

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**“PRODUCCIÓN FOTOFERMENTATIVA DE HIDRÓGENO A PARTIR DE EFLUENTES DE
PRETRATAMIENTOS Y BIOPROCESOS: PRUEBAS DE CONCEPTO Y EVALUACIÓN DE
IMPACTO AMBIENTAL”**

PRESENTADO POR:
ING. BRENDA NELLY LÓPEZ HERNÁNDEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN PROCESOS SUSTENTABLES

JULIO 2022.

Dedicatoria

A Dios y la vida

Por brindarme las herramientas para cumplir mis metas.

A mi familia

Por darme ánimos y su enorme cariño.

A Alonso

Por su amor y apoyo incondicional.

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Escamilla Alvarado, por compartir sus conocimientos, consejos, tiempo y ser un buen líder en la realización de este proyecto.

A la Dra. María Guadalupe Paredes Figueroa y a los miembros del comité tutorial: Dr. Carlos Enrique Escárcega González, Dra. Nancy Elizabeth Dávila Guzmán y Dr. Salvador Tututi Ávila, por sus valiosos consejos y aportes en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Santiago Rodríguez Valderrama, por su apoyo constante, paciencia y asesoría en la fase experimental.

Al Dr. Jean-Pierre Magnin, por sus excelentes aportaciones en el diseño experimental de este proyecto.

A la Dra. María Araceli Hernández Ramírez y al QFB. Jacinto Hernández, por el apoyo en la realización del análisis de carbono orgánico total.

A Alan Antonio Rico Barragán y a la Dra. Nancy Dávila, por su apoyo en la determinación de densidad de un sustrato.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda, trabajo en equipo y platicas que hicieron más agradables los días de trabajo.

A Alonso, mi novio y mejor amigo, por nunca soltar mi mano y siempre buscar la manera de ayudarme y sacar lo mejor de mí.

A mi familia, por siempre estar al pendiente de mí, apoyarme y darme ánimos para seguir adelante.

Al CONACYT, por la beca de manutención concedida durante el desarrollo de este proyecto de maestría.

A la Facultad de Ciencias Químicas y al CIByN, por prestar sus instalaciones, permitiendo la realización de este proyecto.

CONTENIDO

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
RESUMEN	ix
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Generación de residuos orgánicos en México.....	4
2.2 Biomasa lignocelulósica.....	5
2.3 Uso del peróxido de hidrógeno alcalino (AHP) como pretratamiento de bajo consumo energético.....	6
2.4 Producción de hidrógeno por procesos fermentativos.....	8
2.4.1. Fermentación oscura.....	8
2.4.2. Fotofermentación.....	9
2.4.3. Producción de hidrógeno en sistemas acoplados: FO – FF.....	12
2.5 Análisis de Ciclo de Vida.....	13
3. Justificación	17
4. Aportación científica	18
5. Hipótesis general y particulares	18
5.1 Hipótesis particulares.....	18
6. Objetivos y metas	18
6.1 Objetivo general.....	18
6.2 Objetivos específicos.....	19
7. Metodología de trabajo	20
7.1 Actividad 1. Caracterización de sustratos.....	21
7.1.1. Propósito.....	21
7.1.2. Diseño experimental.....	21
7.1.3. Programa de seguimiento y análisis.....	21
7.1.4. Métodos y procedimientos.....	22
7.2 Actividad 2. Pretratamiento peróxido de hidrógeno alcalino de los sustratos.....	24
7.2.1. Propósito.....	24
7.2.2. Diseño experimental.....	24

7.2.3. Programa de seguimiento y análisis	24
7.2.4. Métodos y procedimientos	25
7.3 Actividad 3. Evaluación del potencial de biohidrógeno por fermentación oscura.	28
7.3.1. Propósito	28
7.3.2. Diseño experimental.....	28
7.3.3. Programa de seguimiento y análisis	29
7.3.4. Métodos y procedimientos	30
7.5. Actividad 4. Fotofermentación de efluentes de fermentación oscura.	32
7.5.1. Propósito	32
7.5.2. Diseño experimental.....	32
7.5.3. Programa de seguimiento y análisis.....	33
7.5.4. Métodos y procedimientos	34
7.6 Actividad 5. ACV de sistemas fermentación oscura-fotofermentación.	36
7.6.1. Propósito	36
7.6.2. Diseño experimental.....	36
7.6.3. Objetivo y alcance	36
7.6.4. Unidad funcional	36
7.6.5. Límites del sistema	36
7.6.7. Análisis de inventario	38
7.6.8. Evaluación de impactos.....	39
8. Resultados y discusión	40
8.1 Actividad 1. Caracterización de sustratos.	40
8.2 Actividad 2. Pretratamiento peróxido de hidrógeno alcalino de los sustratos.	40
8.3. Actividad 3. Evaluación del potencial de biohidrógeno.	43
8.4 Actividad 4. Fotofermentación de efluentes de fermentación oscura.	47
8.5 Actividad 5. ACV de sistemas fermentación oscura-fotofermentación.	49
9. Conclusiones.....	50
Referencias bibliográficas	51
Anexos	60

Índice de Tablas

Tabla 1. Pretratamientos AHP en sustratos lignocelulósicos.....	7
Tabla 2. Pretratamiento de residuos lignocelulósicos y generación de derivados lignocelulósicos.	8
Tabla 3. Estudios de producción de hidrógeno por FF con variaciones en C/N.....	11
Tabla 4. Estudios de producción de hidrógeno por FF con dilución de sustrato.....	12
Tabla 5. Estudios de producción de hidrógeno en sistemas secuenciales FO-FF.....	13
Tabla 6. Análisis de ciclo de vida de procesos FO-FF en modo secuencial.	16
Tabla 7. Parámetros de caracterización de los sustratos.....	21
Tabla 8. Diseño de experimental del pretratamiento AHP.....	24
Tabla 9. Parámetros de caracterización de efluentes de pretratamiento.....	24
Tabla 10. Parámetros de caracterización la fracción sólida de pretratamiento AHP.....	25
Tabla 12. Diseño experimental factorial 3 ² de la evaluación del potencial de biohidrógeno.	28
Tabla 13. Diseño de experimental para determinación de aprovechamiento del sustrato.	29
Tabla 14. Parámetros estimados en experimento del potencial de biohidrógeno.....	29
Tabla 15. Parámetros de caracterización para determinación de aprovechamiento de sustrato.	30
Tabla 16. Diseño de experimentos 3 ² producción de hidrógeno por FF.....	32
Tabla 17. Diseño de experimental producción de stock de eFO ricos en AOV.....	32
Tabla 18. Parámetros de caracterización para producción de hidrógeno por FF.....	33
Tabla 19. Parámetros de caracterización para generación de stock de eFO ricos en AÓV.....	33
Tabla 20. Condiciones de operación de los escenarios fermentativos de producción de hidrógeno.....	39
Tabla 21. Características químicas de los sustratos.	40
Tabla 22. Caracterización fisicoquímica de los efluentes de FO.	46
Tabla 23. Caracterización de eFO de BN-p	47
Tabla 24. Producción acumulada de H ₂ por FF.....	48
Tabla A1. Caracterización fisicoquímica de los efluentes de FO.....	60
Tabla A2. Inventario de ACV de Escenario FO-FF. UF = 1 kg H ₂ producido.	61
Tabla A3. Inventario de ACV de Escenario FO. UF = 1 kg H ₂ producido.....	62

Tabla A4. Inventario de ACV de Escenario FF. UF = 1 kg H ₂ producido.	63
---------------------------------------------------------------------------------------	----

Índice de Figuras

Figura 1. Vía metabólica de BPNA para producción de H ₂ fotoheterotrófica a partir de AOV.....	10
Figura 2. Resumen de las categorías de impacto de la metodología ReCiPe 2016.	15
Figura 3. Esquema de plan de trabajo.	20
Figura 4. Límites del sistema del Escenario FO-FF.	37
Figura 5. a) Límites del sistema del Escenario FO; b) Límites del sistema del Escenario FF.	38
Figura 6. a) Sólidos volátiles antes y después de 24 h de pretratamiento. b) Lignina removida antes y después de 24 h de pretratamiento. c) Holocelulosa antes y después de 24 h de pretratamiento.....	41
Figura 7. Contenido de azúcares totales durante el pretratamiento.	42
Figura 8. Contenido de compuestos fenólicos totales durante el pretratamiento.....	43
Figura 9. Rendimiento acumulado de H ₂ de a) BN; b) PS; y c) RVF:RM. Sin ajuste de pH ₀	45
Figura 10. Producción acumulada de H ₂ a partir de BN. Con ajuste de pH ₀ 7.....	45
Figura 11. Superficie de respuestas de la producción acumulada de H ₂ por FF.	48
Figura 13. Cuantificación impactos en indicador de cambio climático.	49

Notación

ACV	Análisis de ciclo de vida
AHP	Peróxido de hidrógeno alcalino (alkaline hydrogen peroxide, por sus siglas en inglés)
AOV	Ácidos orgánicos volátiles
AR	Azúcares reductores
AT	Azúcares totales
BN	Bagazo de naranja
BPNA	Bacterias púrpuras no del azufre
BN-p	Biomasa completa pretratada con pH ajustado
C/N+	Relación carbono nitrógeno amoniacal
CFT	Compuestos fenólicos totales
eFO	Efluente de fermentación oscura
FF	Fotofermentación
FO	Fermentación oscura
FORSU	Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos
GEI	Gases de efecto invernadero
PS	Paja de sorgo
RA	Residuos agroindustriales
RIS	Relación inóculo sustrato
RM	Rastrojo de maíz
RVF	Residuos de vegetales y frutas

RESUMEN

Brenda Nelly López Hernández
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de graduación: 26 julio, 2022

Título de la investigación: PRODUCCIÓN FOTOFERMENTATIVA DE HIDRÓGENO A PARTIR DE EFLUENTES DE PRETRATAMIENTOS Y BIOPROCESOS: PRUEBAS DE CONCEPTO Y EVALUACIÓN DE IMPACTO AMBIENTAL

Número de páginas: 65

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Procesos Sustentables

Se llevó a cabo la producción fotofermentativa de hidrógeno a partir de efluentes reales de fermentación oscura (eFO) en un proceso secuencial de fermentación oscura – fotofermentación (FO-FF). Se usaron residuos orgánicos como sustrato en la FO: bagazo de naranja (BN), paja de sorgo (PS) y residuos de vegetales y frutas (RVF) en combinación con rastrojo de maíz (RM). Estos sustratos fueron caracterizados fisicoquímicamente, mostrando un contenido superior al 88% de materia orgánica vegetal, susceptible de aprovechamiento, aunque con un contenido de lignina de 15–24%, lo que dificultaría su bioaccesibilidad. Por ello, les fue aplicado un pretratamiento peróxido de hidrógeno alcalino (AHP, por sus siglas en inglés) para disminuir su contenido de lignina. En el proceso de pretratamiento, el BN mostró las mayores eficiencias de delignificación, 67% y 75% después de ser pretratado con una solución del 3% ($m v^{-1}$) y 5% ($m v^{-1}$) de H_2O_2 , respectivamente. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre efectuar el pretratamiento a una concentración de 3% ($m v^{-1}$) o de 5% ($m v^{-1}$) en términos de azúcares totales (AT). Por lo tanto, el pretratamiento a 3% ($m v^{-1}$) se seleccionó para obtener biomasa pretratada para los ensayos posteriores.

Se evaluó el potencial de biohidrógeno en el proceso de FO de los tres sustratos pretratados (BNp, PSp y RVF:RMp) a diferentes relaciones inóculo-sustrato (RIS, 0.2, 0.6 y 1). Adicional, se montaron ensayos control para los tres sustratos sin pretratar a RIS intermedia de 0.6 (BNc, PSc y RVF:RMc). Contrario a lo esperado, el experimento BNc presentó el rendimiento de hidrógeno más alto ($99.22 mLH_2 g^{-1}SV$), seguido de los experimentos BNp–RIS1 ($88.10 mLH_2 g^{-1}SV$) y BNp–RIS0.6 ($85.58 mLH_2 g^{-1}SV$). Debido a los resultados globales, se seleccionó el sustrato BN a una RIS 0.6 para ensayos posteriores. A continuación se profundizó en el efecto de las fracciones soluble e insolubles de la biomasa pretratada en la producción de hidrógeno, se realizaron ensayos de potencial de biohidrógeno a partir de BN-p usando fracción

sólida (BN-p,s), fracción líquida (BN-p,l) y mezcla completa (BN-p). Aunque el ensayo BN-p,l presentó los mejores rendimientos por efecto de la menor cantidad de SV presentes en el medio, la producción de hidrógeno con BN-p se consideró como el mejor esquema para el aprovechamiento de BN como sustrato en un proceso de FO-FF debido a su adecuada producción de hidrógeno y a su alta concentración de ácidos orgánicos volátiles (AOV).

Los eFO se aplicaron como sustrato en la FF variando la concentración de AOV (35%, 50% y 65%) y la relación C/N⁺ (17, 26 y 35). El experimento que generó una mayor producción de hidrógeno fue el que se llevó a cabo a niveles bajos en ambos factores de estudio (concentración de AOV al 35% y C/N⁺ 17) produciendo 170 mLH₂ y 486.83 mLH₂ g⁻¹AOV de rendimiento acumulado. Esto se puede asociar a que a menor concentración de AOV hay una menor coloración en el medio fotofermentativo y, por lo tanto, hay una mayor exposición del medio a la luz, lo cual resulta en una mayor producción de hidrógeno. Por otro lado, a menor relación C/N⁺ se favorece el crecimiento de las bacterias purpuras no del azufre (BPNA) y por consiguiente la producción de hidrógeno.

La evaluación de impacto ambiental, en términos del indicador de cambio climático, se realizó para el proceso secuencial: Escenario FO-FF; y se comparó los procesos fermentativos individuales: Escenario FO y Escenario FF. El Escenario FF tuvo los mayores impactos en el indicador de cambio climático entre los escenarios analizados (1623.5 kg CO₂-eq), estando 146.8% por encima del Escenario FO-FF (657.9 kg CO₂-eq). Asimismo, el escenario del proceso secuencial obtuvo 44% más impactos que el Escenario FO (364.7 kg CO₂-eq). No obstante, el Escenario FO-FF usa 3.3 veces menos BN para la producción de 1 kg H₂ que el Escenario FO, por lo que, de considerar en un análisis posterior, los impactos por la etapa de transporte, el Escenario FO seguramente se vería más afectado por los impactos relacionados a dicha etapa. Tomando en cuenta los aspectos operativos y ambientales, el Escenario FO-FF es la mejor propuesta para la producción de biohidrógeno a partir de BN.

Los resultados obtenidos en este proyecto revelaron que el BN es un residuo orgánico prometedor para su aprovechamiento en la producción de hidrógeno por bioprocesos fermentativos, así como condiciones de operación favorables y los impactos asociados al proceso en el indicador de cambio climático. Sin embargo, existen áreas de oportunidad en las que sería conveniente profundizar en el estudio experimental y de impacto ambiental del esquema de producción de hidrógeno estudiado en este trabajo.

1. Introducción

La demanda energética en el mundo ha aumentado a medida que la población crece. Tan solo en 2019, el consumo energético mundial fue de casi 19 TW, del cual solo el 14.1% a partir de renovables (IEA, 2020). En los últimos años se han generado esfuerzos para sustituir los recursos energéticos actuales por fuentes renovables. Dentro de los cuales se puede destacar la biomasa como uno de los principales candidatos para una generación limpia de energía.

La biomasa es un recurso renovable abundante constituida por materia orgánica de origen animal y/o vegetal (Karimi & Taherzadeh, 2016). Las fuentes más importantes de este recurso incluyen: residuos agrícolas, residuos forestales, residuos animales, residuos industriales, aguas residuales y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (Tursi, 2019).

La mayor parte de los residuos agrícolas y forestales son compuestos lignocelulósicos y son ampliamente estudiados para la producción de biocombustibles. Los residuos lignocelulósicos están constituidos principalmente de celulosa (30-50%), hemicelulosa (15-35%) y lignina (10-30%). La celulosa y hemicelulosa son carbohidratos que pueden hidrolizarse en azúcares fermentables y pueden emplearse para obtener combustibles. Sin embargo, la lignina es un polímero aromático que protege a la celulosa y hemicelulosa de la degradación. Para reducir la biomasa lignocelulósica recalcitrante que limita la biodegradabilidad es necesario integrar un proceso de tratamiento previo a su utilización en la producción de biocombustibles (Zheng *et al.*, 2017; Zhang & Zhang, 2018). Los procesos de pretratamiento para la biomasa lignocelulósica que han sido estudiados son de tipo físico (molienda, choque térmico, irradiación, etc.), químico (ácidos, alcalinos, etc.), biológico (fúngico y enzimático) y fisicoquímico (explosión de vapor con amoníaco, o método AFEX por sus siglas en inglés) (Bundhoo *et al.*, 2015).

Entre los biocombustibles que se pueden obtener a partir de la biomasa están el biometano, bioetanol, biobutanol y biohidrógeno (Karimi & Taherzadeh, 2016). El biohidrógeno es considerado como un vector energético alternativo prometedor debido a su alto contenido de energía por unidad de masa (120 MJ kg^{-1}). Además, su combustión no contribuye a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) ni a la lluvia ácida, siendo esta última característica una importante ventaja en comparación con el biogás .

La producción de hidrógeno a partir de biomasa se puede efectuar por medio de procesos termoquímicos y procesos biológicos o microbianos. Particularmente, los procesos biológicos han sido ampliamente estudiados para la generación de hidrógeno durante las décadas más recientes (Argun *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2019; Rodríguez-Valderrama *et al.*, 2020) . Entre las tecnologías biológicas existentes para la obtención de biohidrógeno están la biofotólisis, la fermentación oscura (FO), la fotofermentación (FF) y la electrólisis microbiana (Zhang *et al.*, 2017; Zhang & Zhang, 2018). De las cuales, los procesos fermentativos son los principales bioprocesos que hacen uso de sustratos ricos en carbohidratos como materia prima para la obtención de hidrógeno, donde la FF produce mayores rendimientos (Argun *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2019)

La FO es un bioproceso por el cual bacterias fermentativas hidrogenogénicas producen hidrogeno a partir de biomasa, además de ácidos orgánicos volátiles (AOV) y dióxido de carbono como subproductos (Ranjan Das & Basak, 2020). Por otra parte, la FF es un proceso en el que bacterias fotosintéticas, principalmente bacterias púrpuras no del azufre (BPNA), convierten azúcares simples y AOV en hidrógeno y dióxido de carbono bajo condiciones anoxigénicas y en presencia de luz (Argun & Kargi, 2011). Si bien, el proceso fotofermentativo puede aprovechar tanto azúcares como AOV, la producción de hidrógeno se ve mayormente favorecida con estos últimos (Tian *et al.*, 2019). Por lo cual, es posible utilizar los efluentes de FO (eFO) como sustratos en el proceso de FF, ya que son ricos en AOV. Asimismo, los sistemas secuenciales de FO-FF son considerados más eficientes en la producción de hidrógeno en comparación con los de una sola etapa (Mishra *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019).

No obstante, también es importante considerar estos procesos desde una perspectiva ambiental, como lo sería: la cuantificación de los impactos ambientales de un bioproceso de producción de hidrógeno secuencial FO-FF y su comparación contra los bioprocesos individuales FO y FF. Los impactos ambientales que genera un proceso se pueden evaluar mediante el análisis de ciclo de vida (ACV). La metodología del ACV abarca la identificación, cuantificación y evaluación de los impactos ambientales generados por la materia prima, consumo de energía, generación de residuos y proceso de gestión de un sistema (Curran, 2016). Los resultados del análisis de impactos permiten la identificación de las áreas de oportunidad del proceso y a partir de esto es posible tomar mejores decisiones para hacer cambios en el sistema que permitan disminuir los impactos.

En este trabajo se evaluó el potencial de aprovechamiento de tres tipos de residuos lignocelulósicos, el bagazo de naranja, paja de sorgo y los residuos de vegetales y frutas con rastrojo de maíz para la producción de biohidrógeno. Primero se analizó el efecto del pretratamiento alcalino peróxido en la delignificación de la biomasa, seguido de la producción de biohidrógeno por fermentación oscura. Tras identificar el mejor sustrato, se procedió con la producción secuencial de hidrógeno por fotofermentación de los ácidos orgánicos liberados en fermentación oscura. Finalmente, se evaluaron los impactos ambientales en el indicador de cambio climático asociados al bioproceso secuencial FO-FF, comparándose contra el desempeño de los bioprocesos fermentativos individuales (FO y FF).

