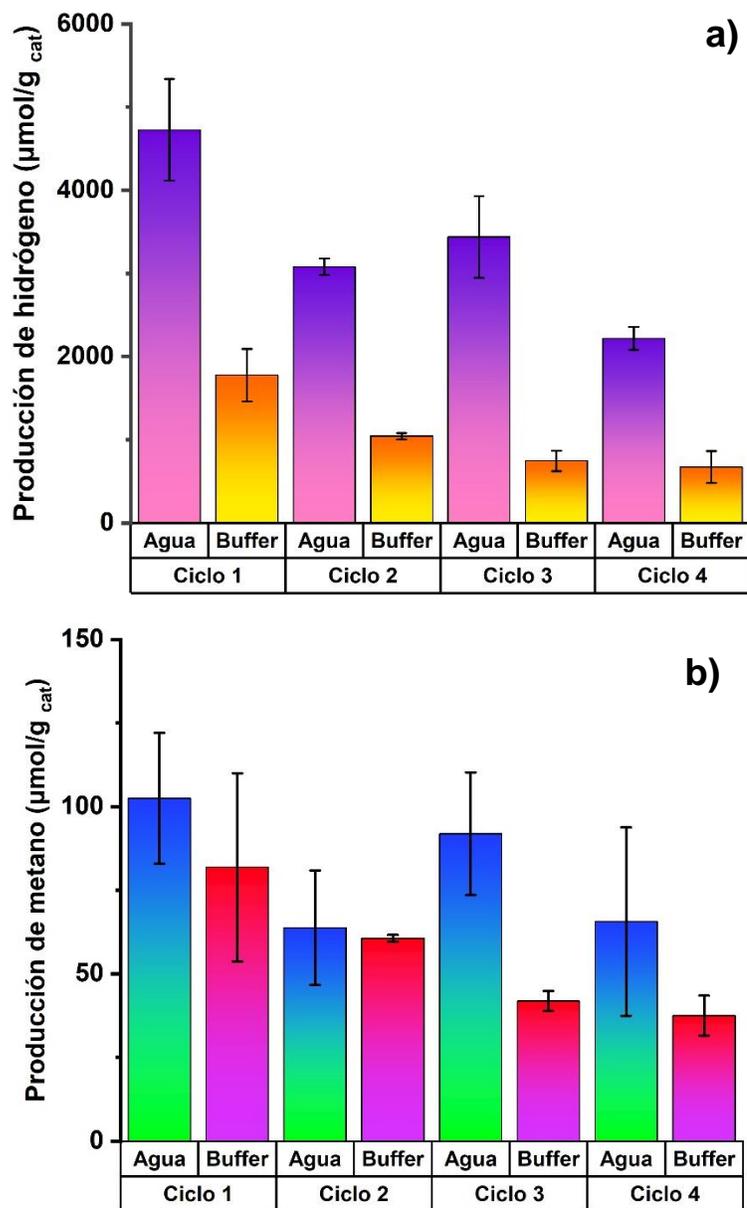
Se llevaron a cabo pruebas de reusabilidad con el objetivo de evaluar la estabilidad del material después de ser empleado en el proceso fotocatalítico y así conocer su desempeño tras varios ciclos de reuso. En esta etapa, se evaluó el material que después de los experimentos de fotorreformado alcanzó los mejores resultados en la producción de hidrógeno, este fue el TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ). Las pruebas de reusabilidad para el fotorreformado de la mezcla sintética de agentes de sacrificio se desarrollaron durante cuatro ciclos, en las dos matrices antes evaluadas: agua desionizada y buffer. En la Fig. 47, se muestran las cinéticas de fotorreformado para la producción de H<sub>2</sub> (a) y CH<sub>4</sub> (b) en matriz buffer; se puede observar una notable disminución en la producción de ambos productos, sin embargo, después del segundo ciclo, e incluso en el tercer y cuarto ciclo la producción disminuye ligeramente; este hecho podría relacionarse a que durante el

primer ciclo parte del Pt se lixivió en la solución, y el Pt remanente en el material quedó anclado al  $\text{TiO}_2$  por lo que la producción de  $\text{H}_2$  y  $\text{CH}_4$  se estabilizan posteriormente.



**Fig. 47.** Cinéticas de reusabilidad del  $\text{TiO}_2\text{-Pt}$  (RQ) en el fotorreformado de la mezcla de agentes de sacrificio en la producción de  $\text{H}_2$  (a) y  $\text{CH}_4$  (b) en matriz de buffer.

En la Fig. 48, se muestra un comparativo de la reusabilidad del  $\text{TiO}_2\text{-Pt}$  (RQ) durante cuatro ciclos del fotorreformado de la mezcla sintética de agentes de sacrificio entre la matriz de agua desionizada y buffer para la producción de  $\text{H}_2$  (a) y  $\text{CH}_4$  (b). Se observa la misma tendencia antes mencionada, donde durante el primer ciclo se pierde hasta el 35% de la producción máxima de  $\text{H}_2$ , y 38% de la producción de  $\text{CH}_4$  en la matriz de agua desionizada, y posterior al ciclo 2, la disminución de la producción de  $\text{H}_2$  baja y la producción de  $\text{CH}_4$  se mantiene. Por otro lado, los resultados mostrados al emplear buffer como matriz son un tanto diferentes, ya que se puede observar una disminución notable en el primer ciclo (41% para  $\text{H}_2$  y 26% para  $\text{CH}_4$ ), pero la disminución continúa hasta el cuarto ciclo, hasta alcanzar una pérdida en la producción de  $\text{H}_2$  del 62% y de  $\text{CH}_4$  del 56%; este hecho podría sumar dos fenómenos como lo fue el lixiviado del Pt principalmente durante el primer ciclo del fotorreformado, y el envenenamiento del fotocatalizador por la adsorción de las sales del buffer sobre la superficie del  $\text{TiO}_2\text{-Pt}$  (RQ). Este segunda conclusión, provoca el bloqueo de sitios activos del material y por consecuencia menor tasa de formación de especies reactivas durante el proceso de fotocatalisis.



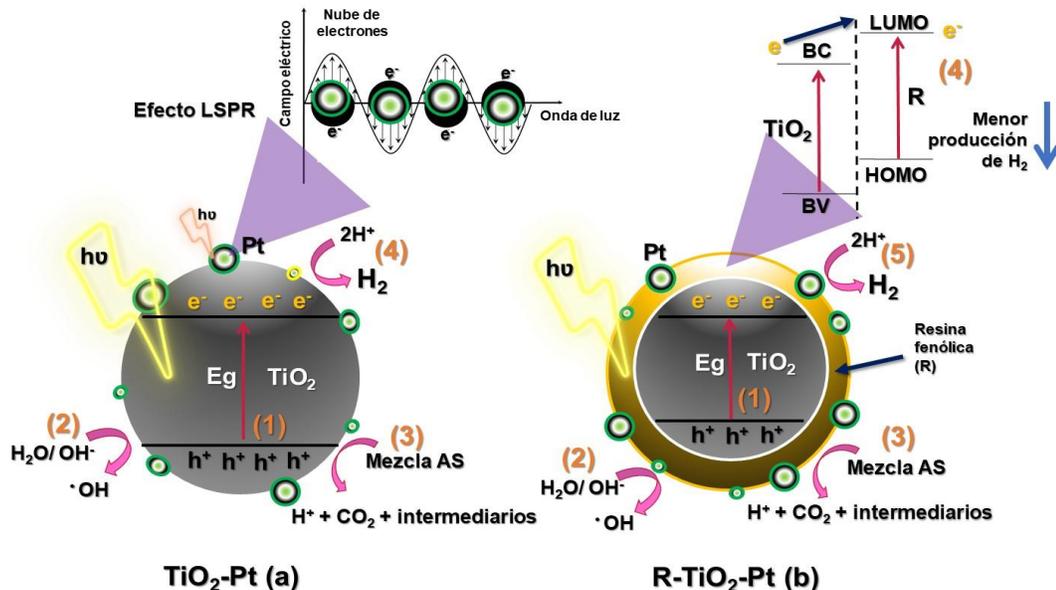
**Fig. 48.** Ciclos de reusabilidad en la producción de H<sub>2</sub> (a) y CH<sub>4</sub> (b) de TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) en matriz de agua.

### 8.7. Mecanismo fotocatalítico principal propuesto para la formación de hidrógeno

En base a los resultados experimentales, se ha propuesto un mecanismo posible para explicar la actividad fotocatalítica de los compuestos TiO<sub>2</sub>-Pt y R-TiO<sub>2</sub>-Pt (Fig. 49). Para el TiO<sub>2</sub>-Pt, primero ocurre la generación de las especies cargadas (h<sup>+</sup> y e<sup>-</sup>) por la

activación de material al ser irradiado por la fuente de luz UV (1a). Posteriormente, por acción de los  $h^+$  de la BV sobre el  $H_2O$  se genera la formación de radicales  $\cdot OH$  (2a); luego, éstos radicales junto con la presencia de  $h^+$  oxidan directamente los compuestos orgánicos presentes y, como consecuencia, se liberan protones y se forman diversos intermediarios (3a); estos protones al encontrarse en abundancia por la oxidación de los agentes de sacrificio, son reducidos a  $H_2$  molecular por los electrones disponibles gracias a la existencia de átomos de Pt sobre la superficie del  $TiO_2$  (4a), y que a la par ayudan a evitar la recombinación de cargas y, con ello, la inactivación del material. Como se discutió anteriormente con los resultados de XPS, la eficiencia en la producción de hidrógeno varía directamente por la cantidad de Pt depositada por cada método de deposición.

En el caso del R- $TiO_2$ -Pt, el mecanismo es similar al ser irradiado bajo luz UV debido a la disponibilidad de energía (1b-3b); sin embargo, como se observó en los resultados de producción de hidrógeno, los materiales con resina fenólica presentaron resultados menores, lo cual indica un efecto negativo provocado por la resina. Como propuesta se discutió con anterioridad que la resina fenólica disminuye la capacidad de reducción del material, ya que podría estar secuestrando los electrones (4b) para distribuirlos en la matriz polimérica y ser utilizados en la generación de otras especies y, como resultado de esto, los electrones no son transportados efectivamente hacia el Pt y la producción de hidrógeno disminuye notoriamente (5b).



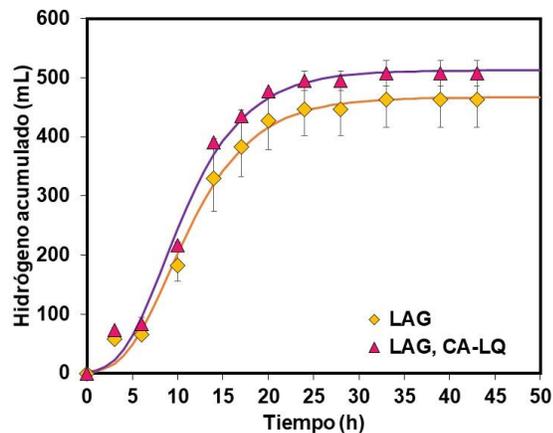
**Fig. 49.** Mecanismo fotocatalítico principal propuesto para la formación de hidrógeno por  $TiO_2$ -Pt (a) y R- $TiO_2$ -Pt (b).

## 8.8. Acoplamiento de la fermentación oscura y fotorreformado para la producción de hidrógeno

Para llevar a cabo el acoplamiento de los dos procesos de producción de hidrógeno, se desarrollaron las dos etapas en forma separada, donde la etapa 1 se realizó la fermentación oscura de glucosa con CA-LQ (lawsona inmovilizada en carbón activado) que fue la mejor condición evaluada por un lodo anaerobio tratado. Posteriormente, en la etapa 2 se filtró el efluente obtenido de la etapa 1 y se empleó como alimentación de el proceso de fotorreformado con  $\text{TiO}_2\text{-Pt}$  (RQ) que fue el material con mejor desempeño fotocatalítico en la presente investigación.

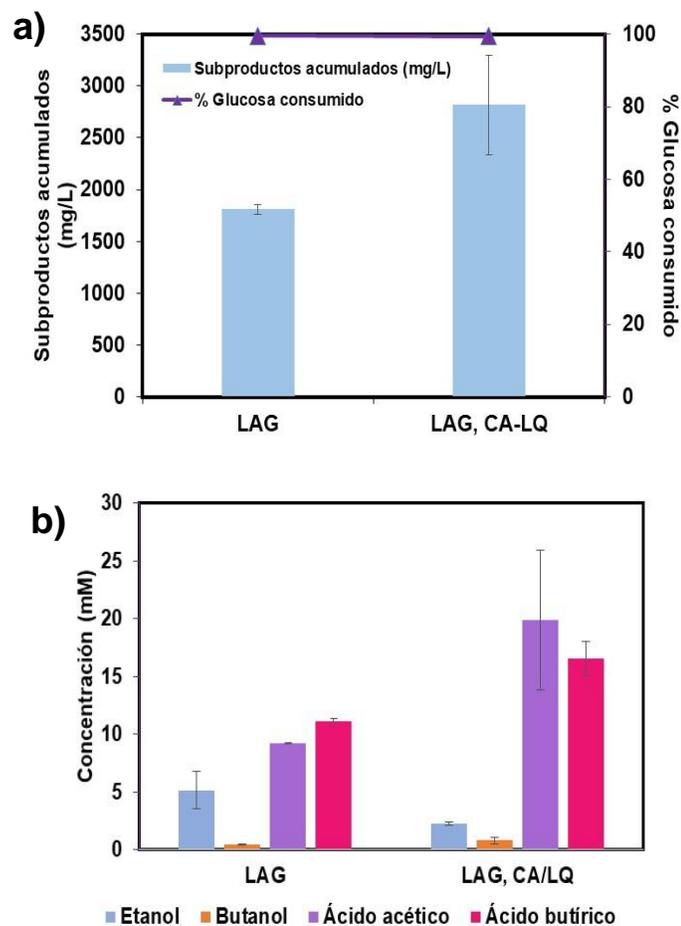
### 8.8.1. Fermentación oscura (Etapa 1)

La fermentación oscura se llevó a cabo en un reactor de mayor tamaño (1 L) en comparación con los resultados de este bioproceso en las secciones anteriores, esto con la finalidad de obtener la suficiente cantidad de efluente de esta etapa. En la Fig. 50, se muestran las cinéticas de producción de  $\text{H}_2$  por la fermentación oscura de la glucosa empleando (CA-LQ) y su respectivo control (LAG) sin mediador redox usando un lodo anaerobio granular tratado; la producción máxima de  $\text{H}_2$  se obtuvo al usar CA-LQ alcanzando 512.34 mL de  $\text{H}_2$  en un periodo de 24 h, bajo una tasa de producción de 38.67 mL/h; se observa un incremento en la  $H_{max}$  y  $R_{max}$  de aproximadamente 10% y 12%, respectivamente con respecto al experimento control (LAG). Este aumento se debe al efecto que tiene el CA-LQ sobre el bioproceso, y que se discute ampliamente en la sección 8.1.4.



**Fig. 50.** Cinéticas de producción de  $\text{H}_2$  por fermentación oscura empleando lawsona inmovilizada en carbón activado (CA-LQ) con lodo anaerobio tratado en un volumen de trabajo de 0.7 L.

Se realizó la caracterización del efluente obtenido de la fermentación oscura dada la importancia al ser la alimentación del proceso subsecuente de fotorreformato (Fig. 51). En la Fig. 51a, se presentan los resultados de consumo de glucosa y la acumulación de subproductos al final de la fermentación para ambos experimentos; se puede destacar un notorio aumento en la acumulación de subproductos al usar el CA-LQ de hasta 36% mayor en comparación del experimento control; y un consumo de la glucosa del 99.9%. Este efecto del CA-LQ sobre el bioproceso fermentativo a estas condiciones es ampliamente discutido en la sección 8.1.5. Adicionalmente, el perfil de los subproductos identificados y sus concentraciones se muestra en la Fig. 51b, donde se destaca un notable incremento en la producción de ácido acético (19.87 mM), ácido butírico (16.55 mM); mientras que el etanol fue ligeramente menor (2.30 mM), seguido por el butanol (0.81 mM).



**Fig. 51.** Consumo de glucosa y acumulación de subproductos líquidos al final de la fermentación oscura empleando lodo anaerobio tratado en un volumen de trabajo de 0.7 L (a), y perfil de los principales subproductos líquidos identificados (b).

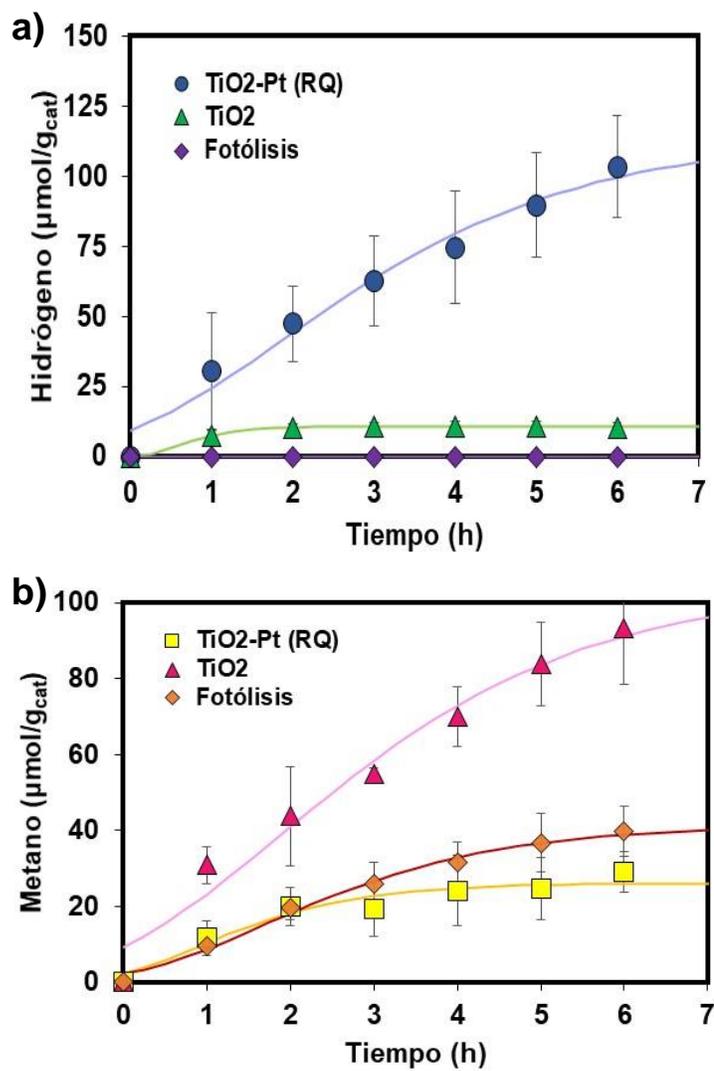
### 8.8.2. Fotorreformado (Etapa 2)

Una vez que concluyó la etapa 1 de fermentación oscura, se obtuvo el efluente del bioproceso para la realización de la etapa 2 de fotorreformado empleando  $\text{TiO}_2\text{-Pt}$  (RQ) como fotocatalizador bajo luz UV LED (365 nm). El efluente se sometió primero a un proceso de filtración para separar los sólidos de tamaño mayor como el CA-LQ y el lodo anaerobio granular; posteriormente, el efluente se centrifugó para separar la materia orgánica sedimentable y que otorgaba turbidez al efluente acuoso. Este efluente presentó la siguiente composición: 19.87 mM ácido acético, 16.55 mM ácido butírico, 2.30 mM etanol, y 0.81 mM de butanol. Cabe mencionar que el efluente no fue esterilizado.

En la Fig. 52, se muestran las cinéticas de fotorreformado del efluente para la producción de  $\text{H}_2$  (a) y  $\text{CH}_4$  (b) empleando  $\text{TiO}_2\text{-Pt}$  (RQ) y los experimentos control correspondientes ( $\text{TiO}_2$  y fotólisis). La producción máxima de  $\text{H}_2$  fue  $114.35 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  al usar  $\text{TiO}_2\text{-Pt}$  (RQ), que al comparar con los resultados de la secciones anteriores donde se empleó una mezcla con una composición similar respecto a los principales subproductos oxidables fue mucho menor (9 veces); mientras que la producción máxima de  $\text{CH}_4$  fue  $105.1 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  usando  $\text{TiO}_2$  sin modificar (Tabla 20). No obstante, este resultado podría deberse a que la composición del efluente real es más compleja, ya que no solo contiene los componentes del buffer que se comprobó afectan notablemente el desempeño de fotorreformado, sino que también al no haberse sometido a un proceso de filtración más exigente, o incluso a su esterilización, la presencia de materia orgánica como bacterias, restos celulares, materia orgánica soluble, o incluso trazas del mediador redox empleado en la fermentación oscura pueden provocar una mayor posibilidad de interacción entre los radicales formados en el proceso fotocatalítico, y someterse a procesos de oxidación que reducen la liberación de protones, y por como consecuencia la producción de  $\text{H}_2$ .

La gran mayoría de los estudios enfocados en la producción de hidrógeno por reformado fotocatalítico emplean soluciones sintéticas de uno o varios componentes, y aunque con ello se incrementa el conocimiento sobre el uso de compuestos fotorreformables, la lejanía de un escenario real provoca falta de información para hacer este tipo de fotoproceso escalable. Dentro de los pocos reportes que han empleado efluentes reales para la producción de  $\text{H}_2$  por fotorreformado, Imizcoz & Puga<sup>291</sup> usaron un efluente real de la producción industrial de jugos que contenía una alta cantidad de carbohidratos, el fotocatalizador utilizado fue  $\text{Au/TiO}_2$  (1 g/L) bajo irradiación de un simulador solar

alcanzando  $115 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{h}$  de  $\text{H}_2$ , los autores atribuyen este bajo desempeño debido a la presencia de diferentes solutos que inhiben la producción de  $\text{H}_2$ , en particular especies iónicas, y al efecto negativo por la presencia de materia orgánica recalcitrante. Badawy et al.<sup>292</sup>, emplearon un efluente real proveniente de la extracción del aceite de oliva con un DQO de 8410 mg/L (COT: 3150 mg/L), el fotocatalizador usado fue  $\text{TiO}_2$  (2 g/L) utilizando una lámpara UV de Hg con un rango de emisión de 100 a 280 nm, y reportaron una tasa de producción de  $\text{H}_2$  de  $11.17 \text{ mmol/g}_{\text{cat}}\text{h}$  a pH 3 después de 120 min y una remoción de DQO del 92%, a pesar que los resultados de estos autores son promisorios, ellos mencionan que las condiciones de irradiación son de gran apoyo para el desempeño del  $\text{TiO}_2$ , sin embargo después de 120 min la actividad decrece considerablemente debido a efectos de recombinación y envenenamiento del material. Otro reporte fue realizado por Liu et al.<sup>293</sup>, que utilizaron lodo activado residual (DQO: 8.7 g/L) como alimentación en un reactor tubular fluidizado, y emplearon tubos recubiertos con el fotocatalizador  $\text{AgX/TiO}_2$ , bajo irradiación solar reportando  $7866.7 \mu\text{mol/L}$  de lodo en 72 h, y una remoción de la DQO del 69.1%. Finalmente, Iervolino et al.<sup>294</sup>, emplearon un compuesto de  $\text{Ru-LaFeO}_3/\text{Fe}_2\text{O}_3$  (1.5 g/L) como semiconductor en la producción fotocatalítica de hidrógeno usando agua residual del lavado de cerezas, que contenía una elevada DQO (37997 mg/L) y la presencia de azúcares como fructosa, glucosa y sorbitol, después de 4 h de irradiación (LED visible) alcanzaron una tasa de producción de  $\text{H}_2$  de  $2056.66 \mu\text{mol/g}_{\text{cat}}\text{h}$  pero una casi nula disminución en la remoción de DQO, concluyendo que los azúcares fueron oxidados a otros intermediarios y por ello la elevada DQO final. Con estos estudios mencionados, es posible observar que el uso de efluentes reales implica diversos retos, y que aún falta mucha investigación para llevar el proceso de fotorreformado a una escala mayor empleando efluentes industriales; no obstante, sería recomendable evaluar pretratamientos a los efluentes alimentados para remover compuestos que afecten el desempeño del sistema fotocatalítico; aunado de seguir con el desarrollo del diseño de fotocatalizadores que sean activos bajo luz visible, y finalmente, implementar la ingeniería de fotorreactores para escalar este proceso a un nivel industrial y así sea atractivo para su aplicación.



**Fig. 52.** Cinéticas de producción de H<sub>2</sub> (a) y CH<sub>4</sub> (b) del fotorreformado del efluente real de la fermentación oscura de glucosa empleando TiO<sub>2</sub>-Pt (RQ) como fotocatalizador.

**Tabla 20.**  $H_{max_{FH}}$  y  $R_{max_{FH}}$  de las cinéticas de producción de  $H_2$  y  $CH_4$  del fotorreformado del efluente real de la fermentación oscura de la glucosa.

		$H_{max_{FH}}$	$R_{max_{FH}}$	$R^2$
TiO <sub>2</sub> -Pt (RQ)	Hidrógeno	114.35	20.29	0.9881
	ES	16.37	3.37	
	Metano	26.13	9.23	0.9689
	ES	2.21	2.95	
TiO <sub>2</sub>	Hidrógeno	10.69	10.33	0.9991
	ES	0.10	1.68	
	Metano	105.10	18.27	0.9857
	ES	16.64	3.29	
Fotólisis	Hidrógeno	0.00	0.00	0.0000
	ES	0.00	0.00	
	Metano	518.38	120.38	0.9959
	ES	30.52	13.07	

ES: error estándar

## 9. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la inmovilización covalente de la riboflavina en bagazo de agave mediante modificación química del soporte lignocelulósico, alcanzando hasta 88.31 mg/g en el soporte. Se obtuvieron las condiciones óptimas para la producción de hidrógeno con relación a la evaluación de la temperatura y concentración de riboflavina. Para el escenario con riboflavina libre fueron 40.09 °C y 300 µM alcanzando 11 mL/h y 86.41 mL de hidrógeno, como *Rmax* y *Hmax*, respectivamente. Mientras que para el escenario con la riboflavina inmovilizada en bagazo de agave fueron 43.38 °C y 300 µM, obteniendo 9.58 mL/h y 88.37 mL de hidrógeno, como *Rmax* y *Hmax*, respectivamente. La temperatura resultó ser un factor importante en la producción de hidrógeno con *Clostridium beijerinckii*, mientras que la concentración de riboflavina no resultó estadísticamente significativa.

La validación experimental de la predicción del análisis estadístico mostró similitud en los resultados obtenidos en la *Hmax*; sin embargo, la *Rmax* fue mayor en ambos tratamientos arrojando una desviación experimental del 20% aproximadamente. El mayor rendimiento de hidrógeno (3.05 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa) fue obtenido bajo la ausencia del mediador redox a 43 °C. Esto puede deberse a la influencia que existe de la temperatura en los cultivos de *Clostridium beijerinckii* y también sobre el estado de oxidación del mediador redox. La adición de bagazo de agave redirige el metabolismo de *Clostridium beijerinckii* a la solventogénesis (mayor producción de etanol) disminuyendo la producción de hidrógeno.

Los mediadores redox (AQS y LQ) fueron evaluados para mejorar la producción de hidrógeno y la formación de subproductos líquidos a partir de la fermentación de glucosa empleando un lodo anaerobio pretratado. La producción máxima de hidrógeno incrementó al adicionar LQ en forma disuelta, mientras que el AQS disuelto mejoró la tasa de producción de hidrógeno. En contraste, los mediadores redox inmovilizados en el carbón activado indujeron significativamente la acumulación de subproductos líquidos. El efecto electrónicamente sinérgico entre el carbón activado y los mediadores redox inmovilizados, mejoró la transferencia de electrones hacia rutas metabólicas solventogénicas. El potencial redox de los mediadores redox estudiados alcanzaron la energía requerida para actuar como acarreadores de electrones con algunas especies biológicas tipo redox como los complejos enzimáticos y coenzimas.

Con relación a la etapa de fotocátalisis heterogénea para la producción de hidrógeno, se logró sintetizar diversos materiales con propiedades semiconductoras usando  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$  como base; mismos que fueron modificados al incorporar resina fenólica como sensibilizador, y dopar con Pt por fotorreducción (FR) y reducción química (RQ). De acuerdo con los resultados preliminares, los materiales obtenidos a base de  $\text{ZnO}$  no alcanzaron a producir hidrógeno satisfactoriamente. Sin embargo, los materiales a base de  $\text{TiO}_2$  mostraron una actividad positiva en la producción de hidrógeno.

Los materiales modificados con resina fenólica (R- $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y R- $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ)) obtuvieron escasos resultados en la producción de hidrógeno con luz visible y luz UV, esto debido al efecto negativo que causó la red polimérica sobre la activación del material. Los materiales  $\text{TiO}_2$ -Pt (FR) y  $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ) mostraron el mejor desempeño para la producción de hidrógeno por fotorreformado. Según la caracterización por DRX de éstos materiales la única fase cristalina encontrada para el  $\text{TiO}_2$  fue anatasa, y los resultados del análisis por SEM demostraron que el tamaño de partícula del  $\text{TiO}_2$  fue de aproximadamente 50 nm con agregados de Pt de 2 a 20 nm, distribuidos homogéneamente sobre la superficie del fotocatalizador, también se corroboró el contenido de Pt con XPS alrededor de 1.46% y 0.38% para  $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ) y  $\text{TiO}_2$ -Pt (FR), respectivamente, aunado que el Pt se encontró como  $\text{Pt}^0$ ; además, el valor de la  $E_g$  estimado para ambos materiales fue de 3.2 eV.