2. Antecedentes

2.1 Generación de residuos orgánicos en México.

En México, cada año se generan aproximadamente 76 millones de toneladas de residuos orgánicos provenientes del sector doméstico, agroindustrial y la industria alimentaria (González-Sánchez *et al.*, 2015). Los residuos domésticos están constituidos en su mayor parte por materia orgánica. En 2017, en México se generaron alrededor de 44.6 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos (SEMARNAT, 2018), de las cuales el 60% corresponde a la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU), conformada por papel, cartón y otros desechos orgánicos como los residuos de vegetales y frutas (RVF). Tanto la FORSU como los RVF son residuos ricos en carbohidratos, por ello se considera que tienen un gran potencial para producir biocombustibles (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2012).

Por otra parte, las actividades agroindustriales generan una gran variedad de esquilmos que pueden ser aprovechados de diversas maneras, una de ellas es la producción de biocombustibles (González-Sánchez *et al.*, 2015; SAGARPA, 2015). El maíz, el sorgo y la naranja son algunos de los principales cultivos de la región Noreste de México, conformada por los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. El rastrojo de maíz (RM) y la paja de sorgo (PS) son los esquilmos más importantes del país, representando el 68% y 11% de la producción nacional de esquilmos, respectivamente (SAGARPA, 2015). A partir de datos del SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) y de un informe de la empresa de Navigant Consulting Inc., Ecofys, se conoce que la producción de maíz grano en 2019 de la región Noreste fue de aproximadamente 926 mil toneladas, generando a su vez 1.2 millones de toneladas de RM, de las cuales el 7.2% queda libre para utilizarse en la producción de energía (SIAP, 2020; Riegelhaupt *et al.*, 2016). En cuanto al sorgo grano del Noreste, en 2019 se estimó una producción de 1.8 millones de toneladas, produciendo cerca de 2.5 millones de toneladas de PS. De igual manera que con el RM, el 7.2% de la PS queda libre para emplearse en la producción de energía. Por otra parte, la producción de naranja del Noreste en 2019 fue de aproximadamente 875 mil toneladas, de las cuales entre 50-60% son residuos, particularmente, bagazo de naranja (BN, cáscara, tejido interno y semillas). Estos residuos en su casi totalidad pueden ser aprovechados para la producción de energía (Jiménez-Castro *et al.*, 2020; SIAP, 2020).

Tomando lo anterior en cuenta, 86.4 mil toneladas de RM, 180 mil toneladas de PS y 481 toneladas de BN en el Noreste de México podrían utilizarse para la fabricación de productos de valor agregado, como biocombustibles (biometano, bioetanol y biohidrógeno).

2.2 Biomasa lignocelulósica.

La mayor parte de los residuos agrícolas y forestales son compuestos lignocelulósicos y han sido ampliamente estudiados para su uso en la producción de biocombustibles. La biomasa lignocelulósica consiste en una estructura compleja de carbohidratos conformada por celulosa (38–50%), hemicelulosa (23–32%) y lignina (15–25%) (Hu & Ragauskas, 2012).

La celulosa es un polisacárido lineal conformado por monómeros de glucosa unidos por enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$. Los monómeros de glucosa contiguos se giran 180° formando una unidad de disacárido (celobiosa) que se repite a lo largo de la cadena de celulosa (Magalhães *et al.*, 2019). La hemicelulosa es un heteropolisacárido amorfo constituido por una combinación de hexosas (D-manosa, D-galactosa y D-glucosa), pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y azúcares ácidos, los cuales pueden ser lineales o ramificados. La hemicelulosa se compone mayormente de pentosas (aproximadamente el 90% D-xilosa y el 10% L-arabinosa de su estructura) unidas por enlaces $\beta(1-4)$. No obstante, las proporciones de los monómeros presentes en la hemicelulosa son variables de acuerdo con la naturaleza y fuente de la biomasa lignocelulósica (Magalhães *et al.*, 2019). Por ser amorfa e hidrofílica, la hemicelulosa actúa como un agente de unión entre fibras que proporciona soporte a la celulosa (Hu & Ragauskas, 2012). En conjunto, la celulosa y la hemicelulosa conforman la holocelulosa.

La lignina es un polímero fenólico amorfo en forma de red que consiste en tres unidades de fenilpropano (guayacilo, siringilo y p-hidroxifenilo) (Magalhães *et al.*, 2019). La lignina es relativamente hidrofóbica y está unida de manera covalente con la hemicelulosa llenando los espacios existentes en la pared celular entre la celulosa y hemicelulosa, dándole firmeza al tejido vegetal, evitando el colapso de las unidades conductoras de agua, además de funcionar como protección ante el ataque microbiano (Hu & Ragauskas, 2012; Ho *et al.*, 2019). Esta característica de la biomasa lignocelulósica impide que las enzimas tengan alcance a los carbohidratos (Ho *et al.*, 2019).

La utilización de biomasa lignocelulósica como materia prima en procesos de producción de biocombustibles requiere de un pretratamiento para poder aumentar su bioaccesibilidad y facilitar el acceso de los microorganismos a los carbohidratos, de no aplicarlo, se obtendrían bajos rendimientos y bajas productividades (Basak *et al.*, 2020). Por lo tanto, extraer o solubilizar parcialmente la lignina podría alterar la matriz estructural de manera significativa y mejorar la sacarificación de la biomasa en la fermentación (Ho *et al.*, 2019).

2.3 Uso del peróxido de hidrógeno alcalino (AHP) como pretratamiento de bajo consumo energético.

El pretratamiento AHP permite eliminar una cantidad significativa de lignina, mientras retiene la mayor parte del polisacárido en la biomasa sólida, mejorando la bioaccesibilidad de la biomasa (Ho *et al.*, 2019). A diferencia de los pretratamientos de hidrólisis ácida y alcalina, el pretratamiento AHP no requiere realizarse bajo condiciones de alta temperatura (i.e. > 100°C) (Cabrera *et al.*, 2014). El uso de temperaturas bajas (25 - 50°C), presión atmosférica, bajo requerimiento de reactivos y generación de productos inocuos (agua y oxígeno) hacen de este pretratamiento una alternativa de bajo consumo energético (Ho *et al.*, 2019; Michalska & Ledakowicz, 2014). En la Tabla 1 se presenta un listado de los distintos residuos lignocelulósicos que han sido pretratados con AHP.

Tabla 1. Pretratamientos AHP en sustratos lignocelulósicos.

Residuos	Condiciones de reacción	Resultados	Observaciones	Ref.
Tallo de maíz	12% (v v ⁻¹) H ₂ O ₂ pH 11.5 50°C 130 rpm 1 h 3% sólidos (w v ⁻¹)	Aumento del 73.4% de celulosa. Reducción del 19.3% de hemicelulosa. Reducción del 71.6% de lignina.	Obtención de biogás con incremento de 22% del volumen final.	Venturin <i>et al.</i> , 2018
Rastrojo de maíz	2.5% (w v ⁻¹) H ₂ O ₂ pH 11.5 50°C 3 h 10% sólidos (w v ⁻¹)	Aumento del 60.3% de celulosa. Aumento del 10.7% de hemicelulosa. Reducción del 64.8% de lignina.	NA	Mittal <i>et al.</i> , 2017
Rastrojo de maíz	1% (w w ⁻¹) H ₂ O ₂ pH 11.5 50°C 3 h 4% sólidos (w v ⁻¹)	Reducción del 56.3% de lignina.	NA	Selig <i>et al.</i> , 2009
Bagazo de sorgo dulce	2% (w v ⁻¹) H ₂ O ₂ pH 11.5 35°C 24 h 8.3% sólidos (w v ⁻¹)	Aumento del 33.9% de celulosa. Reducción del 9.4% de hemicelulosa. Reducción del 11.5% de lignina.	Obtención de etanol con incremento del 200% respecto al del sorgo no pretratado	Cao <i>et al.</i> , 2015
Sorgo	5% (w w ⁻¹) H ₂ O ₂ pH 11.8 25°C 24 h 5% sólidos (w v ⁻¹)	Aumento del 64.0% de celulosa. Reducción del 48.6% de hemicelulosa. Reducción del 62.7% de lignina.	Obtención de biogás con reducción del 3% respecto al inóculo, debido a compuestos inhibidores.	Michalska & Ledakowicz, 2014

NA: No aplica.

Aunque el objetivo de aplicar un pretratamiento a la biomasa lignocelulósica es eliminar la barrera de la lignina y mejorar la bioaccesibilidad, de forma paralela ocurre la generación de subproductos derivados de la lignina tales como el siringaldehído, la vainillina y otros compuestos fenólicos, los cuales resultan ser inhibidores para las células microbianas (Basak *et al.*, 2020). La concentración inhibitoria en la producción fermentativa de hidrógeno depende del tipo de subproducto y el inóculo microbiano utilizado (Basak *et al.*, 2020). En un estudio realizado por Eroglu *et al.* (2004) se reportó una concentración inhibitoria de compuestos fenólicos de 5.8 mg L⁻¹ en un proceso de FF para la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales de almazara usando *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. En la Tabla 2 se muestran las concentraciones de azúcares totales y de compuestos fenólicos totales como resultado de algunas técnicas de pretratamiento.

Tabla 2. Pretratamiento de residuos lignocelulósicos y generación de derivados lignocelulósicos.

Técnica	Sustrato	Azúcares totales	Compuestos fenólicos totales	Ref.
Hidrotermal	Sorgo	9.20 g L ⁻¹	0.40 g L ⁻¹	Eskicioglu <i>et al.</i> , 2017
AHP	Sorgo	1.70 g L ⁻¹	2.40 g L ⁻¹	Michalska & Ledakowicz, 2014
Hidrólisis ácida (H ₂ SO ₄)	RVF:RM (3:1)	21.19 g L ⁻¹ *	0.78 g L ⁻¹	Rodríguez-Valderrama <i>et al.</i> , 2020
Oxidación de aire húmedo con AHP	Paja de arroz	NR	0.29 – 0.36 g L ⁻¹	Morone <i>et al.</i> , 2017

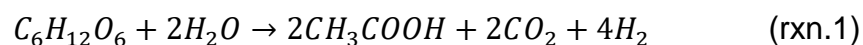
* Concentración de azúcares reductores; NR: No reportado.

2.4 Producción de hidrógeno por procesos fermentativos.

2.4.1. Fermentación oscura.

La FO es un bioproceso que permite la producción de hidrógeno a partir de bacterias fermentativas en un amplio rango de biomasa como sustrato (Ranjan Das & Basak, 2020). La FO emplea la biomasa para convertirla en hidrógeno, AOV y dióxido de carbono. Algunos géneros de bacterias fermentativas hidrogenogénicas incluyen las especies *Clostridium*, *Ethanoligenens*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, así como *Escherichia coli*. El rendimiento de hidrógeno por FO depende del tipo de sustrato, el inóculo y parámetros del proceso (pH, temperatura, etc.) (Mishra *et al.*, 2019). Se ha reportado que el pH óptimo se encuentra en un rango de 5.5 a 8.0, mientras que la temperatura óptima oscila en el rango de 25 – 40 °C (Argun & Kargi, 2011; Hay *et al.*, 2013).

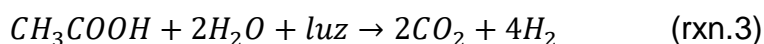
En la producción de hidrógeno por FO a partir de biomasa como fuente de carbono resulta ser predominante la generación de ácido acético (rxn.1) y butírico (rxn.2) en conjunto con otros AOV e hidrógeno (Rai & Singh, 2016).



2.4.2. Fotofermentación.

La FF hace uso de bacterias fotosintéticas, principalmente bacterias púrpuras no del azufre (BPNA), para producir hidrógeno a partir de biomasa en condiciones anoxigénicas y en presencia de luz, generando dióxido de carbono como subproducto. Entre las bacterias más utilizadas en FF se encuentran las *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter sulfidophilus*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodopseudomonas palustris*. Se ha reportado que el pH óptimo para la FF está en un rango de 6.8 a 7.5, mientras que la temperatura óptima va de 30 a 36°C y la longitud de onda apropiada va desde 400 a 1000 nm (Sharma *et al.*, 2020).

En términos generales, la reacción de la producción de hidrógeno por las BPNA puede ser descrita como (Rai & Singh, 2016):



2.4.2.1. Metabolismo microbiano de la FF.

El metabolismo de FF por BPNA comienza con la introducción de los ácidos orgánicos en el ciclo de Krebs en donde se oxidan y se produce CO₂ y electrones. Por otro lado, se requiere una gran cantidad de energía en forma de ATP, obtenida por medio de una fotofosforilación cíclica en condiciones anoxigénicas. A través de complejos, la luz es capturada y canalizada hacia la reacción, la cual inicia por un flujo cíclico de electrones en el proceso de fotosíntesis, en donde un gradiente de protones es generado y la enzima ATP-sintasa produce ATP utilizando este gradiente. En condiciones anaerobias, los electrones provenientes de los AOV son transferidos a la ferredoxidina (ox) a través de moléculas transportadoras de electrones. Posteriormente la ferredoxidina (red) es utilizada para la reducción del N₂ a NH₃, por medio de la enzima nitrogenasa. Sin embargo, esta reacción no es deseable dentro del medio reactivo, debido a que la reducción de protones para la producción de H₂ por medio de la nitrogenasa es el proceso de interés. Esto se logra sometiendo al medio a una condición de N₂ limitante (rxn. 4). Mientras que las enzimas hidrogenasas oxidan el biohidrógeno para reciclar electrones, protones y ATP al metabolismo. Por lo tanto, la cantidad neta de hidrógeno producido consiste en la cantidad producida por la nitrogenasa menos la consumida por la hidrogenasa (Koku *et*

al., 2002; Oh *et al.*, 2011; Hay *et al.*, 2013). En la Figura 1 se presenta un diagrama del proceso descrito.

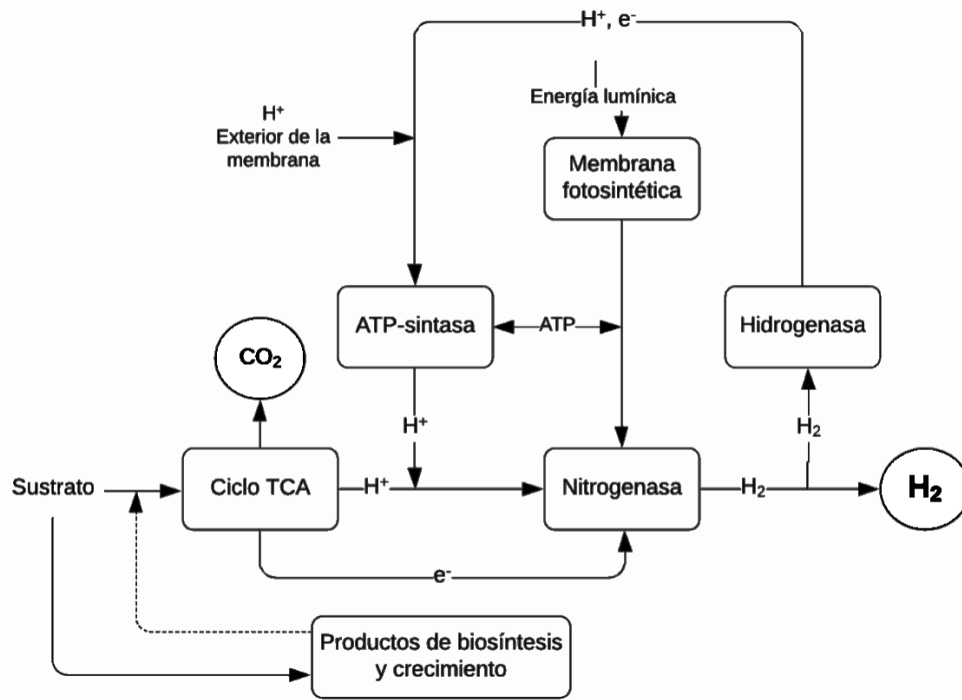
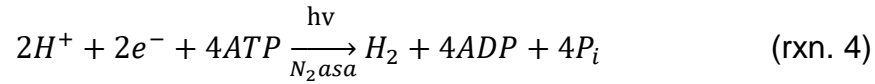


Figura 1. Vía metabólica de BPNA para producción de H₂ fotoheterotrófica a partir de AOV (Koku *et al.*, 2002).

2.4.2.2. Relación C/N

En el proceso FF de producción de hidrógeno, la relación C/N en la alimentación es un factor muy importante que ejerce gran influencia en la estabilidad del proceso fermentativo, la tasa de conversión del sustrato y el rendimiento de hidrógeno (Eroglu *et al.*, 1999). Una relación C/N alta, obtenida al incrementar la concentración de la fuente de carbono, podría afectar la síntesis de sustancias intracelulares de las bacterias, lo que conllevaría a la obtención de baja actividad metabólica. Por lo contrario, una baja relación C/N, resultante del incremento de la concentración de la fuente de nitrógeno, favorece el crecimiento de las bacterias, pero puede disminuir la producción de hidrógeno debido a que el NH₄⁺ inhibe la actividad enzimática (González-Fernández *et al.*, 2011). Por lo tanto, la relación C/N óptima es indispensable para favorecer la producción de hidrógeno. En la literatura se ha reportado que la relación C/N óptima

para *Rhodobacter sphaeroides* está en un rango de 13 a 35 (Li *et al.*, 2019; Al-Mohammedawi *et al.*, 2019). En la Tabla 3 se resumen algunos trabajos con base en la relación C/N estudiada.

Tabla 3. Estudios de producción de hidrógeno por FF con variaciones en C/N.

BPNA	Sustrato	Reactor	Intervalo de C/N	C/N óptimo	Producción de H ₂	Referencia
HAU-M1	Lenteja de agua y paja de maíz	Lote	11 – 59	13.2	78 mL H ₂ (g ST) ⁻¹	Zhang <i>et al.</i> , 2021
HAU-M1	<i>Arundo donax</i> L. (Caña común)	Lote	1.4 – 48.7	25.1	79.2 mL H ₂ (g ST) ⁻¹	Jiang <i>et al.</i> , 2021
HAU-M1	eFO a partir de paja de maíz	Lote	5 – 11	8–9	436.3 mL H ₂	Li <i>et al.</i> , 2019
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> DSM 158	Malato	Lote	15 – 35	27.5	960 mL H ₂ L ⁻¹	Al-Mohammedawi <i>et al.</i> , 2018
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> DSM 158	Agua residual de cervecería	Lote	7.4 – 37.8	25.1	408.3 mL H ₂ L ⁻¹	Al-Mohammedawi <i>et al.</i> , 2019

HAU-M1: Consorcio bacteriano conformado por *Rhodobacter sphaeroides* (9%), *Rhodopseudomonas palustris* (28%), *Rhodospirillum rubrum* (27%), *Rhodopseudo-monas capsulate* (25%), y *Rhodobacter capsulatus* (11%) (Li *et al.*, 2019).

2.4.2.3. Dilución de sustrato de FF.

En los procesos de producción de hidrógeno por FF, la penetración de la luz en el medio reactivo es de suma importancia para las BPNA, ya que la luz tiene un papel muy importante en el metabolismo microbiano. El uso de sustratos oscuros (principalmente provenientes de procesos de FO) puede reducir la penetración de la luz. Por lo tanto, se sugiere realizar una dilución de estos previo al proceso fotofermentativo con el fin de mejorar la conversión de AOV a hidrógeno (Hay *et al.*, 2013; Niño-Navarro *et al.*, 2020). En la Tabla 4 se muestran algunos estudios donde se estudia la proporción de dilución.

Tabla 4. Estudios de producción de hidrógeno por FF con dilución de sustrato.

BPNA	Sustrato	Reactor	Dilución estudiada	Dilución óptima (concentración)	H _{Ymax} óptimo de H ₂	Referencia
C2	eFO a partir de RVF y SQP	Lote	1:2, 1:5, 1:10	1:10 (1.4 gAOV L ⁻¹)	793.7 mLH ₂ g ⁻¹ COD	Niño-Navarro <i>et al.</i> , 2020
<i>Rhodopseudomonas faecalis</i> RLD-53	eFO a partir de glucosa (6.77 gAOV L ⁻¹)	Lote	1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3	1:0.5 (64.7 mM L ⁻¹)	4368 mLH ₂ L ⁻¹ eFO	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> NMBL-01 y <i>Bacillus firmus</i> NMBL-03	eFO a partir de hidrolizado de <i>Spirulina platensis</i> (13.6 gAOV L ⁻¹)	Lote	1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35	1:20 (7.23 mM L ⁻¹)	1.35 mol H ₂ L ⁻¹ eFO	Pandey <i>et al.</i> , 2021
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001	eFO a partir de RPGM	Lote	1:2, 1:4, 1:8, 1:16	1:8 (67g eFO L ⁻¹)	800 mL H ₂ L ⁻¹ eFO diluido	Seifert <i>et al.</i> , 2018
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	eFO a partir de aceite de palma (15 gAOV L ⁻¹)	Lote	1:1, 1:2.3; 1:9	1:2.3 (4.5 gAOV L ⁻¹)	3.07 mol H ₂ mol ⁻¹ acetato	Mishra <i>et al.</i> , 2018

RVF: Residuos de verduras y frutas; SQP: Suero de queso en polvo; COD: Demanda química de oxígeno; C2: Consorcio microbiano conformado por *Bacteroides* 29%, *Dysgonomonas* 34%, *Clostridium* 5%, *Rhodopseudomonas* 2%, *Pseudomonas* 5% y otras; RPGM: Residuos del proceso de la goma de mascar. H_{Ymax}: rendimiento de H₂.

2.4.3. Producción de hidrógeno en sistemas acoplados: FO – FF.

Individualmente, la FO y FF son bioprocesos importantes para la producción de hidrógeno, sin embargo, presentan inconvenientes como bajo rendimiento por la acumulación de AOV en la FO, alto costo de producción y baja recuperación de energía. Por ello acoplar la FO y la FF en un proceso de dos etapas secuenciales se presenta como una buena técnica para contrarrestar sus deficiencias. En una FO y FF secuencial de dos etapas, el efluente obtenido de la FO puede emplearse como sustrato para la FF (Sharma *et al.*, 2020). No obstante, es importante que antes de utilizar el efluente oscuro en la segunda etapa se realice una separación de la biomasa por centrifugación o filtración, posteriormente, una dilución y ajuste de pH. Este modo de proceso presenta mayores rendimientos y se puede controlar fácilmente, sin embargo, necesita más energía para la FF, son necesarios dos reactores (por lo que se elevan los costos) y tiene una tasa de producción baja (Ranjan Das & Basak, 2020). En la Tabla 5 se exponen algunos estudios de sistemas secuenciales FO-FF.

Tabla 5. Estudios de producción de hidrógeno en sistemas secuenciales FO-FF.

Sustrato	Pretratamiento	Fermentación oscura	Fotofermentación	Ref.
RM	Hidrólisis enzimática	Lodos de depuradora con estiércol de vaca. 35°C pH 4.5 $R_{max} = 22.4 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ $Y_{max} = 7.5 \text{ m}^3 \text{ H}_2 \text{ m}^{-3}\text{-d}^{-1}$	Cultivo de bacterias fotosintéticas mixtas HAU-M1. 30°C pH 7.0 3 klx Luz Solar/LED $R_{max} = 37.3 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ $Y_{max} = 4.7 \text{ m}^3 \text{ H}_2 \text{ m}^{-3}\text{-d}^{-1}$	Zhang <i>et al.</i> , 2018
RVF:SQP (1:1)	NA	<i>Bifidobacterium</i> (85.4%), <i>Klebsiella</i> (9.1%), <i>Lactobacillus</i> (0.97%), <i>Citrobacter</i> (0.21%), <i>Enterobacter</i> (0.27%) and <i>Clostridium</i> (0.18%). 35°C pH 5.5 $V_0 = 100 \text{ mL}$ 120 h 150 rpm $H_{max} = 6.3 \text{ mmol H}_2$ $Y_{max} = 0.18 \text{ mmol H}_2 \text{ g COD}^{-1}$	Cultivo de bacterias fotosintéticas mixtas C2 30°C pH 6.8 $V_0 = 80 \text{ mL}$ 240 h 150 rpm Luz LED (30 mmol m ⁻² s ⁻¹). $H_{max} = 27.6 \text{ mmol H}_2$ $Y_{max} = 15.795 \text{ mmol H}_2 \text{ g COD}^{-1}$	Niño-Navarro <i>et al.</i> , 2020
POME	NA	<i>Clostridium butyricum</i> LS2 37°C pH 4.0 $V_0 = 1 \text{ L}$ COD = 28,500 $R_{max} = 21 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1}$ $Y_{max} = 0.784 \text{ mLH}_2 \text{ mL POME}^{-1}$ $H_{max} = 784 \text{ mL H}_2$	<i>R. palustris</i> (1.8929) 30°C pH 7.0 $V_0 = 1 \text{ L}$ COD = 12,200 4-9 klux 100 W lámpara de filamento de tungsteno $R_{max} = 26 \text{ mLH}_2 \text{ h}^{-1}$ $H_{max} = 1679 \text{ mL H}_2$	Mishra <i>et al.</i> , 2016

C2: *Bacteroides* 29%, *Dysgonomonas* 34%, *Clostridium* 5%, *Rhodopseudomonas* 2%, *Pseudomonas* 5% y otras; HAU-M1: *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodopseudomonas palustris*; NA: No aplica; POME: Efluente de fabricación de aceite de palma (por sus siglas en inglés); RVF: Residuos de verduras y frutas; RM: Rastrojo de maíz; SQP: Suero de queso en polvo. R_{max} : tasa de generación máxima de H₂, Y_{max} : Rendimiento de H₂ máximo, V_0 : volumen de operación.

2.5 Análisis de Ciclo de Vida.

El análisis de ciclo de vida (ACV) es una metodología científica que permite cuantificar los impactos ambientales considerando todas las entradas (energía, materiales, agua, etc.) y salidas (productos, emisiones, energía, etc.) del sistema bajo estudio. Mediante el ACV se pueden conocer los puntos débiles del sistema y ayudar en la toma de decisiones que impliquen su implementación (Tian *et al.*, 2019).

La determinación de impactos ambientales puede llevarse a cabo por diferentes metodologías estandarizadas. Entre las más comunes se incluyen Eco-Indicator 99 (Pré Consultants, 2000), CML 2001 (Guinée et al., 2001), EDIP 2003 (Potting y Hauschild, 2006), IMPACT 2002 (Jolliet et al., 2003) y ReCiPe 2016 (Huijbregts *et al.*, 2016). En esta investigación se usó la metodología ReCiPe 2016, por lo cual se hace una descripción un poco más amplia.

- Eco-Indicator 99

Esta metodología fue creada por PRé Consultants en los Países Bajos y consta de 11 categorías de impacto de punto intermedio, las cuales se agrupan en 3 categorías de punto final: salud humana, calidad de los ecosistemas y agotamiento de recursos fósiles (Muthu, 2020).

- CML 2001

Desarrollada en el 2001 por el Instituto de Ciencias Ambientales (CML) de la Universidad de Leiden en los Países Bajos, está basada en categorías de punto intermedio. El método CML 2001 agrupa las categorías de impacto en 3 tipos: obligatorias (incluidas en la mayor parte de los ACV), adicionales (indicadores que comúnmente no se incluyen en los ACV) y otras (indicadores que no existen y por lo tanto no se pueden incluir en un ACV) (Muthu, 2020).

- EDIP 2003

Esta metodología es una nueva versión de EDIP 1996. EDIP 2003 (Diseño Ambiental de Productos Industriales, por sus siglas en inglés) fue desarrollada por el Instituto de Desarrollo de Producto de la Universidad Técnica Danesa. Es una metodología que está enfocada en el punto medio con normalización, pero sin ponderación.

- IMPACT 2002+

IMPACT 2002+ es una metodología creada por el Instituto Federal Suizo de Tecnología y la Escuela Politécnica Federal de Lausana (EPFL)- Francia. Es una versión modificada de IMPACT 2002. Incluye 14 categorías de impacto de punto medio y 4 categorías de punto final. Algunos de los factores de caracterización están adaptados de otras metodologías, tales como IMPACT 2002, CML y Eco-Indicator 99.

- ReCiPe 2016

ReCiPe 2016 es una versión mejorada de ReCiPe 2008 y de sus antecesores: CML 2001 y Eco-Indicator 99. Esta metodología fue desarrollada por el Instituto Nacional Holandés de Salud Pública y Medio Ambiente (RIVM), la Universidad Radboud Nijmegen, la Universidad Noruega de Ciencia y Tecnología y PRé. ReCiPe 2016 permite convertir los inventarios de ciclo de vida en puntuaciones de impacto a nivel de punto medio y final. En total consta de 3 indicadores de punto final (daño a la salud humana, daño a la diversidad de los ecosistemas y daño a la disponibilidad de recursos) y 18 indicadores de punto medio (Figura 2) (Muthu, 2020).

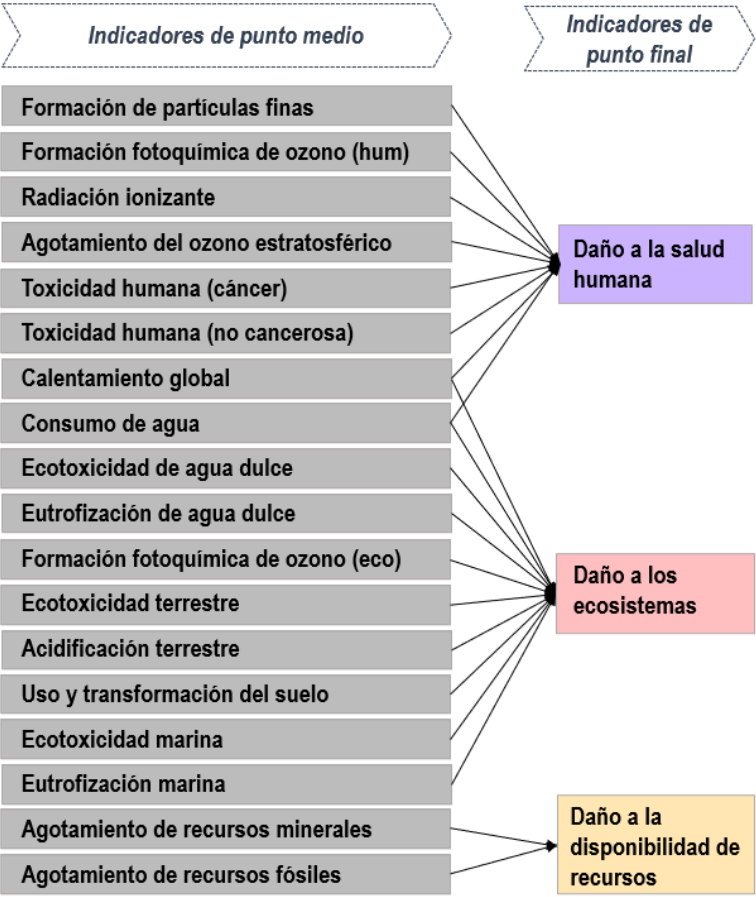


Figura 2. Resumen de las categorías de impacto de la metodología ReCiPe 2016. Adaptado de Huijbregts *et al.*, 2016.

Actualmente, existen pocos estudios de ACV de procesos de FO-FF de manera secuencial para la producción de hidrógeno a partir de biomasa. En la Tabla 6 se muestra un resumen de las consideraciones que se han hecho en los estudios existentes.

Tabla 6. Análisis de ciclo de vida de procesos FO-FF en modo secuencial.

Sustrato	Unidad funcional	Software	Metodología de evaluación de impacto	Alcance	Escala	Observaciones	Ref.
Cáscara de papa al vapor (SPP)	1 kg H ₂	SimaPro 7.1	Eco-Indicador 99	Cuna a la tumba	Pequeña	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mayores emisiones de GEI e impactos generales por la tecnología de fermentación que las del reformado convencional de gas natural o biogás. ▪ Uso de fosfato en los procesos de fermentación generó el 53.5% del impacto ambiental. ▪ Reducción del impacto en un 65.8% con la recirculación de aguas residuales o reducción de la concentración del buffer. ▪ La producción de los ingredientes del proceso causa el 98.3% del impacto ambiental (principalmente fosfato, base y vapor). 	Ochs <i>et al.</i> , 2010
Paja de trigo (WS), tallo de sorgo dulce (SSS) y cáscara de papa al vapor (SPP)	460 ton H ₂ año ⁻¹	SimaPro 7.1	IMPACT 2002+	Cuna a la puerta	Piloto	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reducción de las emisiones de GEI entre un 52-56% en comparación con el diésel y entre un 54-57% en comparación con la producción de H₂ de reformado de metano a vapor. ▪ Agotamiento de recursos y cambio climático fueron las categorías de mayor impacto. La fermentación es la etapa crucial en el ciclo de vida del H₂, ya que representó entre el 41-43% de impacto en la categoría de recursos y entre 42-44% de impacto en cambio climático debido a los grandes requerimientos de energía y vapor de los biorreactores. 	Djomo & Blumberga, 2011

3. Justificación

Con el propósito de evitar los impactos generados por el uso de fuentes fósiles que suplen la demanda energética de la población, se han buscado alternativas para la producción de energéticos centradas en el aprovechamiento de fuentes renovables. Actualmente, el hidrógeno ha sido el centro de atención de muchos investigadores por presentar la posibilidad de ser un combustible obtenido a partir de residuos orgánicos.

En la región Noreste de México, el bagazo de naranja (BN), la paja de sorgo (PS), el rastrojo de maíz (RM) y los residuos de frutas y vegetales (RVF) son residuos orgánicos provenientes del sector doméstico, agroindustrial y la industria alimentaria, que tienen potencial para ser aprovechados en la producción de biocombustibles como el hidrógeno. Sin embargo, antes de introducirlos como sustrato a los procesos de producción deben ser tratados para ser delignificados y mejorar su bioaccesibilidad. El pretratamiento AHP es un método de bajo consumo energético que ha sido eficiente en la destrucción de la lignina de la biomasa lignocelulósica y que no ha sido ampliamente aplicado a los procesos de producción de hidrógeno.

Los procesos fermentativos son los principales en aprovechar biomasa rica en carbohidratos para producir hidrógeno. Estos procesos pueden realizarse de manera secuencial FO-FF con la finalidad de mejorar el rendimiento y producción de hidrógeno mediante el aprovechamiento de los eFO en la FF. Además, la evaluación de impacto ambiental de los procesos FO-FF es importante para hacer una comparación con los procesos convencionales y buscar la manera de mejorar el proceso biológico en términos ambientales, sin embargo, el estudio desde este enfoque ha sido muy limitado en literatura.

Por todo lo anterior, se busca desarrollar un proceso de fermentación oscura-fotofermentación acoplado para la producción de hidrógeno a partir de efluentes reales de FO de residuos orgánicos y evaluar su impacto ambiental basado en el ACV.

4. Aportación científica

La implementación de una estrategia efectiva para el aprovechamiento acoplado (fermentación oscura - fotofermentación) de efluentes reales de FO para la producción de hidrógeno, que involucre un pretratamiento peróxido de hidrógeno alcalino de los sustratos: BN, PS y RVF:RM, así como la determinación de su potencial de producción de biohidrógeno por FO y la evaluación del impacto ambiental del proceso secuencial FO-FF comparado con los procesos fermentativos individuales, basados en la metodología de ACV.

5. Hipótesis general y particulares

El proceso acoplado de FO-FF permitirá el aprovechamiento del mejor de los residuos orgánicos ensayados (PS, BN, RVF:RM), presentando mayor rendimiento de hidrógeno y menores impactos ambientales en el indicador de cambio climático en contraste con cada proceso fermentativo individual.

5.1 Hipótesis particulares

- a) El pretratamiento peróxido de hidrógeno alcalino permitirá un mejor aprovechamiento de los sustratos para la producción de hidrógeno por fermentación oscura.
- b) La producción de biohidrógeno de fermentación oscura se verá mejorada en sustratos pretratados con una mayor relación holocelulosa:lignina.
- c) La fotofermentación con *Rhodobacter capsulatus* B10 a partir de efluentes de fermentación oscura será posible.
- d) El impacto ambiental de la producción secuencial de hidrógeno por fermentación oscura-fotofermentación será menor que el observado en cada proceso fermentativo.

6. Objetivos y metas

6.1 Objetivo general

Desarrollar un proceso acoplado, de fermentación oscura – fotofermentación, para la producción de hidrógeno a partir de efluentes reales de fermentación oscura de residuos orgánicos y evaluar su impacto ambiental basado en el análisis de ciclo de vida.

6.2 Objetivos específicos

- Realizar el pretratamiento peróxido de hidrógeno alcalino para BN, PS y RVF:RM.
- Evaluar el potencial de biohidrógeno de los sustratos pretratados por fermentación oscura.
- Producir hidrógeno por fotofermentación a partir de los efluentes de fermentación oscura, evaluando la relación C/N⁺ y la concentración de AOV.
- Evaluar el impacto ambiental del proceso basado en ACV.

7. Metodología de trabajo

En la Figura 3 se muestra el plan de trabajo del proyecto, el cual está conformado por cuatro fases. En la primera se realizó el acondicionamiento y la caracterización de tres tipos de biomasa: bagazo de naranja (BN), paja de sorgo (PS) y residuos de vegetales y frutas mezclados con rastrojo de maíz (RVF:RM). Posteriormente, todos los sustratos fueron sometidos a un pretratamiento AHP para mejorar su bioaccesibilidad. En la segunda fase se evaluó el potencial de biohidrógeno de estos tres sustratos pretratados y se seleccionó el que presentó mejores resultados. En la tercera se llevó a cabo la producción de hidrógeno por FF a partir de los efluentes de FO ricos en AOV. Finalmente, en la cuarta fase se evaluaron los impactos ambientales de los procesos propuestos para la producción de hidrógeno siguiendo la metodología de ACV.

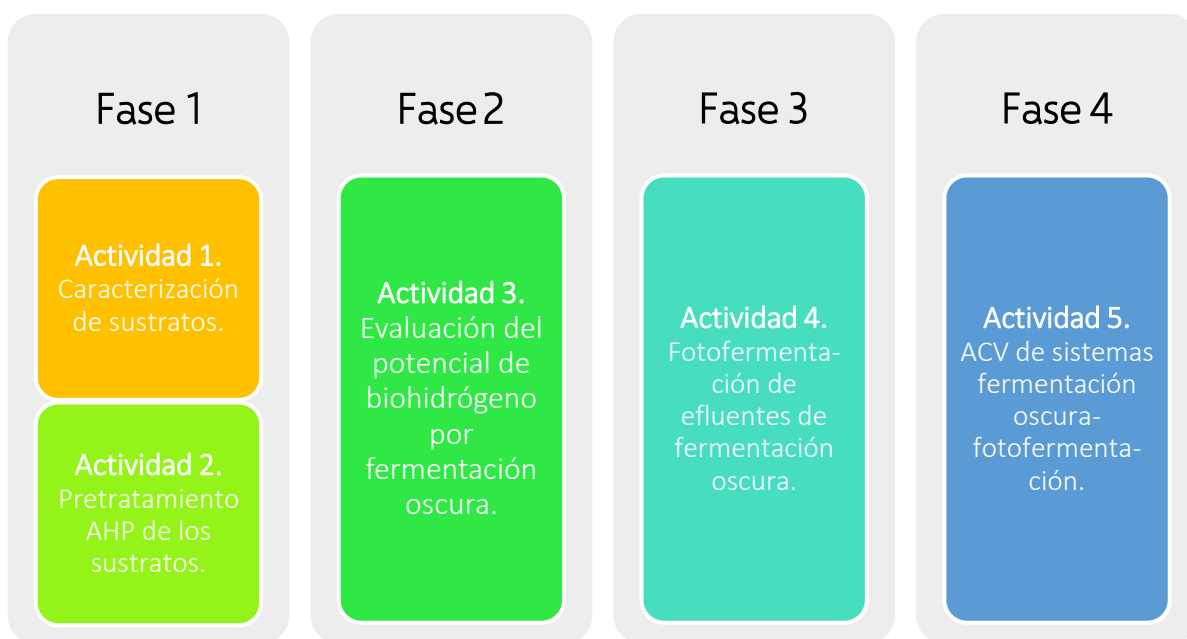


Figura 3. Esquema de plan de trabajo.

7.1 Actividad 1. Caracterización de sustratos.

7.1.1. Propósito

Realizar la caracterización fisicoquímica de los sustratos BN, PS, RM y RVF.

7.1.2. Diseño experimental

Se determinó la composición y características iniciales de los sustratos BN, PS, RM y RVF a partir de la realización de su caracterización fisicoquímica.

7.1.3. Programa de seguimiento y análisis

La Tabla 7 muestra los diferentes análisis de caracterización realizados a los sustratos.

Tabla 7. Parámetros de caracterización de los sustratos.

Parámetro	Frecuencia	Método	Ref.
pH	Lote	Potenciométrico	1
Sólidos totales	Lote	Gravimétrico	2
Sólidos volátiles	Lote	Gravimétrico	2
Alcalinidad	Lote	Titulación	3
Ácidos orgánicos volátiles	Lote	Titulación	3
Celulosa	Lote	Gravimétrico	4
Hemicelulosa	Lote	Gravimétrico	4
Lignina	Lote	Gravimétrico	4
Nitrógeno Total Kjeldahl	Lote	Titulación	5

Referencias: 1: (NMX-AA-25-1984, 1992); 2:(APHA/AWWA/WEF, 2005); 3: (Anderson & Yang, 1992); 4: (AOAC, 1992); 5: (EPA-821-R-01-004, 2001).