El método de reducción química alcanzó mayor cantidad de Pt incorporado en la superficie del  $\text{TiO}_2$ , lo que ocasionó un mejor desempeño fotocatalítico del  $\text{TiO}_2$ -Pt (RQ). Durante el fotorreformado de la mezcla de subproductos de fermentación (ácido acético (10 mM), ácido butírico (4.5 mM), etanol (8.5 mM) y butanol (1.7 mM)) se observó la presencia de  $\text{H}_2$  y  $\text{CH}_4$  durante la reacción fotocatalítica bajo irradiación UV-LED. La mayor producción de  $\text{H}_2$  (2217.7  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ ) y  $\text{CH}_4$  (119.1  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$ ) se alcanzó utilizando agua desionizada; mientras que el experimento control con  $\text{TiO}_2$  alcanzó 79.5  $\mu\text{mol H}_2/\text{g}_{\text{cat}}$  y 44.5  $\mu\text{mol CH}_4/\text{g}_{\text{cat}}$ . Los experimentos en buffer disminuyeron el rendimiento de  $\text{H}_2$  hasta 58% y para  $\text{CH}_4$  hasta 63%, mientras que el  $\text{TiO}_2$  produjo solo 8.1  $\mu\text{mol/g}_{\text{cat}}$  de  $\text{H}_2$  y no se detectó metano. El papel de Pt fue notable debido a la creación de una barrera de Schottky que capturó electrones fotogenerados, lo que provocó una mejora notable en la actividad fotocatalítica; además, el Pt metálico generó efectos plasmónicos que mejoran el coeficiente de absorción de fotones ( $\kappa$ ) y aumentan el uso efectivo de la energía emitida al sistema. La presencia de aniones inorgánicos como  $\text{PO}_4^{3-}$  afectó

notoriamente las reacciones fotocatalíticas debido a la competencia por  $h^+$ ,  $e^-$  u otro radical; específicamente, los fosfatos se pueden adsorber sobre la superficie de  $TiO_2$  en un amplio rango de pH y eliminar el  $e^-$  para reducirlo a fosfito. Aunado que de acuerdo con los diagramas de Pourbaix el ion  $H_2PO_4^-$  permanecerá en mayor proporción en la solución, y que cuando el sistema esta activo, estos iones podrán ser reducidos a  $H_2PO_3^-$ , mientras que el ion  $Cl^-$  en estado acuoso se encontrará en mayor proporción en el sistema y tiende a secuestrar los huecos y formar  $ClOH$ . Las pruebas de reusabilidad demostraron que el  $TiO_2$ -Pt (RQ) pierde un 35% de la actividad durante el primer ciclo debido a una lixiviación del Pt en la solución; sin embargo, después esta pérdida de actividad disminuye notoriamente.

El proceso de acoplamiento de los procesos estudiados en esta investigación fue dividido en dos partes separadas, donde en la etapa fermentativa al emplear CA-LQ con LAG se alcanza un aumento en la producción de  $H_2$  y en la producción de subproductos líquidos de un 10% y 36%, respectivamente. El uso del efluente de la etapa fermentativa al ser empleado en la etapa subsecuente de fotorreformado, alcanzó una producción máxima de  $H_2$  de  $114.35 \mu\text{mol}/g_{\text{cat}}$  que fue 9 veces menor al emplear la mezcla sintética, este hecho se relacionó a que la presencia de compuestos orgánicos como células, y/o restos celulares, y compuestos inorgánicos como sales del medio de cultivo provocaron un secuestro de especies reactivas que no fueron aprovechadas para las reacciones de formación de  $H_2$ . De acuerdo con lo anterior, los subproductos de fermentación efluentes tienen el potencial de ser empleados como agentes de sacrificio en un proceso fotocatalítico para convertirse en energía; aunque sería conveniente evaluar un pretratamiento del efluente para eliminar los aniones inorgánicos, así como compuestos orgánicos recalcitrantes para mejorar la eficacia del proceso de fotorreformación.

## 10. REFERENCIAS

1. Veras, S., Mozer, T. S., Rubim, C. & C, A. S. ScienceDirect Hydrogen : Trends , production and characterization of the main process worldwide. **2**, (2016).
2. Nikolaidis, P. & Poullikkas, A. A comparative overview of hydrogen production processes. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **67**, 597–611 (2017).
3. Linares Hurtado, J. I. & Moratilla Soria, B. Y. *El hidrógeno y la energía*. (2007).
4. International Energy Agency. *Global Energy & CO2 Status Report. Global Energy & CO2 Status Report* (2018).
5. Kapdan, I. K. & Kargi, F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology* (2006).
6. Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E. & Bernet, N. Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems. *Trends in Biotechnology* (2016).
7. Logan, B. E., Oh, S. E., Kim, I. S. & Van Ginkel, S. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ. Sci. Technol.* (2002).
8. Nandi, R. & Sengupta, S. Microbial Production of Hydrogen: An Overview. *Crit. Rev. Microbiol.* (1998).
9. Hwang, M. H., Jang, N. J., Hyun, S. H. & Kim, I. S. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: The role of pH. *J. Biotechnol.* (2004).
10. Saady, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy* (2013).
11. Mathews, J. & Wang, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* (2009).
12. Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A. & Domínguez-Espinosa, R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology* (2004).
13. Hallenbeck, P. C. & Benemann, J. R. Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes. in *International Journal of Hydrogen Energy* (2002).
14. Logan, B. E. Extracting Hydrogen and Electricity from Renewable Resources. *Environmental Science and Technology* (2004).
15. Demmer, J. K., Pal Chowdhury, N., Selmer, T., Ermler, U. & Buckel, W. The semiquinone swing in the bifurcating electron transferring flavoprotein/butyryl-CoA dehydrogenase complex from *Clostridium difficile*. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
16. Hallenbeck, P. C., Abo-Hashesh, M. & Ghosh, D. Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresour. Technol.* **110**, 1–9 (2012).
17. Ruggeri, B., Tommasi, T. & Sanfilippo, S. *BioH2 & BioCH4 Through Anaerobic Digestion. From Research to Full-scale Applications*. (2015).
18. Sinha, P., Roy, S. & Das, D. Role of formate hydrogen lyase complex in hydrogen production in facultative anaerobes. *International Journal of Hydrogen Energy* (2015).
19. Gopalakrishnan, B., Khanna, N. & Das, D. Dark-Fermentative Biohydrogen Production. in 79–122 (2019).

20. CRAVEN, S. E. Increased Sporulation of *Clostridium perfringens* in a Medium Prepared with the Prereduced Anaerobically Sterilized Technique or with Carbon Dioxide or Carbonate. *J. Food Prot.* (1988).
21. Jiunn-Jyi, L., Yu-You, L. & Noike, T. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. *Water Res.* (1997).
22. Van Ginkel, S., Sung, S. & Lay, J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* (2001).
23. Dabrock, B., Bahl, H. & Gottschalk, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1992).
24. Khanal, S. K., Chen, W. H., Li, L. & Sung, S. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. *Int. J. Hydrogen Energy* (2004).
25. Bowles, L. K. & Ellefson, W. L. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1985).
26. Cao, X. & Zhao, Y. The influence of sodium on biohydrogen production from food waste by anaerobic fermentation. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* (2009).
27. Wongthanate, J., Chinnacotpong, K. & Khumpong, M. Impacts of pH, temperature and pretreatment method on biohydrogen production from organic wastes by sewage microflora. *Int. J. Energy Environ. Eng.* (2014).
28. Valentín-Reyes, J. *et al.* Mathematical modelling for biohydrogen production by *Clostridium beijerinckii*. *Int. J. Hydrogen Energy* **43**, 17602–17610 (2018).
29. Levin, D. B., Pitt, L. & Love, M. Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy* (2004).
30. Li, C. & Fang, H. H. P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (2007).
31. Yokoyama, H. *et al.* Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2007).
32. Chen, Y., Cheng, J. J. & Creamer, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* (2008).
33. Lin, C. Y., Chang, C. C. & Hung, C. H. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* (2008).
34. Ghimire, A. *et al.* A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy* (2015).
35. Karadag, D. & Puhakka, J. A. Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy* (2010).
36. Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F. & Poggi-Varaldo, H. M. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrogen Energy* (2005).
37. Van Groenestijn, J. W., Hazewinkel, J. H. O., Nienoord, M. & Bussmann, P. J. T. Energy aspects of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range. in *International Journal of Hydrogen Energy* (2002).
38. Waligorska, M. Fermentative Hydrogen Production- Process Design and Bioreactors. *Chem.*

- Process Eng.* **33**, 585–594 (2012).
39. Massanet-Nicolau, J., Guwy, A., Dinsdale, R., Premier, G. & Esteves, S. Production of hydrogen from sewage biosolids in a continuously fed bioreactor: Effect of hydraulic retention time and sparging. *Int. J. Hydrogen Energy* (2010).
  40. Bastidas-Oyanedel, J. R. *et al.* Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresour. Technol.* (2012).
  41. Rulkens, W. Sewage sludge as a biomass resource for the production of energy: Overview and assessment of the various options. *Energy and Fuels* (2008).
  42. Guo, X., Liu, J. & Xiao, B. Bioelectrochemical enhancement of hydrogen and methane production from the anaerobic digestion of sewage sludge in single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrogen Energy* (2013).
  43. De Gioannis, G., Muntoni, A., Polettoni, A. & Pomi, R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Manag.* (2013).
  44. Wang, C. C. *et al.* Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *J. Biotechnol.* (2003).
  45. Assawamongkholsiri, T., Reungsang, A. & Pattra, S. Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures. in *International Journal of Hydrogen Energy* (2013).
  46. Yasin, N. H. M. *et al.* Biohydrogen production from oil palm frond juice and sewage sludge by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Int. J. Hydrogen Energy* (2013).
  47. Sambusiti, C., Bellucci, M., Zabaniotou, A., Beneduce, L. & Monlau, F. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2015).
  48. Pritchard, H. N. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. E. W. Becker. *Q. Rev. Biol.* (1995).
  49. Roy, S., Kumar, K., Ghosh, S. & Das, D. Thermophilic biohydrogen production using pre-treated algal biomass as substrate. *Biomass and Bioenergy* (2014).
  50. Sun, J. *et al.* Fermentation of *Chlorella* sp. for anaerobic bio-hydrogen production: Influences of inoculum-substrate ratio, volatile fatty acids and NADH. *Bioresour. Technol.* (2011).
  51. Wieczorek, N., Kucuker, M. A. & Kuchta, K. Fermentative hydrogen and methane production from microalgal biomass (*Chlorella vulgaris*) in a two-stage combined process. *Appl. Energy* (2014).
  52. Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L. & Moura, P. Third generation biohydrogen production by *Clostridium butyricum* and adapted mixed cultures from *Scenedesmus obliquus* microalga biomass. *Fuel* (2015).
  53. Batista, A. P. *et al.* *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel* (2014).
  54. Jung, K. *et al.* Optimization of volatile fatty acids and hydrogen production from *Saccharina japonica*: acidogenesis and molecular analysis of the resulting microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2015).
  55. Uggetti, E., Sialve, B., Trably, E. & Steyer, J. P. Integrating microalgae production with anaerobic digestion: A biorefinery approach. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* (2014).
  56. Kumar, G. *et al.* Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2015).
  57. Ren, N., Wang, A., Cao, G., Xu, J. & Gao, L. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen:

- Potential and challenges. *Biotechnology Advances* (2009).
58. Saxena, R. C., Adhikari, D. K. & Goyal, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2009).
  59. Bjorkman, A. Studies on finely divided wood. Part 3. Extraction of lignin-carbohydrate complexes with neutral solvents. *Sven. Papperstidning* (1957).
  60. Wang, J. & Yin, Y. Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstock. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **92**, 284–306 (2018).
  61. Łukajtis, R. *et al.* Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **91**, 665–694 (2018).
  62. Mtui, G. Y. S. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. *African Journal of Biotechnology* (2009).
  63. Ikehata, K., Smith, D. W. & Buchanan, I. D. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J. Environ. Eng. Sci.* **3**, 1–19 (2004).
  64. Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B. & Angelidaki, I. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnol. Bioeng.* (2010).
  65. Wu, J., Ein-Mozaffari, F. & Upreti, S. Effect of ozone pretreatment on hydrogen production from barley straw. *Bioresour. Technol.* (2013).
  66. Song, Z. X. *et al.* Direct bioconversion of raw corn stalk to hydrogen by a new strain *Clostridium* sp. FS3. *Bioresour. Technol.* (2014).
  67. Zhang, K., Ren, N., Guo, C., Wang, A. & Cao, G. Effects of various pretreatment methods on mixed microflora to enhance biohydrogen production from corn stover hydrolysate. *J. Environ. Sci.* (2011).
  68. Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M. & Reungsang, A. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *Int. J. Hydrogen Energy* (2008).
  69. Hobson, P. N. Manure management. Treatment strategies for sustainable agriculture. *Bioresour. Technol.* (1998).
  70. Holm-Nielsen, J. B., Al Seadi, T. & Oleskowicz-Popiel, P. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresour. Technol.* (2009).
  71. Salerno, M. B., Park, W., Zuo, Y. & Logan, B. E. Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Res.* (2006).
  72. Yenigün, O. & Demirel, B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochemistry* (2013).
  73. Zhu, J. *et al.* Swine manure fermentation for hydrogen production. *Bioresour. Technol.* (2009).
  74. Callaghan, F. J., Wase, D. A. J., Thayanithy, K. & Forster, C. F. Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. *Biomass and Bioenergy* (2002).
  75. Li, M., Zhao, Y., Guo, Q., Qian, X. & Niu, D. Bio-hydrogen production from food waste and sewage sludge in the presence of aged refuse excavated from refuse landfill. *Renew. Energy* (2008).
  76. Nakashimada, Y., Rachman, M. A., Kakizono, T. & Nishio, N. Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. in *International Journal of Hydrogen Energy* (2002).
  77. Rachman, M. A., Nakashimada, Y., Kakizono, T. & Nishio, N. Hydrogen production with high yield

- and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1998).
78. Kumar, N. & Das, D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem.* (2000).
  79. Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., Choe, W. S. & Park, J. M. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresour. Technol.* (2008).
  80. Han, S. K. & Shin, H. S. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *Int. J. Hydrogen Energy* (2004).
  81. Lin, P. Y. *et al.* Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *Int. J. Hydrogen Energy* (2007).
  82. Van De Werken, H. J. G. *et al.* Hydrogenomics of the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (2008).
  83. Bredholt, S., Sonne-Hansen, J., Nielsen, P., Mathrani, I. M. & Ahring, B. K. *Caldicellulosiruptor kristjanssonii* sp. nov., a cellulolytic, extremely thermophilic, anaerobic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1999).
  84. Van Niel, E. W. J., Claassen, P. A. M. & Stams, A. J. M. Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol. Bioeng.* (2003).
  85. Slobodkin, A. I. *et al.* *Thermoanaerobacter siderophilus* sp. nov., a novel dissimilatory Fe(III)-reducing, anaerobic, thermophilic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1471–1478 (1999).
  86. Nguyen, T. A. D., Pyo Kim, J., Sun Kim, M., Kwan Oh, Y. & Sim, S. J. Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* (2008).
  87. Lee, K. S., Lin, P. J., Fangchiang, K. & Chang, J. S. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy* (2007).
  88. Chen, C. C., Lin, C. Y. & Lin, M. C. Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2002).
  89. Joe Shaw, A., Jenney, F. E., Adams, M. W. W. & Lynd, L. R. End-product pathways in the xylose fermenting bacterium, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Enzyme Microb. Technol.* (2008).
  90. Zhang, T., Liu, H. & Fang, H. H. P. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *J. Environ. Manage.* (2003).
  91. Cai, G., Jin, B., Monis, P. & Saint, C. Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology Advances* (2011).
  92. Yang, G. & Wang, J. Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2018).
  93. Sivagurunathan, P. *et al.* Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: An overview of pre-treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2017).
  94. Bundhoo, Z. M. A. Effects of microwave and ultrasound irradiations on dark fermentative biohydrogen production from food and yard wastes. *Int. J. Hydrogen Energy* (2017).

95. Sivagurunathan, P. *et al.* A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy* (2016).
96. Wang, J. & Wan, W. Optimization of fermentative hydrogen production process by response surface methodology. *Int. J. Hydrogen Energy* (2008).
97. Nath, K. & Das, D. Modeling and optimization of fermentative hydrogen production. *Bioresour. Technol.* (2011).
98. Yang, G. & Wang, J. Enhanced Hydrogen Production from Sewage Sludge by Co-fermentation with Forestry Wastes. *Energy and Fuels* **31**, 9633–9641 (2017).
99. Mamimin, C., Jehlee, A., Saelor, S., Prasertsan, P. & O-Thong, S. Thermophilic hydrogen production from co-fermentation of palm oil mill effluent and decanter cake by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *Int. J. Hydrogen Energy* (2016).
100. Pachapur, V. L. *et al.* Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *clostridium butyricum*. *Bioresour. Technol.* (2015).
101. Zhao, J. *et al.* Improvement of fermentative hydrogen production using genetically modified *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydrogen Energy* (2017).
102. Singhanian, R. R., Patel, A. K., Pandey, A. & Ganansounou, E. Genetic modification: A tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. *Bioresource Technology* (2017).
103. Taherdanak, M., Zilouei, H. & Karimi, K. The effects of Fe<sub>0</sub> and Ni<sub>0</sub> nanoparticles versus Fe<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> ions on dark hydrogen fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* (2016).
104. Wimonsong, P. & Nitisoravut, R. Biohydrogen enhancement using highly porous activated carbon. in *Energy and Fuels* (2014).
105. Zhang, J., Fan, C. & Zang, L. Improvement of hydrogen production from glucose by ferrous iron and biochar. *Bioresour. Technol.* (2017).
106. Feng, Y., Zhang, Y., Quan, X. & Chen, S. Enhanced anaerobic digestion of waste activated sludge digestion by the addition of zero valent iron. *Water Res.* (2014).
107. Zhang, L., Zhang, L. & Li, D. Enhanced dark fermentative hydrogen production by zero-valent iron activated carbon micro-electrolysis. *Int. J. Hydrogen Energy* (2015).
108. Bao, M. D., Su, H. J. & Tan, T. W. Dark fermentative bio-hydrogen production: Effects of substrate pre-treatment and addition of metal ions or L-cysteine. *Fuel* (2013). doi:10.1016/j.fuel.2013.04.063
109. Adams, M. W. W. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *BBA - Bioenergetics* (1990).
110. Reddy, K. *et al.* Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate: effects of pH, S/X, Fe<sup>2+</sup>, and magnetite nanoparticles. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**, 8790–8804 (2017).
111. Mohanraj, S., Kodhaiyolii, S., Rengasamy, M. & Pugalenth, V. Green synthesized iron oxide nanoparticles effect on fermentative hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2014).
112. Kumar, G. *et al.* Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production. *Bioresour. Technol.* **219**, 725–737 (2016).
113. Mohan, S. V. *et al.* Self-immobilization of acidogenic mixed consortia on mesoporous material (SBA-15) and activated carbon to enhance fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* (2008).

114. Jamali, N. S., Md Jahim, J. & Wan Isahak, W. N. R. Biofilm formation on granular activated carbon in xylose and glucose mixture for thermophilic biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* (2016).
115. Lee, J., Kim, K. H. & Kwon, E. E. Biochar as a Catalyst. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2017).
116. Sharma, P. & Melkania, U. Impact of heavy metals on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *E. Coli*. *Waste Manag.* (2018).
117. Wimonsong, P., Llorca, J. & Nitorisavut, R. Catalytic activity and characterization of Fe-Zn-Mg-Al hydrotalcites in biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* (2013).
118. Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G. & Lee, H. S. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2017).
119. Yuan, Z., Yang, H., Zhi, X. & Shen, J. Enhancement effect of l-cysteine on dark fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* (2008).
120. Guo, W. Q. *et al.* Accelerated startup of hydrogen production expanded granular sludge bed with l-Cysteine supplementation. *Energy* (2013).
121. Kumar, G. *et al.* Enhancement of biofuel production via microbial augmentation: The case of dark fermentative hydrogen. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2016).
122. Guo, W. Q., Ren, N. Q., Wang, X. J. & Xiang, W. S. Accelerated startup of biological hydrogen production process by addition of *Ethanoligenens harbinense* B49 in a biofilm-based column reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* (2010).
123. Kuo, W. C., Chao, Y. C., Wang, Y. C. & Cheng, S. S. Bioaugmentation strategies to improve cellulolytic and hydrogen producing characteristics in CSTR intermittent fed with vegetable kitchen waste and napiergrass. in *Energy Procedia* (2012).
124. Chandra, R. & Venkata Mohan, S. Enhanced bio-hydrogenesis by co-culturing photosynthetic bacteria with acidogenic process: Augmented dark-photo fermentative hybrid system to regulate volatile fatty acid inhibition. *Int. J. Hydrogen Energy* (2014).
125. Quéméneur, M. *et al.* Effect of enzyme addition on fermentative hydrogen production from wheat straw. *Int. J. Hydrogen Energy* (2012).
126. Hatch, J. L. & Finneran, K. T. Influence of reduced electron shuttling compounds on biological H<sub>2</sub> production in the fermentative pure culture *Clostridium beijerinckii*. *Curr. Microbiol.* **56**, 268–273 (2008).
127. Roden, E. E. *et al.* Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances. *Nat. Geosci.* (2010).
128. Martínez, C. M., Celis, L. B. & Cervantes, F. J. Immobilized humic substances as redox mediator for the simultaneous removal of phenol and Reactive Red 2 in a UASB reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9897–9905 (2013).
129. Alvarez, L. H., Perez-Cruz, M. A., Rangel-Mendez, J. R. & Cervantes, F. J. Immobilized redox mediator on metal-oxides nanoparticles and its catalytic effect in a reductive decolorization process. *J. Hazard. Mater.* **184**, 268–272 (2010).
130. Martins, L. R., Baêta, B. E. L., Gurgel, L. V. A., de Aquino, S. F. & Gil, L. F. Application of cellulose-immobilized riboflavin as a redox mediator for anaerobic degradation of a model azo dye Remazol Golden Yellow RNL. *Ind. Crops Prod.* **65**, 454–462 (2015).

131. Martínez Cobos, C. G. Aplicación de mediadores redox solubles e inmovilizados para incrementar la producción de hidrógeno por *Clostridium beijerinckii*. (Universidad Autónoma de Nuevo León, 2016).
132. Girbal, L., Vasconcelos, I., Saint-Amans, S. & Soucaille, P. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol. Rev.* (1995).
133. Peguin, S. & Soucaille, P. Modulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* by iron limitation and methyl viologen addition. *Applied and Environmental Microbiology* (1995).
134. Zhang, C., Ma, K. & Xing, X. H. Regulation of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* by external NADH and NAD<sup>+</sup>. *Int. J. Hydrogen Energy* (2009).
135. Ye, X., Morgenroth, E., Zhang, X. & Finneran, K. T. Anthrahydroquinone-2,6,-disulfonate (AH 2QDS) increases hydrogen molar yield and xylose utilization in growing cultures of *Clostridium beijerinckii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 855–864 (2011).
136. Ye, X., Zhang, X., Morgenroth, E. & Finneran, K. T. Anthrahydroquinone-2,6-disulfonate increases the rate of hydrogen production during *Clostridium beijerinckii* fermentation with glucose, xylose, and cellobiose. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**, 11701–11709 (2012).
137. Rodriguez, S. Y. *et al.* Biotransformation of 4-nitrophenol by co-immobilized *Geobacter sulfurreducens* and anthraquinone-2-sulfonate in barium alginate beads. *Chemosphere* (2019).
138. Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. & Van't Riet, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* (1990).
139. Wang, J. & Wan, W. Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* (2009).
140. Christoforidis, K. C. & Fornasiero, P. Photocatalytic Hydrogen Production: A Rift into the Future Energy Supply. *ChemCatChem* **9**, 1523–1544 (2017).
141. Shimura, K. & Yoshida, H. Heterogeneous photocatalytic hydrogen production from water and biomass derivatives. *Energy Environ. Sci.* **4**, 2467 (2011).
142. Ibhaddon, A. & Fitzpatrick, P. Heterogeneous Photocatalysis: Recent Advances and Applications. *Catalysts* **3**, 189–218 (2013).
143. Wen, J., Xie, J., Chen, X. & Li, X. A review on g-C 3 N 4 -based photocatalysts. *Appl. Surf. Sci.* (2017).
144. Zhu, J. & Zäch, M. Nanostructured materials for photocatalytic hydrogen production. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (2009).
145. Acar, C., Dincer, I. & Zamfirescu, C. A review on selected heterogeneous photocatalysts for hydrogen production. *International Journal of Energy Research* (2014).
146. Chiarello, G. L., Aguirre, M. H. & Sellì, E. Hydrogen production by photocatalytic steam reforming of methanol on noble metal-modified TiO<sub>2</sub>. *J. Catal.* (2010).
147. Etacheri, V., Di Valentin, C., Schneider, J., Bahnemann, D. & Pillai, S. C. Visible-light activation of TiO<sub>2</sub> photocatalysts: Advances in theory and experiments. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* (2015).
148. Taniguchi, Y., Yoneyama, H. & Tamura, H. Hydrogen evolution on surface-modified silicon powder photocatalysts in aqueous ethanol solutions. *Chem. Lett.* (1983).
149. Luo, N. *et al.* Photo-catalytic conversion of oxygenated hydrocarbons to hydrogen over heteroatom-

- doped TiO<sub>2</sub> catalysts. *Int. J. Hydrogen Energy* (2009).
150. Colmenares, J. C. *et al.* Influence of the strong metal support interaction effect (SMSI) of Pt/TiO<sub>2</sub> and Pd/TiO<sub>2</sub> systems in the photocatalytic biohydrogen production from glucose solution. *Catal. Commun.* (2011).
  151. Fajrina, N. & Tahir, M. A critical review in strategies to improve photocatalytic water splitting towards hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* **44**, 540–577 (2019).
  152. Abe, R. Recent progress on photocatalytic and photoelectrochemical water splitting under visible light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* (2010).
  153. Li, X., Yu, J. & Jaroniec, M. Hierarchical photocatalysts. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 2603–2636 (2016).
  154. Fujishima, A., Zhang, X. & Tryk, D. A. TiO<sub>2</sub> photocatalysis and related surface phenomena. *Surf. Sci. Rep.* (2008).
  155. Du, H., Liu, Y. N., Shen, C. C. & Xu, A. W. Nanoheterostructured photocatalysts for improving photocatalytic hydrogen production. *Cuihua Xuebao/Chinese J. Catal.* **38**, 1295–1306 (2017).
  156. Hashimoto, K., Kawai, T. & Sakata, T. Photocatalytic reactions of hydrocarbons and fossil fuels with water. Hydrogen production and oxidation. *J. Phys. Chem.* (1984).
  157. Zhang, P., Wang, T. & Gong, J. Current Mechanistic Understanding of Surface Reactions over Water-Splitting Photocatalysts. *Chem* (2018).
  158. Rather, R. A., Singh, S. & Pal, B. Visible and direct sunlight induced H<sub>2</sub> production from water by plasmonic Ag-TiO<sub>2</sub> nanorods hybrid interface. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* (2017).
  159. Tahir, M. & Amin, N. S. Advances in visible light responsive titanium oxide-based photocatalysts for CO<sub>2</sub> conversion to hydrocarbon fuels. *Energy Convers. Manag.* (2013).
  160. Zhu, Z., Kao, C. T., Tang, B. H., Chang, W. C. & Wu, R. J. Efficient hydrogen production by photocatalytic water-splitting using Pt-doped TiO<sub>2</sub> hollow spheres under visible light. *Ceram. Int.* (2016).
  161. Reddy, N. L. *et al.* A review on frontiers in plasmonic nano-photocatalysts for hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* **44**, 10453–10472 (2019).
  162. Xu, Y. & Xu, R. Nickel-based cocatalysts for photocatalytic hydrogen production. *Appl. Surf. Sci.* **351**, 779–793 (2015).
  163. Simon, T. *et al.* Redox shuttle mechanism enhances photocatalytic H<sub>2</sub> generation on ni-decorated CdS nanorods. *Nat. Mater.* **13**, 1–6 (2014).
  164. Chen, S. *et al.* Promotion effect of nickel loaded on CdS for photocatalytic H<sub>2</sub> production in lactic acid solution. *Appl. Surf. Sci.* **316**, 590–594 (2014).
  165. Zhang, J., Qi, L., Ran, J., Yu, J. & Qiao, S. Z. Ternary NiS/ZnxCd<sub>1-x</sub>S/reduced graphene oxide nanocomposites for enhanced solar photocatalytic h<sub>2</sub>-production activity. *Adv. Energy Mater.* (2014).
  166. Sreethawong, T. & Yoshikawa, S. Enhanced photocatalytic hydrogen evolution over Pt supported on mesoporous TiO<sub>2</sub> prepared by single-step sol-gel process with surfactant template. *Int. J. Hydrogen Energy* (2006).
  167. Zhang, D., Ma, X., Zhang, H., Liao, Y. & Xiang, Q. Enhanced photocatalytic hydrogen evolution activity of carbon and nitrogen self-doped TiO<sub>2</sub> hollow sphere with the creation of oxygen vacancy and Ti<sup>3+</sup>. *Mater. Today Energy* (2018).
  168. Yan, X. *et al.* A selective ion replacement strategy for the synthesis of copper doped carbon nitride nanotubes with improved photocatalytic hydrogen evolution. *Appl. Catal. B Environ.* (2018).