Cada uno de los sustratos fue caracterizado individualmente. Cabe destacar que en las actividades posteriores los RVF y RM se usaron en mezcla con una relación 3:1, respectivamente, basado en lo obtenido previamente en el grupo de investigación GIBIOS (Rodríguez Valderrama, 2018). Por lo tanto, los resultados de las caracterizaciones de estos dos sustratos se ponderaron conforme a la relación para obtener los valores correspondientes a RVF:RM.

7.1.4. Métodos y procedimientos

7.1.4.1. Recolección y preparación del BN, PS, RM y RVF.

El BN se obtuvo de un negocio ambulante de jugos de la ciudad de Guadalupe, Nuevo León. Este sustrato se sometió a un proceso para extraer el D-limoneno contenido en las cáscaras de la naranja (Ruiz *et al.*, 2016). El BN se cortó en tiras de aproximadamente 2 – 4 cm de largo por 1 cm de ancho y se suspendieron en una solución de etanol 70% v v⁻¹ durante 60 min en constante agitación a temperatura ambiente, manteniendo una relación BN:solvente de 1:10. Posteriormente, se secó a 80°C durante 24 h. Se trituró y se tamizó hasta obtener un tamaño de partícula de 210 µm y finalmente, se almacenó a temperatura ambiente en condiciones de vacío.

La PS se recolectó del lote de alimentación del ganado de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se secó durante 24 h a 80°C. Después se trituró con un molino de estrella manual y se tamizó hasta obtener partículas menores a 210 µm. Se almacenó a temperatura ambiente en condiciones de vacío para su posterior uso.

El RM se recolectó de El Pasaje en el municipio de Cuencamé, Durango. Se secó durante 24 h a 80°C. Posteriormente se trituró en un molino de estrella manual y se tamizó hasta obtener partículas menores 210 µm y se almacenó a temperatura ambiente en condiciones de vacío para su posterior uso.

Los RVF se recolectaron de domicilios de la zona Metropolitana de Monterrey. Se trituraron y se homogeneizaron con un procesador de alimentos (Hamilton Beach 70610). Posteriormente fueron secados a 80°C durante 48 h. Se trituraron y se tamizaron hasta obtener un tamaño de partícula de 210 µm. Finalmente, se almacenaron a temperatura ambiente en condiciones de vacío.

7.1.4.2. Análisis de sólidos, pH, alcalinidad y AOV.

La determinación de humedad, sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas se realizó de acuerdo con el método estándar (APHA/AWWA/WEF, 2005).

Para la determinación del pH del BN, PS, RM y RVF, se hizo una extracción con agua destilada de cada uno de los sustratos secos en polvo empleando una relación 1:10 m v⁻¹

muestra: agua y se obtuvo el pH a partir del sobrenadante después de hacer la extracción, con un medidor de pH (Conductronic PC45, México). Se utilizó una alícuota de 5 mL del extracto para determinar la alcalinidad y los AOV presentes en los sustratos; utilizando HCl 0.1 N para la alcalinidad y NaOH 0.1 N para los AOV, siguiendo la metodología de Anderson & Yang (1992).

7.1.4.3. Análisis de celulosa, lignina, hemicelulosa y nitrógeno total Kjeldahl.

La determinación de celulosa se realizó por el método gravimétrico presentado por AOAC (1992). Se agregó ácido nítrico 99% v v⁻¹ y ácido acético 70% v v⁻¹ para lograr remover la lignina y la hemicelulosa. Por último, se calcinó la muestra y se estimó el contenido de celulosa por diferencia de masa.

El contenido de hemicelulosa se determinó por diferencia entre la holocelulosa y la celulosa, ya que la holocelulosa es la suma de la celulosa y hemicelulosa. Por lo tanto, se realizó el análisis de holocelulosa por el método gravimétrico presentado por la AOAC (1992). Primero, se llevó a cabo una cloración de las muestras con NaClO el cual logra oxidar la lignina. Posteriormente se filtró la muestra; la diferencia entre el peso inicial y final (antes y después de la cloración) representa el contenido de holocelulosa.

El contenido de lignina insoluble se determinó por método gravimétrico. Inicialmente, se extrajeron los carbohidratos de los residuos orgánicos por medio de una hidrólisis ácida concentrada con H₂SO₄ al 72% v v⁻¹ durante 1 h. Posteriormente, se realizó una hidrólisis diluida en un baño de agua a ebullición durante 4 h y se recuperó la biomasa mediante filtración. El remanente filtrado se cuantifica como lignina.

Se hizo la corrección del contenido de cenizas en cada uno de los análisis anteriores.

La determinación del nitrógeno total Kjeldahl se llevó a cabo por el método de digestión Kjeldahl, el cual se resume en tres partes: 1) la digestión de la muestra para transformar el nitrógeno orgánico a NH₄⁺; 2) la destilación del digestato, donde se destila el NH₃ y se retiene en un vaso con H₃BO₃ al 4% v v⁻¹; y 3) la titulación a pH 4.65 con HCl 0.1 N para determinar la cantidad de nitrógeno en la muestra.

7.2 Actividad 2. Pretratamiento peróxido de hidrógeno alcalino de los sustratos.

7.2.1. Propósito

Disminuir el contenido de lignina y aumentar la disponibilidad de azúcares fermentables de los sustratos.

7.2.2. Diseño experimental

Para determinar las condiciones óptimas, se llevó a cabo el pretratamiento AHP a 25°C para los sustratos BN, PS y RVF:RM (3:1) utilizando H₂O₂ a dos diferentes concentraciones (3% y 5% w v⁻¹) durante 24 h (Tabla 8). A lo largo del pretratamiento se tomaron muestras a las 0, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 h. La experimentación se realizó por duplicado en frascos KIMAX de 100 mL, teniendo un total de seis experimentos por triplicado.

Tabla 8. Diseño de experimental del pretratamiento AHP.

Ensayo	Sustrato	Concentración H ₂ O ₂ (% w v ⁻¹)	Tiempo (h)
1	BN	3	24
2	PS	3	
3	RVF:RM	3	
4	BN	5	
5	PS	5	
6	RVF:RM	5	

7.2.3. Programa de seguimiento y análisis

A cada una de las muestras se le agregó 300 µL de Na₂SO₃ y se colocaron en baño maría a 50°C durante 30 min para detener la reacción (Michalska & Ledakowicz, 2014). Posteriormente, fueron centrifugadas para separarlas en sus fracciones sólida y líquida. Los análisis realizados para la caracterización de los efluentes se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros de caracterización de efluentes de pretratamiento.

Parámetro	Frecuencia	Método	Ref.
Azúcares reductores	0, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 h.	Colorimétrico	1
Azúcares totales		Colorimétrico	2
Compuestos fenólicos totales		Colorimétrico	3

Referencias: 1:(Miller, 1959); 2:(Dubois *et al.*, 1951); 3: (Dávila-Hernández *et al.*, 2019).

Al cabo de las 24 h del pretratamiento, los experimentos se colocaron en baño maría a 50°C durante 30 min para descomponer el resto de H₂O₂ y parar la reacción (Michalska & Ledakowicz, 2014). Posteriormente, fueron centrifugados para separarlos en sus fracciones sólida y líquida. La fracción sólida hidrolizada de pretratamiento AHP al cabo de 24 h fue caracterizada bajo los parámetros que se muestran en la Tabla 10 y la fracción líquida hidrolizada se caracterizó por los parámetros de la Tabla 9.

Tabla 10. Parámetros de caracterización la fracción sólida de pretratamiento AHP.

Parámetro	Frecuencia	Método	Ref.
Sólidos totales	Inicial-Final	Gravimétrico	1
Sólidos volátiles	Inicial-Final	Gravimétrico	1
Holocelulosa	Inicial-Final	Gravimétrico	2
Lignina	Inicial-Final	Gravimétrico	2

Referencias: 1: (APHA/AWWA/WEF, 2005); 2: (AOAC, 1992)

7.2.4. Métodos y procedimientos

7.2.4.1. Pretratamiento AHP.

El pretratamiento se llevó a cabo siguiendo la metodología de (Michalska & Ledakowicz, 2014). Se colocaron 2 g SV de sustrato (preparados de acuerdo con la sección 7.1.4.1) en un frasco con 50 mL de la solución de H₂O₂ (concentración de sustrato de 40 g SV L⁻¹). Se ajustó el pH de la mezcla a 11.5 con una solución concentrada de NaOH. Posteriormente, la mezcla se colocó en agitación en una incubadora orbital (PRENDO INO-650 M, México) a 160 rpm a 25°C durante 24 h. Al terminar el pretratamiento se colocó en baño maría a 50°C durante 30 min con la finalidad de descomponer el resto de H₂O₂ presente. Posteriormente se enfriaron y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min para separar las fracciones líquida y sólida.

7.2.4.2. Determinación de la concentración de azúcares reductores totales

El contenido de azúcares reductores se determinó siguiendo el procedimiento de Miller (1959). Se tomó 0.5 mL de hidrolizado líquido diluido, se le añadió 1.5 mL de la solución DNS y se homogenizó con un vortex (Scientific Industries 51-0136, USA). A continuación, se colocó en baño maría a punto de ebullición durante 5 min. Se enfrió aplicando un choque térmico en agua con hielo y se le agregaron 3 mL de agua destilada. Se midió la absorbancia en un

espectrofotómetro (HACH DR 6000, USA) a 550 nm y se calculó la concentración en base a una curva de calibración previamente elaborada con dextrosa como estándar.

7.2.4.3. Determinación de la concentración de azúcares totales

El contenido de azúcares totales se determinó a partir del procedimiento de Dubois *et al.*, (1951). Se tomó 0.5 mL de hidrolizado líquido diluido, se le adicionó 0.5 mL de fenol al 8% y se homogenizó con un vortex (Scientific Industries 51-0136, USA). Se agregaron 2.5 mL de H₂SO₄ concentrado y se dejó enfriar durante 30 min. Finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (HACH DR 6000, USA) a 490 nm y se calculó la concentración en base a una curva de calibración previamente elaborada con dextrosa como estándar.

7.2.4.4. Determinación de compuestos fenólicos totales.

La determinación de los compuestos fenólicos totales se realizó siguiendo el método de Dávila-Hernández *et al.* (2019). Se tomó 1 mL de hidrolizado líquido diluido y se le agregaron 0.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente, se le agregaron 0.75 mL de Na₂CO₃ al 20% p v⁻¹ y se dejó reaccionar en ausencia de luz durante 90 min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (HACH DR 6000, USA) a 760 nm y se calculó la concentración en base a una curva de calibración previamente elaborada con ácido gálico como estándar.

7.2.4.5. Caracterización de la fracción sólida y líquida de pretratamiento AHP (24 h).

Para la caracterización de la fracción sólida se determinaron los sólidos totales y sólidos volátiles como se describe en la sección 7.1.4.2. El contenido de lignina y holocelulosa se determinaron siguiendo lo explicado en la sección 7.1.4.3.

El pH de la fracción líquida se cuantificó directamente de los hidrolizados líquidos con un medidor de pH (Conductronic PC45, México). La alcalinidad y AOV se determinaron como se describe en la sección 7.1.4.2.

7.2.4.6. Escalamiento 1 de pretratamiento AHP.

Se llevó a cabo el escalamiento del pretratamiento AHP con el mejor resultado del diseño de experimentos mostrado en la sección 7.2.2. El escalamiento se realizó en botellas serológicas de 120 mL con volúmenes de operación correspondientes a lo necesario para cumplir con las

RIS de la Tabla 12, manteniendo una concentración de sustrato de 40 g SV L⁻¹. El pretratamiento de cada uno de los sustratos (BN, PS y RVF:RM) se llevó a cabo como se describe en la sección 7.2.4.1. Una vez terminado el pretratamiento AHP, se procedió a realizar el diseño experimental del potencial de biohidrógeno descrito en la sección 7.3.2.1 en las botellas serológicas con los sustratos pretratados.

7.2.4.7. Escalamiento 2 de pretratamiento AHP.

El segundo escalamiento de pretratamiento AHP se llevó a cabo con el mejor resultado del diseño de experimentos mostrado en la sección 7.2.2. El escalamiento se realizó en un frasco KIMAX de 1 L, manteniendo una concentración de sustrato de 40 g SV L⁻¹. El pretratamiento del mejor sustrato (BN), como lo señala la sección 8.2, se llevó a cabo como se describe en la sección 7.2.4.1. Una vez terminado el pretratamiento AHP, se procedió a realizar el diseño experimental de determinación de aprovechamiento de sustrato en FO descrito en la sección 7.3.2.2 en botellas serológicas de acuerdo con la Tabla 13.

7.2.4.8. Escalamiento 3 de pretratamiento AHP.

El tercer escalamiento de pretratamiento AHP se llevó a cabo a las condiciones de operación correspondientes al mejor resultado del diseño de experimentos mostrado en la sección 7.2.2. El escalamiento se realizó en dos frascos KIMAX de 1 L cada uno con un volumen de operación de 620 mL, manteniendo una concentración de sustrato de 40 g SV L⁻¹. El pretratamiento del mejor sustrato (BN), como lo señala la sección 8.2, se llevó a cabo como se describe en la sección 7.2.4.1. Una vez terminado el pretratamiento AHP, se procedió a realizar la FO como se describe en la sección 7.5.2.2 en matraces Erlenmeyer de 1 L de acuerdo con la Tabla 17.

7.3 Actividad 3. Evaluación del potencial de biohidrógeno por fermentación oscura.

7.3.1. Propósito

Realizar la producción de biohidrógeno para determinar la mejor RIS y el mejor sustrato en términos de rendimiento.

7.3.2. Diseño experimental

7.3.2.1. Potencial de biohidrógeno.

La evaluación del potencial de hidrógeno se realizó siguiendo un diseño factorial 3^2 en el cual se consideraron como factores la relación inóculo-sustrato (RIS: 0.2, 0.6 y 1) y el sustrato pretratado (BNp, PSp y RVF:RMp). Estos experimentos se llevaron a cabo en botellas serológicas de 120 mL con un volumen de operación de 70 mL. Las botellas se cerraron con un tapón de butilo y un sello de aluminio. Los experimentos control fueron realizados con los sustratos sin pretratamiento a RIS 0.6 (BNc, PSc y RVF:RMc) y el blanco fue el inóculo. Los experimentos se realizaron por duplicado. La variable de respuesta fue el rendimiento de hidrógeno. En la Tabla 12 se resumen las condiciones a las que se llevó a cabo este experimento.

Tabla 12. Diseño experimental factorial 3^2 de la evaluación del potencial de biohidrógeno.

	Sustrato		RIS		Condiciones de operación
Experimento	RVF:RMp	0.2	0.6	1	Temperatura = 35 °C; V ₀ = 70 mL; Agitación: manual 1 vez al día.
	PSp	0.2	0.6	1	
	BNp	0.2	0.6	1	
Control	RVF:RMc		0.6		
	PSc		0.6		
	BNc		0.6		
	Inóculo		NA		

c: Control; p: Pretratamiento AHP aplicado; NA: No aplica. RIS: relación inóculo-sustrato. Vo: volumen de operación.

7.3.2.2. Determinación de mejor forma de aprovechamiento de sustrato.

Una vez determinada la mejor RIS y sustrato, se realizó un experimento multifactorial para determinar la mejor manera de aprovechar este sustrato (BN), de acuerdo con presentación de la biomasa: usando fracción sólida (BN-p,s), fracción líquida (BN-p,l) y mezcla completa (BN-p); y realizando su comparación cuando no se aplica pretratamiento (BN-s, BN-l, BN). Este experimento se realizó en botellas serológicas de 120 mL con un volumen de operación de 70 mL y RIS 0.6. Estas fueron cerradas con un tapón de butilo y un sello de aluminio. Los experimentos se realizaron por duplicado y el blanco fue el inóculo. En la Tabla 13 se sintetizan los factores y condiciones de este experimento.

Tabla 13. Diseño de experimental para determinación de aprovechamiento del sustrato.

Presentación de biomasa	Pretratamiento AHP		Condiciones de operación
Completa	Con (BN-p)	Sin (BN)	Temperatura = 35 °C;
Sólida	Con (BN-p,s)	Sin (BN-s)	$V_0 = 70$ mL; $pH_0 = 7$;
Líquida	Con (BN-p,l)	Sin (BN-l)	Agitación: manual 1 vez al día.

7.3.3. Programa de seguimiento y análisis

En la Tabla 14 se muestran los parámetros determinados para el diseño experimental de potencial de biohidrógeno.

Tabla 14. Parámetros estimados en experimento del potencial de biohidrógeno.

Parámetro	Frecuencia	Método	Ref.
pH	Final	Potenciométrico	1
Hidrógeno	0 – 189.5 h	Desplazamiento volumétrico alcalino	2

Referencias: 1: (NMX-AA-25-1984, 1992);2: (Rodríguez Valderrama, 2018)

En la Tabla 15 se enlistan los parámetros caracterizados del diseño experimental para la determinación del aprovechamiento del sustrato.

Tabla 15. Parámetros de caracterización para determinación de aprovechamiento de sustrato.

Parámetro	Frecuencia	Método	Ref.
pH	Inicial-Final	Potenciométrico	1
Sólidos totales	Inicial-Final	Gravimétrico	2
Sólidos volátiles	Inicial-Final	Gravimétrico	2
Alcalinidad	Final	Titulación	3
Ácidos orgánicos volátiles	Final	Titulación	3
Azúcares totales	Final	Colorimétrico	4
Carbono Orgánico Total	Final	----	--
Nitrógeno amoniacal	Final	Titulación	5
Nitrógeno Total Kjeldahl	Final	Titulación	5
Hidrógeno	0 – 148 h	Desplazamiento volumétrico alcalino	6

Referencias: 1: (NMX-AA-25-1984, 1992); 2:(APHA/AWWA/WEF, 2005); 3: (Anderson & Yang, 1992); 4: (AOAC, 1992); 5: (EPA-821-R-01-004, 2001).; 6:(Rodríguez Valderrama, 2018)

7.3.4. Métodos y procedimientos

7.3.4.1. Preparación del inóculo.

El inóculo utilizado para la producción de hidrógeno por FO provino de un digestor anaerobio alimentado con RVF. Fue caracterizado por los parámetros: sólidos volátiles, sólidos totales, pH, alcalinidad y AOV. Con el fin de beneficiar la presencia de los microorganismos productores de hidrógeno, se llevó a cabo un pretratamiento siguiendo la metodología propuesta por Zinatizadeh *et al.* (2017). El procedimiento consistió en aplicar un choque térmico al inóculo en un baño maría a 96°C durante 2 h.

7.3.4.2. Inoculación y arranque de experimentos potencial de biohidrógeno.

Una vez finalizado el pretratamiento descrito en la sección 7.2.4.6., se agregó inóculo manteniendo las RIS como se muestran en la Tabla 12 y completando a su vez un volumen de operación de 70 mL (de ser necesario, se agregó agua destilada). En estos experimentos no se agregó ningún tipo de medio mineral, buffer ni se realizó ajuste de pH inicial, con el fin de llevar a cabo una producción de hidrógeno de bajo impacto. Después de la inoculación, los reactores fueron gaseados con nitrógeno para mantener un medio de reacción anaerobio y posteriormente, fueron cerrados con un tapón de butilo y un sello de aluminio. La FO se llevó a

cabo a las condiciones de operación mencionadas en la Tabla 12. La medición del hidrógeno producido fue realizada mediante desplazamiento alcalino con una solución de NaOH 1 N en probetas invertidas.

7.3.4.3. Inoculación y arranque de experimentos aprovechamiento de sustrato.

En base a los resultados del experimento de potencial, se llevó a cabo la producción de hidrógeno por FO en botellas serológicas de 120 mL con volumen de operación de 70 mL. El inóculo se preparó como se describe en la sección 7.3.4.1. En estos experimentos se mantuvo la mejor RIS y el mejor sustrato en términos de rendimiento del experimento previo, señalados en la sección 8.2. Los factores y condiciones se exponen en la Tabla 13. Para los experimentos que se realizaron con sustrato pretratado se siguió la metodología de la sección 7.2.4.6. Una vez terminado el pretratamiento, una parte de ello se centrifugó para separarlo en sus fracciones líquida y sólida. En el caso de los no pretratados, se siguió una metodología homóloga, con la diferencia de la sustitución del H₂O₂ por agua destilada, es decir, se puso el sustrato en disolución con agua destilada manteniendo una concentración de sustrato de 40 g SV L⁻¹ durante 24 h a 25°C y en agitación en una incubadora orbital (PRENDO INO-650 M, México) a 160 rpm. Parte del sustrato en disolución fue centrifugado y separado en sus fracciones líquida y sólida. El montaje se realizó añadiendo las cantidades correspondientes de biomasa en sus diferentes presentaciones (mezcla completa, fracción líquida y fracción sólida), manteniendo una RIS 0.6. En el caso de los experimentos con sustrato líquido, se hizo la consideración de que la concentración de azúcares totales era igual en términos de sólidos volátiles. No se agregó ningún tipo de medio mineral, ni buffer con el fin de llevar a cabo una producción de hidrógeno por FO de bajo impacto. Se realizó ajuste de pH inicial 7. Después de la inoculación, los reactores fueron gaseados con nitrógeno para mantener un medio de reacción anaerobio y posteriormente, fueron cerrados con un tapón de butilo y un sello de aluminio. La FO se llevó a cabo a las condiciones de operación mencionadas en la Tabla 13. La medición del hidrógeno producido fue realizada mediante desplazamiento alcalino con una solución de NaOH 1 N en probetas invertidas.

7.5. Actividad 4. Fotofermentación de efluentes de fermentación oscura.

7.5.1. Propósito

Producir hidrógeno por fotofermentación a partir de los efluentes ricos en AOV provenientes de la fermentación oscura del mejor sustrato (BN).

7.5.2. Diseño experimental

7.5.2.1. Producción de hidrógeno por FF a partir de eFO.

Para la producción de hidrógeno se siguió un diseño de experimentos 3^2 , teniendo como factores: la concentración de AOV y la relación C/N⁺. Se utilizó el eFO del experimento BN-p y la cepa *Rhodobacter capsulatus* B10. La variable de respuesta fue la producción de hidrógeno. En la Tabla 16 se resume el diseño experimental y las condiciones de operación.

Tabla 16. Diseño de experimentos 3^2 producción de hidrógeno por FF.

Factor	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto	Condiciones de operación
Concentración AOV (% v v ⁻¹)	35%	50%	65%	Temperatura = 30 °C; V ₀ = 100 mL; pH ₀ = 7; Agitación: manual 1 vez al día. 20–30 klux
C/N ⁺	17	26	35	

7.5.2.2. Stock de eFO ricos en AOV.

Para la realización de los experimentos de producción de hidrógeno por FF, se generó un stock de eFO. En la Tabla 17 se muestra el diseño experimental que realizó. Este fue basado en los mejores resultados del diseño de la sección 7.3.2.2. La FO se realizó por triplicado.

Tabla 17. Diseño de experimental producción de stock de eFO ricos en AOV.

Presentación de biomasa	Pretratamiento AHP	Condiciones de operación
Completa	Con (BN-p)	Temperatura = 35 °C; V ₀ = 583 mL; pH ₀ = 7; Agitación: manual 1 vez al día.

7.5.3. Programa de seguimiento y análisis

En la Tabla 18 se muestran los parámetros que se caracterizaron en los experimentos de producción de hidrógeno por FF a partir de eFO.

Tabla 18. Parámetros de caracterización para producción de hidrógeno por FF.

Parámetro	Frecuencia	Método	Ref.
pH	Inicial-Final	Potenciométrico	1
Alcalinidad	Inicial-Final	Titulación	2
Ácidos orgánicos volátiles	Inicial-Final	Titulación	2
Azúcares totales	Inicial-Final	Colorimetría	3
Nitrógeno amoniacal	Inicial-Final	Titulación	4
Densidad Óptica	Final	Colorimetría	5
Hidrógeno	0 – 148 h	Desplazamiento volumétrico alcalino	5

Referencias: 1: (NMX-AA-25-1984, 1992); 2: (Anderson & Yang, 1992); 3: (Dubois *et al.*, 1951); 4: (EPA-821-R-01-004, 2001); 5:(Rodríguez Valderrama, 2018)

En la Tabla 19 se enlistan los parámetros caracterizados en la generación de stocks de eFO ricos en AOV.

Tabla 19. Parámetros de caracterización para generación de stock de eFO ricos en AOV.

Parámetro	Frecuencia	Método	Ref.
pH	Inicial-Final	Potenciométrico	1
Sólidos totales	Inicial-Final	Gravimétrico	2
Sólidos volátiles	Inicial-Final	Gravimétrico	2
Alcalinidad	Final	Titulación	3
Ácidos orgánicos volátiles	Final	Titulación	3
Azúcares totales	Final	Colorimétrico	4
Carbono Orgánico Total	Final	-----	--
Nitrógeno amoniacal	Final	Titulación	5
Nitrógeno Total Kjeldahl	Final	Titulación	5
Hidrógeno	0 – 216 h	Desplazamiento volumétrico alcalino	6

Referencias: 1: (NMX-AA-25-1984, 1992); 2:(APHA/AWWA/WEF, 2005); 3: (Anderson & Yang, 1992); 4: (Dubois *et al.*, 1951); 5: (EPA-821-R-01-004, 2001). 6:(Rodríguez Valderrama, 2018)

7.5.4. Métodos y procedimientos

7.5.4.1. Reactivación de cepas fotofermentativas.

La cepa *Rhodobacter capsulatus* B10 se reactivó en medio RCV (Weaver *et al.*, 1975; He *et al.*, 2006) modificado el cual fue adicionado con 25 mM de lactato y 10 mM de L-glutamato como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. Para mantener el pH neutro se le adicionó un buffer de fosfatos: 0.6 g L⁻¹ KH₂PO₄ y 0.9 g L⁻¹ K₂HPO₄. Por cada litro de medio RCV para crecimiento de bacterias se tienen 50 mL de una solución de supersales, la cual está compuesta por lo siguiente: 0.236 g FeSO₄·7H₂O, 0.4 g EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O), 1.5 g CaCl₂·2H₂O, 4 g MgSO₄·7H₂O, 0.02 g Tiamina (Vitamina B1) y 20 mL de solución de oligoelementos. Un litro de solución de oligoelementos contiene: 2.8 g de H₃BO₃, 1.592 g de MnSO₄·H₂O, 0.04 g de CuSO₄·5H₂O, 0.24 g de ZnSO₄·7H₂O y 0.752 g de Na₂MoO₄·2H₂O.

Esta reactivación se llevó a cabo en tubos FALCON de 15 mL con 13.5 mL de medio RCV y 1 mL de cultivo de la cepa. Los tubos fueron previamente esterilizados con etanol al 70% v v⁻¹, dejándolos bajo luz UV durante 15 min. De igual forma, el medio RCV también fue esterilizado dejándolo por 20 min bajo luz UV. La reactivación se llevó a cabo en la cámara de FF a 30°C durante 5 días a 20–30 klux. La fuente de luz fue una lámpara de alta presión de sodio (SILVANIA, USA) y la intensidad lumínica fue medida con un luxómetro digital (LX1010B).

7.5.4.2. Stock de eFO ricos en AOV para producción de hidrógeno por FF.

Previo a la producción de hidrógeno por FF, se preparó un stock de eFO ricos en AOV, el cual cumple el diseño experimental de la sección 6.5.2.2. La mitad del stock pasó por un proceso de pretratamiento AHP como se describe en la sección 7.2.4.7, y la otra mitad no fue pretratado, para el cual se siguió una metodología homóloga en la que se sustituyó el volumen de H₂O₂ por agua destilada. Para la generación de este stock se llevó a cabo la misma metodología que la descrita en la sección 7.3.4.3, con las siguientes modificaciones: 1) la FO se llevó a cabo en reactores de 1 L con volumen de operación de 583 mL; 2) previo a la FO no se realizó ninguna separación de las fracciones líquida y sólida de la biomasa pretratada y no pretratada. La medición del hidrógeno producido fue realizada mediante desplazamiento alcalino con una solución de NaOH 1 N en probetas invertidas. Al finalizar la producción de hidrógeno por FO,

se centrifugó y se recuperó el eFO líquido, el cual fue caracterizado y almacenado a 4°C para su posterior uso en la fase experimental de producción de hidrógeno por FF.

7.5.4.3. Producción de hidrógeno por FF.

Para la realización de los experimentos de la sección 7.5.2.1, la fuente de carbono original del medio RCV fue reemplazada por los eFO del stock preparado previamente y la fuente de nitrógeno fue modificada como se expone en la Tabla 16. Los experimentos se realizaron en botellas de cara plana de 115 mL con un volumen de operación de 103 mL (100 mL de medio con dilución al 50% de eFO y 3 mL de cepa *Rhodobacter capsulatus* B10), ajustando el pH a 7. Las botellas fueron previamente esterilizadas con etanol al 70% v v⁻¹, dejándolas bajo luz UV durante 15 min. De igual forma, el medio también fue esterilizado dejándolo por 20 min bajo luz UV. La reactivación se llevó a cabo en la cámara de FF a 30°C a 20–30 klux. La medición del hidrógeno producido fue realizada mediante desplazamiento alcalino con una solución de NaOH 1 N en probetas invertidas. La fuente de luz fue una lámpara de alta presión de sodio (SILVANIA, USA) y la intensidad lumínica fue medida con un luxómetro digital (LX1010B).

7.6 Actividad 5. ACV de sistemas fermentación oscura-fotofermentación.

7.6.1. Propósito

Evaluar los impactos ambientales en el indicador de cambio climático de un proceso FO-FF y comparar con los procesos fermentativos individuales.

7.6.2. Diseño experimental

La evaluación se llevó a cabo siguiendo la metodología de ACV, basada en las normas ISO 14040 y 14044. La información se tomó de datos experimentales y de la base de datos Ecoinvent. El análisis de impacto se realizó la ayuda del software SimaPro 9.2 (PRé Consultants, 2006) siguiendo la metodología ReCiPe.

7.6.3. Objetivo y alcance

El objetivo de esta evaluación de impacto por la metodología de análisis de ciclo de vida fue contrastar los impactos ambientales de un proceso secuencial FO-FF para la producción de biohidrógeno, contra los procesos fermentativos individuales: FO y FF. En los tres escenarios se usó el BN como sustrato. El análisis se realizó de a partir de los datos experimentales obtenidos en las actividades anteriores.

7.6.4. Unidad funcional

La unidad funcional establecida fue: 1 kg H₂, ya que se quiere evaluar el impacto del proceso en base a la cantidad de hidrógeno producido debido a que es el producto de interés, además facilita su conversión a otras unidades.

7.6.5. Límites del sistema

Los límites del sistema fueron establecidos en un modelo “puerta a la puerta” a partir de los datos experimentales y de bibliografía. En la Figura 4 se muestran de manera gráfica los límites del sistema del proceso secuencial: Escenario FO-FF (escenario “base”), el cual incluye las etapas de proceso: trituración, pretratamiento AHP, fermentación oscura y fotofermentación. asimismo, incluye la fabricación de los suministros y energía necesarios en el proceso.

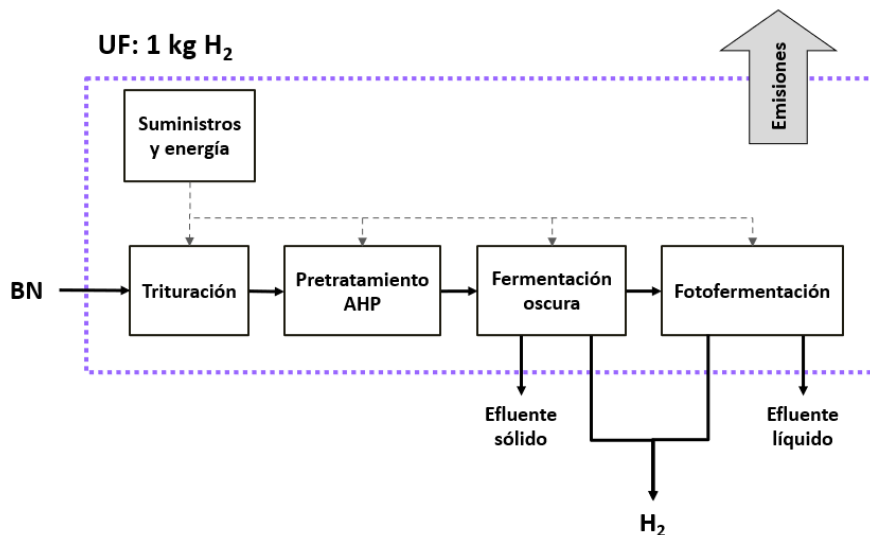


Figura 4. Límites del sistema del Escenario FO-FF.

- **Sustrato.** El BN fue el mejor sustrato y a partir del cual se profundizó más en la experimentación de las actividades anteriores, por lo tanto, fue el sustrato seleccionado para llevar a cabo la evaluación de impacto ambiental. Se considera que el BN entra húmedo al sistema después de que se extrae su jugo y el D-limoneno industrialmente. En este estudio no se consideraron los impactos asociados al transporte del sustrato.
- **Energía.** Se contabilizó la energía requerida en cada etapa del proceso a partir de datos experimentales y de bibliografía. La energía de los equipos de trituración y centrifugación se calculó a partir de la potencia proporcionada por las fichas técnicas de los fabricantes.
- **Suministros.** Los suministros secundarios que se contemplaron en el proceso fueron: agua desionizada (para solución de H₂O₂ del pretratamiento y la dilución del eFO para el proceso de FF), reactivos químicos (para el pretratamiento y medio de FF). No se incluyeron las emisiones del inóculo de FO ni del crecimiento de las cepas de BPNA de la FF.

7.6.5.1 Descripción del sistema

El proceso inicia con la trituración del BN por una licuadora industrial. Posteriormente, el BN triturado ingresa a la etapa de pretratamiento AHP, en la cual se usa una solución de 3% H₂O₂ v v⁻¹ con pH ajustado a 11.5, manteniendo una concentración 40 g SV L⁻¹. El pretratamiento se lleva a cabo durante 24 h a temperatura ambiente. A continuación, se aumenta la temperatura del pretratamiento a 50°C por 30 min para reducir el H₂O₂ remanente.

El BN pretratado entra a la etapa de FO en donde se usa inóculo previamente pretratado con choque térmico y se mantiene una RIS 0.6. La FO se lleva a cabo a 35°C y 7 días. Al finalizar, se recupera el efluente líquido por centrifugación (eFO).

El eFO recuperado se usó como fuente de carbono en el proceso de FF. La producción de hidrógeno por esta etapa se realizó a 30°C y se tomó en cuenta sólo la fase exponencial de producción por las BPNA de 3 días.

7.6.5.2 Escenarios de comparación

En la Figura 5 se muestran los diagramas de los límites del sistema de los escenarios de comparación que consideran los procesos individuales de producción de hidrógeno

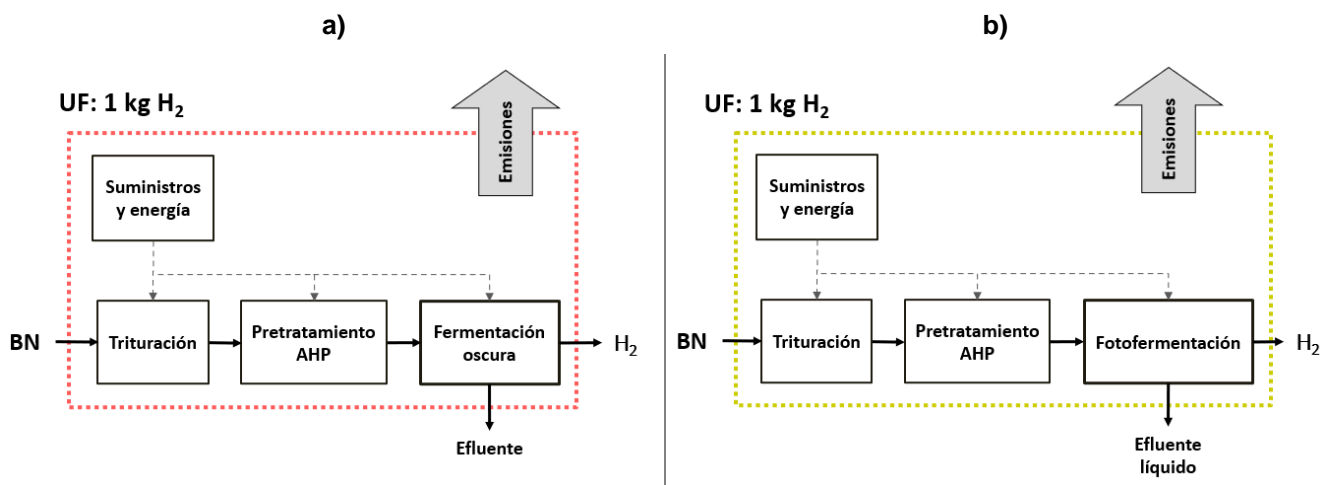


Figura 5. a) Límites del sistema del Escenario FO; b) Límites del sistema del Escenario FF.

7.6.7. Análisis de inventario

El inventario de suministros y energía se realizó en base a los balances de masa y energía del proceso, así como sus impactos asociados obtenidos de la base de datos Ecoinvent.

En el Escenario FO-FF, la cuantificación del inventario se realizó primero usando 1 kg de BN como flujo de referencia y de esta forma se cuantificó la cantidad de hidrógeno producido por cada uno de los procesos fermentativos, basados a su vez en los rendimientos experimentales obtenidos en este estudio. Esto se realizó con la finalidad de no errar en las proporciones de hidrógeno producido por FO y FF para cumplir con la unidad funcional. Una vez que se completó el inventario tomando en cuenta 1 kg BN a la entrada del proceso, se

dividió por la cantidad de hidrógeno total producido para obtener los datos del inventario del Escenario FO-FF correspondientes a la producción de 1 kg H₂.

Para los Escenarios FO y FF se realizaron sus respectivos inventarios partiendo desde las etapas fermentativas.

En el Escenario FF se consideró que el rendimiento de la FF fue el mismo que el del Escenario FO-FF, ya que por ahora no se realizó la experimentación como lo detalla diagrama de límites de este sistema: pretratamiento AHP → FF.

Tabla 20. Condiciones de operación de los escenarios fermentativos de producción de hidrógeno.

	Trituración	Pretratamiento AHP	FO	FF
Escenario FO-FF	P = 0.37 kWh t = 0.5 min kg ⁻¹ BN	H ₂ O ₂ 3% v v ⁻¹ pH 11.5 T = 25°C Concent. = 40 gSV L ⁻¹	RIS 0.6 T = 35°C t = 7 días AOV = 9.07 g L ⁻¹ Y _{H₂} = 68.94 mL g ⁻¹ SV	T = 30°C t = 3 días C/N ⁺ = 17 Concent.AOV = 0.35 Y _{H₂} = 486.83 mL g ⁻¹ AOV
Escenario FO	P = 0.37 kWh t = 0.5 min kg ⁻¹ BN	H ₂ O ₂ 3% v v ⁻¹ pH 11.5 T = 25°C Concent. = 40 gSV L ⁻¹	RIS 0.6 T = 35°C t = 7 días AOV = 9.07 g L ⁻¹ Y _{H₂} = 68.94 mL g ⁻¹ SV	NA
Escenario FF	P = 0.37 kWh t = 0.5 min kg ⁻¹ BN	H ₂ O ₂ 3% v v ⁻¹ pH 11.5 T = 25°C Concent. = 40 gSV L ⁻¹ AOV = 5.31 g L ⁻¹	NA	T = 30°C t = 3 días C/N ⁺ = 17 Concent.AOV = 0.35 Y _{H₂} = 486.83 mL g ⁻¹ AOV

7.6.8. Evaluación de impactos

Para la evaluación de impactos se siguió la metodología ReCiPe (H) de punto medio.

Se seleccionó el indicador de cambio climático, ya que es el indicador más comúnmente analizado en literatura para estos procesos fermentativos de producción de hidrógeno. El indicador de cambio climático tiene unidades de kg CO₂-eq y se estableció con el incremento de la temperatura superficial del planeta tierra a causa de los GEI (IPCC, 2013).

8. Resultados y discusión

8.1 Actividad 1. Caracterización de sustratos.

La Tabla 20 muestra los resultados del análisis fisicoquímico de los sustratos: BN, PS y RVF:RM. Se puede observar un pH ácido para todos los sustratos, además de un alto contenido de sólidos volátiles. Este último es relevante debido a que una mayor proporción de sólidos volátiles en el sustrato favorecerá una mayor producción de hidrógeno y AOV en el proceso de FO (Rodríguez Valderrama, 2018). Como se observa en la tabla de caracterización, el BN presenta el menor contenido de lignina y la mezcla RVF:RM el más alto, esto se debe a las propiedades intrínsecas de los sustratos. Valores similares se encontraron en literatura para estos sustratos, 4.18% y 13.88% para BN y RVF:RM, respectivamente (Cypriano *et al.*, 2018; Rodríguez Valderrama, 2018)

Tabla 21. Características químicas de los sustratos.