169. Luo, Z., Li, C., Liu, S., Wang, T. & Gong, J. Gradient doping of phosphorus in Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoarray photoanodes for enhanced charge separation. *Chem. Sci.* (2016).
170. Li, H. *et al.* A systematic study on visible-light N-doped TiO<sub>2</sub> photocatalyst obtained from ethylenediamine by sol-gel method. *Appl. Surf. Sci.* (2015).
171. Duan, J., Chen, S., Jaroniec, M. & Qiao, S. Z. Heteroatom-Doped Graphene-Based Materials for Energy-Relevant Electrocatalytic Processes. *ACS Catal.* (2015).
172. Jiao, Y., Zheng, Y., Jaroniec, M. & Qiao, S. Z. Design of electrocatalysts for oxygen- and hydrogen-involving energy conversion reactions. *Chemical Society Reviews* (2015).
173. Sudha, D. & Sivakumar, P. Review on the photocatalytic activity of various composite catalysts. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* (2015).
174. Lakshmana Reddy, N., Emin, S., Valant, M. & Shankar, M. V. Nanostructured Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@TiO<sub>2</sub> photocatalyst for enhanced hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* (2017).
175. Serpone, N. & Emeline, A. V. Semiconductor photocatalysis - Past, present, and future outlook. *Journal of Physical Chemistry Letters* (2012).
176. Xie, M. Y. *et al.* Hydrogen production by photocatalytic water-splitting on Pt-doped TiO<sub>2</sub>-ZnO under visible light. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* (2017).
177. Singh, P. *et al.* Review on various strategies for enhancing photocatalytic activity of graphene based nanocomposites for water purification. *Arab. J. Chem.* (2018).
178. Kong, C., Min, S. & Lu, G. Dye-sensitized NiS<sub>x</sub> catalyst decorated on graphene for highly efficient reduction of water to hydrogen under visible light irradiation. *ACS Catal.* (2014).
179. Phongamwong, T., Chareonpanich, M. & Limtrakul, J. Role of chlorophyll in Spirulina on photocatalytic activity of CO<sub>2</sub> reduction under visible light over modified N-doped TiO<sub>2</sub> photocatalysts. *Appl. Catal. B Environ.* **168–169**, 114–124 (2015).
180. Joshi, M., Kamble, S. P., Labhsetwar, N. K., Parwate, D. V. & Rayalu, S. S. Chlorophyll-based photocatalysts and their evaluations for methyl orange photoreduction. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **204**, 83–89 (2009).
181. Kondo, M. *et al.* Photoinduced hydrogen production with photosensitization of Zn chlorophyll analog dimer as a photosynthetic special pair model. *Int. J. Hydrogen Energy* **40**, 5313–5318 (2015).
182. Yang, P. *et al.* The Functionality of Surface Hydroxy Groups on the Selectivity and Activity of Carbon Dioxide Reduction over Cuprous Oxide in Aqueous Solutions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* (2018).
183. Chen, W. T. *et al.* Effect of TiO<sub>2</sub> polymorph and alcohol sacrificial agent on the activity of Au/TiO<sub>2</sub> photocatalysts for H<sub>2</sub> production in alcohol-water mixtures. *J. Catal.* (2015).
184. Wang, T. & Gong, J. Single-Crystal Semiconductors with Narrow Band Gaps for Solar Water Splitting. *Angew. Chemie - Int. Ed.* (2015).
185. Al-Azri, Z. H. N. *et al.* The roles of metal co-catalysts and reaction media in photocatalytic hydrogen production: Performance evaluation of M/TiO<sub>2</sub> photocatalysts (M = Pd, Pt, Au) in different alcohol-water mixtures. *J. Catal.* (2015).
186. Zuo, F., Wang, L. & Feng, P. Self-doped Ti<sup>3+</sup>@TiO<sub>2</sub> visible light photocatalyst: Influence of synthetic parameters on the H<sub>2</sub> production activity. *Int. J. Hydrogen Energy* (2014).
187. Tee, S. Y. *et al.* Recent Progress in Energy-Driven Water Splitting. *Advanced Science* (2017).
188. Puga, A. V. Photocatalytic production of hydrogen from biomass-derived feedstocks. *Coordination Chemistry Reviews* (2016).

189. Ahmad, H., Kamarudin, S. K., Minggu, L. J. & Kassim, M. Hydrogen from photo-catalytic water splitting process: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2015).
190. Baniasadi, E., Dincer, I. & Naterer, G. F. Measured effects of light intensity and catalyst concentration on photocatalytic hydrogen and oxygen production with zinc sulfide suspensions. *Int. J. Hydrogen Energy* (2013).
191. Huaxu, L. *et al.* Analyzing the effects of reaction temperature on photo-thermo chemical synergetic catalytic water splitting under full-spectrum solar irradiation: An experimental and thermodynamic investigation. *Int. J. Hydrogen Energy* (2017).
192. Zhang, Z. & Maggard, P. A. Investigation of photocatalytically-active hydrated forms of amorphous titania,  $\text{TiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* (2007).
193. Clarizia, L. *et al.* Copper modified-TiO<sub>2</sub> catalysts for hydrogen generation through photoreforming of organics. A short review. *Int. J. Hydrogen Energy* (2014).
194. Skaf, D. W., Natrin, N. G., Brodwater, K. C. & Bongo, C. R. Comparison of photocatalytic hydrogen production from glycerol and crude glycerol obtained from biodiesel processing. *Catal. Letters* (2012).
195. Fujita, S. ichiro, Kawamori, H., Honda, D., Yoshida, H. & Arai, M. Photocatalytic hydrogen production from aqueous glycerol solution using NiO/TiO<sub>2</sub> catalysts: Effects of preparation and reaction conditions. *Appl. Catal. B Environ.* (2016).
196. Nada, A. A., Hamed, H. A., Barakat, M. H., Mohamed, N. R. & Veziroglu, T. N. Enhancement of photocatalytic hydrogen production rate using photosensitized TiO<sub>2</sub>/RuO<sub>2</sub>-MV<sup>2+</sup>. *Int. J. Hydrogen Energy* (2008).
197. Ortega Méndez, J. A. *et al.* Production of hydrogen by water photo-splitting over commercial and synthesised Au/TiO<sub>2</sub> catalysts. *Appl. Catal. B Environ.* (2014).
198. Kawai, T. & Sakata, T. Conversion of carbohydrate into hydrogen fuel by a photocatalytic process. *Nature* **286**, 474–476 (1980).
199. Sakata, T. & Kawai, T. Heterogeneous photocatalytic production of hydrogen and methane from ethanol and water. *Chem. Phys. Lett.* **80**, 341–344 (1981).
200. Kawai, T. & Sakata, T. Photocatalytic hydrogen production from liquid methanol and water. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 694–695 (1980).
201. Sakata, T., Kawai, T. & Hashimoto, K. Heterogeneous photocatalytic reactions of organic acids and water. New reaction paths besides the photo-Kolbe reaction. *J. Phys. Chem.* **88**, 2344–2350 (1984).
202. Kondarides, D. I., Daskalaki, V. M., Patsoura, A. & Verykios, X. E. Hydrogen production by photo-induced reforming of biomass components and derivatives at ambient conditions. *Catal. Letters* **122**, 26–32 (2008).
203. Li, Y. *et al.* Hydrogen production from organic fatty acids using carbon-doped TiO<sub>2</sub> nanoparticles under visible light irradiation. *Int. J. Hydrogen Energy* **43**, 4335–4346 (2018).
204. Olivo-Alanis, D., Garcia-Reyes, R. B., Alvarez, L. H. & Garcia-Gonzalez, A. Mechanism of anaerobic bio-reduction of azo dye assisted with lawsone-immobilized activated carbon. *J. Hazard. Mater.* **347**, 423–430 (2018).
205. Alvarez, L. H., Del Angel, Y. A. & García-Reyes, B. Improved Microbial and Chemical Reduction of Direct Blue 71 Using Anthraquinone-2,6-disulfonate Immobilized on Granular Activated Carbon. *Water. Air. Soil Pollut.* (2017).

206. Ye, X., Zhang, X., Morgenroth, E. & Finneran, K. T. Exogenous anthrahydroquinone-2,6-disulfonate specifically increases xylose utilization during mixed sugar fermentation by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Int. J. Hydrogen Energy* **38**, 2719–2727 (2013).
207. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (American Public Health Association, 2005).
208. Zhang, G. *et al.* Macro-mesoporous resorcinol-formaldehyde polymer resins as amorphous metal-free visible light photocatalysts. *J. Mater. Chem. A* **3**, 15413–15419 (2015).
209. Zhao, M. & Song, H. Catalytic Graphitization of Phenolic Resin. *J. Mater. Sci. Technol.* **27**, 266–270 (2011).
210. Saraswat, R. *et al.* Development of novel in situ nickel-doped, phenolic resin-based micro-nano-activated carbon adsorbents for the removal of vitamin B-12. *Chem. Eng. J.* **197**, 250–260 (2012).
211. Yang, J. B. *et al.* Preparation and properties of phenolic resin-based activated carbon spheres with controlled pore size distribution. *Carbon N. Y.* **40**, 911–916 (2002).
212. Zhang, G. & Choi, W. A low-cost sensitizer based on a phenolic resin for charge-transfer type photocatalysts working under visible light. *Chem. Commun.* **48**, 10621–10623 (2012).
213. Zhang, G., Kim, C. & Choi, W. Poly(4-vinylphenol) as a new stable and metal-free sensitizer of titania for visible light photocatalysis through ligand-to-metal charge transfer process. *Catal. Today* **281**, 109–116 (2017).
214. Lee, J. & Choi, W. Effect of platinum deposits on TiO<sub>2</sub> on the anoxic photocatalytic degradation pathways of alkylamines in water: Dealkylation and N-alkylation. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4026–4033 (2004).
215. Teran-Salgado, E. *et al.* Platinum nanoparticles supported on electrochemically oxidized and exfoliated graphite for the oxygen reduction reaction. *Electrochim. Acta* (2019).
216. Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428 (1959).
217. Gurgel, L. V. A., Júnior, O. K., Gil, R. P. de F. & Gil, L. F. Adsorption of Cu(II), Cd(II), and Pb(II) from aqueous single metal solutions by cellulose and mercerized cellulose chemically modified with succinic anhydride. *Bioresour. Technol.* (2008). doi:10.1016/j.biortech.2007.05.072
218. Allen Nyquist, R. *Interpreting Infrared, Raman, and Nuclear Magnetic Resonance Spectra*. (Elsevier, 2001).
219. Abe, M. *et al.* Infrared spectra and molecular association of lumiflavin and riboflavin derivatives. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* (1986).
220. Alvarez, L. H. *et al.* Quinone-functionalized activated carbon improves the reduction of congo red coupled to the removal of p-cresol in a UASB reactor. *J. Hazard. Mater.* **338**, 233–240 (2017).
221. Gilles, V. *et al.* A new, simple and efficient method of steglich esterification of juglone with long-chain fatty acids: Synthesis of a new class of non-polymeric wax deposition inhibitors for crude oil. *J. Braz. Chem. Soc.* (2015).
222. Spyroudis, S. *Hydroxyquinones: Synthesis and reactivity. Molecules* **5**, (2000).
223. Abuilaiwi, F. A., Laoui, T., Al-Harhi, M. & Atieh, M. A. Modification and functionalization of multiwalled carbon nanotube (MWCNT) via fischer esterification. *Arab. J. Sci. Eng.* (2010).
224. Bosilj, M. *et al.* Functionalising hydrothermal carbons for catalysis-investigating solid acids in esterification reactions. *Catal. Sci. Technol.* (2020). doi:10.1039/c9cy01465a

225. Evvyernie, D. *et al.* Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium. *J. Biosci. Bioeng.* (2000).
226. Philips, J., Verbeeck, K., Rabaey, K. & Arends, J. B. A. *Electron Transfer Mechanisms in Biofilms. Microbial Electrochemical and Fuel Cells: Fundamentals and Applications* (Elsevier Ltd., 2015).
227. Lee, K., Lin, P. & Chang, J. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **31**, 465–472 (2006).
228. Ye, X., Morgenroth, E., Zhang, X. & Finneran, K. T. Anthrahydroquinone-2,6,-disulfonate (AH 2QDS) increases hydrogen molar yield and xylose utilization in growing cultures of *Clostridium beijerinckii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2011).
229. Cervantes, F. J. *et al.* Enrichment and immobilization of quinone-respiring bacteria in anaerobic granular sludge. in *Water Science and Technology* (2003).
230. Reddy, M. V., Mohan, S. V. & Chang, Y. C. Medium-Chain Fatty Acids (MCFA) Production Through Anaerobic Fermentation Using *Clostridium kluveri*: Effect of Ethanol and Acetate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2018).
231. Del Angel-Acosta, Y. A., Alvarez, L. H., Garcia-Reyes, R. B., Garza-González, M. T. & Carrillo-Reyes, J. Addition of electron shuttling compounds and different pH conditions for hydrogen production by a heat-treated sludge. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* (2020).
232. Ye, X., Zhang, X., Morgenroth, E. & Finneran, K. T. Anthrahydroquinone-2,6-disulfonate increases the rate of hydrogen production during *Clostridium beijerinckii* fermentation with glucose, xylose, and cellobiose. *Int. J. Hydrogen Energy* (2012).
233. Popovic, J. & Finneran, K. T. Electron shuttling to ferrihydrite selects for fermentative rather than Fe<sup>3+</sup>—reducing biomass in xylose—fed batch reactors derived from three different inoculum sources. *Biotechnol. Bioeng.* **115**, 577–585 (2018).
234. Popovic, J., Ye, X., Haluska, A. & Finneran, K. T. Ferric iron and extracellular electron shuttling increase xylose utilization and butanol production during fermentation with multiple solventogenic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 8053–8061 (2017).
235. González-Cabaleiro, R., Lema, J. M. & Rodríguez, J. Metabolic energy-based modelling explains product yielding in anaerobic mixed culture fermentations. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
236. Trchounian, A. & Trchounian, K. Fermentation Revisited: How Do Microorganisms Survive Under Energy-Limited Conditions? *Trends Biochem. Sci.* **44**, 391–400 (2019).
237. Huang, J. *et al.* Insights into redox mediator supplementation on enhanced volatile fatty acids production from waste activated sludge. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **26**, 27052–27062 (2019).
238. Del Angel-Acosta, Y. A., Alvarez, L. H., Garcia-Reyes, R. B., Garza-González, M. T. & Carrillo-Reyes, J. Addition of electron shuttling compounds and different pH conditions for hydrogen production by a heat-treated sludge. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **23**, 101507 (2020).
239. Waligórska, M. Fermentative hydrogen production - Process design and bioreactors. *Chem. Process Eng. - Inz. Chem. i Proces.* (2012).
240. Yuan, Y. *et al.* Applications of biochar in redox-mediated reactions. *Bioresour. Technol.* **246**, 271–281 (2017).
241. Lu, J. H. *et al.* Dark fermentation production of volatile fatty acids from glucose with biochar amended biological consortium. *Bioresour. Technol.* (2020).
242. Naresh Kumar, A., Nagendranatha Reddy, C., Hari Prasad, R. & Venkata Mohan, S. Azo dye load-

- shock on relative behavior of biofilm and suspended growth configured periodic discontinuous batch mode operations: Critical evaluation with enzymatic and bio-electrocatalytic analysis. *Water Res.* **60**, 182–196 (2014).
243. Guin, P. S., Das, S. & Mandal, P. C. Electrochemical Reduction of Quinones in Different Media: A Review. *Int. J. Electrochem.* **2011**, 1–22 (2011).
  244. Borghese, R. *et al.* Reduction of chalcogen oxyanions and generation of nanoprecipitates by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Hazard. Mater.* **269**, 24–30 (2014).
  245. Dos Santos, A. B., Traverse, J., Cervantes, F. J. & Van Lier, J. B. Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. *Biotechnol. Bioeng.* (2005).
  246. Ye, X., Zhang, X., Morgenroth, E. & Finneran, K. T. Exogenous anthrahydroquinone-2,6-disulfonate specifically increases xylose utilization during mixed sugar fermentation by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Int. J. Hydrogen Energy* (2013).
  247. Martinez, C. M. & Alvarez, L. H. Application of redox mediators in bioelectrochemical systems. *Biotechnol. Adv.* **36**, 1412–1423 (2018).
  248. Chabert, N., Amin Ali, O. & Achouak, W. All ecosystems potentially host electrogenic bacteria. *Bioelectrochemistry* **106**, 88–96 (2015).
  249. Czaplá, M., Sarewicz, M. & Osyczka, A. Fusing proteins as an approach to study bioenergetic enzymes and processes. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1817**, 1847–1851 (2012).
  250. Venkata Mohan, S. & Pandey, A. Chapter 1 - Sustainable Hydrogen Production: An Introduction. *Biomass, Biofuels, Biochem.* (2019).
  251. Lovley, D. R. Syntrophy Goes Electric: Direct Interspecies Electron Transfer. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 643–664 (2017).
  252. Li, F. *et al.* Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.* **190**, 843–850 (2008).
  253. Bowker, M. *et al.* Hydrogen production by photoreforming of biofuels using Au, Pd and Au-Pd/TiO<sub>2</sub> photocatalysts. *J. Catal.* **310**, 10–15 (2014).
  254. Yasuda, M., Matsumoto, T. & Yamashita, T. Sacrificial hydrogen production over TiO<sub>2</sub>-based photocatalysts: Polyols, carboxylic acids, and saccharides. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **81**, 1627–1635 (2018).
  255. AlSalka, Y., Hakki, A., Fleisch, M. & Bahnemann, D. W. Understanding the degradation pathways of oxalic acid in different photocatalytic systems: Towards simultaneous photocatalytic hydrogen evolution. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **366**, 81–90 (2018).
  256. Al-Azri, Z. H. N., Aloufi, M., Chan, A., Waterhouse, G. I. N. & Idriss, H. Metal Particle Size Effects on the Photocatalytic Hydrogen Ion Reduction. *ACS Catal.* (2019).
  257. Bianchi, C. L. *et al.* Sustainable photocatalytic porcelain grés slabs active under LED light for indoor depollution and bacteria reduction. in *Handbook of Smart Photocatalytic Materials* (2020).
  258. Tri Wahyuni, E. & Hidayat Aprilita, N. Photoreduction Processes over TiO<sub>2</sub> Photocatalyst. *Photocatal. - Appl. Attrib.* (2019).
  259. Bahruji, H., Bowker, M., Davies, P. R. & Pedrono, F. New insights into the mechanism of photocatalytic reforming on Pd/TiO<sub>2</sub>. *Appl. Catal. B Environ.* (2011).

260. Panagiotopoulou, P., Karamerou, E. E. & Kondarides, D. I. Kinetics and mechanism of glycerol photo-oxidation and photo-reforming reactions in aqueous TiO<sub>2</sub> and Pt/TiO<sub>2</sub> suspensions. *Catal. Today* **209**, 91–98 (2013).
261. Imizcoz, M. & Puga, A. V. Optimising hydrogen production: Via solar acetic acid photoreforming on Cu/TiO<sub>2</sub>. *Catal. Sci. Technol.* **9**, 1098–1102 (2019).
262. Zheng, X. J. *et al.* Photocatalytic degradation of butyric acid over Cu<sub>2</sub>O/Bi<sub>2</sub>WO<sub>6</sub> composites for simultaneous production of alkanes and hydrogen gas under UV irradiation. *Int. J. Hydrogen Energy* **42**, 7917–7929 (2017).
263. Al-Azri, Z. H. N., Aloufi, M., Chan, A., Waterhouse, G. I. N. & Idriss, H. Metal Particle Size Effects on the Photocatalytic Hydrogen Ion Reduction. *ACS Catal.* **9**, 3946–3958 (2019).
264. Sampaio, M. J. *et al.* Photocatalytic performance of Au/ZnO nanocatalysts for hydrogen production from ethanol. *Appl. Catal. A Gen.* **518**, 198–205 (2016).
265. Patsoura, A., Kondarides, D. I. & Verykios, X. E. Photocatalytic degradation of organic pollutants with simultaneous production of hydrogen. *Catal. Today* (2007).
266. Li, Y. *et al.* Hydrogen and Propane Production From Butyric Acid Photoreforming Over Pt-TiO<sub>2</sub>. *Int. J. Hydrogen Energy* **9**, 1098–1102 (2019).
267. Huang, Z. *et al.* Enhanced photocatalytic alkane production from fatty acid decarboxylation via inhibition of radical oligomerization. *Nat. Catal.* **3**, 170–178 (2020).
268. Strataki, N., Bekiari, V., Kondarides, D. I. & Lianos, P. Hydrogen production by photocatalytic alcohol reforming employing highly efficient nanocrystalline titania films. *Appl. Catal. B Environ.* **77**, 184–189 (2007).
269. Fox, M. A. & Dulay, M. T. Heterogeneous Photocatalysis. *Chem. Rev.* **93**, 341–357 (1993).
270. Pârvulescu, V. I. & Marcu, V. *Heterogeneous photocatalysis. Surface and Nanomolecular Catalysis* (2006).
271. Dean, J. A. *Lange's Handbook Of Chemistry, 15th ed. McGraw-Hill: New York* (1999).
272. Polo, A. S., Santos, M. C., De Souza, R. F. B. & Alves, W. A. Pt-Ru-TiO<sub>2</sub> photoelectrocatalysts for methanol oxidation. *J. Power Sources* **196**, 872–876 (2011).
273. Di, L., Xu, Z., Wang, K. & Zhang, X. A facile method for preparing Pt/TiO<sub>2</sub> photocatalyst with enhanced activity using dielectric barrier discharge. *Catal. Today* **211**, 109–113 (2013).
274. Colmenares, J. C. *et al.* Influence of the strong metal support interaction effect (SMSI) of Pt/TiO<sub>2</sub> and Pd/TiO<sub>2</sub> systems in the photocatalytic biohydrogen production from glucose solution. *Catal. Commun.* **16**, 1–6 (2011).
275. Lin, C. H., Chao, J. H., Liu, C. H., Chang, J. C. & Wang, F. C. Effect of calcination temperature on the structure of a Pt/TiO<sub>2</sub> (B) nanofiber and its photocatalytic activity in generating H<sub>2</sub>. *Langmuir* **24**, 9907–9915 (2008).
276. Olivo-Alanis, D. *et al.* Effective photocatalytic mechanism on dye decolorization in different water matrices with phenolic resins as a photocatalyst under visible LED irradiation. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **372**, 296–308 (2019).
277. Lakshmanareddy, N., Navakoteswara Rao, V., Cheralathan, K. K., Subramaniam, E. P. & Shankar, M. V. Pt/TiO<sub>2</sub> nanotube photocatalyst – Effect of synthesis methods on valence state of Pt and its influence on hydrogen production and dye degradation. *J. Colloid Interface Sci.* **538**, 83–98 (2019).
278. Atilano-Camino, M. M. Evaluation of dissolved and immobilized redox mediators on dark

- fermentation: Driving to hydrogen or solventogenic pathway. *Bioresour. Technol.* (2020). doi:10.1016/j.biortech.2020.123981
279. Kisch, H. Semiconductor photocatalysis - Mechanistic and synthetic aspects. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 812–847 (2013).
280. Escobedo Salas, S., Serrano Rosales, B. & De Lasa, H. Quantum yield with platinum modified TiO<sub>2</sub> photocatalyst for hydrogen production. *Appl. Catal. B Environ.* **140–141**, 523–536 (2013).
281. Zhou, D. *et al.* Influence of material properties on TiO<sub>2</sub> Nanoparticle agglomeration. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0081239
282. Dionysiou, D. D., Suidan, M. T., Bekou, E., Baudin, I. & Lainé, J. M. Effect of ionic strength and hydrogen peroxide on the photocatalytic degradation of 4-chlorobenzoic acid in water. *Appl. Catal. B Environ.* (2000).
283. Chong, M. N., Jin, B., Laera, G. & Saint, C. P. Evaluating the photodegradation of Carbamazepine in a sequential batch photoreactor system: Impacts of effluent organic matter and inorganic ions. *Chem. Eng. J.* (2011).
284. Polo, A. S. *et al.* TiO<sub>2</sub> photocatalysis of naproxen: Effect of the water matrix, anions and diclofenac on degradation rates. *Langmuir* **139**, 579–588 (2015).
285. Ziegmann, M., Doll, T. & Frimmel, F. H. Matrix effects on the photocatalytic degradation of dichloroacetic acid and atrazine in water. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* (2006).
286. Zhang, X., Xiong, X. & Xu, Y. Brookite TiO<sub>2</sub> photocatalyzed degradation of phenol in presence of phosphate, fluoride, sulfate and borate anions. *RSC Adv.* **6**, 61830–61836 (2016).
287. Jing, L. *et al.* Dynamics of photogenerated charges in the phosphate modified TiO<sub>2</sub> and the enhanced activity for photoelectrochemical water splitting. *Energy Environ. Sci.* (2012).
288. Habisreutinger, S. N., Schmidt-Mende, L. & Stolarczyk, J. K. Photocatalytic reduction of CO<sub>2</sub> on TiO<sub>2</sub> and other semiconductors. *Angewandte Chemie - International Edition* (2013).
289. Kondratenko, E. V., Mul, G., Baltrusaitis, J., Larrazábal, G. O. & Pérez-Ramírez, J. Status and perspectives of CO<sub>2</sub> conversion into fuels and chemicals by catalytic, photocatalytic and electrocatalytic processes. *Energy and Environmental Science* (2013). doi:10.1039/c3ee41272e
290. Dimitrijevic, N. M. *et al.* Role of water and carbonates in photocatalytic transformation of CO<sub>2</sub> to CH<sub>4</sub> on titania. *J. Am. Chem. Soc.* (2011).
291. Imizcoz, M. & Puga, A. V. Assessment of photocatalytic hydrogen production from biomass or wastewaters depending on the metal co-catalyst and its deposition method on TiO<sub>2</sub>. *Catalysts* (2019).
292. Badawy, M. I., Ghaly, M. Y. & Ali, M. E. M. Photocatalytic hydrogen production over nanostructured mesoporous titania from olive mill wastewater. *Desalination* (2011). doi:10.1016/j.desal.2010.09.035
293. Liu, C., Lei, Z., Yang, Y. & Zhang, Z. Preliminary trial on degradation of waste activated sludge and simultaneous hydrogen production in a newly-developed solar photocatalytic reactor with AgX/TiO<sub>2</sub>-coated glass tubes. *Water Res.* **47**, 4986–4992 (2013).
294. Iervolino, G. *et al.* Hydrogen production from glucose degradation in water and wastewater treated by Ru-LaFeO<sub>3</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic particles photocatalysis and heterogeneous photo-Fenton. *Int. J. Hydrogen Energy* (2018).

## ANEXOS

### Anexo A

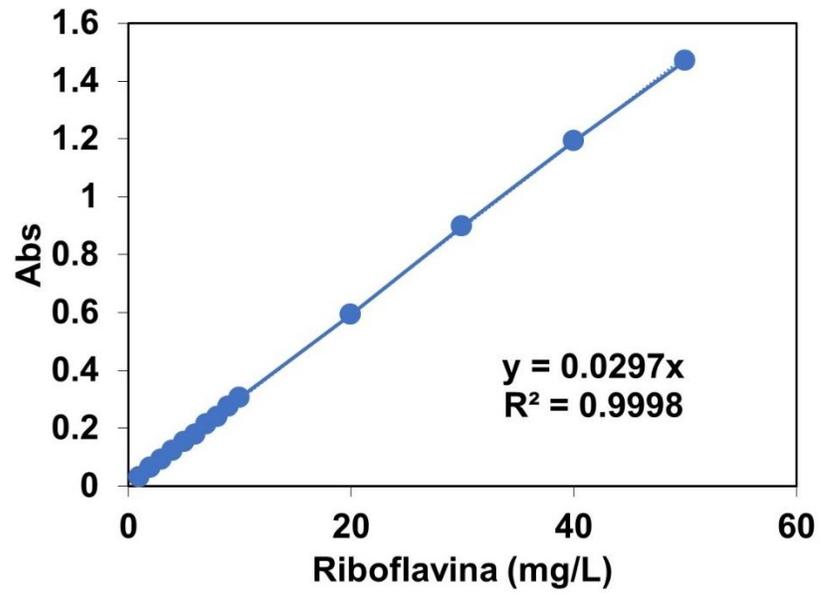


Fig. A1. Curva de calibración de lumiflavina a 354 nm.