Parámetro	BN	PS	RM	RVF	RVF:RM
pH	4.32 ± 0.01	5.86 ± 0.01	5.68 ± 0.02	4.75 ± 0.02	4.99 ± 0.02
Humedad (%bh)	5.81 ± 0.17	7.38 ± 0.07	5.29 ± 0.07	13.60 ± 0.50	11.52 ± 0.39
Sólidos totales (%bh)	94.19 ± 0.17	92.62 ± 0.07	94.71 ± 0.07	86.40 ± 0.50	88.48 ± 0.39
Sólidos volátiles (%bs)	95.55 ± 0.13	88.75 ± 0.29	91.06 ± 0.22	89.30 ± 0.13	89.74 ± 0.15
Cenizas (%bs)	4.45 ± 0.13	11.25 ± 0.29	8.94 ± 0.22	10.70 ± 0.13	10.26 ± 0.15
Alcalinidad (g CaCO ₃ kg _{bs} ⁻¹)	13.27 ± 0.58	46.60 ± 1.20	38.53 ± 0.23	76.87 ± 0.60	67.28 ± 0.51
Ácidos orgánicos volátiles (g AOV kg _{bs} ⁻¹)	8.92 ± 0.59	22.16 ± 1.09	19.12 ± 0.39	42.80 ± 4.03	36.88 ± 3.12
Celulosa (%bs)	25.20 ± 1.58	28.98 ± 0.82	21.06 ± 0.14	14.32 ± 0.34	14.32 ± 0.34
Hemicelulosa (%bs)	20.63 ± 4.12	33.02 ± 0.60	49.51 ± 0.14	16.61 ± 2.15	16.61 ± 2.15
Lignina (%bs)	15.17 ± 0.88	20.80 ± 0.49	16.83 ± 0.81	26.75 ± 0.21	24.27 ± 0.36

8.2 Actividad 2. Pretratamiento peróxido de hidrógeno alcalino de los sustratos.

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos de los análisis de sólidos volátiles, lignina removida y holocelulosa.

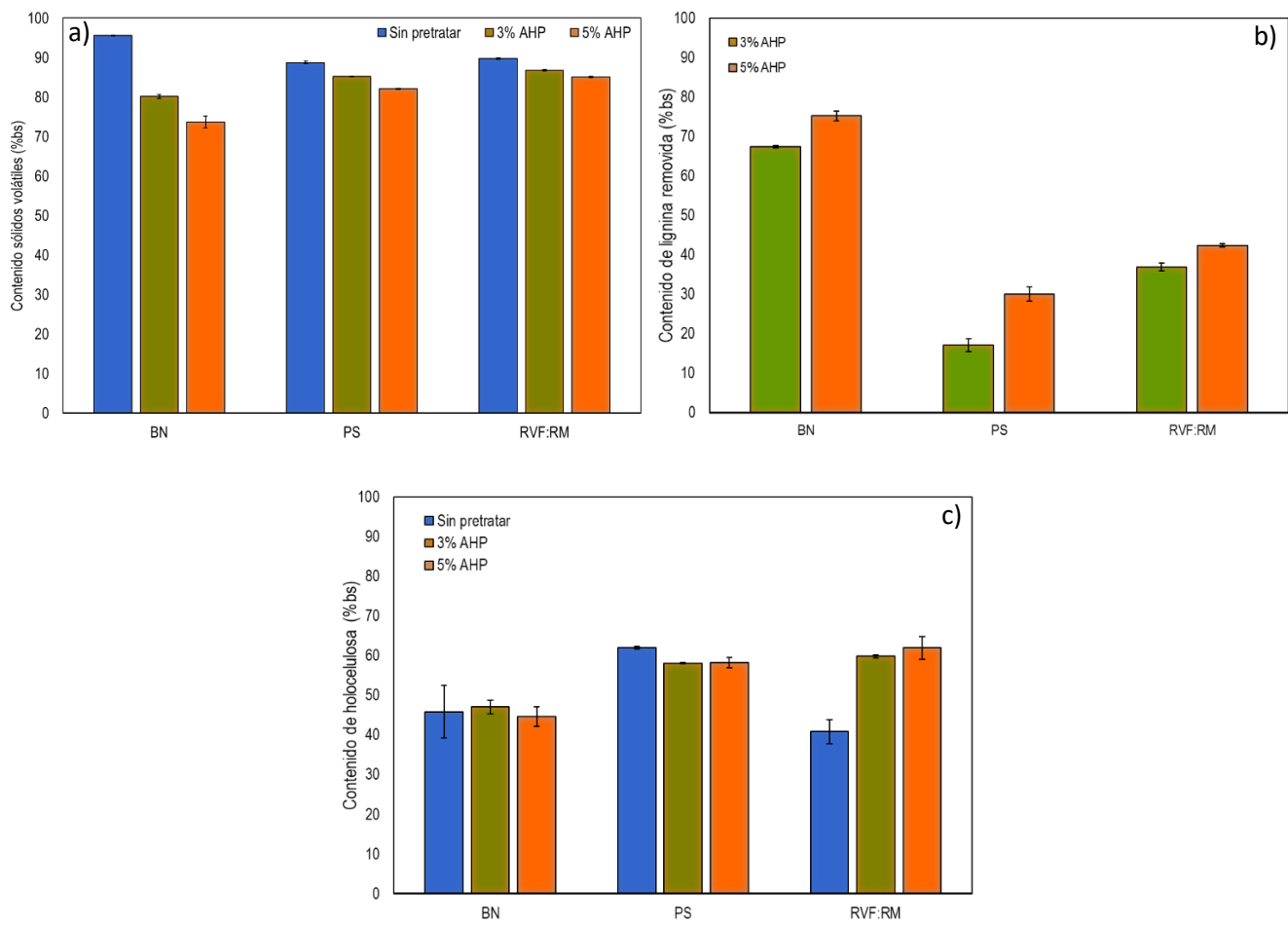


Figura 6. a) Sólidos volátiles antes y después de 24 h de pretratamiento. b) Lignina removida antes y después de 24 h de pretratamiento. c) Holocelulosa antes y después de 24 h de pretratamiento.

A partir de la Figura 6 b) se observa que todos los sustratos presentaron una delignificación después de haber sido pretratados, destacando BN con la mayor disminución en la proporción de lignina, de 67% y 75% en los experimentos pretratados con 3% ($w v^{-1}$) y 5% ($w v^{-1}$) de H_2O_2 , respectivamente. Debido a su estructura y alto contenido de pectina (15–40 %bs) este residuo es más vulnerable al ataque químico del pretratamiento en comparación con los otros sustratos que por su estructura son hidrofóbicos (Cypriano *et al.*, 2018)

En la Figura 6 c) se muestra que el contenido de holocelulosa de BN se mantuvo constante, lo cual quiere decir que en este sustrato se delignificó y se dejó expuesta la holocelulosa. En el caso del PS presentó una pequeña disminución en la proporción de

holocelulosa, lo cual indica que además de la delignificación también hubo un pequeño porcentaje de degradación de la holocelulosa, el cual se podría ver reflejado en un aumento de azúcares. Por último, en el caso del RVF:RM se obtuvo un aumento en la proporción de holocelulosa que podría deberse a que hay una delignificación y además una disminución en su contenido de azúcares, lo cual en términos de proporción se refleja un aumento.

En la Figura 7 se muestran el contenido de azúcares totales y el contenido de compuestos fenólicos totales durante el pretratamiento.

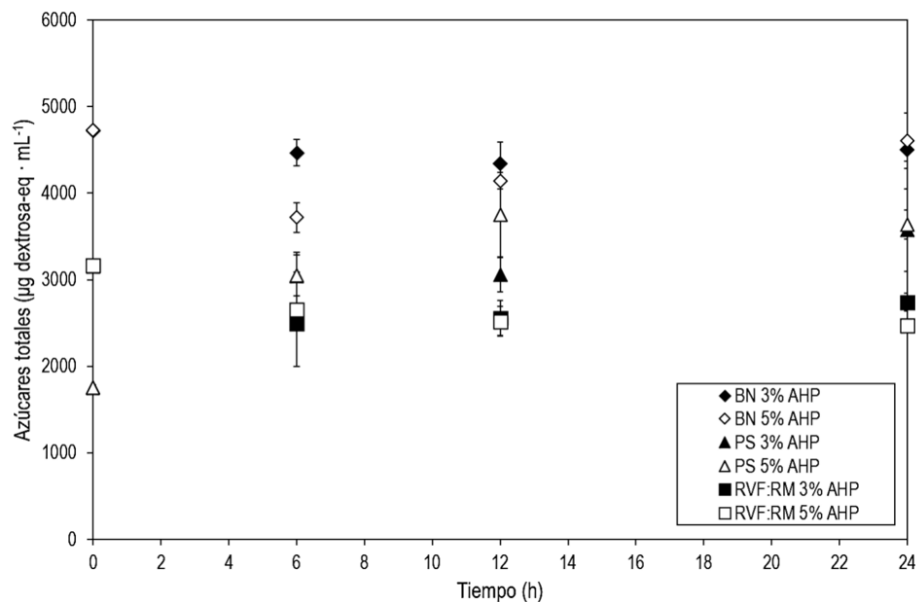


Figura 7. Contenido de azúcares totales durante el pretratamiento.

Precisamente, en la Figura 7 se corrobora lo que se obtuvo en los análisis de holocelulosa, en donde el contenido de azúcares totales de PS aumenta, el de RVF:RM disminuye y el de BN de queda similar al inicial.

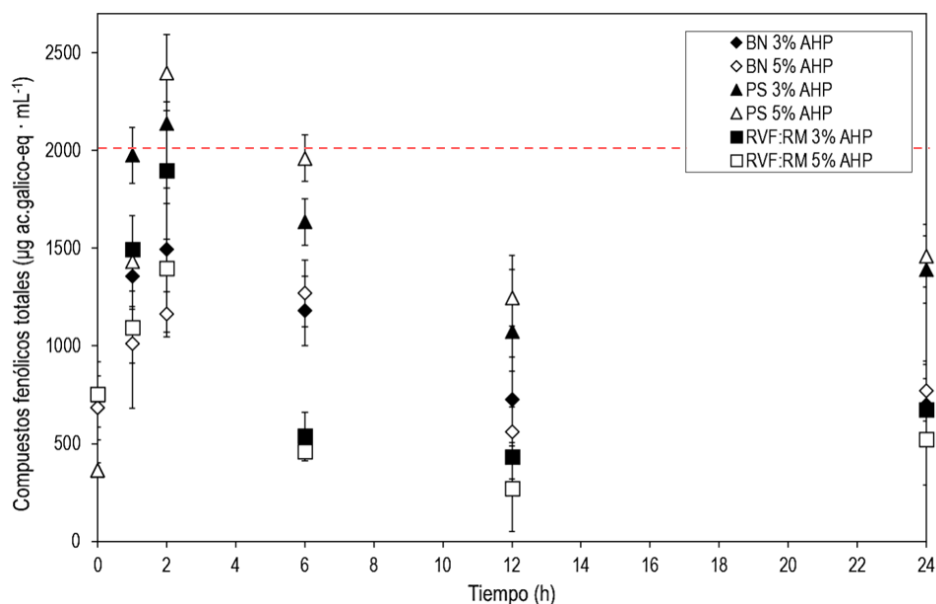


Figura 8. Contenido de compuestos fenólicos totales durante el pretratamiento.

En cuanto a la Figura 8 se muestra que la concentración de CFT de BN y RVF:RM al final queda aproximadamente igual que al inicio y en la PS sí resultó un aumento. Sin embargo, aun así, las concentraciones de CFT de todos los sustratos al final del pretratamiento (24 h) quedan por debajo del límite de inhibición reportado en literatura, que es de 2 g L⁻¹.

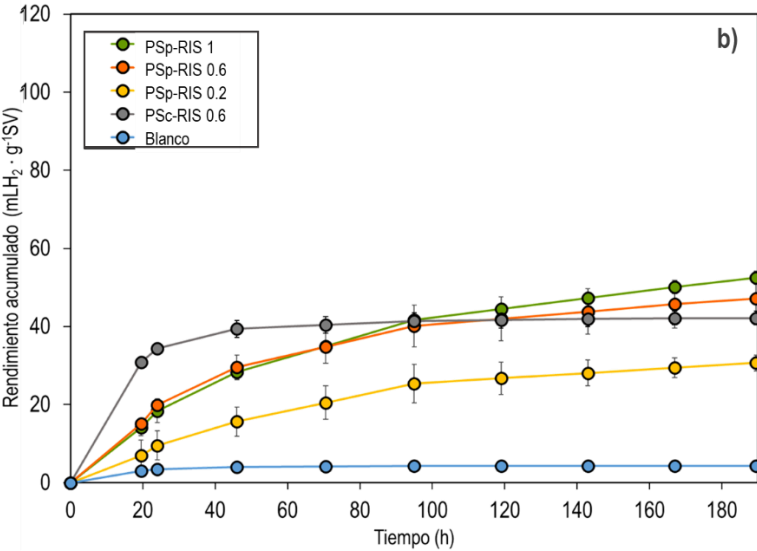
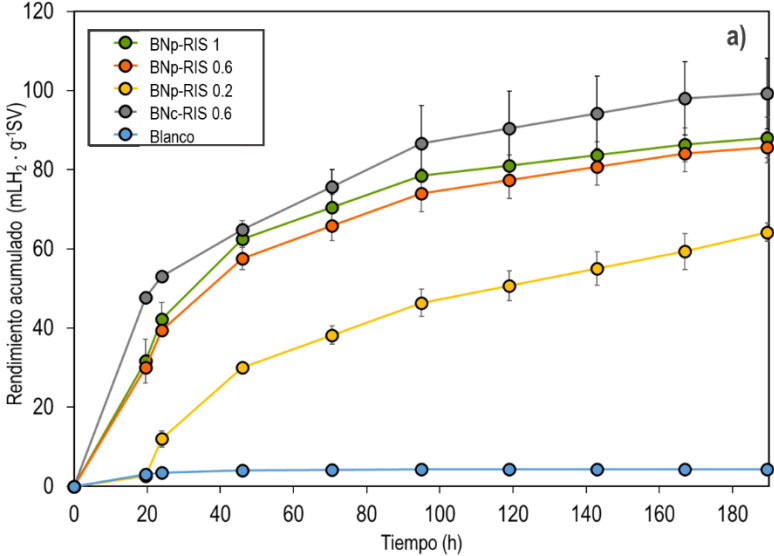
En la Tabla A1 de la sección de Anexos se muestra la caracterización de la etapa de pretratamiento de forma numérica.

Al no observar una diferencia significativa en los resultados de la cinética de pretratamiento en términos de AT y CFT, se optó por utilizar una concentración de 3% (w v⁻¹) de H₂O₂ por un tiempo de 24 h, con el propósito de usar menos H₂O₂ y con ello disminuir los impactos ambientales asociados al proceso.

8.3. Actividad 3. Evaluación del potencial de biohidrógeno.

De acuerdo con los resultados de mostrados en la Figura 9, el BN fue el sustrato que generó los mejores rendimientos acumulados de H₂. El experimento control (BNc–RIS 0.6) presentó el rendimiento más alto (99.22 mL H₂ g⁻¹SV), seguido de los experimentos BNp–RIS 1 (88.10 mL H₂ g⁻¹SV) y BNp–RIS 0.6 (85.58 mL H₂ g⁻¹SV). Este resultado puede atribuirse al alto contenido de sólidos volátiles del BN sin pretratar (95.55 %bs), así como a su alta concentración de AT

(4.72 g dextrosa-eq L⁻¹) en comparación con el resto de los sustratos y efluentes de pretratamiento. Para los experimentos con pretratamiento, los altos rendimientos se pueden asociar al alto porcentaje de delignificación (67.38%). Entre los experimentos BNp-RIS 1 y BNp-RIS 0.6, existe una diferencia en sus rendimientos de H₂ de 2.86%, la cual es menor a la desviación estándar de ambos, concluyendo así que no existe una diferencia significativa entre ellos. Por lo tanto, se seleccionó a los experimentos de BN con una RIS de 0.6, pretratado y sin pretratar (BNp-RIS 0.6 y BNC-RIS 0.6) como los procesos precursores a evaluar para la FF.



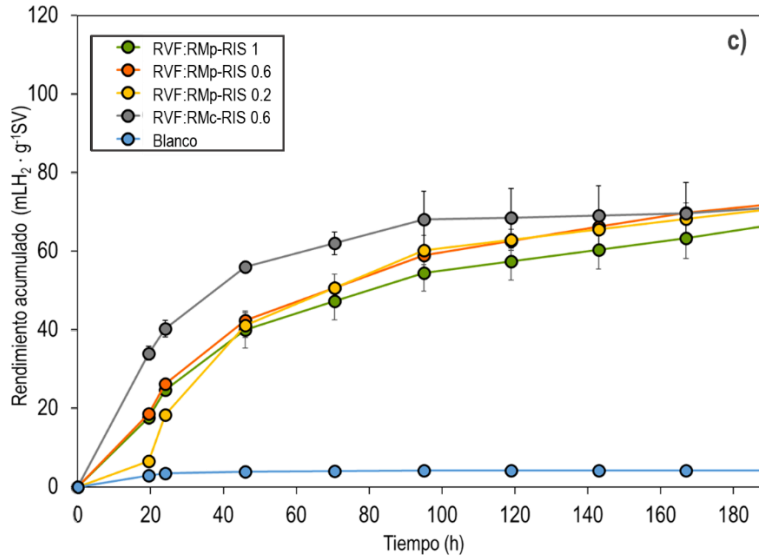


Figura 9. Rendimiento acumulado de H₂ de a) BN; b) PS; y c) RVF:RM. Sin ajuste de pH₀.

Con el objetivo de establecer el mejor esquema para la generación de H₂ y AOV a partir del sustrato y efluente de pretratamiento seleccionados, se llevó a cabo la FO de ambos utilizando la mezcla completa, la fracción sólida y la fracción líquida por separado. Los resultados se muestran en la Figura 10.

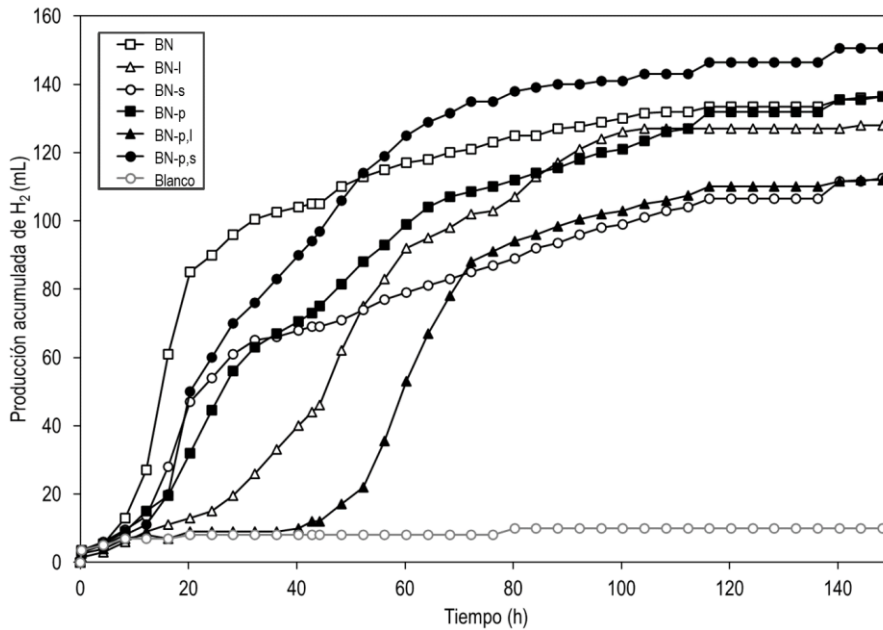


Figura 10. Producción acumulada de H₂ a partir de BN. Con ajuste de pH₀ 7.

Se observa que el experimento BN-p,s presentó la mayor producción acumulada de H₂ (150.50 mL). En la Tabla 22 se presentan las caracterizaciones para los efluentes de la FO, en donde se puede apreciar que el proceso con efluente completo de pretratamiento (BN-p) produjo la mayor cantidad de AOV (9.90 g AOV L⁻¹), seguido de BN, correspondiente a la mezcla completa sin pretratamiento (9.00 g AOV L⁻¹). Este resultado es importante debido a que una alta concentración de AOV nos permitirá favorecer la producción de H₂ en el proceso de FF. Además, estos experimentos presentan la segunda mayor producción acumulada de H₂ (136.50 mL), 9.30% menor a la producción de BN-p,s. Si bien, el experimento BN-p,s obtuvo la mayor producción acumulada de H₂, generó 24.10% menos AOV en comparación BN-p, por lo tanto, no es un efluente viable para el proceso de FF. Una ventaja por resaltar para BN-p es que se omite la etapa de centrifugación, con lo que disminuye el gasto energético del proceso. Por lo tanto, el mejor esquema de FO es BN-p.

Tabla 22. Caracterización fisicoquímica de los efluentes de FO.

Parámetro	BN-p,s	BN-p,l	BN-p	BN-s	BN-l	BN	Blanco
Humedad (%bh)	93.46 ± 0.13	97.5 ± 0.07	94.87 ± 0.18	93.62 ± 0.48	98.86 ± 0.08	95.70 ± 0.16	97.52 ± 0.40
Sólidos totales (%bh)	6.54 ± 0.13	2.50 ± 0.07	5.13 ± 0.18	6.38 ± 0.48	1.14 ± 0.08	4.30 ± 0.16	2.48 ± 0.40
Sólidos volátiles (%bs)	68.31 ± 1.18	48.01 ± 1.83	57.81 ± 1.25	77.92 ± 1.37	77.55 ± 1.27	69.19 ± 0.51	51.29 ± 0.61
Cenizas (%bs)	31.69 ± 1.18	51.99 ± 1.83	42.19 ± 1.25	22.08 ± 1.37	22.45 ± 1.27	30.81 ± 0.51	48.71 ± 0.61
AT (g dextrosa-eq L ⁻¹)	0.86 ± 0.14	1.23 ± 0.21	1.07 ± 0.98	1.61 ± 0.17	0.67 ± 0.04	0.91 ± 0.11	0.19 ± 0.03
pH final	6.64 ± 0.09	7.81 ± 0.18	7.18 ± 0.08	4.91 ± 0.03	4.36 ± 0.07	5.04 ± 0.01	7.41 ± 0.15
Alcalinidad efluen. (gCaCO ₃ L ⁻¹)	5.68 ± 0.01	4.59 ± 0.04	7.10 ± 0.14	4.12 ± 0.0	1.10 ± 0.13	4.24 ± 0.02	2.72 ± 0.11
AOV en efluentes (g L ⁻¹)	7.51 ± 0.66	5.72 ± 0.11	9.90 ± 0.25	7.84 ± 0.87	3.35 ± 0.34	9.00 ± 0.0	2.81 ± 0.13
NTK en efluentes (g L ⁻¹)	1.96	2.66	1.82	1.96	2.10	2.03	NP
N-NH ₄ ⁺ en efluentes (g L ⁻¹)	0.122 ± 0.002	0.131 ± 0.002	0.114 ± 0.003	0.117 ± 0.002	0.122 ± 0.002	0.122 ± 0.002	NP
TON en efluentes (g L ⁻¹)	1.84	2.53	1.71	1.84	1.98	1.91	NP
TOC en efluentes (g L ⁻¹)	5.71 ± 0.24	5.61 ± 0.03	5.78 ± 0.11	6.00 ± 0.18	3.82 ± 0.02	5.35 ± 0.20	1.07 ± 0.41

8.4 Actividad 4. Fotofermentación de efluentes de fermentación oscura.

Se llevaron a cabo ensayos para determinar la factibilidad del uso de los eFO de BN-p como sustrato para la producción de hidrógeno por FF. En la Tabla 23 se muestra la caracterización de los eFO usados en este experimento.

Tabla 23. Caracterización de eFO de BN-p

Parámetro	BN-p (stockAOV)
Humedad (%bh)	95.31 ± 0.08
Sólidos totales (%bh)	4.69 ± 0.08
Sólidos volátiles (%bs)	64.46 ± 0.33
Cenizas (%bs)	35.54 ± 0.33
AT efluentes (g dextrosa-eq L ⁻¹)	1.37 ± 0.12
pH final efluentes	5.32 ± 0.01
Alcalinidad efluentes (g CaCO ₃ L ⁻¹)	7.72 ± 0.25
AOV efluentes (g AOV L ⁻¹)	9.07 ± 0.16
NTK en efluentes (g L ⁻¹)	4.27
N-NH ₄ ⁺ en efluentes (g L ⁻¹)	0.16 ± 0.01
TOC en efluentes (g L ⁻¹)	6.71 ± 0.16
C/N molar	1.83
C/N+ molar	49.02
% N-NH ₄ ⁺ en NTK	3.74
% TON en NTK	96.26

En la Tabla 24 se muestran las condiciones de cada uno de los experimentos con su correspondiente producción máxima acumulada de hidrógeno. Los experimentos E1, E2 y E3 fueron los que obtuvieron una producción significativa y tienen en común el factor de dilución de AOV de 35%, esto puede deberse a que a una menor concentración de AOV provenientes de un eFO, el medio de FF tiene menor coloración y esto a su vez permite un mayor paso de la luz al medio y, por consiguiente, una mejor exposición a las BPNA.

Tabla 24. Producción acumulada de H₂ por FF.

Experimento	AOV (% v v ⁻¹)	C/N ⁺	Producción acumulada (mL H ₂)
E1	35	17	170
E2	35	26	108
E3	35	35	59
E4	50	17	9
E5	50	26	9
E6	50	35	6
E7	65	17	15
E8	65	26	8
E9	65	35	5

Así como a una menor concentración de AOV hay mayor producción, también a una menor relación C/N⁺. Esto se debe a que esta relación juega un papel imprescindible en el medio reactivo, ya que influye en la estabilidad el proceso, en la tasa de conversión del sustrato y en el rendimiento de hidrógeno. Por lo tanto, tener un equilibrio en este factor es de suma importancia. El rango reportado como óptimo en literatura de 13 – 35 (Li et al, 2019). Cuando hay una mayor C/N⁺ se tiene una mayor concentración de carbono y esto podría afectar la síntesis de sustancias intracelulares de BPNA. En cambio, a una menor C/N⁺ se favorece el crecimiento de las BPNA, sin embargo, también puede traer efectos negativos, como la inhibición de la producción de hidrógeno al tener más nitrógeno en el medio, el metabolismo se decanta a la producción de NH₃ por la nitrogenasa, por lo que esta concentración debe estar limitada para que esta enzima favorezca la producción de hidrógeno.

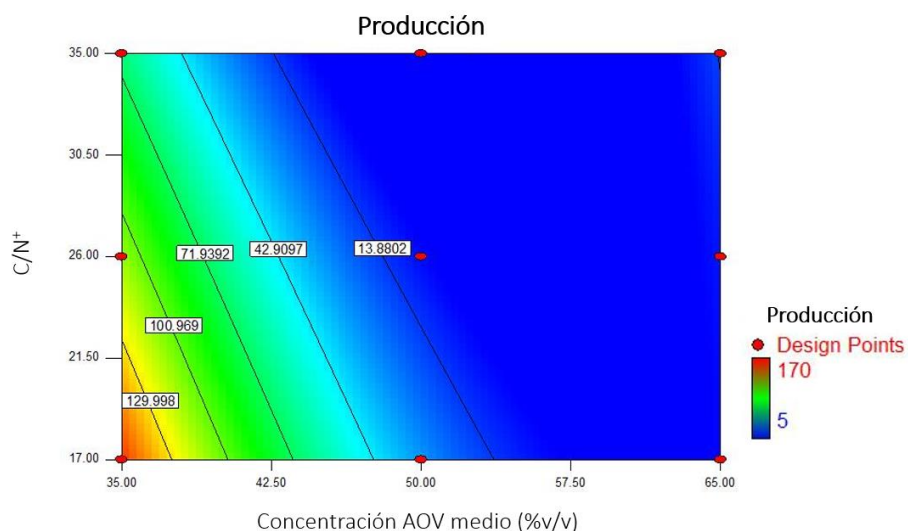


Figura 11. Superficie de respuestas de la producción acumulada de H₂ por FF.

8.5 Actividad 5. ACV de sistemas fermentación oscura-fotofermentación.

El inventario de los tres escenarios se encuentra en el apartado de Anexos (Tabla A2 – A4).

Los resultados de la evaluación de impacto ambiental en el indicador de cambio climático de la Figura 13 muestran que el Escenario FO presenta menores impactos, siendo 44.6% menores que el Escenario FO-FF (657.9 kg CO₂-eq). Esto puede deberse a que en el Escenario FO solo se contempla la generación de hidrógeno por FO y este proceso fermentativo se realizó sin uso de medio mineral, por lo que fue una FO de menor impacto.

Por el contrario, el Escenario FF generó 146.8% más impactos que el Escenario FO-FF, siendo en su mayor parte por el proceso de FF. El 90% de los impactos de la FF son debido a la energía consumida por la lámpara. Estos impactos podrían disminuirse al implementar energía solar directamente en el proceso o el uso de fuentes renovables para la generación de la electricidad requerida por el proceso.

La segunda etapa con mayores impactos es la del pretratamiento AHP. En esta, el 47% del impacto generado se debe al uso del H₂O₂ por su proceso de producción convencional, que, a pesar de emplear una solución con un porcentaje bajo de este reactivo, tiene un impacto significativo. Por esto, el uso de un H₂O₂ proveniente de un proceso menos contaminante como la electrolisis de celdas microbianas (Foley et al., 2010) ayudaría a disminuir los impactos por esta etapa.

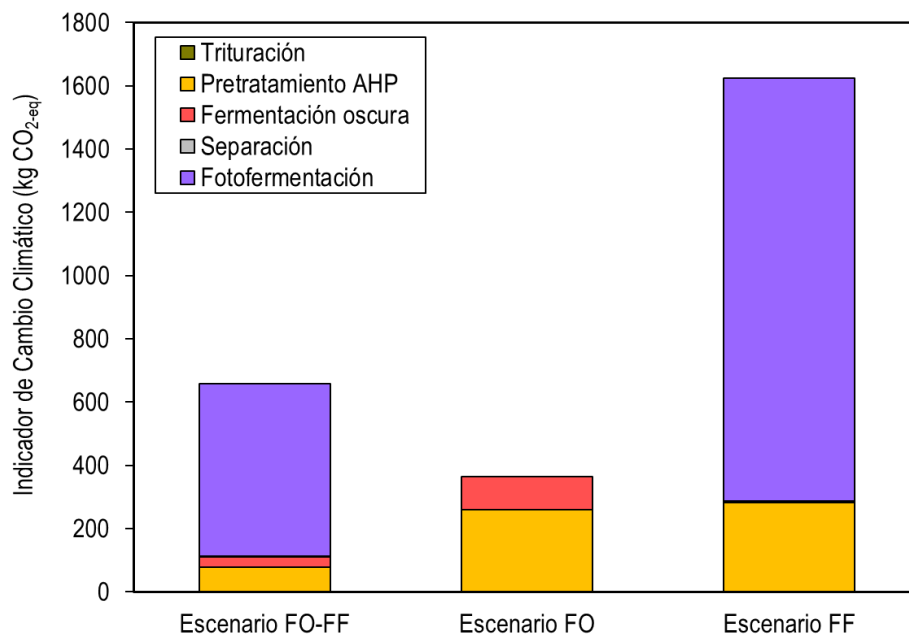


Figura 13. BCuantificación impactos en indicador de cambio climático.

La cantidad de BN requerido por cada uno de los escenarios para la producción de 1 kg H₂ fue de 247.8 kg (Escenario FO-FF), 816.3 kg (Escenario FO) y 885.8 kg (Escenario FF). Por lo que, a partir del inventario podemos asumir que el Escenario FO-FF es el que requiere menor cantidad de sustrato para producir la misma cantidad de hidrógeno que el resto de los escenarios. A pesar de que el Escenario FO tiene 44.6% menos impactos en el indicador de cambio climático que el Escenario FO-FF, requiere 3.3 veces más BN para producir 1 kg H₂, haciéndolo más eficiente en la conversión energética del sustrato.

En trabajo a futuro, se considera ampliar este estudio considerando, entre otras cosas, una etapa de transporte de BN, por lo que, al requerir más sustrato, se tendrían mayores impactos por transportar más carga. Tomando en cuenta los aspectos operativos y ambientales, el Escenario FO-FF es la mejor propuesta para la producción de biohidrógeno a partir de BN.

9. Conclusiones

En este trabajo se desarrolló un proceso fotofermentativo para la producción de hidrógeno a partir de efluentes reales de fermentación oscura de residuos orgánicos.

En el proceso de pretratamiento la mayor delignificación se observó en el BN, debido a la estructura molecular del sustrato, haciéndolo un sustrato vulnerable al ataque químico del pretratamiento. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre usar un pretratamiento a una concentración de 3% w v⁻¹ o de 5% w v⁻¹ en términos de la concentración de AT. Por lo tanto, el proceso de pretratamiento a una concentración de 3% w v⁻¹ es el mejor después de un periodo de 24 h.

A partir de los resultados obtenidos para el potencial de biohidrógeno de los sustratos evaluados por FO, el experimento realizado con BN sin pretratar (BNc-RIS 0.6) presentó el rendimiento de hidrógeno más alto (99.22 mL H₂ g⁻¹ SV), seguido de los experimentos BNp-RIS 1 (88.10 mL H₂ g⁻¹ SV) y BNp-RIS 0.6 (85.58 mL H₂ g⁻¹ SV). El mejor resultado puede adjudicarse al alto contenido de sólidos volátiles del BN sin pretratar (95.55 %bs), así como a su alta concentración de AT (4.72 g dextrosa-eq L⁻¹) en contraste con el resto de los sustratos y efluentes de pretratamiento. En el caso de los experimentos en los que el BN pasó por un pretratamiento AHP, los altos rendimientos se pueden asociar al alto porcentaje de

delignificación (67.38%). El proceso BN-p es el mejor esquema para el aprovechamiento de BN como sustrato en un proceso de FO debido a su alta producción de AOV e hidrógeno.

En FF, el mejor esquema de producción de hidrógeno (170 mL) es operando a niveles bajos de concentración de AOV (35% v v⁻¹) y C/N⁺ (17), ya que a una menor concentración de AOV la coloración del medio es menor permitiendo una mayor exposición del medio a la luz y a una baja C/N⁺ favorece el crecimiento de las BPNA.

En cuanto a la evaluación e impacto ambiental, el Escenario FF presentó 146.8% de impacto mayor que el Escenario FO-FF debido al alto consumo energético requerido por la lámpara en FF.

A pesar de obtener 44.6% más en el indicador de cambio climático, el Escenario FO-FF requiere de 3.3 veces menos sustrato que el Escenario FO.

Tomando en cuenta los aspectos operativos y ambientales, el Escenario FO-FF es la mejor propuesta para la producción de H₂ a partir de BN.

Referencias bibliográficas

Abd-Alla, M. H. *et al.* (2019) 'Enhancement of biohydrogen production from sustainable orange peel wastes using *Enterobacter* species isolated from domestic wastewater', *International Journal of Energy Research*, 43(1), pp. 391–404. doi: 10.1002/er.4273.

Al-Mohammedawi, H. H., Znad, H. and Eroglu, E. (2018) 'Synergistic effects and optimization of photo- fermentative hydrogen production of *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158', *Internatinal Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.ijhydene.2018.06.140.

Al-Mohammedawi, H. H., Znad, H. and Eroglu, E. (2019) 'Improvement of photofermentative biohydrogen production using pre-treated brewery wastewater with banana peels waste', *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 44, pp. 2560–2568. doi: 10.1016/j.ijhydene.2018.11.223.

Anderson, G. K. and Yang, G. (1992) 'Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration', *Water Environment Research*, 64, pp. 53–59.

AOAC (1992) *AOAC Official Methods of Analysis*. 15th edn, Association of Official Agricultural Chemists. 15th edn. Washington, D. C.

APHA/AWWA/WEF (2005) 'Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater'. American Public Health Association.

Argun, H., Gokfiliz, P. and Karapinar, I. (2017) 'Biohydrogen production potential of different biomass sources', *Biohydrogen production: sustainability of current technology and future perspective*, pp. 11–48. doi: https://doi.org/10.1007/978-81-322-3577-4_2.

Argun, H. and Kargi, F. (2011) 'Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview', *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 36, pp. 7443–7459. doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.03.116.

Basak, B. *et al.* (2020) 'Dark fermentative hydrogen production from pretreated lignocellulosic biomass: Effects of inhibitory byproducts and recent trends in mitigation strategies', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd, 133(September), p. 110338. doi: 10.1016/j.rser.2020.110338.

Bundhoo, M. A. Z., Mohee, R. and Hassan, M. A. (2015) 'Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review', *Journal of Environmental Management*. Elsevier Ltd, 157, pp. 20–48. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.04.006.

Cabrera, E. *et al.* (2014) 'Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 167, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.biortech.2014.05.103.

Cao, W. *et al.* (2016) 'Pretreatment of sweet sorghum bagasse by alkaline hydrogen peroxide for enhancing ethanol production', *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34(12), pp. 1249–1257. doi: 10.1007/s11814-015-0217-5.

Curran, M. A. (2016) 'Life-Cycle Assessment', in *Encyclopedia of Ecology*, pp. 359–366. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09700-1.

Cypriano, D. Z., da Silva, L. L. and Tasic, L. (2018) 'High value-added products from the orange juice industry waste', *Waste Management*. Elsevier Ltd, 79, pp. 71–78. doi: 10.1016/j.wasman.2018.07.028.

- Das, S. R. and Basak, N. (2021) 'Molecular biohydrogen production by dark and photo fermentation from wastes containing starch: recent advancement and future perspective', *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 44(1). doi: 10.1007/s00449-020-02422-5.
- Dávila-Hernández, G. *et al.* (2019) 'Effect of microwave pretreatment on bioactive compounds extraction from xoconostle (*Opuntia joconostle*) by-products', *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18, pp. 191–204.
- Djomo, N. S. and Blumberga, D. (2011) 'Comparative life cycle assessment of three biohydrogen pathways', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 102, pp. 2684–2694. doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.139.
- Dubois, M. *et al.* (1951) 'A colorimetric method for the determination of sugars', *Nature*, (4265), p. 167. Available at: <https://www.nature.com/articles/168167a0>.
- EPA-821-R-01-004 (2001) 'Method 1690 Ammonia-N in Water & Biosolids by Automated Colorimetry with Preliminary Distillation'. Environmental Protection.
- Eroğlu, E. *et al.* (2004) 'Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source', *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), pp. 163–171. doi: 10.1016/S0360-3199(03)00110-1.
- Eroglu, I. *et al.* (1999) 'Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor', *Journal of Biotechnology*, 70, pp. 103–113. doi: [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80104-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80104-0).
- Escamilla-Alvarado, C. *et al.* (2012) 'Gas biofuels from solid substrate hydrogenogenic-methanogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 47(11), pp. 1572–1587. doi: 10.1016/j.procbio.2011.12.006.
- Eskicioglu, C. *et al.* (2017) 'Assessment of hydrothermal pretreatment of various lignocellulosic biomass with CO₂ catalyst for enhanced methane and hydrogen production', *Water Research*, 120, pp. 32–42. doi: 10.1016/j.watres.2017.04.068.
- Ghimire, A. *et al.* (2015) 'Biohydrogen production from food waste by coupling semi-continuous dark-photofermentation and residue post-treatment to anaerobic digestion: A synergy for

energy recovery', *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(46), pp. 16045–16055. doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.09.117.

González-Fernández, C., Molinuevo-Salces, B. and García-González, M. C. (2011) 'Evaluation of anaerobic codigestion of microalgal biomass and swine manure via response surface methodology', *Applied Energy*, 88, pp. 3448–3453. doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.035.

González-Sánchez, M. E. *et al.* (2015) 'Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia', *Rev Argent Microbiol.*, 47(3), pp. 229–235. doi: 10.1016/j.ram.2015.05.003.

Hay, J. X. W. *et al.* (2013) 'Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen usage', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 7(3), pp. 246–256. doi: 10.1002/bbb.

He, D. *et al.* (2006) 'Kinetic analysis of photosynthetic growth & photohydrogen production of two strains of *Rhodobacter Capsulatus*', 38, pp. 253–259.

Ho, M. C., Ong, V. Z. and Wu, T. Y. (2019) 'Potential use of alkaline hydrogen peroxide in lignocellulosic biomass pretreatment and valorization – A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd, 112, pp. 75–86. doi: 10.1016/j.rser.2019.04.082.

Hu, F. and Ragauskas, A. (2012) 'Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry', *Bioenergy Research*, 5(4), pp. 1043–1066. doi: 10.1007/s12155-012-9208-0.

Huijbregts, M. A. J. *et al.* (2016) 'ReCiPe2016: a harmonised life cycle impact assessment method at midpoint and endpoint level', *International Journal of Life Cycle Assessment*. The International Journal of Life Cycle Assessment, 22(2017), pp. 138–147. doi: 10.1007/s11367-016-1246-y.

IEA (2020) *Total energy supply by source - World*.

Jiang, D. *et al.* (2021) 'Insights into correlation between hydrogen yield improvement and glycerol addition in photo-fermentation of *Arundo donax* L. ', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 321, pp. 1–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124467>.