Anexo B

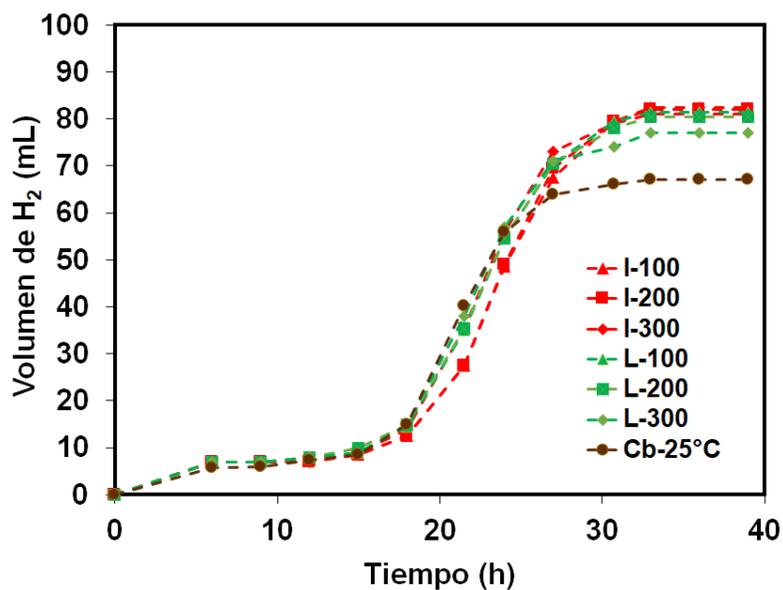


Fig. B1. Cinética de producción de hidrógeno a 25 °C usando riboflavina libre e inmovilizada en bagazo de agave (I: inmovilizada, L: libre; 100, 200 y 300  $\mu$ M; Cb: sin riboflavina)

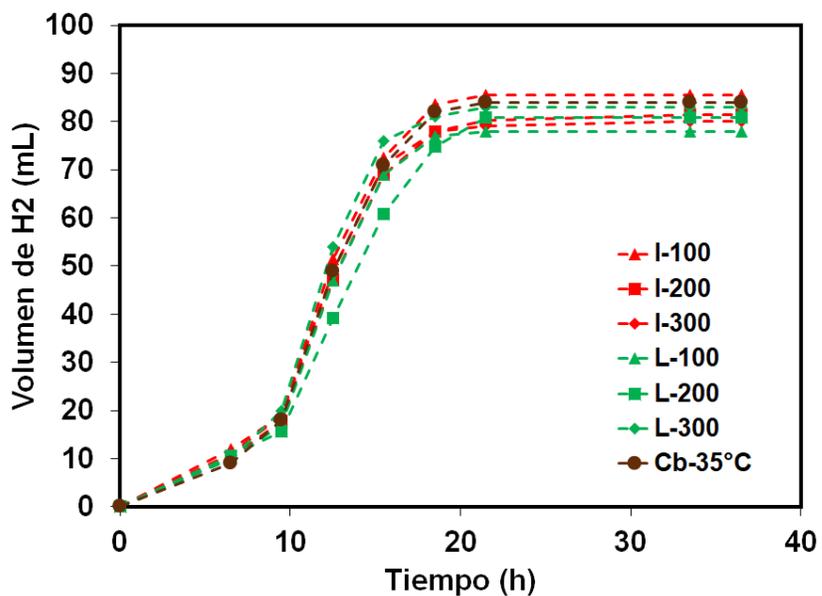


Fig. B2. Cinética de producción de hidrógeno a 35 °C usando riboflavina libre e inmovilizada en bagazo de agave (I: inmovilizada, L: libre; 100, 200 y 300  $\mu$ M; Cb: sin riboflavina)

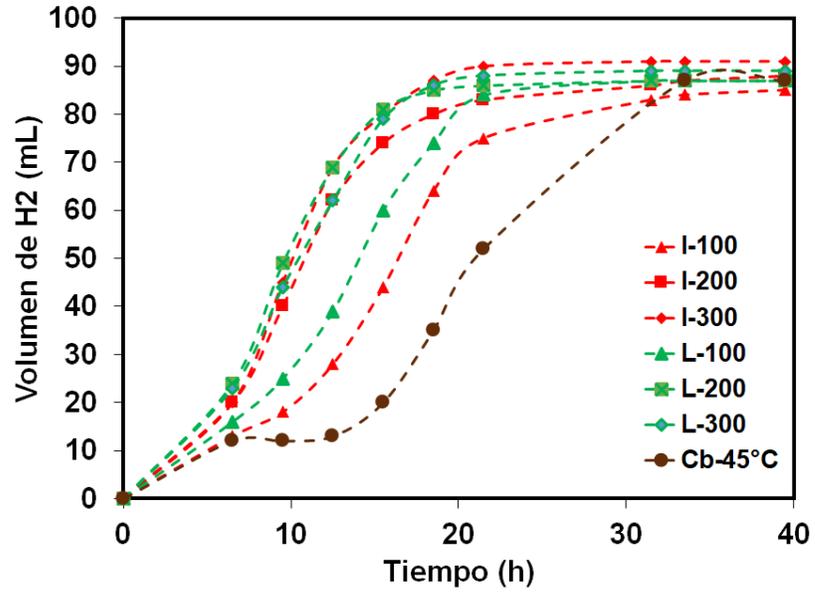


Fig. B3. Cinética de producción de hidrógeno a 45 °C usando riboflavina libre e inmovilizada en bagazo de agave (I: inmovilizada, L: libre; 100, 200 y 300  $\mu$ M; Cb: sin riboflavina)

Anexo C

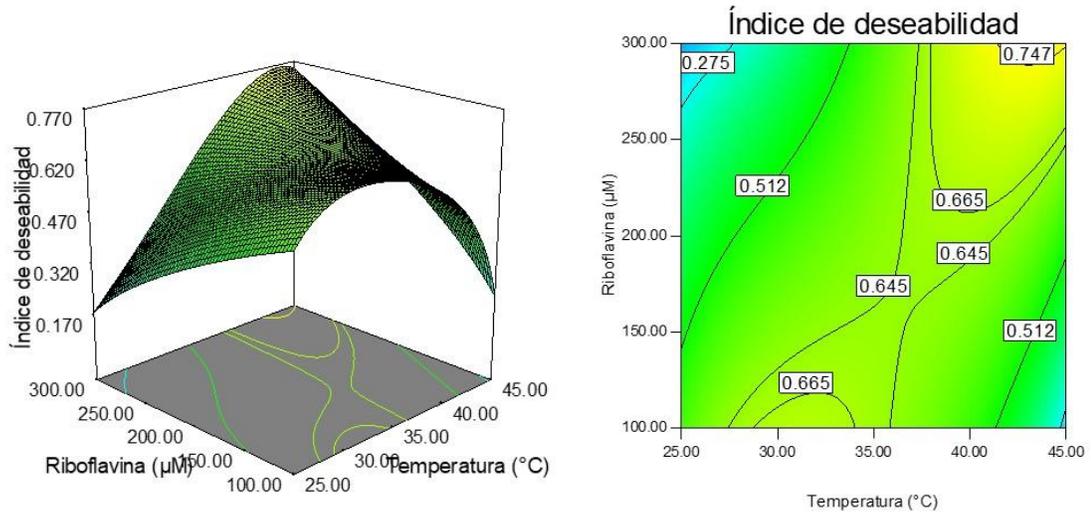


Fig. C1. Gráfico de superficie de respuesta y gráfico de contorno del índice de deseabilidad maximizando  $H_{max}$  y  $R_{max}$  durante la fermentación con riboflavina inmovilizada.

Anexo D

Tabla D1. ANOVA de los resultados de los resultados del diseño de experimentos empleando riboflavina libre.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Prob > F (Valor -p)
<b>Modelo</b>	70.94	5	14.19	3.10	0.0864
<b>A-Temperatura</b>	1.35	1	1.35	0.30	0.6036
<b>B-Riboflavina</b>	1.35	1	1.35	0.30	0.6036
<b>AB</b>	1.23	1	1.23	0.27	0.6200
<b>A^2</b>	44.13	1	44.13	9.63	0.0172
<b>B^2</b>	3.57	1	3.57	0.78	0.4065
<b>Residual</b>	32.07	7	4.58		
<b>Falta de ajuste</b>	1.25	3	0.42	0.05	0.9813
<b>Error puro</b>	30.82	4	7.71		
<b>Total</b>	103.01	12			

$$R_{max} = 12.17 + 0.47A + 0.47B + 0.56AB - 4.00A^2 - 1.14B^2$$

$$R^2 : 0.6887$$

Anexo E

Tabla E1. ANOVA de los resultados de los resultados del diseño de experimentos empleando riboflavina libre.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Prob > F (Valor -p)
<b>Modelo</b>	31.12	5	6.22	2.89	0.0995
<b>A-Temperatura</b>	0.00002	1	0.00002	0.000008	0.9979
<b>B-Riboflavina</b>	3.02	1	3.02	1.40	0.2746
<b>AB</b>	3.22	1	3.22	1.50	0.2608
<b>A^2</b>	20.92	1	20.92	9.72	0.0169
<b>B^2</b>	0.009	1	0.009	0.0042	0.9501
<b>Residual</b>	15.07	7	2.15		
<b>Falta de ajuste</b>	2.20	3	0.73	0.23	0.8731
<b>Error puro</b>	12.88	4	3.22		
<b>Total</b>	46.19	12			

$$R_{max} = 10.11 - 1.667E-003A + 0.71B + 0.90AB - 2.75A^2 - 0.057B^2$$

$$R^2 : 0.6737$$

## Anexo F

Table F1. ANOVA de los ensayos de la tasa de producción de hidrógeno ( $R_{max}$ ).

	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
Modelo	5	50.4016	10.08032	9.66555	6.86E-04
Error	12	12.51495	1.04291		
Total	17	62.91656			

Tabla F2. Prueba Tukey de los ensayos de la tasa de producción de hidrógeno ( $R_{max}$ ).

	<b>Diferencia de medias</b>	<b>Error estándar de la media</b>	<b>Valor q</b>	<b>Prob</b>	<b>Alpha</b>	<b>Sig</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>	<b>Intervalo de confianza (95%)</b>
AC Control	-0.87209	0.83383	1.4791	0.89315	0.05	0	-3.67286	1.92868	2.80077
LQ Control	-3.19944	0.83383	5.42639	0.02233	0.05	1	-6.00022	-0.39867	2.80078
LQ AC	-2.32735	0.83383	3.94729	0.12669	0.05	0	-5.12813	0.47342	2.80078
AQS Control	2.39074	0.83383	4.0548	0.11223	0.05	0	-0.41003	5.19152	2.80077
AQS AC	3.26283	0.83383	5.5339	0.01964	0.05	1	0.46206	6.06361	2.80077
AQS LQ	5.59019	0.83383	9.48119	2.44E-04	0.05	1	2.78941	8.39096	2.80078
AC-LQ Control	0.48521	0.83383	0.82294	0.99042	0.05	0	-2.31556	3.28599	2.80077
AC-LQ AC	1.3573	0.83383	2.30204	0.59746	0.05	0	-1.44347	4.15808	2.80077
AC-LQ LQ	3.68466	0.83383	6.24933	0.0084	0.05	1	0.88388	6.48543	2.80078
AC-LQ AQS	-1.90553	0.83383	3.23186	0.27095	0.05	0	-4.7063	0.89524	2.80077
AC-AQS Control	0.16835	0.83383	0.28553	0.99994	0.05	0	-2.63242	2.96912	2.80077
AC-AQS AC	1.04044	0.83383	1.76463	0.80608	0.05	0	-1.76033	3.84121	2.80077
AC-AQS LQ	3.36779	0.83383	5.71192	0.01588	0.05	1	0.56702	6.16857	2.80077
AC-AQS AQS	-2.22239	0.83383	3.76927	0.15432	0.05	0	-5.02317	0.57838	2.80078
AC-AQS AC-LQ	-0.31686	0.83383	0.53741	0.99868	0.05	0	-3.11764	2.48391	2.80078

Tabla F3. ANOVA de los ensayos de la producción máxima de hidrógeno (*Rmax*).

	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
Modelo	5	157.61684	31.52337	5.80724	0.00595
Error	12	65.13945	5.42829		
Total	17	222.75629			

Tabla F4. Prueba Tukey de los ensayos de la producción máxima de hidrógeno.

	<b>Diferencia de medias</b>	<b>Error estándar de la media</b>	<b>Valor q</b>	<b>Prob</b>	<b>Alpha</b>	<b>Sig</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>	<b>Intervalo de confianza (95%)</b>
AC Control	37.29217	89.68	0.58809	0.99798	0.05	0	-263.9321	338.5164	301.22
LQ Control	196.6561	89.68	3.10122	0.30776	0.05	0	-	497.8803	301.22
LQ AC	159.36393	89.68	2.51313	0.5128	0.05	0	104.56818	460.5882	301.22
AQS Control	209.17101	89.68	3.29857	0.25348	0.05	0	-	510.3952	301.22
AQS AC	171.87884	89.68	2.71049	0.43764	0.05	0	-92.05326	473.1031	301.22
AQS LQ	12.51492	89.68	0.19736	0.99999	0.05	0	129.34543	313.7391	301.22
AC-LQ Control	570.64812	89.68	8.99898	3.99E-04	0.05	1	288.70936	269.42385	871.8723
AC-LQ AC	533.35595	89.68	8.41089	7.38E-04	0.05	1	232.13168	834.5802	301.22
AC-LQ LQ	373.99202	89.68	5.89776	0.01273	0.05	1	72.76775	675.2163	301.22
AC-LQ AQS	361.47711	89.68	5.7004	0.0161	0.05	1	60.25283	662.7013	301.22
AC-AQS Control	515.91951	89.68	8.13592	9.91E-04	0.05	1	214.69524	817.1437	301.22
AC-AQS AC	478.62734	89.68	7.54783	0.00189	0.05	1	177.40307	779.8516	301.22
AC-AQS LQ	319.26341	89.68	5.0347	0.03565	0.05	1	18.03914	620.4876	301.22
AC-AQS AQS	306.7485	89.68	4.83735	0.04509	0.05	1	5.52422	607.9727	301.22
AC-AQS AC-LQ	-54.72861	89.68	0.86306	0.98815	0.05	0	-	246.4956	301.22
							355.95288		

Tabla F5. ANOVA de los ensayos de cinética de acumulación de subproductos.

	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
Modelo	5	856916.153	171383.231	14.20681	1.10E-04
Error	12	144761.501	12063.4584		
Total	17	1.00E+06			

Tabla F6. Prueba Tukey de los ensayos de la cinética de acumulación de subproductos.

	<b>Diferencia de medias</b>	<b>Error estándar de la media</b>	<b>Valor q</b>	<b>Prob</b>	<b>Alpha</b>	<b>Sig</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>	<b>Intervalo de confianza (95%)</b>
AC Control	-1.08675	1.90233	0.8079	0.99119	0.05	0	-7.47652	5.30302	6.38977
LQ Control	7.96631	1.90233	5.92224	0.01236	0.05	1	1.57653	14.35608	6.38978
LQ AC	9.05306	1.90233	6.73015	0.00479	0.05	1	2.66328	15.44283	6.38978
AQS Control	1.72765	1.90233	1.28435	0.93704	0.05	0	-4.66213	8.11742	6.38978
AQS AC	2.8144	1.90233	2.09226	0.68242	0.05	0	-3.57538	9.20417	6.38978
AQS LQ	-6.23866	1.90233	4.63789	0.0571	0.05	0	-12.62843	0.15111	6.38977
AC-LQ Control	0.53731	1.90233	0.39944	0.99969	0.05	0	-5.85247	6.92708	6.38978
AC-LQ AC	1.62406	1.90233	1.20734	0.95067	0.05	0	-4.76572	8.01383	6.38978
AC-LQ LQ	-7.429	1.90233	5.5228	0.0199	0.05	1	-13.81877	-1.03923	6.38977
AC-LQ AQS	-1.19034	1.90233	0.88491	0.98676	0.05	0	-7.58011	5.19943	6.38977
AC-AQS Control	0.55761	1.90233	0.41453	0.99962	0.05	0	-5.83216	6.94738	6.38977
AC-AQS AC	1.64436	1.90233	1.22244	0.94816	0.05	0	-4.74541	8.03413	6.38977
AC-AQS LQ	-7.4087	1.90233	5.50771	0.02026	0.05	1	-13.79847	-1.01892	6.38977
AC-AQS AQS	-1.17004	1.90233	0.86982	0.98773	0.05	0	-7.55981	5.21974	6.38977
AC-AQS AC-LQ	0.0203	1.90233	0.01509	1	0.05	0	-6.36947	6.41008	6.38977

ANEXO G

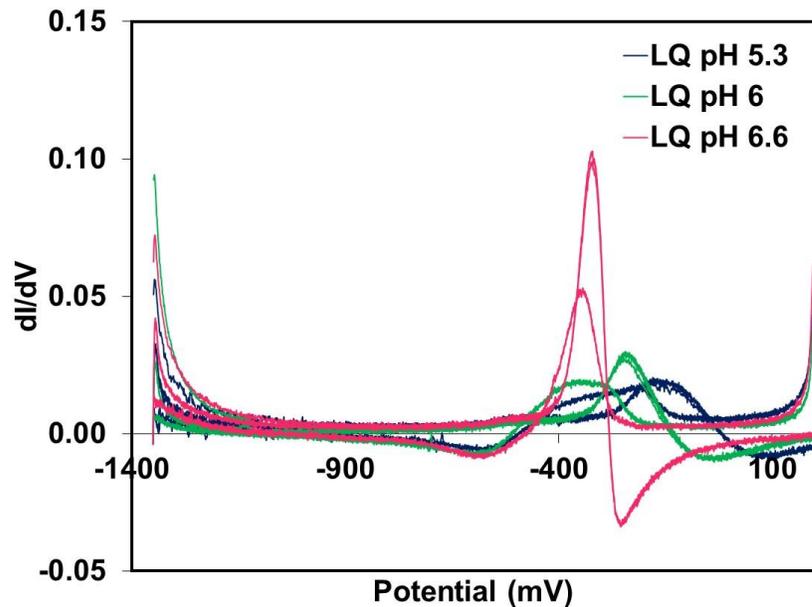


Fig. 1G. Perfil de la derivada del voltamperograma cíclico de LQ a diferente pH.