Jiménez-Castro, M. P. *et al.* (2020) 'Bioenergy production from orange industrial waste: a case

- study', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(6), pp. 1239–1253. doi: 10.1002/bbb.2128.
- Karimi, K. and Taherzadeh, M. J. (2016) 'A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 200, pp. 1008–1018. doi: 10.1016/j.biortech.2015.11.022.
- Koku, H. *et al.* (2002) 'Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*', *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, pp. 1315–1329. doi: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00127-1).
- Lee, D. J. *et al.* (2017) 'Photo-fermentative hydrogen production from crop residue: A mini review', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 229, pp. 222–230. doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.008.
- Li, Y. *et al.* (2020) 'Enhancement of bio-hydrogen yield and pH stability in photo fermentation process using dark fermentation effluent as succedaneum', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 297, p. 122504. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122504.
- Liu, B.-F. *et al.* (2010) 'Enhanced bio-hydrogen production by the combination of dark- and photo-fermentation in batch culture', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 101, pp. 5325–5329. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.024.
- Magalhães, A. I. *et al.* (2019) 'Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(6), pp. 1505–1519. doi: 10.1002/bbb.2048.
- Michalska, K. and Ledakowicz, S. (2014) 'Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of energy crops for biogas production', *Chemical Papers*, 68(7), pp. 913–922. doi: 10.2478/s11696-013-0531-5.
- Miller, G. L. (1959) 'Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar', *Analytical Chemistry*, 31, pp. 426–428.
- Mishra, P. *et al.* (2016) 'Enhanced hydrogen production from palm oil mill effluent using two stage sequential dark and photo fermentation', *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 41(41), pp. 18431–18440. doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.07.138.

- Mishra, P. *et al.* (2018) 'Photohydrogen production from dark-fermented palm oil mill effluent (DPOME) and statistical optimization: Renewable substrate for hydrogen', *Journal of Cleaner Production*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.028.
- Mishra, P. *et al.* (2019) 'Outlook of fermentative hydrogen production techniques: An overview of dark, photo and integrated dark-photo fermentative approach to biomass', *Energy Strategy Reviews*. Elsevier, 24, pp. 27–37. doi: 10.1016/j.esr.2019.01.001.
- Mittal, A. *et al.* (2017) 'Alkaline peroxide delignification of corn stover', *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5, pp. 6310–6321. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b01424.
- Morone, A., Chakrabarti, T. and Pandey, R. A. (2017) 'Assessment of alkaline peroxide-assisted wet air oxidation pretreatment for rice straw and its effect on enzymatic hydrolysis', *Cellulose*. Springer Netherlands, 24(11), pp. 4885–4898. doi: 10.1007/s10570-017-1451-2.
- Muthu, S. S. (2020) 'Estimating the overall environmental impact of textile processing: life cycle assessment of textile products', in Muthu, S. S. (ed.) *Assessing the Environmental Impact of Textiles and the Clothing Supply Chain*. 2nd edn. Woodhead Publishing, pp. 105–129. doi: 10.1016/B978-0-12-819783-7.00006-5.
- Niño-Navarro, C. *et al.* (2020) 'Enhanced hydrogen production by a sequential dark and photo fermentation process: Effects of initial feedstock composition, dilution and microbial population', *Renewable Energy*, 147, pp. 924–936. doi: 10.1016/j.renene.2019.09.024.
- NMX-AA-25-1984 (1992) 'Norma Mexicana NMX-AA-25-1984. Protección al ambiente-Contaminación del suelo-residuos sólidos-determinación del pH-Método potenciométrico.', pp. 4–5.
- Ochs, D., Wukovits, W. and Ahrer, W. (2010) 'Life cycle inventory analysis of biological hydrogen production by thermophilic and photo fermentation of potato steam peels (PSP)', *Journal of Cleaner Production*. Elsevier Ltd, 18, pp. S88–S94. doi: 10.1016/j.jclepro.2010.05.018.
- Oh, Y.-K. *et al.* (2011) 'Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 102(18), pp. 8357–8367. doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.054.

- Pandey, Anjana, Sinha, P. and Pandey, Ashutosh (2021) 'Hydrogen production by sequential dark and photofermentation using wet biomass hydrolysate of *Spirulina platensis* : Response surface methodological approach', *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 46, pp. 7137–7146. doi: 10.1016/j.ijhydene.2020.11.205.
- Rai, P. K. and Singh, S. P. (2016) 'Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement', *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 41(44), pp. 19957–19971. doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.08.084.
- Riegelhaupt, E., Odedenthal, J. and Janeiro, L. (2016) *Diagnóstico de la situación actual del biodiésel en México y escenarios para su aprovechamiento*, Red Mexicana de Bioenergía.
- Rodríguez-Valderrama, S., Escamilla-Alvarado, C., Magnin, J. P., et al. (2020) 'Batch biohydrogen production from dilute acid hydrolyzates of fruits-and-vegetables wastes and corn stover as co-substrates', *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 140, p. 105666. doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105666.
- Rodríguez-Valderrama, S., Escamilla-Alvarado, C., Rivas-García, P., et al. (2020) 'Biorefinery concept comprising acid hydrolysis, dark fermentation, and anaerobic digestion for co-processing of fruit and vegetable wastes and corn stover', *Environmental Science and Pollution Research*. Environmental Science and Pollution Research, 27, pp. 28585–28596. doi: 10.1007/s11356-020-08580-z.
- Rodríguez Valderrama, S. (2018) *Enfoque de biorrefinería para la producción de hidrógeno y metano a partir de residuos orgánicos*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ruiz, B. et al. (2016) 'Assessment of different pre-treatment methods for the removal of limonene in citrus waste and their effect on methane potential and methane production rate', *Waste Management and Research*, 34(12), pp. 1249–1257. doi: 10.1177/0734242X16661053.
- SAGARPA (2015) 'Plan de manejo de residuos generados en actividades agrícolas primera etapa: Diagnóstico Nacional', p. 145. Available at: http://www.sagarpa.gob.mx/ProgramasSAGARPA/2015/Productividad_y_competitividad_agroalimentaria/Programa_regional_de_desarrollo_previsto_en_el_PND/36_incentivos/211PP064_NUEVA_AMERICA_S.P.R._DE_R.L/5.PROYECTO/Manejo_de_residuos_Detallado.pdf.

Seifert, K. *et al.* (2018) 'Biohydrogen production from chewing gum manufacturing residue in a two-step process of dark fermentation and photofermentation', *Renewable Energy*, 122, pp. 526–532. doi: 10.1016/j.renene.2018.01.105.

Selig, M. J. *et al.* (2009) 'The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 155(1–3), pp. 397–406. doi: 10.1007/s12010-008-8511-x.

SEMARNAT (no date) *Informe del Medio Ambiente*.

Sharma, S. *et al.* (2020) 'Waste-to-energy nexus for circular economy and environmental protection: Recent trends in hydrogen energy', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 713, p. 136633. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136633.

SIAP (2020) 'SIACON-NG'.

Tian, H. *et al.* (2019) 'Organic waste to biohydrogen: A critical review from technological development and environmental impact analysis perspective', *Applied Energy*. Elsevier, 256(August). doi: 10.1016/j.apenergy.2019.113961.

Tursi, A. (2019) 'A review on biomass: Importance, chemistry, classification, and conversion', *Biofuel Research Journal*, 6(2), pp. 962–979. doi: 10.18331/BRJ2019.6.2.3.

Venturin, B. *et al.* (2018) 'Effect of pretreatments on corn stalk chemical properties for biogas production purposes', *Bioresource Technology*, 266, pp. 116–124. doi: 10.1016/j.biortech.2018.06.069.

Weaver, P. F., Wall, J. D. and Gest, H. (1975) 'Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. Archives of Microbiology', 105, pp. 207–216.

Zhang, Q. *et al.* (2018) 'Sequential dark and photo fermentation hydrogen production from hydrolyzed corn stover: A pilot test using 11 m³ reactor', *Bioresource Technology*, 253(December 2017), pp. 382–386. doi: 10.1016/j.biortech.2018.01.017.

Zhang, Q. and Zhang, Z. (2018) 'Biological hydrogen production from renewable resources by photofermentation', in *Advances in Bioenergy*. 1st edn. Elsevier Inc., pp. 137–160. doi: 10.1016/bs.aibe.2018.03.001.

Zhang, X. *et al.* (2021) 'Bioresource Technology Enhancement of the biohydrogen production performance from mixed substrate by photo-fermentation : Effects of initial pH and inoculation volume ratio', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 319. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124153>.

Zheng, Y. *et al.* (2017) 'Principles and development of lignocellulosic biomass pretreatment for biofuels', in *Advances in Bioenergy*. Elsevier Ltd, pp. 1–68. doi: 10.1016/bs.aibe.2017.03.001.

Anexos

Tabla A1. Caracterización fisicoquímica de etapa de pretratamiento.

Parámetro	BN	BN 3%AHP	BN 5%AHP	PS	PS 3%AHP	PS 5%AHP	RVF:RM	RVF:RM 3%AHP	RVF:RM 5%AHP
Humedad (%bh)	5.81 ± 0.17	92.44 ± 0.10	91.35 ± 0.10	7.38 ± 0.07	87.53 ± 0.35	86.30 ± 0.23	11.52 ± 0.39	88.01 ± 0.34	85.58 ± 0.13
Sólidos totales (%bh)	94.19 ± 0.17	7.56 ± 0.10	8.65 ± 0.10	92.62 ± 0.07	12.47 ± 0.35	13.70 ± 0.23	88.48 ± 0.39	11.99 ± 0.34	14.42 ± 0.13
Sólidos volátiles (%bs)	95.55 ± 0.13	80.14 ± 0.46	73.71 ± 1.45	88.75 ± 0.29	85.22 ± 0.14	82.09 ± 0.15	89.74 ± 0.15	86.76 ± 0.23	85.04 ± 0.13
Cenizas (%bs)	4.45 ± 0.13	19.86 ± 0.46	26.29 ± 1.45	11.25 ± 0.29	14.78 ± 0.14	17.91 ± 0.15	10.26 ± 0.15	13.24 ± 0.23	14.96 ± 0.13
Lignina (%bs)	15.17 ± 0.88	4.95 ± 0.36	3.77 ± 1.21	20.80 ± 0.49	17.26 ± 1.62	14.56 ± 1.86	24.27 ± 0.36	15.30 ± 0.99	13.99 ± 0.44
Holocelulosa (%bs)	45.83 ± 6.65	47.02 ± 1.67	44.64 ± 2.48	62.00 ± 0.38	58.10 ± 0.14	58.23 ± 1.27	40.84 ± 3.01	59.83 ± 0.42	61.93 ± 2.83
AR (g dextrosa-eq L ⁻¹)	2.72 ± 0.06	0.97 ± 0.08	0.75 ± 0.04	3.03 ± 0.09	0.73 ± 0.02	0.60 ± 0.04	3.99 ± 0.15	1.06 ± 0.007	0.67 ± 0.03
AT (g dextrosa-eq L ⁻¹)	4.72 ± 0.02	4.49 ± 0.13	4.60 ± 0.32	1.75 ± 0.03	3.57 ± 0.48	3.64 ± 0.17	3.17 ± 0.04	2.74 ± 0.10	2.47 ± 0.04
CFT (g ac.gálico-eq L ⁻¹)	0.68 ± 0.16	0.69 ± 0.21	0.77 ± 0.15	0.36 ± 0.04	1.39 ± 0.17	1.46 ± 0.16	0.75 ± 0.17	0.68 ± 0.16	0.52 ± 0.23
pH	4.32	9.47	9.89	5.86	9.60	9.85	4.99	9.70	9.97
Alcalinidad (gCaCO ₃ kg _{bs} ⁻¹)	13.27 ± 0.58	83.95 ± 4.3	105.85 ± 9.81	46.60 ± 1.2	54.33 ± 4.82	66.31 ± 13.78	67.28 ± 0.51	57.41 ± 3.95	73.73 ± 2.65
AOV (gAOV kg _{bs} ⁻¹)	8.92 ± 0.59	70.20 ± 0.56	76.55 ± 0.00	22.16 ± 1.09	44.07 ± 0.27	50.45 ± 0.00	36.88 ± 3.12	62.14 ± 2.97	64.84 ± 0.59

Tabla A2. Inventario de ACV de Escenario FO-FF. UF = 1 kg H₂ producido.

Etapa	Entradas			Salidas		
	Sustancia	Cantidad	Unidad	Sustancia	Cantidad	Unidad
Trituración	BN	247.79	kg UF ⁻¹	BN	247.79	kg UF ⁻¹
	Electricidad	0.76	kWh UF ⁻¹			
Pretratamiento AHP	AHP 30% total	36.17	L UF ⁻¹	Efluente sól&liq	1421.44	L UF ⁻¹
	H ₂ O total	1302.22	L UF ⁻¹			
	BN ^{Escalamiento}	56.02	kgST UF ⁻¹			
	NaOH 40% w v ⁻¹	27.03	L UF ⁻¹			
	Q Total	27.97	kWh UF ⁻¹			
Fermentación oscura	V _{Ef.pret.}	1421.44	L UF ⁻¹	Producción H ₂	3686.11	L UF ⁻¹
	V _{Inóculo}	588.18	L UF ⁻¹	Producción CO ₂	1843.06	L UF ⁻¹
	V _{T reactor}	2009.62	L UF ⁻¹	Efluente líquido	1915.37	L UF ⁻¹
	Q Total; FO	6.27	kWh UF ⁻¹	Efluente sólido	94.25	kg UF ⁻¹
	E Separación	3.01	kWh UF ⁻¹			
	Q Total; Choque térmico inóculo	42.38	kWh UF ⁻¹			
Fotofermentación	Cepa B10	164.17	L UF ⁻¹	Producción H ₂	8457.47	L UF ⁻¹
	eFO	1915.37	L UF ⁻¹	Producción CO ₂	4228.74	L UF ⁻¹
	L-Glutamato	7.70	kg UF ⁻¹	Cepa B10	164.17	L UF ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	3.28	kg UF ⁻¹	Medio AOV	1915.37	L UF ⁻¹
	K ₂ HPO ₄	4.93	kg UF ⁻¹	L-Glutamato	7.70	kg UF ⁻¹
	H ₂ O en sol'n kpi	82.09	L UF ⁻¹	KH ₂ PO ₄	3.28	kg UF ⁻¹
	H ₂ O destilada	3201.40	L UF ⁻¹	K ₂ HPO ₄	4.93	kg UF ⁻¹
	FeSO ₄ .7H ₂ O	64.58	g UF ⁻¹	H ₂ O en solución kpi	82.09	L UF ⁻¹
	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ *2H ₂ O	109.45	g UF ⁻¹	H ₂ O destilada	3201.40	L UF ⁻¹
	CaCl ₂ *2H ₂ O (7.5 %)	410.44	g UF ⁻¹	FeSO ₄ .7H ₂ O	64.58	g UF ⁻¹
	MgSO ₄ *7H ₂ O (20 %)	1094.50	g UF ⁻¹	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ *2H ₂ O	109.45	g UF ⁻¹
	Tiamina-HCl (0.1%)	5.47	g UF ⁻¹	CaCl ₂ *2H ₂ O (7.5 %)	410.44	g UF ⁻¹
	H ₂ O destilada	268.15	L UF ⁻¹	MgSO ₄ *7H ₂ O (20 %)	1094.50	g UF ⁻¹
	H ₃ BO ₃	15.32	g UF ⁻¹	Tiamina-HCl (0.1%)	5.47	g UF ⁻¹
	MnSO ₄ *H ₂ O	8.71	g UF ⁻¹	H ₂ O destilada	268.15	L UF ⁻¹
	CuSO ₄ *5H ₂ O	0.22	g UF ⁻¹	H ₃ BO ₃	15.32	g UF ⁻¹
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	1.31	g UF ⁻¹	MnSO ₄ *H ₂ O	8.71	g UF ⁻¹
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4.12	g UF ⁻¹	CuSO ₄ *5H ₂ O	0.22	g UF ⁻¹
	H ₂ O destilada	5.47	L UF ⁻¹	ZnSO ₄ *7H ₂ O	1.31	g UF ⁻¹
	Q Total; FF	42.42	kWh UF ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4.12	g UF ⁻¹
	Q Luz	757.98	kWh UF ⁻¹	H ₂ O destilada	5.47	L UF ⁻¹

Tabla A3. Inventario de ACV de Escenario FO. UF = 1 kg H₂ producido.

Etapa	Entradas			Salidas		
	Sustancia	Cantidad	Unidad	Sustancia	Cantidad	Unidad
Trituración	BN	816.31	kg UF ⁻¹	BN	816.31	kg UF ⁻¹
	Electricidad	2.52	kWh UF ⁻¹			
Pretratamiento AHP	AHP 30% total	119.14	L UF ⁻¹	Efluente sól&líq	4682.81	L UF ⁻¹
	H ₂ O total	4290.07	L UF ⁻¹			
	BN _{Escalamiento}	184.54	kgST UF ⁻¹			
	NaOH 40% w v ⁻¹	89.06	L UF ⁻¹			
	Q Total	92.14	kWh UF ⁻¹			
Fermentación oscura	V _{Ef.pret.}	4682.81	L UF ⁻¹	Producción H ₂	12143.59	L UF ⁻¹
	V _{Inóculo}	1937.71	L UF ⁻¹	Producción CO ₂	6071.79	L UF ⁻¹
	V _{T reactor}	6620.52	L UF ⁻¹	Efluente líquido	6310.02	L UF ⁻¹
	Q Total; FO	20.66	kWh UF ⁻¹	Efluente sólido	310.50	kg UF ⁻¹
	Q Total; Choque térmico inóculo	139.61	kWh UF ⁻¹			

Tabla A4. Inventario de ACV de Escenario FF. UF = 1 kg H₂ producido.

Etapa	Entradas			Salidas		
	Sustancia	Cantidad	Unidad	Sustancia	Cantidad	Unidad
Trituración	BN	885.85	kg UF ⁻¹	BN	885.85	kg UF ⁻¹
	Electricidad	2.73	kWh UF ⁻¹			
Pretratamiento AHP	AHP 30% total	129.29	L UF ⁻¹	Efluente sólido	384.18	kg UF ⁻¹
	H ₂ O total	4655.53	L UF ⁻¹	Efluente líquido	4697.55	L UF ⁻¹
	BN ^{Escalamiento}	200.26	kgST UF ⁻¹			
	NaOH 40% w v ⁻¹	96.64	L UF ⁻¹			
	E ^{Separación}	7.62	kWh UF ⁻¹			
	Q Total	99.99	kWh UF ⁻¹			
Fotofermentación	Cepa B10	402.65	L UF ⁻¹	Producción H ₂	12143.59	L UF ⁻¹
	Efluente líquido pretratado	4697.55	L UF ⁻¹	Producción CO ₂	6071.79	L UF ⁻¹
	L-Glutamato	18.89	kg UF ⁻¹	Cepa B10	402.65	L UF ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	8.05	kg UF ⁻¹	Medio AOV	4697.55	L UF ⁻¹
	K ₂ HPO ₄	12.08	kg UF ⁻¹	L-Glutamato	18.89	kg UF ⁻¹
	H ₂ O en sol'n kpi	201.32	L UF ⁻¹	KH ₂ PO ₄	8.05	kg UF ⁻¹
	H ₂ O destilada	7851.62	L UF ⁻¹	K ₂ HPO ₄	12.08	kg UF ⁻¹
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.16	kg UF ⁻¹	H ₂ O en solución kpi	201.32	L UF ⁻¹
	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	0.27	kg UF ⁻¹	H ₂ O destilada	7851.62	L UF ⁻¹
	CaCl ₂ ·2H ₂ O (7.5 %)	1.01	kg UF ⁻¹	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.16	kg UF ⁻¹
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (20 %)	2.68	kg UF ⁻¹	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	0.27	kg UF ⁻¹
	Tiamina-HCl (0.1%)	0.01	kg UF ⁻¹	CaCl ₂ ·2H ₂ O (7.5 %)	1.01	kg UF ⁻¹
	H ₂ O destilada	657.66	L UF ⁻¹	MgSO ₄ ·7H ₂ O (20 %)	2.68	kg UF ⁻¹
	H ₃ BO ₃	37.58	g UF ⁻¹	Tiamina-HCl (0.1%)	0.01	kg UF ⁻¹
	MnSO ₄ ·H ₂ O	21.37	g UF ⁻¹	H ₂ O destilada	657.66	L UF ⁻¹
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.54	g UF ⁻¹	H ₃ BO ₃	37.58	g UF ⁻¹
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3.22	g UF ⁻¹	MnSO ₄ ·H ₂ O	21.37	g UF ⁻¹
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	10.09	g UF ⁻¹	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.54	g UF ⁻¹
	H ₂ O destilada	13.42	L UF ⁻¹	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3.22	g UF ⁻¹
	Q Total; FF	104.04	kWh UF ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	10.09	g UF ⁻¹
	Q Luz	1858.99	kWh UF ⁻¹	H ₂ O destilada	13.42	L UF ⁻¹