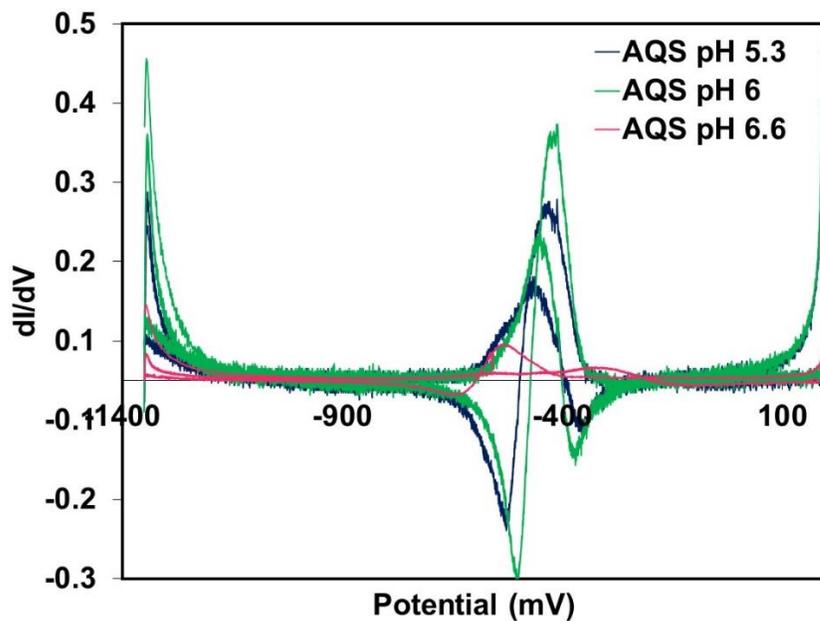


Fig. 2G. Perfil de la derivada del voltamperograma cíclico de AQS a diferente pH.

## Anexo H

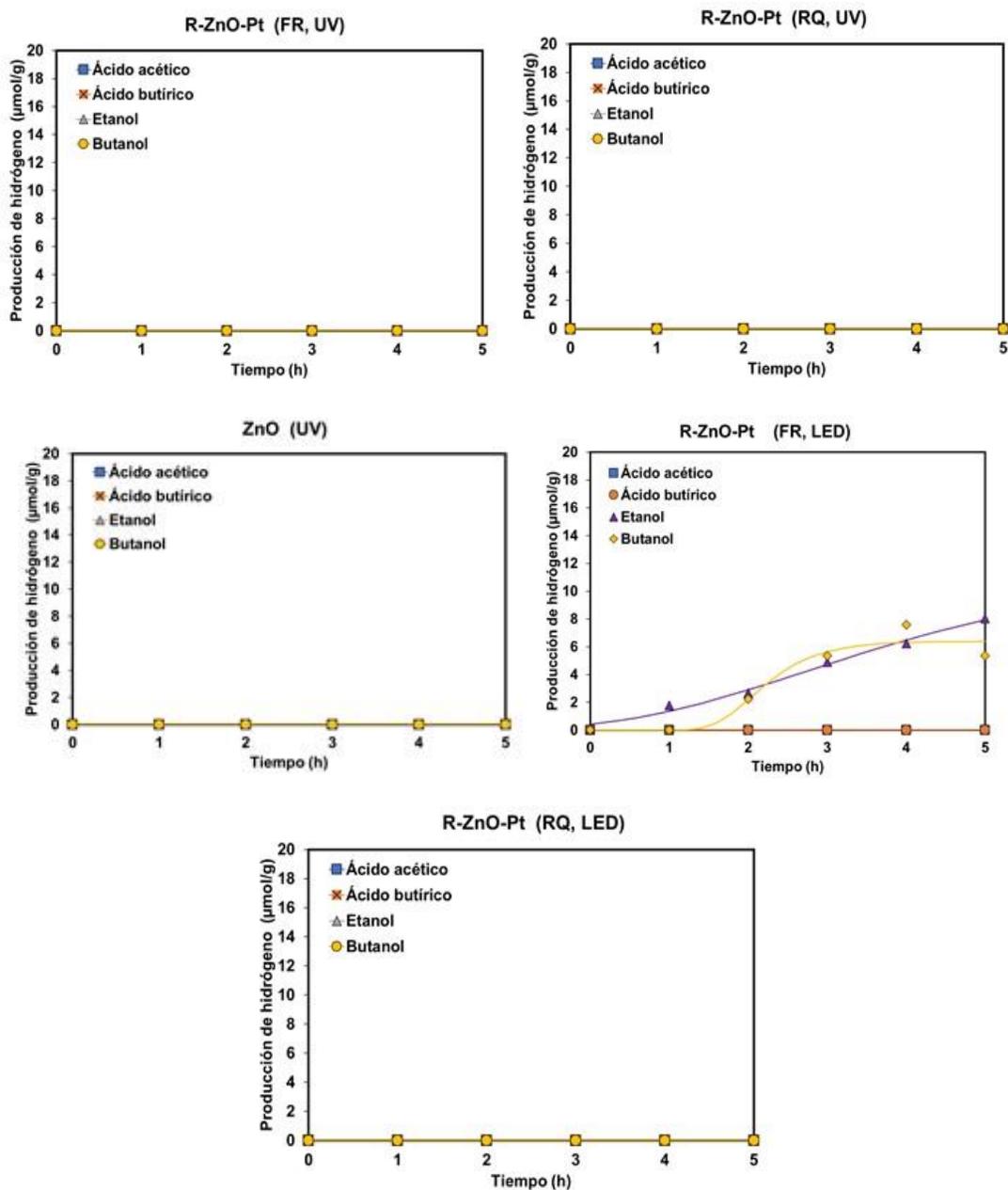


Fig. H1. Producción de H<sub>2</sub> empleando AS en forma individual (0.1 M) bajo irradiación LED Vis y LED UV mediante el uso de R-ZnO-Pt (FR), R-ZnO-Pt (RQ) y ZnO.

ANEXO I

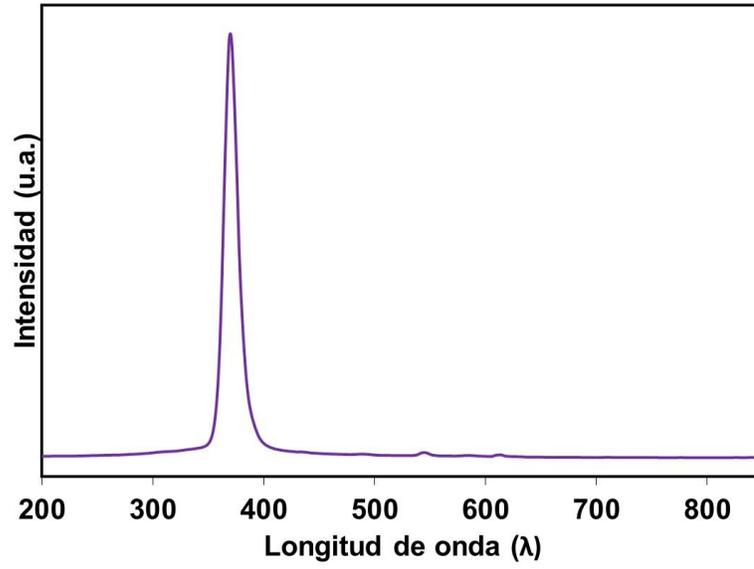


Fig. 11. Distribución de potencia espectral de la lámpara UV LED.

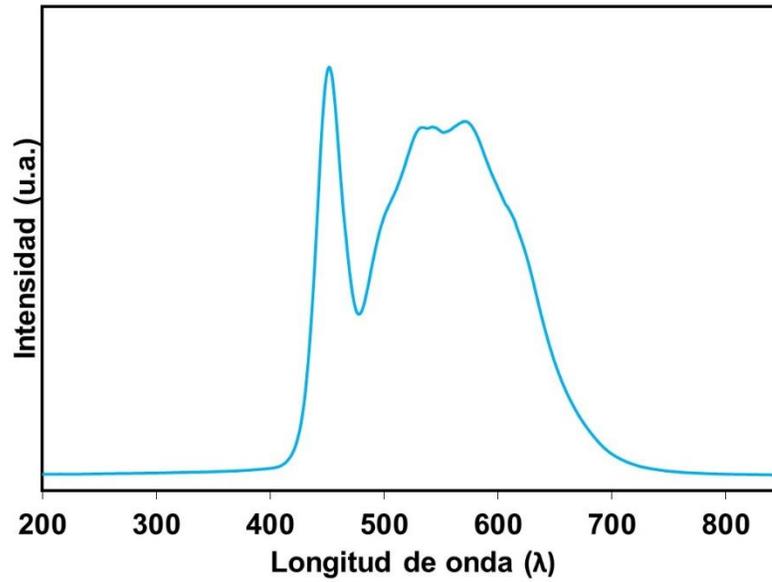


Fig. 12. Distribución de potencia espectral de la lámpara LED Visible.

ANEXO J

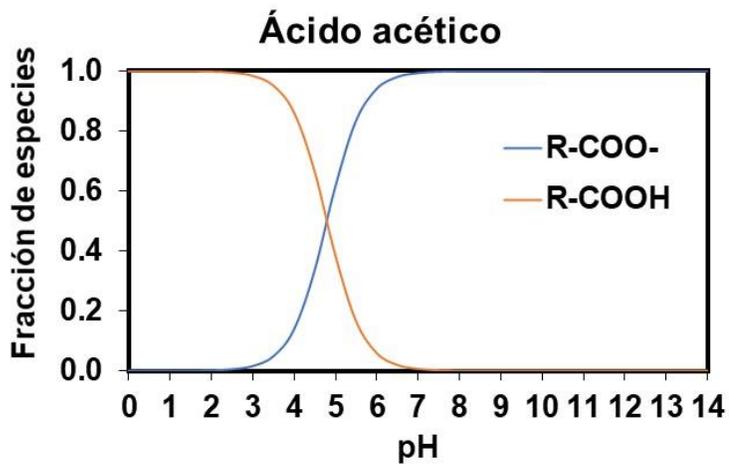


Fig. J1. Diagrama de especiación del ácido acético.

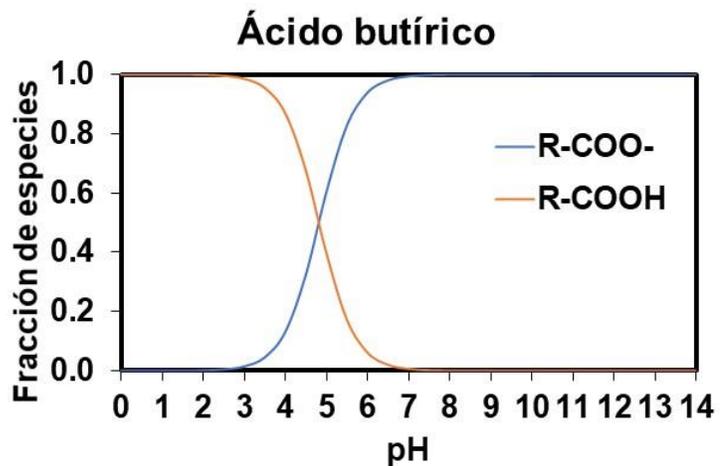


Fig. J2. Diagrama de especiación del ácido butírico.

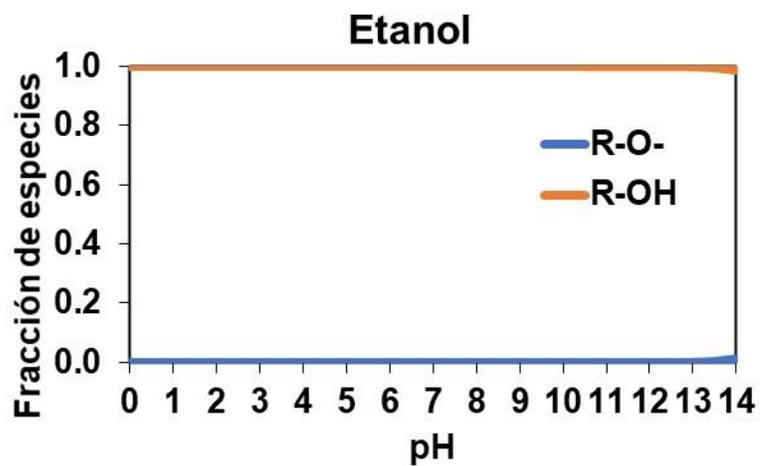


Fig. J3. Diagrama de especiación del etanol.

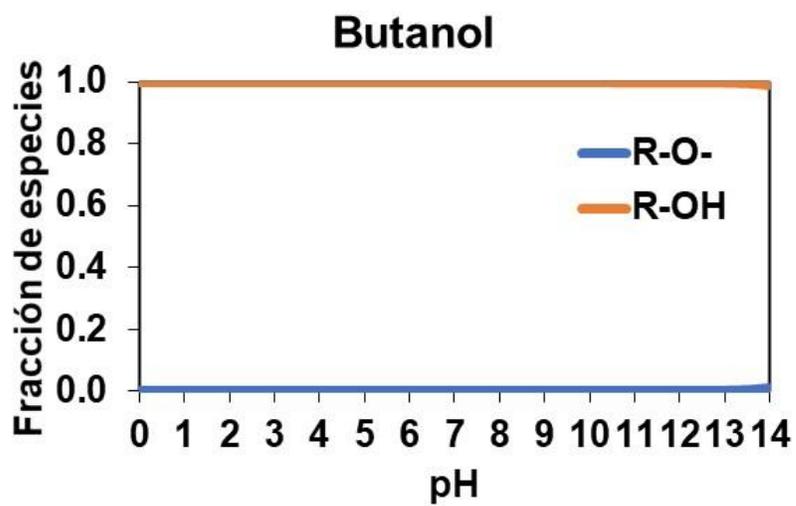


Fig. J4. Diagrama de especiación del butanol.